



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO ELECTROHILADO DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO)/GELATINA CON FACTORES DE CRECIMIENTO PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS DE PIEL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. VÁZQUEZ TORRES NADIA ADRIANA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANNIE PARDO CEMO**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

**DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CD. MX., JUNIO, 2019



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO ELECTROHILADO DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO)/GELATINA CON FACTORES DE CRECIMIENTO PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS DE PIEL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. VÁZQUEZ TORRES NADIA ADRIANA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANNIE PARDO CEMO**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

**DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CD. MX., JUNIO, 2019

OFICIO CPCB/690/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramirez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de abril de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **VÁZQUEZ TORRES NADIA ADRIANA** con número de cuenta **407047468**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO ELECTROHILADO DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO-COGLICÓLICO)/GELATINA CON FACTORES DE CRECIMIENTO PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS DE PIEL"**, realizada bajo la dirección del **DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**:

Presidente: DRA. GERTRUDIS HORTENSIA GONZÁLEZ GÓMEZ  
Vocal: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA  
Secretario: DRA. ANNIE PARDO CEMO  
Suplente: DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ  
Suplente: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 10 de junio de 2019



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la oportunidad que me dio de realizar mis estudios de doctorado bajo su programa en los cuales seguí aprendiendo y formándome como investigadora. Definitivamente, ser parte de la mejor Universidad de Latinoamérica, además de un orgullo, es la posibilidad de tener acceso a un nivel académico de excelencia, gozar de infinidad de servicios y alta infraestructura que se deben valorar.

A CONACYT por la beca que me otorgó durante 8 semestres (# 270063). A los apoyos PAEP que me permitieron asistir a dos congresos internacionales durante el doctorado. A la Coordinación de Innovación y Desarrollo, UNAM por el apoyo otorgado durante la participación en el certamen Brain Chile. Al apoyo financiero de los proyectos: PAPIIT-DGAPA UNAM IN218315, IN108116 y IA207917

A mi tutor, el Dr. Andrés E. Castell Rodríguez, que me abrió las puertas de su laboratorio desde la licenciatura para que logrará desarrollar todo mi potencial. Por todo lo que me ha enseñado, que antes de ser un investigador hay que ser un gran ser humano. Por todas esas charlas que tuvimos sobre la vida, por sus consejos, madurez y profesionalismo, su paciencia, tiempo, etc, etc. pero sobre todo por siempre creer en mí y darme la confianza para hacer posible lo imposible.

A los miembros del Comité Tutor, por todo el tiempo que dedicaron en mis tutorales y en la revisión de tesis. Por la retroalimentación que me brindaron para enriquecer este trabajo. También por abrirme las puertas de sus laboratorios y facilitarme sus equipos para la realización del proyecto. Por su comprensión y apoyo cuando me robaron mi computadora.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

*“Sentir gratitud y no expresarla es como envolver un regalo y no darlo”*

William Arthur Ward

Primeramente, a Dios que me ha permitido vivir más de lo que pude imaginar, ha cuidado mis pasos y me ha puesto en el lugar y momento correcto.

A mis padres, porque no hay nadie en la vida que me quiera y apoye como ellos siempre lo han hecho. Independientemente de mi edad o de mi lugar de residencia se han hecho presentes con un amor y apoyo incondicional. Gracias por todo su esfuerzo para que hoy yo esté aquí, siendo lo que yo quise ser y estando donde quise estar. Por dejarme volar lejos de casa y confiar en mí y en la gran labor que hicieron como mis padres.

A mi esposo, por todo su amor, apoyo, paciencia y comprensión que siempre me ha tenido. Por reconocer cada uno de mis logros y motivarme a seguir en la lucha. Por aquellos momentos adversos que hemos pasado juntos sin que suelte mi mano.

A mi hermano, por sus consejos y sabiduría cuando se me nubla la mirada. Por todos estos años acompañándome sin importar el camino que seguimos.

A los miembros de mi jurado por el tiempo que dedicaron a leer la tesis y sus valiosos comentarios para mejorar este trabajo.

A los Dres. Alfredo Maciel Cerda y Ricardo Vera Graziano por permitirme fabricar los andamios en el laboratorio a su cargo. Por todos los reactivos disponibles que nunca me hicieron falta y por su asesoría durante este tiempo.

Al Dr. Francisco M. Sánchez Arévalo que me adoptó en su laboratorio, brindándome todas las facilidades para realizar la caracterización mecánica de mis andamios. Por darme las herramientas necesarias para hacer aún mejor las cosas y apoyarme tanto en la realización de mi artículo.

Al Dr. Mathieu Hautefeuille por su apoyo, confianza y todo ese entusiasmo que me ha contagiado. Por ser digno representante de una nueva generación de investigadores que deja huella en sus estudiantes.

A todas las personas que conocí en estos 4 años y que de alguna u otra forma aportaron algo en este trabajo. En el IIM, a Vladimir Gómez, Abril García Fonseca, Erick Robles Hurtado, Eliza Miranda, Josué Barrón, Jorge Benítez, Jonathan López, Alida Orejarena y Ma. Eugenia Caballero. En la Facultad de Medicina: Casandra Chaires, Rodrigo Ontiveros, Beatriz Hernández, Katia Jarquín, Gabriela Piñón, Miguel Herrera, Raquel Guerrero Alquicira, Maritza García y Trinidad Iglesias.

A todos los que me apoyaron con la realización de alguna técnica. En SEM a Berenit Mendoza Garfias, Josué Romero, Omar Novelo, Silvia Antuna. En microscopía confocal a Edgar Jiménez. En FTIR a. José Saninger, Selene Islas y José Ocotlán Flores (LUCE ICAT). En DSC y TGA a Eriseth Reyes Morales. En indentación a Diego Zamarrón. En RMN a Gerardo Cedillo Valverde

A Itzel Marisol Garnica Palafox mi compañera de viaje. Por su apoyo en las pruebas mecánicas y por vivir conmigo cada aventura fuera de México en los eventos académicos a los que asistimos.

A mi familia, mis sobrinitos, mi cuñada, mi tía Ofe, mis primas: Isabel, Yadira y Yara entre otros, por todo su apoyo y sus porras.

A mis amigas de toda la carrera: Guadalupe, Minerva, Karla R., Paulina, Azalea, Flor, Karla P y Ximena. A las amistades que hice en esta etapa: Erick Robles, Alda Malagón, Beatriz Vega y Verónica Cortés por todo su apoyo.

# ÍNDICE

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABLAS

## ABREVIATURAS

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1 Heridas cutáneas .....	3
1.2 Ingeniería de tejidos .....	7
1.3 Electrohilado .....	9
1.4 Tipos de polímeros .....	11
<b>1.4.1 Poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA).....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.2 Gelatina.....</b>	<b>13</b>
1.5 Factores de crecimiento .....	16
<b>1.5.1 Factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb).....</b>	<b>16</b>
1.6 Antecedentes.....	18
1.7 Relevancia e impacto del proyecto en el área de estudio.....	19
1.8 Planteamiento del problema .....	20
1.9 Hipótesis .....	20
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
2.1 General.....	20
2.2 Particulares.....	21
<b>3 METODOLOGÍA .....</b>	<b>21</b>
3.1 Materiales .....	21
3.2 Fabricación de los andamios mediante electrohilado .....	22
3.3 Caracterización físico-química del andamio .....	22
3.3.1 Morfología de las fibras.....	22
3.3.2 Composición química de las fibras mediante FTIR .....	23
3.3.3 Pruebas de hinchamiento.....	23
3.3.4 Resonancia magnética nuclear .....	24



3.3.5	Ángulo de contacto.....	24
3.3.6	Análisis térmico.....	25
3.3.7	Pruebas mecánicas .....	25
3.3.8	Degradación <i>in vitro</i> .....	26
3.4	Caracterización biológica del andamio .....	27
3.4.1	Cultivo celular y caracterización de fenotipo de las células troncales mesenquimales (CTMs) .....	27
3.4.2	Adhesión celular.....	28
3.4.3	Viabilidad y proliferación.....	28
3.4.4	Implante subcutáneo de los andamios de PLGA/Ge.....	29
3.4.5	Evaluación histológica .....	30
3.5	Incorporación de FGFb a las fibras de PLGA/Ge.....	31
3.5.1	Liberación del FGFb <i>in vitro</i> .....	31
3.5.2	Morfología de las fibras durante la liberación del FGFb .....	31
3.6	Análisis estadístico.....	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	32
4.1	Caracterización física y química del andamio .....	32
4.1.1	Morfología de las fibras.....	32
4.1.2	Análisis de grupos funcionales por FTIR .....	34
4.1.3	Porcentaje de hinchamiento .....	36
4.1.4	Ángulo de contacto.....	39
4.1.5	Análisis térmico.....	41
4.1.6	Pruebas mecánicas .....	43
4.1.7	Degradación <i>in vitro</i> .....	46
4.3	Caracterización biológica del andamio .....	50
4.3.1	Cultivo y caracterización del fenotipo de las células troncales mesenquimales (CTM) .....	50
4.3.2	Adhesión celular.....	52
4.3.3	Viabilidad y proliferación.....	54
4.3.4	Evaluación de biocompatibilidad .....	56
4.4	Andamio funcionalizado con factores de crecimiento .....	61
4.4.1	Liberación del FGFb <i>in vitro</i> .....	63
4.4.2	Morfología de las fibras durante la liberación de los factores .....	64
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	65

<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>APÉNDICE (ARTÍCULO REQUISITO PARA OBTENCIÓN DE GRADO)</b> .....	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Componentes principales de un equipo de electrohilado.

**Figura 2.** Estructura química del PLGA y sus monómeros.

**Figura 3.** Estructura de la colágena

**Figura 4.** Morfología y distribución de los diámetros de las fibras de los andamios PLGA y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5

**Figura 5.** Espectro de FTIR de andamios de PLGA, Gelatina, PLGA/Ge y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5

**Figura 6.** Curvas de hinchamiento de los andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5.

**Figura 7.** Espectro obtenido mediante resonancia magnética nuclear a partir de los sobrenadantes en los que estuvieron los andamios de PLGA, Gelatina, PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5.

**Figura 8.** Ángulo de contacto evaluados en condiciones secas y húmedas de andamios de PLGA, PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5.

**Figura 9.** Termograma TGA de andamios de PLGA, Gelatina y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5.

**Figura 10.** Termograma DSC de andamios de PLGA, Gelatina y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5

**Figura 11.** Respuesta mecánica de los andamios de PLGA y PLGA/Ge bajo tensión uniaxial en condiciones secas y húmedas

**Figura 12.** Morfología de las fibras durante la degradación de andamios de andamios PLGA y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5

**Figura 13.** Gráfica de pérdida de peso y cambio del pH durante la prueba de degradación de andamios de PLGA, PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5 durante 4 semanas.

**Figura 14.** Aislamiento y cultivo de las células troncales mesenquimales

**Figura 15.** Fenotipo de las células troncales mesenquimales (CTM) evaluado por citometría de flujo

**Figura 16.** Inmunocitoquímicas contra SSEA4 en células troncales mesenquimales y fibroblastos.

**Figura 17.** Observación por SEM de células troncales mesenquimales sobre andamios de PLGA, PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5 a 3 días de cultivo.

**Figura 18.** Análisis de viabilidad de células troncales mesenquimales a los 3 días de cultivo sembradas sobre andamios de PLGA, Gelatina y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5.

**Figura 19.** Ensayo de proliferación celular en andamios de PLGA, Gelatina y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5 a los días 1, 3 y 5 de cultivo.

**Figura 20.** Implante subdérmico de los andamios de PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5 sin células en ratas Wistar.

**Figura 21.** Cortes histológicos de los controles en pruebas de biocompatibilidad en de rata. Tinción H&E.

**Figura 22.** Cortes histológicos de implantes subdérmicos de andamios de PLGA/Ge acelulares en ratas Wistar. A) PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5 a 1, 4, 8 y 12 semanas pos-implante.

**Figura 23.** Dispositivo fabricado artesanalmente para la fabricación de fibras coaxiales.

**Figura 24.** Aguja comercial para la fabricación de fibras coaxiales.

**Figura 25.** Morfología de las fibras de andamios de PLGA/Ge 7:3 funcionalizados con FGFb después de estar sumergidas en PBS a 37°C.

## **LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.** Andamios electrohilados fabricados con PLGA/Gelatina.

**Tabla 2.** Comportamiento mecánico de andamios de PLGA y PLGA/Ge en condiciones secas.

**Tabla 3.** Comportamiento mecánico de andamios de PLGA y PLGA/Ge en condiciones húmedas.

**Tabla 4.** Comportamiento mecánico de andamios de PLGA y PLGA/Ge mediante indentación.

**Tabla 5.** Concentraciones de FGFb en sobrenadantes de andamio de PLGA/Ge 7:3 a 6,24 y 192 horas.

## **ABREVIATURAS**

OPS: Organización Panamericana de la Salud

OMS: Organización Mundial de la Salud

EMC: Matriz extracelular

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

PLGA: Poli(ácido láctico-co-glicólico)

PLA: Poli(ácido láctico)

PGA: Poli(ácido glicólico)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

RGD: arginina-glicina-ácido aspártico

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FGFb: Factor de crecimiento de fibroblastos básico

Línea L929: línea de fibroblastos murinos L929

HFIP: Hexafluorisopropanol

DMEM/F12: Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco y medio de Ham ́s F12

FBS: Suero fetal bovino

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FTIR: Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier

<sup>1</sup>H-RMN: Resonancia magnética nuclear de protón

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

TMS: Tetrametilsilano

W<sub>s</sub>: Peso seco

W<sub>h</sub>: Peso húmedo

TGA: Análisis termogravimétrico

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

W<sub>i</sub>: Peso inicial

W<sub>f</sub>: Peso final

CTM: Células troncales mesenquimales

CD: Grupo de diferenciación

SEM: Microscopía electrónica de barrido

TEM: Microscopía de electrónica de transmisión

H&E: Hematoxilina/eosina

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ANOVA: Análisis de varianza

T<sub>g</sub>: Temperatura de transición vítrea

SSEA4: Antígeno de estado embrionario específico

αSMA: alfa Actina de musculo liso

## RESUMEN

Las heridas crónicas, tales como: úlceras vasculares, por presión, por pie diabético, y causadas quemaduras, son un problema de salud pública a nivel mundial y su tratamiento es complicado y prolongado. Así, por medio de ingeniería de tejidos se han construido sustitutos cutáneos y dispositivos médicos que se han enfocado en reparar este tipo de lesiones. En el presente estudio, se demostró que la combinación de polímeros naturales y sintéticos, como el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y la gelatina (Ge) fue adecuada para la fabricación de andamios para reparación de heridas cutáneas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de diferentes proporciones de PLGA/gelatina (9:1, 7:3 y 5:5 v/v) en las propiedades físicas, químicas y biológicas de andamios electrohilados para cubiertas cutáneas. Los andamios de PLGA/Ge tuvieron fibras orientadas al azar con superficies lisas y exhibieron distancias entre fibras menores a 10  $\mu\text{m}$ . Los andamios PLGA/Ge 7:3 y 5:5 mostraron una mayor tasa de hinchamiento, hidrofiliidad y degradación que los de PLGA sólo y PLGA/Ge 9:1. Los módulos de Young de los andamios fueron:  $72 \pm 10$ ,  $48 \pm 6$ ,  $58 \pm 6$  and  $6 \pm 1$  MPa para PLGA, 9:1, 7:3 y 5:5 (v/v) PLGA/Ge respectivamente. Las células troncales mesenquimales (CTM) sembradas en los andamios de PLGA/Ge fueron viables y las células se adhirieron a las fibras en los diferentes días de evaluación. La tasa de proliferación fue significativa en las células sembradas sobre el andamio PLGA/Ge 7:3 durante 1,3 y 5 días de cultivo. Los análisis de biocompatibilidad mostraron que todos los andamios sin células que se implantados subdérmicamente produjeron inflamación, de acuerdo con la presencia de neutrófilos y células de Langhans en la primera semana post-implante, sin embargo, los andamios de PLGA/Ge 7:3 y 5:5 fueron degradados completamente sin reacción inflamatoria en la cuarta semana después del implante. En contraste, los andamios de PLGA/Ge 9:1 persistieron debajo de la piel por más de cuatro semanas, pero en la semana 8 ya no se observaron restos de este tipo de andamio. En conclusión, los andamios de PLGA/Ge con la proporción 7:3 mostraron las propiedades físicas (morfología de fibra, hinchamiento, hidrofiliidad, módulo elástico y degradación), químicas (composición) y biológicas (citocompatibilidad y biocompatibilidad) adecuadas para su funcionalización con FGFb y su potencial aplicación en tratamientos de heridas crónicas y quemaduras.



## ABSTRACT

Chronic wounds, such as diabetic foot ulcers, venous leg ulcers, pressure ulcers and burns, are a global health problem, and their treatments are difficult and long lasting. The development of medical devices through tissue engineering has been conducted to heal this type of wounds. In this work it has been demonstrated that the combination of natural and synthetic polymers such as poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and gelatin (Ge) were useful to construct scaffolds for wound healing. The aim of this work was to evaluate the influence of different PLGA/Gelatin ratios (9:1, 7:3 and 5:5 (v/v)) on the physical, chemical and biological properties of electrospun scaffolds for wound dressing. These PLGA/Ge scaffolds presented randomly-oriented fibers with smooth surfaces and exhibited distances between fibers of less than 10  $\mu\text{m}$ . The 7:3 and 5:5 scaffolds showed higher swelling, hydrophilicity and degradation rates than pure PLGA and 9:1(v/v) PLGA/Ge scaffolds. The Young's moduli of scaffolds were  $72 \pm 10$ ,  $48 \pm 6$ ,  $58 \pm 6$  and  $6 \pm 1$  MPa for pure PLGA, 9:1, 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge ratios, respectively. The mesenchymal stem cells (MSCs) seeded on all PLGA/Ge scaffolds were viable, and the cells were attached to the fibers at different evaluation times. The most significant proliferation rate was observed in the 7:3 PLGA/Ge scaffolds. Biocompatibility tests showed that all the scaffolds without cells implanted subdermally produced inflammation at the first week post implantation according to the presence of neutrophils and Langhans cells, however, only 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds were degraded completely and there was no inflammatory reaction at the fourth week after implantation. In contrast, 9:1 PLGA/Ge scaffolds persisted in the tissue for more than four weeks; nevertheless, at the eighth week no traces were found. In conclusion, the scaffolds with the 7:3 PLGA/Ge ratio showed suitable physical (fiber morphology, swelling, hydrophilicity, elastic moduli and degradation rate), chemical (composition) and biological (cytocompatibility and biocompatibility) properties to functionalization with bFGF and its potential application in the treatment of chronic wounds and burns.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Heridas cutáneas

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano con una superficie de aproximadamente 2 m<sup>2</sup> y un peso de 3.5-5 kg [1, 2]. Desempeña funciones de protección, regulación de temperatura, recepción de estímulos y secreción de diferentes moléculas, entre otras. La piel está constituida por tres capas: 1) Epidermis que es la capa más superficial y está compuesta principalmente por queratinocitos que a su vez forman cinco estratos (córneo, lúcido, granuloso, espinoso y basal). 2) Dermis, la capa intermedia cuyo componente celular mayoritario son los fibroblastos que residen en una red de fibras de colágena y elastina. La dermis está dividida en dos regiones: papilar y reticular. 3) Hipodermis es la capa más profunda y antecede al músculo, está formada por adipocitos. Sin embargo, cuando la piel sufre una lesión, su estructura y funcionalidad se ven comprometidas de acuerdo con la profundidad y extensión de la misma lo que puede poner en riesgo la vida [3].

Existen diferentes tipos de heridas crónicas, por su etiología pueden ser: vasculares, diabéticas, por presión y las provocadas por quemaduras las cuales afectan en algunos casos, grandes extensiones de piel [4].

Las heridas vasculares son lesiones con pérdida de piel producidas por alteraciones en la circulación, ya sea venosa, arterial o linfática, que afecta las extremidades inferiores, principalmente el tercio distal de la pierna. Son lesiones crónicas, exudativas y dolorosas. Pueden subdividirse en: úlceras venosas originadas por insuficiencia venosa y úlceras arteriales causadas por arteriosclerosis e insuficiencia arterial [5].

Heridas por pie diabético son ocasionadas por una disfunción de los nervios periféricos en pacientes con diabetes. Este tipo de úlceras son el resultado de la combinación de angiopatía, neuropatía e isquemia que provocan úlceras que pueden terminar en amputación [6].

Las heridas por presión, decúbito o escaras son úlceras de origen isquémico localizadas en la piel y el tejido subyacente con pérdida cutánea, que se producen por presión prolongada o fricción entre dos planos duros, uno que pertenece al paciente y otro externo a él. El desarrollo de la herida se da por la oclusión vascular por la presión externa y el daño endotelial a nivel de la microcirculación [7]

Las quemaduras son lesiones de la piel producidas por el contacto directo con fuego, líquidos, gases, sustancias químicas, electricidad o radiación. Las quemaduras pueden clasificarse de acuerdo con su profundidad (primero, segundo y tercer grado), extensión y agente causal.

En general, las heridas crónicas afectan directamente la calidad de vida de las personas, en los órdenes social, emocional y laboral e implican una estadía más prolongada en el hospital, así como mayor consumo de recursos médicos y económicos.

Las heridas crónicas han incrementado significativamente su incidencia en todo el mundo. De acuerdo a las estadísticas, en el año 2017, el 1-2% de la población mundial habría sufrido una herida crónica durante su vida [8]. En países desarrollados, la incidencia de este tipo de herida está en el rango de 2-6% mientras en países en desarrollo, la incidencia aumentó significativamente del 12 a 41% [9, 10].

Dentro de las heridas vasculares, las úlceras venosas son las más frecuentes con el 85% del total de este tipo de heridas crónicas. Afectan aproximadamente el 2% de la población mundial. Aparecen con mayor frecuencia en las mujeres, siendo la relación 1:3 con respecto a varones y la incidencia se incrementa a partir de los 65 años [5].

En el año 2011, la OPS y la OMS estimaron que, tan sólo en el continente americano, había aproximadamente 62.8 millones de personas con diabetes y que dicho número podría incrementarse en 25 a 40 millones para el año 2030. Asimismo, se ha calculado que aproximadamente el 25% de los pacientes diabéticos desarrollará una úlcera cutánea durante la evolución de la enfermedad, y de ellos, el 85% será sometido a la amputación del miembro debido a complicaciones derivadas de las úlceras, incrementando de 2-4 veces la mortalidad del paciente [11].

Por otro lado, en México, cada año, 120,000 personas padecen de algún tipo de quemadura; siendo necesario un autoinjerto o alguna cubierta que induzca la curación del tejido en el 15% de los casos. Así, aproximadamente 18,000 personas por año necesitan atención altamente especializada, entre ellas la de una cubierta cutánea que permita la curación de la lesión en la piel [12].

Para el tratamiento de heridas crónicas se recomienda una adecuada técnica de limpieza que comprende la aplicación de un fluido, no tóxico para la herida, capaz de remover del lecho de la lesión el tejido necrótico, el exudado, los cuerpos extraños, incluyendo los restos del vendaje anterior, para crear un ambiente óptimo para la cicatrización, sin provocar daños al tejido sano. Además de un exhaustivo desbridamiento, es decir, limpieza mecánica donde el tejido necrótico es eliminado hasta que sólo quede del tejido sano. Las heridas mantenidas en ambiente húmedo

cicatrizan de tres a cinco veces más rápido y con menor dolor que las lesiones sometidas a un ambiente seco. Las condiciones secas de la herida provocan dolor debido a la exposición de las terminaciones nerviosas libres. Para el tratamiento tópico, se prescribe el uso de coberturas o apósitos, capaces de absorber el exudado y crear un ambiente propicio para el desarrollo del proceso de cicatrización, es decir, garantizar un ambiente oclusivo con baja concentración de microorganismos y con humedad y temperatura fisiológica, reduciendo, así, el tiempo de cicatrización. La cobertura debe ser fácil de cambiar, no causar reacción alérgica y actuar como una membrana semipermeable que proteja de infecciones [13].

Para los pacientes con quemaduras, el tratamiento de elección es el injerto autólogo para el cual se pueden requerir varios procesos quirúrgicos con el consiguiente riesgo de morbi-mortalidad para el paciente, además de las lesiones que se provocan en el área donadora. Por otro lado, es necesario considerar que los pacientes con quemaduras extensas no tienen la disponibilidad de regiones donadoras sanas para que se realice un autotransplante. Otras opciones son los aloinjertos o xenoinjertos que se han utilizado como tratamientos para heridas crónicas, sin embargo, el riesgo de transmisión de infecciones o el rechazo inmunológico siempre está latente [14].

Por lo anterior y con el propósito de coadyuvar en el tratamiento de este tipo de heridas cutáneas, se han desarrollado diferentes sustitutos cutáneos. Considerando las características de las heridas cutáneas, los sustitutos de piel creados en un laboratorio deben contar con algunas prestaciones como: fácil manejo y aplicación a la herida, proteger de infecciones, evitar pérdida de fluidos y temperatura, presentar propiedades físicas y mecánicas adecuadas, una degradación controlada capaz de soportar la

reconstrucción del nuevo tejido, ser estéril, no tóxico, no antigénico y una vez colocado en el hospedero no deberá causar cicatrices, ni dolor facilitando la angiogénesis [15, 16].

## **1.2 Ingeniería de tejidos**

La ingeniería de tejidos es el área multidisciplinaria que aplica los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la salud hacia el entendimiento de la relación estructura-función en tejidos mamíferos normales y patológicos y el desarrollo de sustitutos biológicos que permitan restaurar, mantener o mejorar la función del tejido u órgano [17]. La medicina regenerativa se ha definido como *«un campo interdisciplinario emergente de investigación y aplicaciones clínicas centrado en la reparación, reemplazo o regeneración de células, tejidos u órganos para restaurar una función dañada por cualquier causa, incluyendo defectos congénitos, trauma y envejecimiento»* [18]. Sin embargo, los términos ingeniería de tejidos y medicina regenerativa han llegado a ser intercambiables debido a que tienen el mismo objetivo.

La ingeniería de tejidos combina a) células, b) moléculas biológicamente activas y c) andamios o matrices tridimensionales para crear tejidos funcionales. En cuanto a las células, éstas deben proliferar y ser viables en condiciones de cultivo ya que constituyen parte fundamental para la generación *ex vivo* de tejidos que reemplazarán a los dañados. Pueden ser utilizadas líneas celulares o bien, células de cultivos primarios provenientes del mismo paciente (autólogas) o de otro (heterólogas), En el segundo caso, deberá contemplarse problemas por antigenicidad o algún tipo infección. Por ello, se ha considerado como una opción alternativa, el empleo de células troncales [19]. En

relación a las moléculas biológicamente activas, se refiere principalmente a factores de crecimiento que deben inducir la proliferación y/o diferenciación celular dentro del nuevo tejido mediante señalizaciones intracelulares que inhiben o inducen funciones celulares específicas [20]. Por último, los andamios serán fabricados con biomateriales que tengan una estructura y composición que permitan la formación de un tejido tridimensional similar al del tejido que desee regenerarse, permitiendo la viabilidad y proliferación de las células incluidas en su interior o sobre su superficie.

### **1.2.1 Andamios**

Un andamio o matriz de sostén puede ser definida como una estructura artificial capaz de mantener la formación de tejido, actuando como un sustrato que permita a su vez la viabilidad, proliferación, adhesión y migración celular. Un andamio ideal deberá tener características parecidas a las de la matriz extracelular (MEC) con relación a su composición, estructura y función. Los andamios con gran porosidad e interconectividad incrementan la superficie disponible para la adhesión celular facilitando la distribución de las células, así como un adecuado intercambio de nutrientes y productos del metabolismo [21]. Por otra parte, los andamios deben poseer una fuerza mecánica adecuada, biodegradabilidad y productos de degradación no tóxicos, pero sobre todo, excelente biocompatibilidad, no induciendo efectos adversos en el tejido circundante [22]

El desarrollo de un andamio ideal para la reparación de tejidos dañados que tenga todos los requisitos ya mencionados se ha convertido en uno de los objetivos principales en ingeniería de tejidos. En este sentido, se han utilizado diferentes técnicas para fabricar

una estructura tridimensional con un alto grado de porosidad e interconectividad con apropiada geometría y tamaño de poro [23].

Existen gran variedad de técnicas para fabricar andamios con diferentes arquitecturas, sin embargo, por sus características y de acuerdo con la aplicación de liberación de factores de crecimiento, una de las más utilizadas es el electrohilado.

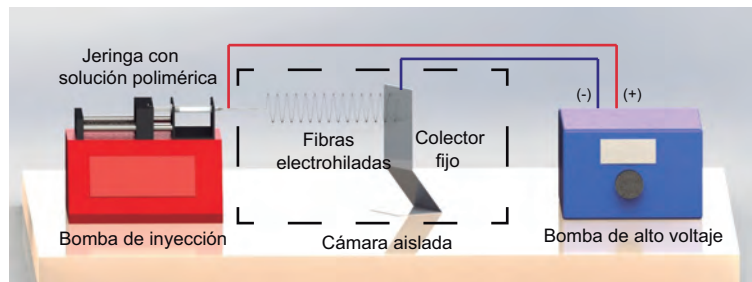
### **1.3 Electrohilado**

La técnica de electrohilado consiste en someter soluciones de poliméricas a campos eléctricos intensos, de manera que las cargas se acumulan promoviendo la formación de una gota en la punta del capilar, a medida que la intensidad del campo eléctrico se incrementa, la gota se alarga para crear una forma cónica conocida como cono de *Taylor*. La fuerza del campo eléctrico supera las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado y es así como un chorro de solución de polímero es expulsado desde la punta del capilar hasta el plato colector. Durante su recorrido, el disolvente se evapora y finalmente las fibras se solidifican a su llegada al plato colector. Luego de ser extraídas del plato colector es recomendable mantener las fibras en vacío para eliminar el disolvente remanente [24].

Un equipo de electrohilado (Fig.1) consta de un capilar (aguja) a través del cual será expulsada la solución polimérica, una bomba de inyección que dispensa la solución polimérica a cierta velocidad y una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno al lugar de salida de la solución y otro directamente al plato colector (lámina de metal conductor o rodillo) donde se depositarán las fibras tras la evaporación del disolvente [25]. Con relación al disolvente, es recomendable que éste



solubilice completamente al polímero, presente una alta conductividad, constante dieléctrica y sea volátil [24].



**Figura 1.** Componentes principales de un equipo de electrohilado.

La técnica de electrohilado es versátil ya que se pueden modificar varios aspectos, entre ellos la orientación de las fibras (ordenadas o al azar) y el tipo de polímero (natural y/o sintético) con lo que se mejoran las propiedades mecánicas y biológicas respectivamente. Además de lo anterior, se pueden fabricar multicapas de fibras de diferentes polímeros o combinaciones para ampliar las aplicaciones, inclusive elaborar fibras compuestas de una fibra corteza y una fibra núcleo como las fibras coaxiales que son muy utilizadas en la liberación de moléculas tales como: factores de crecimiento y fármacos [26].

Algunas ventajas del electrohilado son: técnica de fácil uso, bajo costo, con escalabilidad y adaptabilidad, permite la fabricación de fibras de escala nanométrica hasta micrométrica semejando la estructura de la MEC, alta superficie de contacto, porosidad y tamaño de poro regulable. Además, las fibras obtenidas por este método pueden servir para encapsulación de fármacos y para andamios en ingeniería de tejidos [27].

### **1.3.1 Factores que intervienen en el electrohilado**

Existen diversos parámetros que influyen en propiedades y características de las fibras obtenidas por medio de electrohilado. Se han clasificado en tres categorías [28].

- Parámetros de electrohilado: voltaje, diámetro de la aguja, velocidad de flujo tipo del colector y distancia aguja-colector.
- Parámetros de la solución: concentración, peso molecular del polímero, viscosidad, conductividad y tensión superficial.
- Parámetros ambientales: humedad, temperatura y electricidad estática.

### **1.4 Tipos de polímeros**

Hasta la fecha, se han electrohilado infinidad de polímeros, sin embargo, polímeros sintéticos y naturales por sí solos no pueden cumplir con todos lo necesario que un andamio requiere.

Los polímeros sintéticos cuentan con una afinidad celular pobre debido a su baja hidrofiliidad y falta de sitios de reconocimiento, pero tienen la ventaja de presentar mejores propiedades fisicoquímicas y mecánicas, tales como fuerza de tensión, módulos elásticos y tasa de degradación. Además, son flexibles con relación a su síntesis y modificaciones posteriores [29].

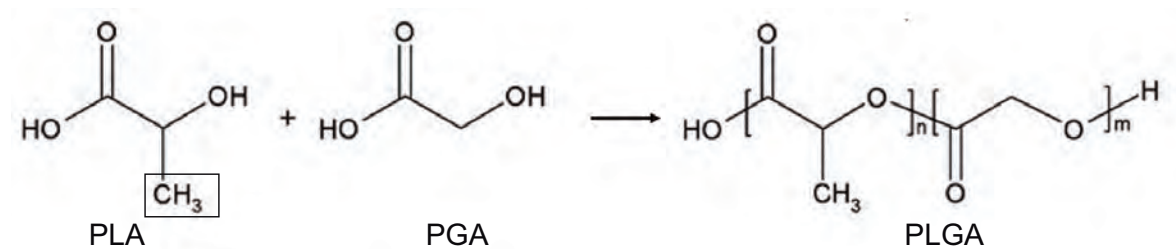
Los polímeros naturales son biomateriales biodegradables y biocompatibles, con propiedades bioactivas que facilitan la interacción con las células. No obstante, tienen la limitante de presentar propiedades mecánicas deficientes [30]. Los polímeros naturales pueden ser clasificados como: a) proteínas (seda, colágena, gelatina, fibrinógeno, elastina, queratina, actina o miosina, entre otros); b) polisacáridos

(celulosa, amilosa, dextrán, quitosán, y glucosaminoglicanos) y c) polinucleótidos (ADN y ARN)[23].

Así, es recomendable preparar andamios que contengan ambos tipos de polímeros para mejorar las propiedades de estos. Con relación al presente trabajo fabricamos andamios electrohilados con los polímeros poli(ácido láctico-co-glicólico) y gelatina.

#### 1.4.1 Poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA)

El PLGA es un copolímero constituido de poli (ácido láctico, PLA) y poli(ácido glicólico, PGA). Pertenece a la familia de poliéster alifáticos lineales al igual que el PLA y PGA.



**Figura 2.** Estructura química de copolímero PLGA y sus monómeros (PLA y PGA), donde *n* es el número de unidades de PLA y *m* el número de unidades de PGA. Nótese el grupo metil extra entre PLA y PGA.

El PGA es usado ampliamente debido a relativa naturaleza hidrofiliidad, su rápida degradación en soluciones acuosa que provoca que pierda su integridad mecánica entre 2-4 semanas. Por otro lado, el PLA con su grupo metil extra (Fig. 2), con respecto al PGA, lo hace más hidrofóbico reduciendo su afinidad por el agua retardando su hidrólisis. El PLA es altamente cristalino, se degrada lentamente tanto *in vitro* como *in vivo*, manteniendo su integridad mecánica hasta por varios meses [21]. Para obtener índices de degradación intermedios entre el PLA y el PGA así como optimizar sus propiedades, se han sintetizado PLGA en diferentes proporciones de acuerdo con las necesidades que se requiera. Así, existe PLGA 50:50, 65:35, 75:25, 85:15, 90:10.

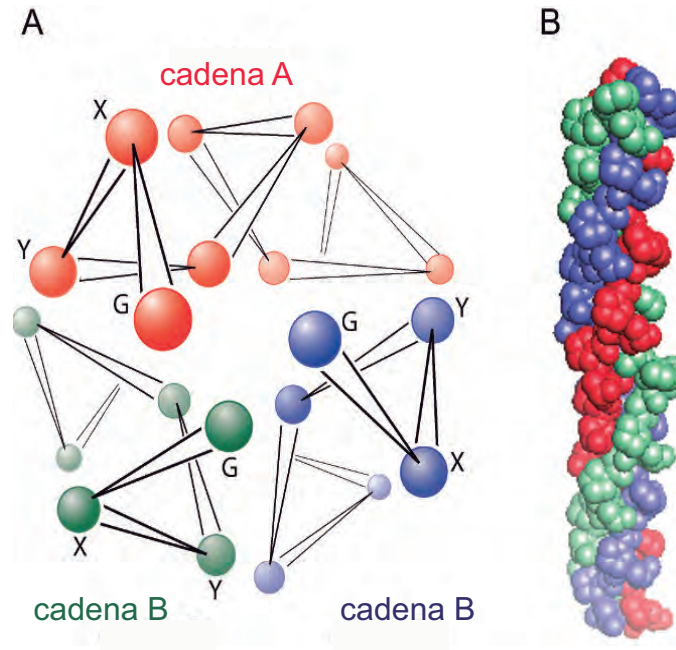
Las propiedades físicas del PLGA dependen de varios factores, incluyendo: el peso molecular, la composición, forma y temperatura de almacenaje. El PLGA presenta buenas propiedades mecánicas [31]. Su fuerza mecánica se ve afectada por el peso molecular y el índice de polidispersión. Con respecto a la degradación de PLGA, ésta no se lleva a cabo por la acción de enzimas, sino por la hidrólisis química de enlaces éster. Los productos de la degradación del PLGA son el PLA y el PGA. El PLA se incorpora al ciclo de Krebs y es metabolizado y eliminado como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Mientras que el PGA es excretado a través del hígado o entra también al ciclo de Krebs y eventualmente se elimina también CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Altos contenidos de PGA propician un mayor índice de degradación, así la proporción PLA/PGA 50:50 que presenta la más rápida degradación [32].

Debido a la biocompatibilidad y biodegradabilidad del PLGA, es de los pocos polímeros sintéticos aprobados por la FDA para su uso en humanos. Entre sus principales aplicaciones están ser utilizado como acarreador de liberación de fármacos y andamio para ingeniería de tejidos. También se han realizado estudios utilizando al PLGA como vehículo de liberación para proteínas, DNA y RNA.

#### **1.4.2 Gelatina**

La gelatina es el producto de la desnaturalización de la colágena, que es principal componente de la matriz extracelular en el cuerpo [30]. Esta proteína tiene cuatro grupos de aminoácidos predominantemente, donde de cada 1000 residuos, 330 son glicina, 132 son prolina, 112 son alanina, 93 hidroxiprolina y el restante son otros aminoácidos. La configuración (Glicina-X-Y) es responsable de la estructura triple hélice

de la colágena (Fig.3), en donde X representa un aminoácido que generalmente es lisina, arginina, metionina y valina y Y frecuentemente es prolina o hidroxiprolina [33].



**Figura 3.** Estructura de la colágena. A) Vista transversal donde se muestran las 3 cadenas alfa y su composición G-X-Y (G=Glicina, X= lisina,arginina o metionina y Y=prolina o hidroxiprolina). B) Triple hélice. (Imagen modificada [34])

La gelatina se obtiene por la desnaturalización de la hélice colágenica simple liberando cadenas sencillas mediante calor. Así, existen dos tipos de gelatina dependiendo del pretratamiento que se le dé a la colágena antes del proceso de extracción. La gelatina tipo A es obtenida de un tratamiento ácido de la colágena que afecta escasamente los grupos amida y la gelatina tipo B se obtiene por un tratamiento alcalino de la colágena que desnaturaliza a los grupos amida de la asparagina y glutamina hidrolizándolos en grupos carboxilo y convirtiendo esos residuos en aspartato y glutamato. Ambos tipos de gelatina difieren principalmente en su composición de aminoácidos, patrón de polipéptidos, turbidez y propiedades espumosas [35, 36].

Generalmente, la gelatina se obtiene de diferentes fuentes animales, las más usadas son de origen porcino o bovino e incluso pueden provenir de pescado. La composición de aminoácidos varía de acuerdo a su fuente de procedencia, La gelatina de piel y hueso de cerdo no contiene cisteína, mientras que la de piel de pescado tiene menos contenido de glicina en comparación con la de mamíferos [37].

La gelatina tiene como características: ser biocompatible, biodegradable, no inmunogénica (en contraste con la colágena), barata y presenta regiones que incluyen a las secuencias de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que permiten la adhesión y migración celular además de tener algunas propiedades hemostáticas que facilitan la cicatrización [38, 39].

Con relación a sus propiedades físicas, la gelatina es muy fácil de manipular debido a su punto isoeléctrico que permite el cambio de carga negativa a positiva en determinados ambientes fisiológicos o durante su fabricación. Además, la gelatina es susceptible a la mayoría de las proteasas, sin embargo no son capaces de romperla en péptidos menores a 20 aminoácidos [37] Entre algunas de las desventajas de la gelatina se encuentra su alta solubilidad en agua y su rápida degradación cuando está en contacto con ella [40]. Sin embargo, lo anterior se puede compensar tanto con el entrecruzamiento químico, como por la mezcla física con otros polímeros, brindándole estabilidad [41, 42].

Tanto la colágena como la gelatina han sido empleadas para la fabricación de andamios debido a que mejoran de manera importante la infiltración, adhesión y proliferación celular [43-46]. Adicionalmente, en andamios electrohilados, la gelatina presenta

ventajas sobre la colágena ya que ésta no se desnaturaliza con el campo eléctrico aplicado durante el procedimiento [47].

Es necesario hacer notar, la gelatina es uno de los polímeros naturales más empleados también para la liberación de biomoléculas, tales como fármacos, proteínas y factores de crecimiento. Con la adición de factores de crecimiento y otras citocinas los andamios pueden ser funcionalizados confiriéndoles propiedades para inducir cambios biológicos como proliferación y/o diferenciación celulares lo que es de mucho interés para su aplicación clínica.

## **1.5 Factores de crecimiento**

Las estrategias para mejorar el proceso de cicatrización de una herida mediante ingeniería de tejidos, han incorporado factores de crecimiento a los andamios desarrollados. Factores de crecimiento juegan una función fundamental en la modulación del comportamiento celular durante la cicatrización. Varias cubiertas cutáneas que contiene factores han sido usadas para acelerar la cicatrización, en particular, EGF y FGF son elementos clave en la promoción de la reparación de la piel [48].

### **1.5.1 Factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb)**

El FGFb es una glucoproteína de aproximadamente 17 Kd en su forma recombinante. Es un potente mitógeno que induce la proliferación de fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y melanocitos. Promueve la angiogénesis, regula negativamente la transcripción de ARNm de colágena y tropoeleastina en fibroblastos de ligamento

periodontal y positivamente, la síntesis de ácido hialurónico en fibroblastos dérmicos *in vitro* [49].

Debido sus características mitogénicas y angiogénicas, el FGFb puede inducir la remodelación tisular, cicatrización, neovascularización, regula la síntesis y depósito de varios componente de la matriz extracelular [50]. El FGFb inhibe eficientemente la diferenciación terminal a miofibroblastos, los cuales son fundamentales para el cierre de las heridas y en situaciones patológicas como cicatrices hipertróficas. Esto ha sido confirmado por un decremento significativo de células positivas a alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) en cultivos celulares dérmicos suplementados con FGFb.

El FGFb también potencia el reclutamiento leucocitario a los sitios de inflamación en la piel y mejora los resultados en la cicatrización dérmica cuando es aplicado directamente, ya sea por un sistema de liberación dirigido con péptidos o por la liberación a partir de un andamio [51].

El empleo de FGFb en la práctica clínica, acelera el cierre de heridas de cualquier origen, como las úlceras por presión, úlceras vasculares, úlceras diabéticas y quemaduras. Si se aplica inmediatamente después del desbridamiento de úlceras o quemaduras de segundo grado, la calidad de la cicatriz es mejorada considerablemente. Incluso en el tratamiento de heridas crónicas y de difícil abordaje, hay un uso apropiado de constructo dérmico combinado con células [52]. El FGFb es recomendado para su uso diario, sin embargo, un desbridamiento profundo y una hemostasia suficiente antes de la aplicación del FGFb es fundamental para un tratamiento exitoso.



## 1.6 Antecedentes

La fabricación de andamios poliméricos encaminados hacia la aplicación de lesiones cutáneas ha sido basta. Se han desarrollado matrices tanto sintéticas como naturales y combinaciones de 2 o hasta 3 polímeros de origen diverso. En la siguiente tabla, se muestran los trabajos realizados empleando la técnica de electrohilado y combinando PLGA con gelatina.

**Tabla 1.** Andamios electrohilados fabricados con PLGA/Gelatina

Composición del andamio	Molécula asociada	Caracterización	Referencia
PLGA-Gelatina	Ninguno	Física Biológica <i>in vitro</i> Regeneración de hueso Osteoblastos	Meng <i>et al.</i> 2010 [30]
PLGA-Gelatina	Fenbufeno (antiinflamatorio)	Física y química de las fibras	Meng <i>et al.</i> 2011 [53]
PLGA-Gelatina	Cefradina (antibiótico)	Células L929 (Fibroblastos ratón)	Hu <i>et al.</i> 2012 [54]
PLGA-Gelatina	Ninguno	Física Biológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> Células IEC-18 Aplicación en <i>stent</i> intestinal	Son <i>et al.</i> 2013 [55]
PLGA-Gelatina	Ninguno	Biológica <i>in vitro</i> Fibroblastos humanos	Irani <i>et al.</i> 2013 [31]
PLGA-Gelatina	EFG	Biológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Norouzi <i>et al.</i> 2014 [38].

Es de notar que, a pesar de que hay numerosos estudios acerca de la combinación de PLGA y gelatina, solo hay un estudio reportado en la literatura que se enfoca en la aplicación en piel y que además contiene un factor de crecimiento. Sin embargo, también es necesario resaltar que el constructo reportado es un andamio híbrido en donde fueron electrohiladas por separado, fibras de PLGA con EGF y fibras de gelatina [38]. Por otro lado, también es necesario considerar que sólo hay un estudio que compara adhesión, morfología, viabilidad y proliferación de la línea celular L929 (fibroblastos de ratón) en andamios electrohilados de PLGA, gelatina y la combinación de ambos en una única proporción 1:1 PLGA/Ge.[31].

### ***1.7 Relevancia e impacto del proyecto en el área de estudio***

En nuestro país, hay una alta incidencia de lesiones de piel. Las quemaduras son consideradas un problema de salud pública. Por otro lado, la diabetes es una de las principales enfermedades en México y puede agravarse con la presencia de úlceras en extremidades inferiores. Además, hay otro tipo de lesiones como las úlceras vasculares de origen venoso y úlceras de decúbito que se caracterizan por su frecuencia y dificultad para cicatrizar.

Así, si bien es cierto que se han fabricado diferentes tipos de andamios como sustitutos cutáneos, no hay ninguno que incluya en su estructura factores de crecimiento que potencien su efecto biológico y repercutan directamente en la eficiencia y disminución del tiempo de entrega para el paciente en el tratamiento de lesiones cutáneas de diversa índole.

### ***1.8 Planteamiento del problema***

En la actualidad, los andamios desarrollados para ingeniería de tejidos de piel tienen algunas limitaciones, entre ellas, el bajo índice de prendimiento después de ser injertados, una baja disponibilidad en centros hospitalarios, un costo alto y un elevado tiempo de entrega para que puedan ser colocados en los pacientes. Por otro lado, a pesar de que se han fabricado andamios de PLGA/Gelatina, a la fecha no se ha construido alguno que contenga factores de crecimiento que puedan ser liberados de manera consistente con el objeto de inducir un proceso reparador en la piel después de que esta ha sido lesionada. Además, tampoco se ha analizado el efecto en las propiedades físicas, químicas y biológicas y de diferentes proporciones de PLGA y gelatina en la construcción de andamios.

### ***1.9 Hipótesis***

Si en un andamio de PLGA/Gelatina construido mediante electrohilado se aumenta la proporción de gelatina, entonces las propiedades del andamio se incrementarán con relación a la hidrofiliidad, degradabilidad, hinchamiento, elasticidad, citocompatibilidad y biocompatibilidad, lo que permitirá establecer la proporción adecuada para ser funcionalizados con el factor de crecimiento FGFb.

## **2. OBJETIVOS**

### ***2.1 General***

- Caracterizar física, química y biológicamente andamios electrohilados con PLGA/gelatina a las proporciones 9:1, 7:3 y 5:5 y establecer el más adecuado para ser funcionalizado con FGFb

## 2.2 Particulares

- Construcción andamios de PLGA/Ge a diferentes proporciones (9:1, 7:3 y 5:5) mediante la técnica de electrohilado.
- Analizar la influencia de la gelatina en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los andamios de PLGA/Ge.
- Caracterizar los andamios de PLGA/Ge a diferentes proporciones con relación a sus propiedades física y químicas
- Evaluar las propiedades biológicas de los andamios a diferentes proporciones en pruebas *in vitro* (citocompatibilidad) e *in vivo* (biocompatibilidad)
- Determinar la liberación de FGFb incorporado a los andamios de PLGA/Ge.

## 3 METODOLOGÍA

### 3.1 Materiales

Poli (ácido láctico co-glicólico) (PLGA) terminación ácida, con rango de peso molecular 38000-54000g/mol y una proporción 50:50 de lactida: glicolida (No. Cat. 719900). Gelatina tipo B de origen bovino en polvo (No.Cat. G9391). 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) (No. Cat. 105228) todos, adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) para la fabricación de las fibras. Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM /F12) (No. Cat. P0095), suero bovino fetal (FBS) (No. Cat. S16509 y antibiótico-antimicótico (No. Cat. L0010) fueron obtenidos de BioWest. Adicionalmente, tripsina polvo (No. Cat. 27250018) (Gibco) y EDTA (Marca Merck, No. Cat 324503) fueron usados para la disgregación celular. Finalmente, Kit de Viabilidad/Citotoxicidad LIVE/DEAD para células de mamífero (No. Cat. L3224) y Reactivo para viabilidad celular Presto Blue (No. Cat. A13261) ambos de Thermo Fisher

Scientific. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue adquirido en Sigma Aldrich (No. Cat. E9644) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) en R&D systems (233-FB-025).

### **3.2 Fabricación de los andamios mediante electrohilado**

La solución de PLGA (18% p/v) y la de gelatina (10% p/v) fueron preparadas con HFIP y fueron disueltas con ayuda de un agitador magnético. Ambas soluciones fueron mezcladas en diferentes proporciones PLGA/Ge (9:1, 7:3 y 5:5 v/v) con agitadores magnéticos por 24 horas. Las soluciones fueron cargadas en jeringa de plástico de 5 ml con una aguja 21G. Las condiciones de electrohilado para los andamios de PLGA, 9:1 y 5:5 PLGA/Ge fueron: velocidad de flujo 0.3ml/hr, distancia aguja colector 10cm y diferencia de potencial aplicado 10 kV; mientras que para los andamios 7:3 PLGA/Ge fueron 1 ml/hr, 20 cm y 10 kv, respectivamente.

### **3.3 Caracterización físico-química del andamio**

#### **3.3.1 Morfología de las fibras**

La morfología de las fibras de los andamios de PLGA y PLGA/Ge fueron analizadas por un microscopio electrónico de barrido (JEOL modelo JSM-7600F) con una aceleración de 20 kV. Todas las muestras fueron recubiertas con oro usando el ionizador JEOL JFC 1100. El diámetro de las fibras y la distancia entre fibras fueron analizadas usando el programa Image J. Doscientas fibras de PLGA y PLGA/Ge en las diferentes proporciones fueron seleccionadas al azar de una serie de imágenes en la misma magnificación para medir los diámetros. Tres diferentes imágenes en la magnificación de 1000x para cada tipo de material fueron usados para estimar la distancia entre fibras en el primer plano.

Las mediciones incluyeron 100 diferentes campos al azar en cada imagen para obtener la distancia entre fibras promedio.

### **3.3.2 Composición química de las fibras mediante FTIR**

Las características químicas de los andamios de PLGA y PLGA/Ge fueron analizados usando Espectroscopia Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) mediante el espectrofotómetro Thermo Nicolet NEXUS 670 FTIR en el LUCE, ICAT, UNAM. Los espectros fueron obtenidos en el rango de 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y un promedio de 32 escaneos.

### **3.3.3 Pruebas de hinchamiento**

La capacidad de absorción del agua de los andamios fue determinada por el porcentaje de hinchamiento. Los diferentes andamios de PLGA y PLGA/Ge fueron cortados en círculos con un diámetro de 0.7 cm y pesados en seco para determinar su peso inicial antes de ser hidratados. Posteriormente, cada muestra fue colocada en tubos de microcentrifuga (Eppendorf®) con 1 ml de PBS (pH=7.4) y se mantuvieron a 37 °C por 12 días. Los andamios mojados fueron sacados de los tubos en las primeras horas y durante cada uno de los días de evaluación retirando el exceso de PBS con papel filtro y después fueron pesados. El porcentaje de hinchamiento fue calculado a la siguiente ecuación:

$$\text{hinchamiento (\%)} = \frac{W_h - W_s}{W_s} * 100 \quad (1)$$

donde  $W_s$  es el peso inicial (condición seca) y  $W_h$  es el peso en húmedo de la muestra a determinado tiempo de evaluación. Cada experimento se repitió tres veces.

### **3.3.4 Resonancia magnética nuclear**

Los andamios de PLGA, Gelatina, PLGA/Ge (9:1, 7:3, 5:5) se sumergieron en PBS por tres horas. Los sobrenadantes obtenidos a este tiempo, fueron analizados por resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H-RMN}$ ) a 400 MHz en un equipo Bruker Avance III y Tetrametilsilano (TMS) como referencia. Quinientos microlitros de cada sobrenadante fue mezclado con 1 mL de agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Se realizó el análisis para conocer si existía gelatina disuelta en el sobrenadante ya que no se realiza ningún anclaje químico (injerto o enlace) entre el PLGA y la Gelatina.

### **3.3.5 Ángulo de contacto**

La hidrofiliidad de los andamios fue determinada por las mediciones de ángulo de contacto que se realizaron con un goniómetro Rame Hart-Inc (Modelo 100-07-00). Una gota de agua ionizada (0.5  $\mu\text{l}$ ) fue depositada en la superficie de cada uno de los andamios de PLGA/Ge y PLGA. La adquisición de imágenes inició 1 segundo antes de que la gota fuera dispensada asegurando la captura de la imagen justo en el momento en que tiene contacto con los andamios. Los ángulos de contacto fueron determinados con el programa Image J. Las mediciones se realizaron 5 veces por cada andamio en condiciones secas (sin humectación previa) y húmedas. Para esta última condición, los andamios fueron inmersos en PBS hasta el equilibrio obtenido en las pruebas de hinchamiento (72 horas para las fibras de PLGA y PLGA/Ge 9:1 y 144 horas para fibras PLGA/Ge 7:3 y 5:5) y posteriormente se depositaron las gotas.

### **3.3.6 Análisis térmico**

La estabilidad térmica de los andamios de PLGA/Ge en sus diferentes proporciones fue determinada por la pérdida de masa mediante Análisis Termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) y por la determinación de la temperatura de fusión, transición vítrea y cristalización por la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Para realizar ambos análisis, las muestras fueron secadas, en un desecador con bomba de vacío (Marca Vacuubrand, modelo RZ 2.5) durante toda una noche. El análisis de TGA se realizó en un equipo TGA Q5000 (Marca TA Instruments, modelo V3.17 Build 265) y el de DSC en un equipo DSC Q200 (Marca TA Instruments, modelo V24.11 Build 124) Cada una de las muestras se colocó en una charola de aluminio para DSC y de platino para TGA. Para TGA, la rampa de calentamiento fue de 25 °C a 600 °C con una rapidez de calentamiento de 10 °C/min bajo una atmósfera de nitrógeno. Para DSC, se hicieron 2 ciclos de 25 °C a 250 °C y regresando a 25 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min bajo una atmósfera de nitrógeno. Los resultados obtenidos de ambos análisis fueron procesados en el programa TA Universal Analysis.

### **3.3.7 Pruebas mecánicas**

Las propiedades mecánicas de los andamios de PLGA/Ge fueron determinados por un probador uniaxial diseñado de acuerdo con protocolos previamente reportados [56, 57] Los diferentes andamios de PLGA y PLGA/Ge fueron cortados en tiras de 1x3 cm para hacer las pruebas de tensión. El grosor de cada uno de los andamios fueron medidos en tres puntos diferentes de la muestra usando un micrómetro Mitutoyo (Modelo MDC-1-SXF) para obtener el grosor promedio. Cada una de las tiras fue colocada entre dos mordazas y la prueba se realizó a una velocidad de 0.16 mm/s para obtener los valores de fuerza y desplazamiento. Para cada proporción PLGA/Ge del andamio, se utilizaron



5 muestras de cada una y fueron evaluadas bajo condiciones secas y húmedas. Las muestras húmedas se mantuvieron inmersas en PBS hasta el día en que alcanzaban su equilibrio de hinchamiento determinado en las pruebas de hinchamiento antes descrito. Las curvas de esfuerzo- deformación fueron determinados con los datos adquiridos de la prueba mientras que el módulo de Young fue calculado por un modelo lineal cuadrado y el promedio de los módulos de Young fueron obtenidos para cada andamio.

Para conocer el Módulo de Young de manera más puntual, a nivel de fibras se realizaron pruebas de indentación con el microindentador FT-MTA02 (Marca Femto Tools). Las mediciones se realizaron con una punta esférica de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro con una sensibilidad de 0.5  $\mu\text{N}$ , todos los datos se analizaron con el modelo de Hertz considerando el módulo de Young de la punta (vidrio) mucho mayor al del material.

### **3.3.8 Degradación *in vitro***

La degradación de los andamios fue calculada por el método de porcentaje de pérdida de peso [58]. Los andamios fueron seccionados en círculos de 0.7 cm de diámetro y después fueron pesados en una balanza analítica (Marca Ohaus, modelo Explorer) en condiciones secas para obtener el peso inicial ( $W_i$ ). Los andamios de PLGA y PLGA/Ge se colocaron en una placa de 48 pozos (Marca Jet Biofil, No. Cat. TCP 11048) y se esterilizaron con UV/ozono descrito en secciones anteriores. Posteriormente, se adicionó 2 ml de PBS en cada uno de los pozos y se incubaron a 37 °C durante diferentes tiempos (1, 2, 3 y 4 semanas). Como medio de degradación fue usado PBS pH=7.4. Cada semana, las muestras fueron lavadas con agua desionizada y secadas en vacío por 24 horas para posteriormente obtener los pesos finales ( $W_f$ ) en cada uno de los

tiempos de evaluación. El porcentaje de pérdida de peso fue calculado por triplicado usando la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_f} * 100 \quad (2)$$

El medio de degradación fue recolectado de cada uno de los pozos cada semana y se midió el pH usando un potenciómetro (Marca Corning, modelo 7).

### **3.4 Caracterización biológica del andamio**

#### **3.4.1 Cultivo celular y caracterización de fenotipo de las células troncales mesenquimales (CTMs)**

Las células troncales mesenquimales (CTMs) fueron aisladas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano. Los cordones umbilicales provinieron de donadoras con firma previa de consentimiento informado pertenecientes al Hospital General en Tláhuac. Los cordones fueron seccionados en fragmentos de 5 cm de longitud y los restos de sangre y los vasos sanguíneos fueron retirados de las biopsias. Posteriormente, el tejido fue seccionado en piezas de 1 cm<sup>2</sup> para ser cultivado en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF) y un 1% de antibiótico-antimicótico en una incubadora a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta pase 3. Los explantes fueron recambiados de medio de cultivo cada tercer día hasta la segunda semana, donde el tejido fue removido. Las CTMs fueron cultivadas hasta alcanzar 80% de confluencia para ser separadas de las botellas de cultivo con una solución de 0.05% Tripsina / 0.02% EDTA.

Para evidenciar el fenotipo de las células recién aisladas y confirmar que eran troncales mesenquimales, se realizaron tinciones con los anticuerpos: anti-CD73, anti-CD105 y anti CD45, todos acoplados a Cy5 (BD Biosciences, San Diego, CA) [59]. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo en un equipo FACS Calibur (BD Biosciences) y analizadas con el software FlowJo.

Previo a la siembra de los andamios de PLGA/Ge, éstos fueron esterilizados mediante radiación UV/ozono (UV Ozone ProCleaner™, Bioforce Nanosciences) durante 10 minutos en cada lado del andamio. Las células mesenquimales fueron sembradas en andamios circulares de 0.7 cm de diámetro a una densidad de 26 000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en placas de 48 pozos por 1, 3 y 5 días para las pruebas biológicas *in vitro*.

#### **3.4.2 Adhesión celular**

La adhesión celular fue observada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) con el equipo JEOL (Modelo JSM-7600F). Los andamios de PLGA/Ge sembrados con las CTMs a los 3 días de cultivo fueron fijados con glutaraldehído al 2.5% durante 1 hora. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas con una serie de soluciones de alcoholes en una gradación creciente (20, 40, 60, 80, 90 y 100 v/v) por 10 minutos para cada concentración. Finalmente, las muestras fueron recubiertas con oro durante 90 segundos con un ionizador JEOL (Fine coat ion sputter JFC-1100).

#### **3.4.3 Viabilidad y proliferación**

La viabilidad y la proliferación de las CTMs fueron evaluados con el Kit de viabilidad y citotoxicidad LIVE/DEAD para células de mamífero (Thermo Fisher Scientific, No. Cat. L3224) y el reactivo Presto Blue (Thermo Fisher Scientific, No. Cat. A13261)

respectivamente. Los andamios sembrados que se habían mantenido en cultivo fueron lavados con PBS para retirar restos de medio de cultivo.

Para analizar la viabilidad celular, las muestras fueron incubadas con calceína AM y homodímero de etidio (Kit LIVE/DEAD) por una hora. Las células vivas fueron teñidas de color verde con la calceína mientras que en las muertas sus núcleos fueron marcados por el homodímero de etidio en color rojo. Después de la incubación, nuevamente se hicieron lavados de PBS para retirar residuos de los reactivos y después los andamios fueron analizados bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse 80i). El número total de células (vivas y muertas) fue contabilizado con el programa Image J. El índice de viabilidad fue calculado de acuerdo con la ecuación:

$$\text{índice de viabilidad} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células muertas}} \quad (3)$$

Los ensayos de proliferación se realizaron incubando los andamios sembrados con Presto Blue por 1 hora y posteriormente los sobrenadantes fueron colocados en una placa de 96 pozos en donde se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro (Thermo Multiskan Ascent Type 3549).

Para ambos ensayos, se consideraron controles positivos a las células cultivados directamente en las placas de cultivo y como controles negativos los andamios sin células. Cada experimento se realizó por triplicado.

#### **3.4.4 Implante subcutáneo de los andamios de PLGA/Ge**

Para evaluar la biocompatibilidad de los andamios se realizó el análisis de implantes subcutáneos en ratas Wistar. El protocolo de investigación fue aprobado por la Comisión de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM (Proyecto 125/2017). Todos

los animales fueron manejados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM 062-200-199. Las ratas fueron anestesiadas con Zoletil (Tiletamina- Zolaccpam) para ser intervenidas. Para identificar a los animales de cada grupo, fueron etiquetadas en la cola. El dorso de las ratas fue rasurado y se les realizó un proceso de asepsia y antisepsia. Los implantes de los diferentes andamios sin células se realizaron subdérmicamente en 12 ratas Wistar (machos, 300 gramos y edad 2.5 meses). Las ratas fueron organizadas en 4 grupos (n=3) de acuerdo con el momento de evaluación pos-implante: 1, 4, 8 y 12 semanas. Cada grupo a su vez, estuvo constituido por a) un “sham” en donde sólo se le hizo una incisión al animal e inmediatamente se suturó, b) implante de una astilla, c) implante andamio PLGA/Ge 9:1, d) implante andamio PLGA/Ge 7:3, e) implante andamio PLGA/Ge 5:5. Después se suturaron con hilos de ácido poliglicólico (Atramat 4-0) y se mantuvieron en un ambiente cálido mientras el efecto de la anestesia pasaba. Las ratas fueron monitoreadas hasta el día de su sacrificio en las instalaciones del bioterio del departamento. de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM. Cada tercer día, las ratas eran rasuradas en la zona de implante con la finalidad de tener bien identificada la lesión. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital.

#### **3.4.5 Evaluación histológica**

Después del implante de los andamios de PLGA/Ge se tomaron biopsias a la semana 1, 4, 8 y 12 semanas. El área de piel en donde se colocaron los implantes fue fijada en formol amortiguado al 4% por una semana, deshidratada en alcoholes y posteriormente se incluyó en parafina para cortes histológicos y tinción hemotoxilina-eosina(H&E).

### **3.5 Incorporación de FGFb a las fibras de PLGA/Ge**

Para la funcionalización de los andamios con factores de crecimiento únicamente se consideró el andamio de PLGA/Ge 7:3 por los resultados obtenidos en la caracterización física, química y biológica. Se adicionó 2 µg de FGF por mililitro de solución polimérica y se mantuvo en agitación por 30 minutos. Inmediatamente se electrohiló a 1 ml/hr, 20 cm y 10 kV

#### **3.5.1 Liberación del FGFb *in vitro***

Los andamios de PLGA/gelatina con FGFb fueron sumergidos en PBS y mantenidos en incubación a 37°C por varios días. Los sobrenadantes de los mismos, fueron recolectados a las 6, 24 y 192 horas para ser congelados hasta su evaluación mediante ELISA. Se utilizó el Kit estándar ABTS ELISA FGF humano (900-K08) Preprotech. Las placas de 96 pozos fueron incubadas toda la noche con el anticuerpo de captura. Al siguiente día, se realizaron lavados para retirar el anticuerpo y se bloqueó por una hora. Se realizó la curva de calibración con el estándar de FGFb y se adicionaron las muestras de los sobrenadantes provenientes de los andamios con FGF en dilución 1:10 y 1:200. Posteriormente se incubó el anticuerpo de detección por 2 horas y al término el complejo avidina- HRP. Finalmente se reveló la placa multipozos con sustrato ABTS y se analizó con el lector de placas Sinergy H1 (Biotek) a 405 nm con una corrección a 600nm.

#### **3.5.2 Morfología de las fibras durante la liberación del FGFb**

Los andamios 7:3 funcionalizados con FGFb sometidos a incubación con PBS para hacer el monitoreo de la liberación del factor de crecimiento en los sobrenadantes, fueron evaluados por microscopía electrónica de barrido a los 2,4, 8 y 16 días con el propósito

de analizar cambios en la morfología de las fibras. Las muestras para SEM fueron preparadas de la misma forma que se describió en la sección 3.3.1

### **3.6 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron presentados en promedios y sus desviaciones estándar.

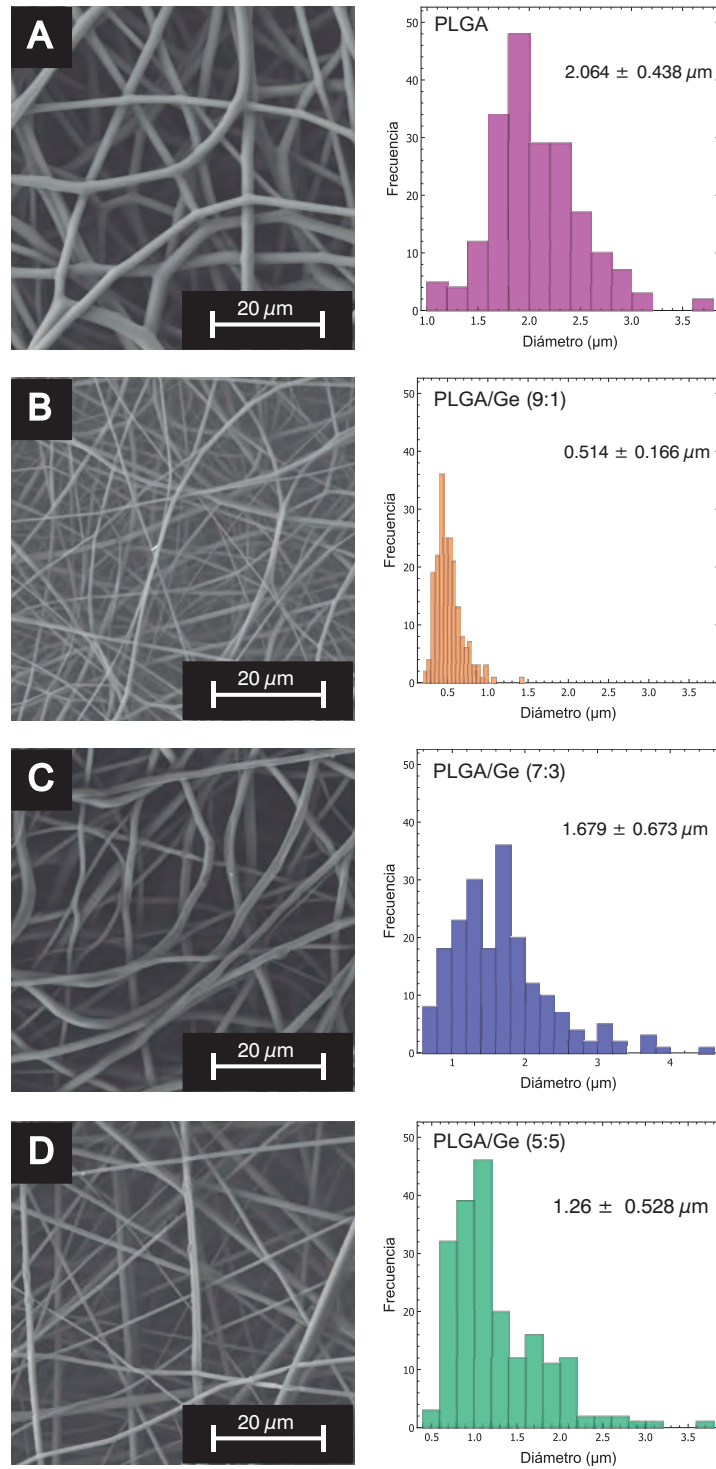
Cada experimento fue llevado a cabo por triplicado, excepto las pruebas mecánicas y ángulo de contacto en donde se realizaron 5 veces. Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos vías y una comparación múltiple de Tukey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $P \leq 0.05$ .

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Caracterización física y química del andamio**

#### **4.1.1 Morfología de las fibras**

Los andamios de PLGA y de PLGA/Ge preparados en tres diferentes proporciones (9:1, 7:3 y 5:5 v/v) presentaron fibras con superficie lisa y ausencia de bulbos (Fig. 2A-D). Todas las muestras contenían una serie de fibras depositadas al azar que formaban una red interconectada. El promedio de diámetro de fibra de los andamios de PLGA, PLGA/Ge 9:1, PLGA/Ge 7:3 y PLGA/Ge 5:5 fueron:  $2.1 \pm 0.4$ ,  $0.5 \pm 0.2$ ,  $1.7 \pm 0.7$  y  $1.3 \pm 0.5$   $\mu\text{m}$ , respectivamente. El diámetro de las fibras disminuyó con la adición de la gelatina a los andamios de PLGA, excepto para el andamio PLGA/Ge 7.3 (Fig. 4C).



**Figura 4.** Fotomicrografías de la morfología y gráficas de la distribución de los diámetros de las fibras de los andamios A) PLGA, B) PLGA/Ge 9:1, C) PLGA/Ge 7:3 y D) PLGA/Ge 5:5 (v/v).

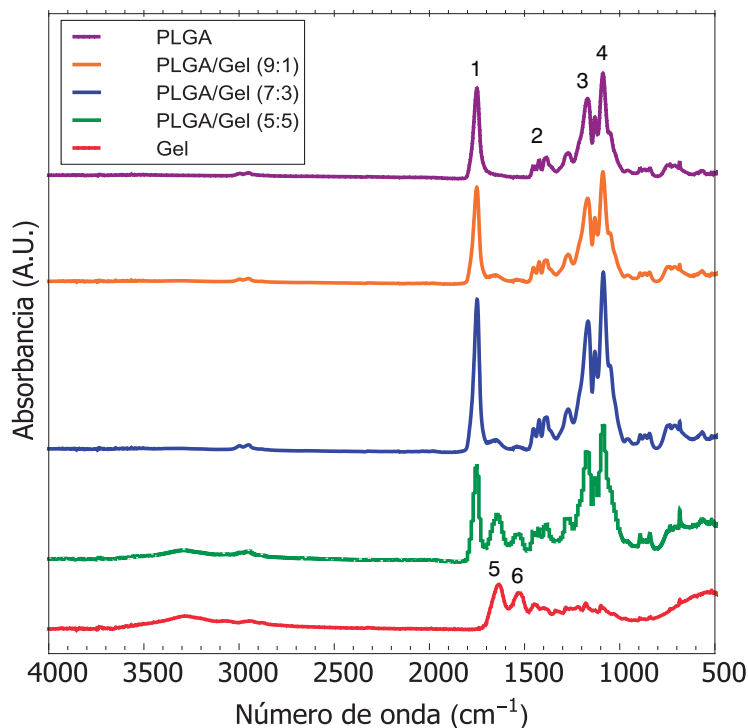


Las fibras de PLGA/Ge 7:3 presentaron diámetros mayores con respecto a las de la proporción 5:5. Lo anterior se opuso al concepto de que entre más gelatina presente mayor es el diámetro. En este caso, las condiciones de electrohilado para las fibras de proporción 7:3, fueron diferentes a las utilizadas para fabricar el resto de los andamios. La velocidad de flujo y la distancia entre la aguja y el colector fueron distintas en el andamio PLGA/Ge 7:3 para evitar la aparición de bulbos en las fibras.

La distancia interfibrilar de todos los andamios fue aparentemente insuficiente ( $<10\mu\text{m}$ ) para permitir la migración de las células dentro de la red de fibras. Las distancias promedio interfibrilares para cada andamio fueron:  $8.9 \pm 2.4 \mu\text{m}$  para PLGA,  $3.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$  para PLGA/Ge (9:1),  $6.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$  para PLGA/Ge (7:3) and  $6.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$  para PLGA/Ge (5:5).

#### **4.1.2 Análisis de grupos funcionales por FTIR**

El análisis FTIR en biomateriales fue empleado para determinar los grupos funcionales químicos más importantes presentes en los andamios de PLGA/Ge y además conocer si la combinación PLGA/Ge había sido meramente una mezcla física o se había formado algún enlace químico entre estos polímeros. Algunos grupos funcionales tales como  $\text{CH}_3$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ , and  $-\text{NH}_2$  son necesarios para una respuesta biológica adecuada, biocompatibilidad y biodegradabilidad de los andamios [14, 60]. Los espectros FTIR de los andamios con las diferentes proporciones de PLGA/Ge son mostrados en la Fig. 5. Las principales bandas fueron numeradas para su identificación.



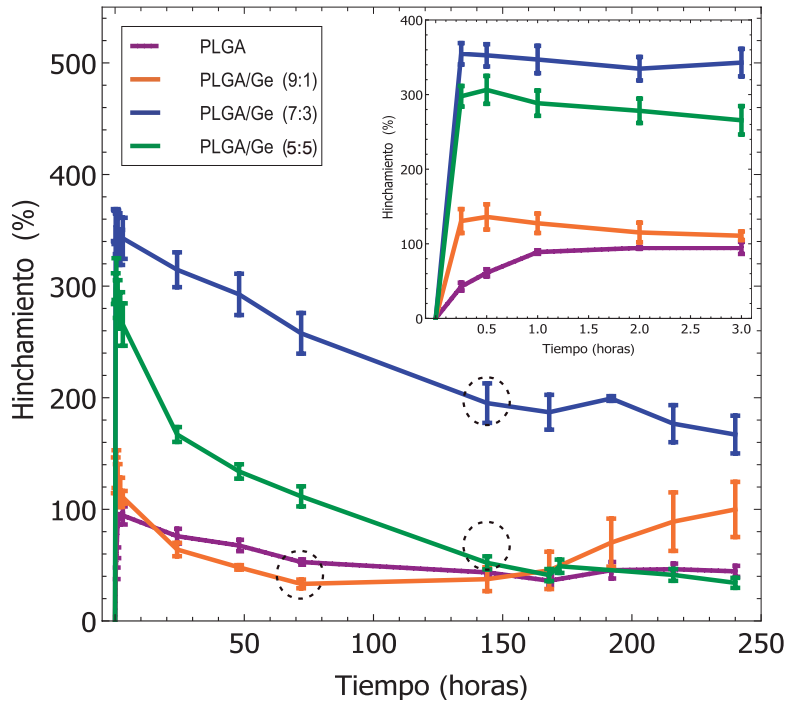
**Figura 5.** Espectro de FTIR de andamios de PLGA, Gelatina, PLGA/Ge 9.1, 7.3 y 5:5. Las principales bandas de PLGA se numeran del 1-4 y las de la gelatina del 5-6.

Los andamios de PLGA/Ge mostraron bandas a  $1752\text{ cm}^{-1}$  (1) asignada a la vibración de estiramiento del enlace C=O,  $1452\text{ cm}^{-1}$  (2) para el grupo metilo,  $1182\text{ cm}^{-1}$  (3) es atribuido vibración de estiramiento del grupo éter C-O-C y  $1130\text{ cm}^{-1}$  (4) es asociado al enlace C-O [61]. Además, otras bandas en  $1650\text{ cm}^{-1}$  (5) asignadas a amida I resultado de las vibraciones de estiramiento C-O de los enlaces peptídicos y  $1532\text{ cm}^{-1}$  (6) corresponden a amida II producida por la combinación N-H y la vibración de estiramiento C-N [62]. El espectro del PLGA no muestra ninguna banda en la región de  $1530\text{-}1660$  (amida I y II) debido a que esos grupos funcionales son característicos de las proteínas, como lo es la gelatina.

Los andamios que fueron preparados en 3 diferentes proporciones de PLGA/Ge presentaron bandas representativas del PLGA y gelatina. Sin embargo, las bandas de la amida I y II incrementaron conforme era mayor la cantidad de gelatina en el andamio.

#### **4.1.3 Porcentaje de hinchamiento**

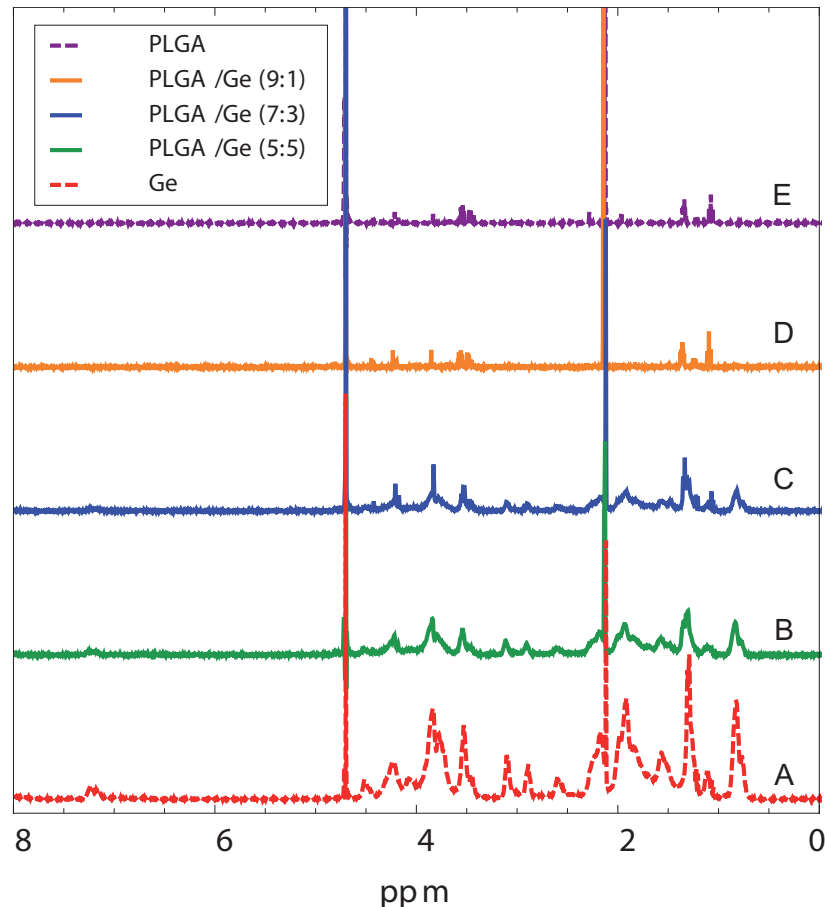
Las modificaciones físicas de los polímeros en los andamios al estar en contacto con medios acuosos resultan importantes para la ingeniería de tejidos. La capacidad de absorción de agua de los andamios de PLGA/Ge fue analizada a través del porcentaje de hinchamiento. La figura 6 muestra el hinchamiento de los andamios en PBS en términos de porcentaje de absorción de agua en función del tiempo. Los andamios de PLGA tuvieron la menor capacidad de hinchamiento debido a que estas fibras exhibieron un porcentaje máximo de hinchamiento (94.5%) hasta las 3 horas. El porcentaje de hinchamiento de los andamios de PLGA disminuyó a un 52% hasta su equilibrio a las 72 horas. La hidrofiliidad tuvo una influencia proporcional en la capacidad de hinchamiento, de manera que mientras más hidrofílico es un material, es mayor su hinchamiento.



**Figura 6.** Curvas de hinchamiento obtenidas a partir de la inmersión en PBS de los andamios de PLGA, PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5. durante 250 horas. El equilibrio de hinchamiento es indicado con círculos punteados, para andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1 fue alcanzado a las 72 horas y para PLGA/Ge 7:3 y 5:5 fue a las 144 horas.

Los andamios de PLGA/Ge 9:1 presentaron un porcentaje de hinchamiento de 130% durante los primeros 15 minutos y alcanzaron su capacidad máxima de absorción a la media hora con 136%. Sin embargo, su fase de equilibrio fue alcanzada a las 72 horas, al igual que los andamios de únicamente PLGA en donde su peso se estabilizó. Los andamios con las proporciones 7:3 y 5.5 (v/v) exhibieron los más altos porcentajes de hinchamiento: 354 y 306%, respectivamente a los 15 minutos. Después de 144 horas, llegaron a su equilibrio, el andamio PLGA/Ge 7:3 en 190% y el de 5:5 en 50%. La hidrofiliidad de la gelatina mejoró y aumentó una rápida absorción de agua. Sin embargo, se esperaba que el mayor porcentaje de hinchamiento lo presentara los andamios de PLGA/Ge 5:5 y no los de 7:3.

Lo anterior se podría explicar debido a que los andamios de PLGA/Ge 5:5 fueron los que mayor contenido de gelatina presentaron en sus fibras, pero también los que más rápido perdían gelatina al estar en contacto con medios acuosos. Esto fue corroborado con un análisis de resonancia magnética nuclear



**Figura 7.** Espectro obtenido mediante resonancia magnética nuclear de protón a partir de los sobrenadantes de los andamios A) Gelatina, B) PLGA/Ge 5:5, C) PLGA/Ge 7:3 D) PLGA/Ge 9:1 y E) PLGA.

Los espectros obtenidos mostraron la solubilidad de la Gelatina a tres horas de los andamios. En el espectro del andamio de gelatina (Fig. 7A) se muestra una señal a 7.25 ppm perteneciente al protón de benceno de los residuos de fenilalanina [63]; también aparece en los andamios de PLGA/Ge 5:5 (Fig. 7B), PLGA/Ge 7:3 (Fig. 7C) y una señal muy pequeña en PLGA/Ge 9:1 (Fig. 7D) lo que sugiere que existe Gelatina en todos los

sobrenadantes analizados, excepto en el espectro de PLGA (Fig. 7E). Otras señales características de la gelatina pertenecen a Leucina, valina e isoleucina que muestra una señal a 0.86ppm. Treonina a 1.16 ppm. Alanina 1.34 ppm. Lisina 1.61 ppm. Arginina 1.72 ppm. Acido aspártico 2.64 ppm. Lisina 2.93 ppm, Arginina 3.14 ppm y Prolina 3.57 ppm. Estas señales son por la resonancia del metil de los aminoácidos mencionados [64].

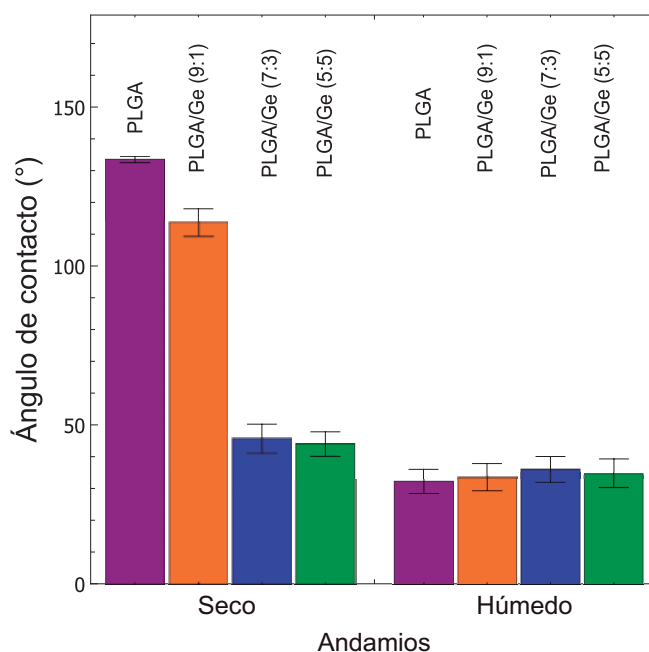
De acuerdo con el espectro, se pudo apreciar que la gelatina se disuelve en el PBS y que la señal obtenida del sobrenadante del andamio PLGA/Ge 7:3 (Fig. 7 b) tiene una señal con mayor intensidad perteneciente a la gelatina, disminuyendo esta señal en PGLA/Ge 7:3 y aún más en PLGA/Ge 9:1. Esto se sustenta en la integración de los picos de los espectros de H-RMN muestra la disminución del área sobre la curva

Se calculó el área bajo curva de las señales de la gelatina en los espectros de RMN con los siguientes resultados: Gelatina 1305.68, PLGA/Ge 7:3 404.56, PLGA/Ge 5:5 473.60 y PLGA/Ge 9:1 117.47. Este resultado sugiere que una menor disolución de gelatina se presentó en el andamio de PLGA/Ge 7:3 con respecto al de PLGA/Ge 5:5 lo que resultó en un mayor porcentaje de hinchamiento para el 7:3 que para el 5:5.

#### **4.1.4 Ángulo de contacto**

La mojabilidad es un prerrequisito para asegurar una respuesta biológica deseada, por ejemplo: la interacción del tejido y las células con un sustrato. La mojabilidad es estimada por mediciones de ángulo de contacto de un líquido predeterminado como lo es el agua. Nuestros resultados mostraron que los valores del ángulo de contacto de agua para los andamios de PLGA/Ge en condiciones secas disminuyeron con la adición de la gelatina (Fig. 8) Los andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1 tuvieron ángulos de contacto

promedio de  $133.4 \pm 1^\circ$  y  $113.5 \pm 4.4^\circ$  respectivamente, indicando la naturaleza hidrofóbica del material. En contraste, los resultados encontrados para las proporciones PLGA/Ge 7:3 y 5:5 fueron  $45.6 \pm 4.5^\circ$  y  $44 \pm 3.8^\circ$ , respectivamente, evidenciando su hidrofiliidad. Superficies con ángulos de contacto menores a  $90^\circ$  son considerados hidrofílicos y las superficies con ángulos de contacto por arriba de los  $90^\circ$  son catalogados como hidrofóbicos [65]



**Figura 8.** Ángulo de contacto evaluados en condiciones secas y húmedas de andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5.

En condiciones húmedas, todos andamios evaluados tuvieron ángulos de contacto menores a  $90^\circ$  por lo que fueron consideradas como superficies hidrofílicas. Las mediciones del ángulo se realizaron en el tiempo en que llegaban a su equilibrio en las pruebas de hinchamiento, por lo que los andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1 que en seco habían resultado hidrofóbicos, después de permanecer 3 días en PBS llegaron a ser hidrofílicos. Lo anterior podría retardar la adhesión y por ende la viabilidad y proliferación

celular. No así para los andamios 7:3 y 5:5 en donde en cualquiera de las condiciones, secas o húmedas, siempre mantuvieron su carácter hidrofílico.

#### 4.1.5 Análisis térmico

De acuerdo con los termogramas TGA, la estabilidad térmica fue afectada por el contenido de gelatina (Fig. 9). Los resultados obtenidos por TGA mostraron que los andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1 fueron estables hasta 270 °C pero entre 270-330 °C exhibieron una descomposición abrupta donde el 90% del material se perdió. Sin embargo, los andamios de gelatina resultaron en una curva con dos zonas de pérdida de peso. La primera zona fue entre 70-90 °C con aproximadamente el 6% de pérdida de peso debido a la pérdida de agua residual y la segunda zona inició a los 180 °C y terminó a los 260 °C en donde 80% del material se mantuvo. Después de este punto, se presentó una abrupta descomposición que terminó en 350 °C donde el 50% del material permaneció. Finalmente, la degradación térmica continuó a una tasa menor hasta los 600 °C donde el 20% del material continuó[66].

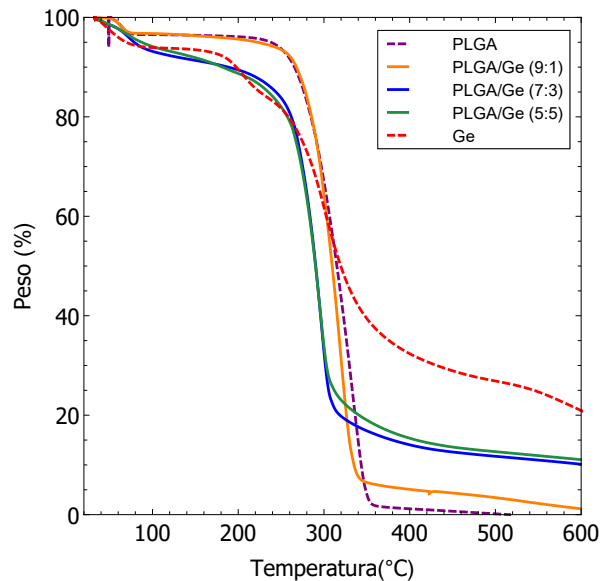
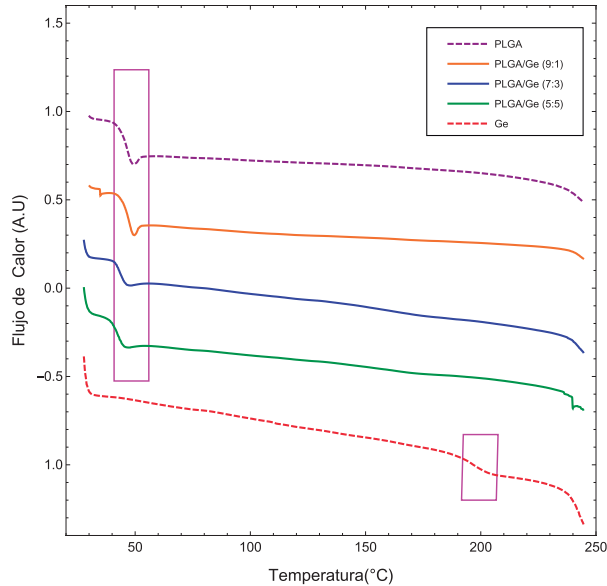


Figura 9. Termograma TGA de andamios de PLGA, Gelatina y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5.



Los andamios de PLGA /Ge 7:3 y 5:5 también presentaron la primera región de pérdida de peso aproximadamente a los 100 °C atribuida a la pérdida de agua y en la segunda región causada por la calcinación del PLGA y la gelatina. Las curvas de estos dos andamios fueron intermedias, entre las descritas por la de PLGA y por la de gelatina (Fig.7) [67].



**Figura 10.** Termograma DSC de andamios de PLGA, Gelatina y PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5. En un recuadro rosa se indica la transición vítrea (Tg) de cada uno de los andamios.

La temperatura de transición vítrea (Tg) es un parámetro importante porque puede influir tanto en las propiedades mecánicas como en la degradación. Por lo que mediante DSC se determinó la Tg de los polímeros base de los andamios, así como de las diferentes proporciones. Las temperaturas de transición vítrea encontradas fueron: 47.69 °C PLGA, 47.57 °C PLGA/Ge 9:1, 43.31 °C PLGA/Ge 7:3, 43.09 °C PLGA/Ge 5:5 y 196.34 °C Ge. La adición de la gelatina disminuyó la Tg de los andamios aun siendo la Tg de la gelatina mucho mayor a la del PLGA y las distintas combinaciones de PLGA/Ge (Fig.10). Sin embargo, aunque la Tg se modificó, ésta no fue menor a la temperatura

corporal por lo que ninguno de los andamios de PLGA/Ge se verían afectados en una posible aplicación clínica.

#### 4.1.6 Pruebas mecánicas

Las curvas de fuerza-deformación de los andamios de PLGA/Ge bajo pruebas de tensión uniaxial en condiciones secas y húmedas se muestra en la Fig. 11. Las gráficas indican un comportamiento lineal antes del límite elástico para ambas condiciones siguiendo la Ley de Hooke. Sin embargo, los límites elásticos en condiciones secas fueron mayores a las observadas en las húmedas.

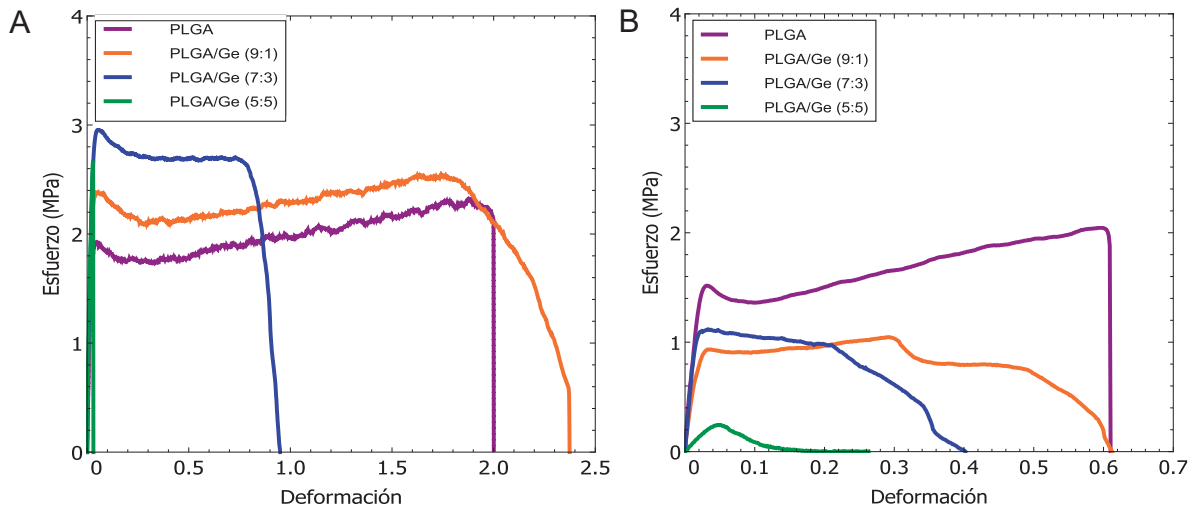


Tabla 2 y 3 muestran los módulos elásticos, límites elásticos y la deformación asociada al límite elástico e las condiciones secas y húmedas respectivamente. Los resultados son el promedio y la desviación estándar de 5 pruebas en cada uno de los tipos de andamio.

**Tabla 2.** Comportamiento mecánico de andamios de PLGA y PLGA/Ge en condiciones secas.

Andamio	Módulo Young's (MPa)	Límite elástico (MPa)	Deformación asociada al límite elástico (%)
PLGA	69 ± 7	1.9 ± 0.3	2.8 ± 0.4
9:1	81 ± 5	2.2 ± 0.2	3.1 ± 0.5
7:3	91 ± 19	3.1 ± 0.4	3.7 ± 0.6
5:5	101 ± 18	2.6 ± 0.5	2.8 ± 0.5

Estos resultados mostraron que un incremento en el contenido de gelatina en los andamios de PLGA en condiciones secas, producen módulos de Young y límites elásticos mayores a los obtenidos en andamios de PLGA. Sin embargo, valores de deformación asociados con el límite de elástico no sufrieron grandes cambios. Por lo tanto, en condiciones secas, la gelatina mezclada con PLGA a las proporciones 9:1, 7:3 y 5:5, incrementaron el módulo de Young, haciendo los andamios más rígidos en 18, 33 y 46% respectivamente.

Las propiedades mecánicas de los andamios de PLGA y PLGA/Ge en condiciones húmedas también fueron evaluadas simulando el ambiente en el que se dan heridas crónicas humanas. En esta condición, los andamios de PLGA/Ge exhibieron también un comportamiento mecánico lineal en la región elástica (hasta el límite elástico) como se observa en la curva de fuerza-deformación (Fig. 9B). Los valores de módulo de Young, límite elástico y deformación asociada al límite elástico fueron calculados de la misma forma que para las condiciones secas.

**Tabla 3.** Comportamiento mecánico de andamios de PLGA y PLGA/Ge en condiciones húmedas

Andamio	Módulo Young's (MPa)	Límite elástico (MPa)	Deformación asociada al límite elástico (%)
PLGA	72 ± 10	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.2
9:1	48 ± 6	1.1 ± 0.1	2.2 ± 0.3
7:3	58 ± 6	1.2 ± 0.1	2.1 ± 0.3
5:5	6 ± 1	0.2 ± 0.03	4.3 ± 0.5

Como se muestra en la tabla 3, después del incremento en el contenido de gelatina en los andamios de PLGA, el módulo de Young y el límite elástico disminuyeron hasta un 91 y 85% respectivamente, comparado con el de PLGA. Con respecto a la deformación asociada al límite elástico permaneció sin cambios importantes para las proporciones 9:1 y 7:3 en comparación al de PLGA, sin embargo, cuando la proporción de PLGA/Ge fue 5:5, la deformación aumentó más de 2 veces con respecto al PLGA.

Las pruebas mecánicas realizadas con el probador uniaxial nos dieron información de las propiedades mecánicas del andamio en un nivel más general. Para conocer el módulo de Young a una escala micrométrica, las pruebas de indentación fueron muy útiles debido a que la punta tan pequeña que usa es capaz de evaluar un área de 25 mm<sup>2</sup> inclusive hasta micras cuadradas. Los módulos de Young que se obtuvieron en condiciones secas y húmedas se indican en la tabla 4.

**Tabla 4.** Comportamiento mecánico de andamios de PLGA y PLGA/Ge mediante indentación

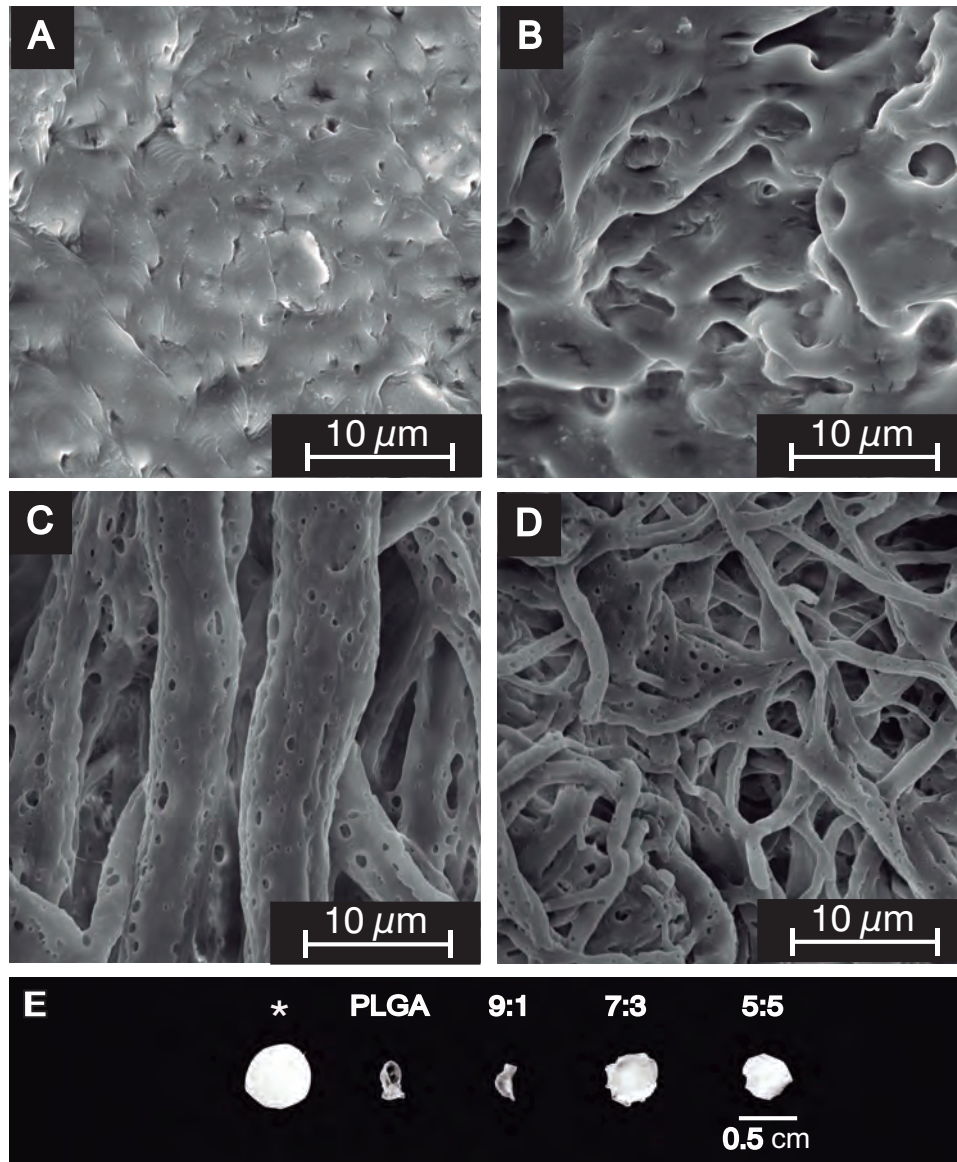
Andamio	Módulo de Young (MPa)	
	Secos	Húmedos
PLGA	2.79 ± 1.64	2.41 ± 0.517
9:1	1.47 ± 0.455	4.22 ± 0.320
7:3	3.35 ± 0.347	3.98 ± 1.03
5:5	2.26 ± 1.11	1.69 ± 0.173

En general, los resultados son heterogéneos en ambas condiciones, sin una tendencia clara con respecto a la adición de la gelatina. La variabilidad de los resultados dentro de un mismo tipo de andamio, así como entre los diferentes andamios y condiciones es debida a la naturaleza fibrilar de las muestras. También es importante considerar el diámetro de fibra y la porosidad, por lo que el módulo de Young del 7:3 es muy diferente al de 9:1 y 5:5 dado que 7:3 presentó mayor diámetro de fibra que el 9:1. En algunos casos, también se observó un aumento en el módulo de Young en condiciones húmedas con respecto a las secas, que pudiera estar relacionado con el encogimiento de los andamios y a la reducción de distancia interfibrilar.

#### **4.1.7 Degradación *in vitro***

La tasa de degradación de un andamio es un parámetro fundamental porque provee un tiempo aproximado en que el andamio interactúa con un organismo vivo hasta que cumpla su función. Para investigar la vida media de los andamios, se realizó un ensayo de degradación evaluando la morfología de las fibras y el peso de los diferentes andamios con distintas proporciones de PLGA/Ge a 37 °C en PBS durante 4 semanas.

Los resultados mostraron notables cambios en la morfología durante la prueba de degradación (Fig.12). Para los andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1 (v/v), todas las fibras perdieron su individualidad y su forma, mostrando una apariencia fusionada (Fig 12 A-B). En el caso de los andamios PLGA/Ge 7:3 y 5:5, pocas fibras se observan con esa morfología fusionada (Fig.12C).

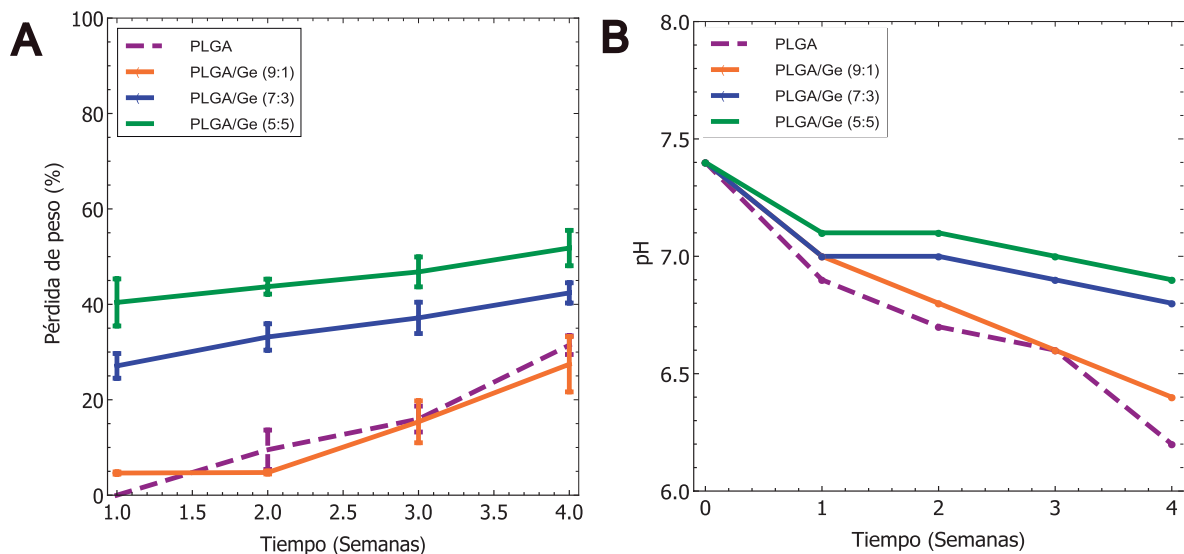


**Figura 12.** Microfotografías obtenidas por SEM durante la degradación de andamios de A) PLGA, PLGA/Ge B) 9:1, C) 7:3 y D) 5:5 después de 4 semanas inmersas en PBS. Nótese la presencia de pequeños hoyos en las fibras de los andamios de 7:3 y 5:5. E) Apariencia macroscópica de los andamios después de 4 semanas de degradación. Con asterisco se indica el tamaño original antes de iniciar la prueba de degradación.

En las fibras de los andamios de PLGA/Ge 7:3 y 5:5 (v/v) se observaron gran cantidad de “hoyos” (Fig. 12C-D), lo cual sugiere una erosión superficial. Los análisis revelaron que el andamio PLGA/Ge 5:5 tuvo un 10% de erosión mayor que el 7:3, lo cual se

relaciona directamente con el contenido de gelatina en los andamios y la hidrofiliidad de este polímero natural, resultando en una alta solubilidad.

Todos los andamios evaluados sufrieron un encogimiento, sin embargo, fue evidente que fue en los andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1 donde el encogimiento fue mayor con respecto al resto. Adicionalmente, la distancia interfibrilar disminuyó, inclusive en andamios de PLGA y 9:1 desapareció, mientras en los 7:3 y 5:5 la distancia interfibrilar disminuyó más del 50%.



**Figura 13.** Gráfica de A) pérdida de peso y B) cambio del pH durante la prueba de degradación de andamios de PLGA, PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5 durante 4 semanas.

Los andamios de PLGA/Ge tuvieron diferentes porcentajes de pérdida de peso de acuerdo con la cantidad de gelatina en su composición. Los andamios de PLGA mantuvieron su peso original, los PLGA/Ge 9:1 perdieron 5% de peso mientras que los PLGA/Ge 7:3 y 5:5 presentaron una pérdida de 27% y 40%, respectivamente en la primera semana de incubación con PBS a 37 °C. Durante la cuarta y última semana de

la prueba de degradación, los porcentajes de pérdida fueron 31% para PLGA, 27% para 9:1, 42% para 7:3 y 52% para 5:5 (Fig. 13A)

Adicionalmente, la prueba de degradación *in vitro* se llevó a cabo sin reemplazamiento de PBS, por lo que el decremento en el pH durante las 4 semanas pudo haber afectado la tasa de degradación de los andamios. En el caso de los andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1 (v/v) mostraron el mayor decremento de pH en el medio de degradación (6.3 - 6.4) con respecto a los de 7:3 y 5:5 los cuales exhibieron una disminución ligera en el pH (6.9-6.8) en la cuarta semana (Fig. 13B). En este trabajo, el pH del PBS fue de 7.4 al inicio de la prueba y se mantuvo por arriba de 6 hasta la cuarta semana, sin embargo, el pH no disminuyó lo suficiente como para acelerar el aún más la tasa de degradación y producir una completa degradación. Por otro lado, es importante considerar que, en las pruebas biológicas *in vitro*, el medio de cultivo se ajusta a un pH 7.4-7.2 y es cambiado cada 2-3 días precisamente para asegurar que el pH sea el óptimo para mantener la viabilidad de las células sembradas en el andamio. En condiciones *in vivo*, el cuerpo tiene un amortiguador biológico que regula y mantiene todos los fluidos corporales bajo condiciones fisiológicas (pH 7.4). No obstante, hay que considerar la presencia de enzimas que sí podrían modificar de manera importante la tasa de degradación.

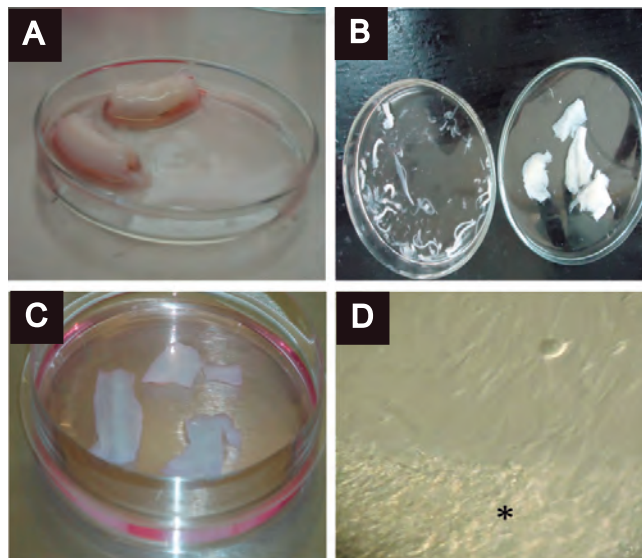
e el FGFb



## 4.3 Caracterización biológica del andamio

### 4.3.1 Cultivo y caracterización del fenotipo de las células troncales mesenquimales (CTM)

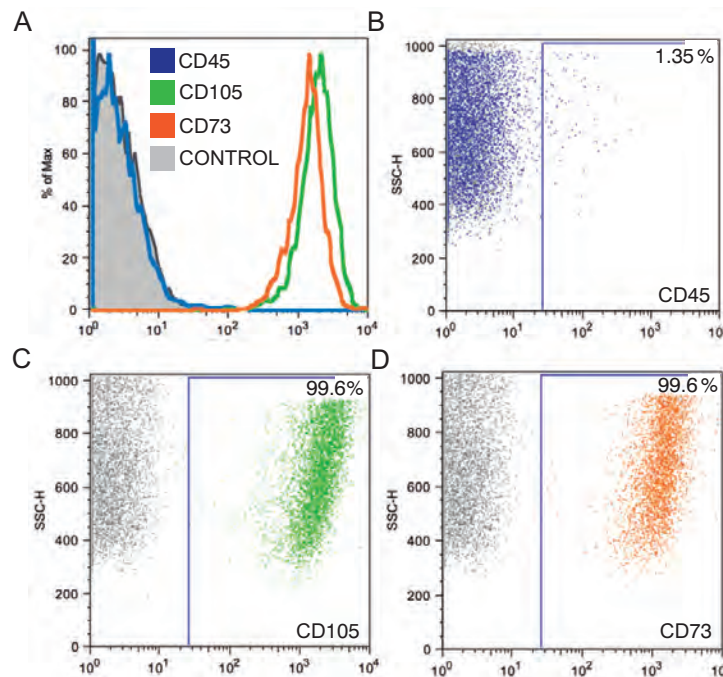
Las células troncales mesenquimales fueron aisladas de la gelatina de Warthon mediante la técnica de explantes, por la cual las células son capaces de migrar del tejido hacia la placa de cultivo (Fig. 14). El número de células obtenidas fue de 313 000/cm<sup>2</sup> con una viabilidad del 97%. Los cultivos se expandieron hasta pase 3 encontrando un rendimiento promedio de 1125000 células/caja Petri, es decir, 19841 células /cm<sup>2</sup>.



**Figura 14.** Aislamiento y cultivo de las células troncales mesenquimales. A) Lavado y fragmentación del cordón umbilical. B) Eliminación de venas y arterias, así como de la estructura tubular del cordón. C) Cultivo por explante. D) Migración de las células de la gelatina de Wharton a la caja Petri después de 1 semana en cultivo. Con asterisco se indica el fragmento de cordón.

Las células obtenidas de la gelatina de Wharton fueron fuertemente positivas para CD73 y CD105. En contraste, las células fueron negativas para CD45. Los porcentajes de las células CD73+ y CD105+ fueron similares (Fig.15). La Sociedad Internacional para Terapia Celular ha establecido el criterio específico para la identificación de las células trocales mesenquimales [68]. Las CTM deben expresar específicos marcadores de

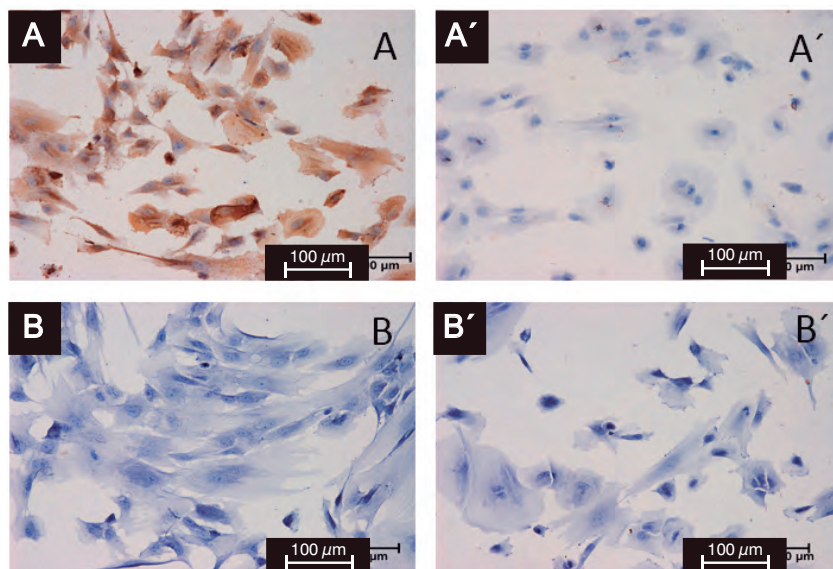
superficie, tales como CD73 y CD105, los cuales son marcadores característicos de células mesenquimales en diferentes nichos y especies, incluyendo humanos [69]. Por el contrario, las CTM deben ser negativas para marcadores de leucocitos, células hematopoyéticas y monocitos/macrófagos, como CD45 [70, 71]. Por lo tanto, las células obtenidas de la gelatina de Warthon de cordón umbilical fueron células troncales mesenquimales.



**Figura 15.** Fenotipo de las células troncales mesenquimales (CTM) evaluado por citometría de flujo. A) Intensidad de fluorescencia promedio de CD45, CD105 y CD73 en células obtenidas de la gelatina de Warthon. Todas las células fueron positivas a CD105 y CD73 y negativas para CD45. B), C) y D) *Dot plots* representativos mostrando la expresión de CD45, CD105 y CD73

Adicionalmente, para complementar la caracterización del fenotipo celular, se realizaron inmunocitoquímicas para SSEA4, marcador de células troncales embrionarias. La Fig. 16 muestra como las células mantenidas en cultivo son positivas para SSEA4 mientras que fibroblastos humanos no presentan este marcador. En ambos casos, se realizó el control negativo de la técnica en donde no se adicionó el anticuerpo primario para

evidenciar que la inmunocitoquímica se realizó correctamente. De esta forma se complementó mediante otra técnica, que las células obtenidas presentan el fenotipo esperada.

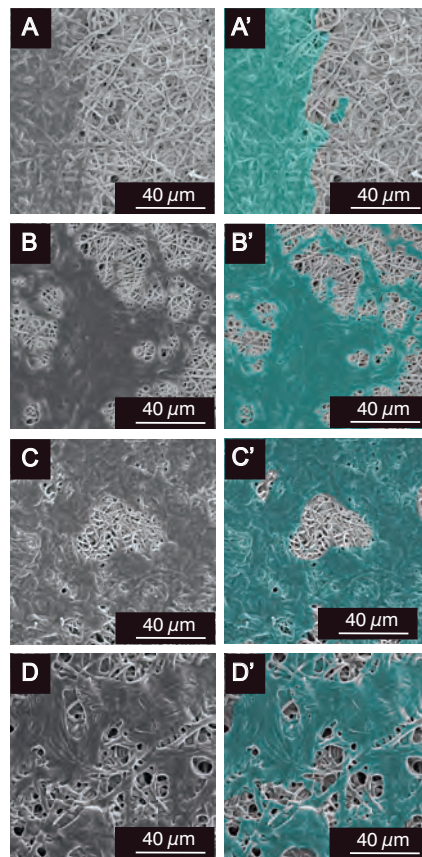


**Figura 16.** Inmunocitoquímicas contra SSEA4. A) Células mesenquimales positivas a SSEA4 y A´) Control de la inmunocitoquímica sin adición del anticuerpo primario. B) Fibroblastos humanos negativos a SSEA4 y B´) Control de la inmunocitoquímica sin adición del anticuerpo primario.

#### 4.3.2 Adhesión celular

Las características de los andamios, como su morfología, composición química, topografía e hidrofiliicidad, son fundamentales para la adhesión y proliferación celular. Los andamios electrohilados asemejan la estructura de la matriz extracelular promoviendo la adhesión de las células. La capacidad de las células a adherirse a los andamios fue evaluada indirectamente a través de su morfología observada mediante SEM, considerando que las células alargadas son características de células adheridas mientras que células redondas sugieren la ausencia de adhesión al sustrato [72]. Las células mesenquimales sembradas en los andamios de PLGA/Ge a diferentes proporciones se muestran en la figura 17, donde se ha resaltado a las CTM con color

verde para identificarlas del andamio (Fig. 17 A'-D'). Después de 3 días de cultivo, las células presentan una morfología extendida y aplanada en todos los andamios. Los andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1 aun siendo hidrofobicos en condiciones secas, permitieron la adhesión de las células sobre el andamio (Fig. 20A-B). Para los andamios hidrofílicos (PLGA/Ge 7:3 y 5:5), las CTM exhibieron una mayor extensión y confluencia (Fig. 17C-D) sobre los andamios con respecto a los de PLGA y PLGA/Ge 9:1. En todos los casos, las CTM se observaron en la superficie de los andamios sin lograr penetrar la red de fibras electrohiladas.

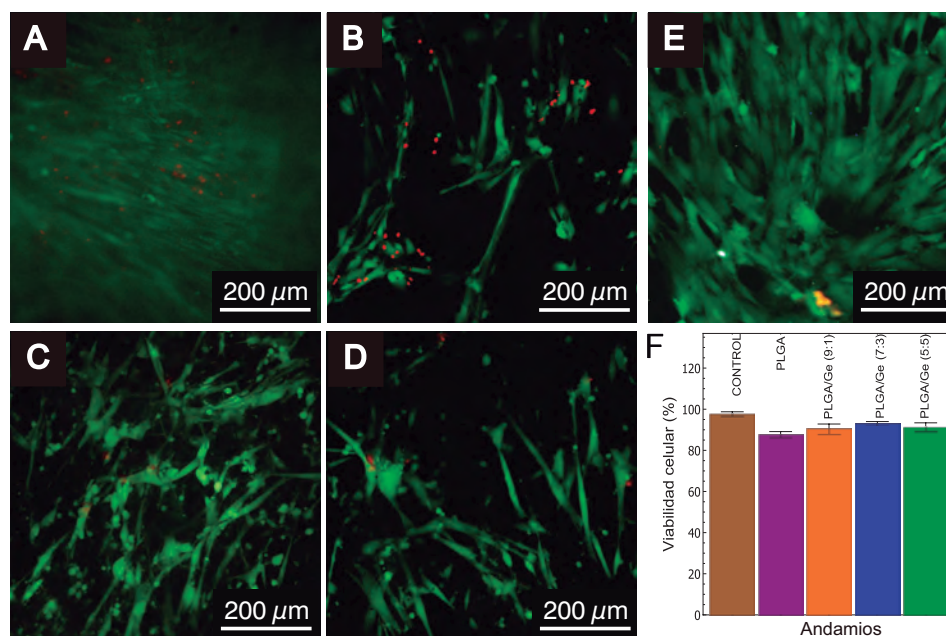


**Figura 17.** Fotomicrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido para evaluar adhesión indirecta de células troncales mesenquimales sobre andamios de A) PLGA, B) PLGA/Ge 9:1, C) PLGA/Ge 7:3 y D) PLGA/Ge 5:5 a tres días de cultivo. En las imágenes de la derecha (A' - D') las células fueron coloreadas artificialmente en verde para resaltar a las células sembradas sobre los andamios.

El tipo de polímero usado para la fabricación de los andamios también tienen un efecto en la adhesión celular. En este caso, la presencia de un polímero natural, como la gelatina, confirió una mayor capacidad adhesiva a los andamios que los polímeros sintéticos, PLGA, que poseen baja afinidad celular [73].

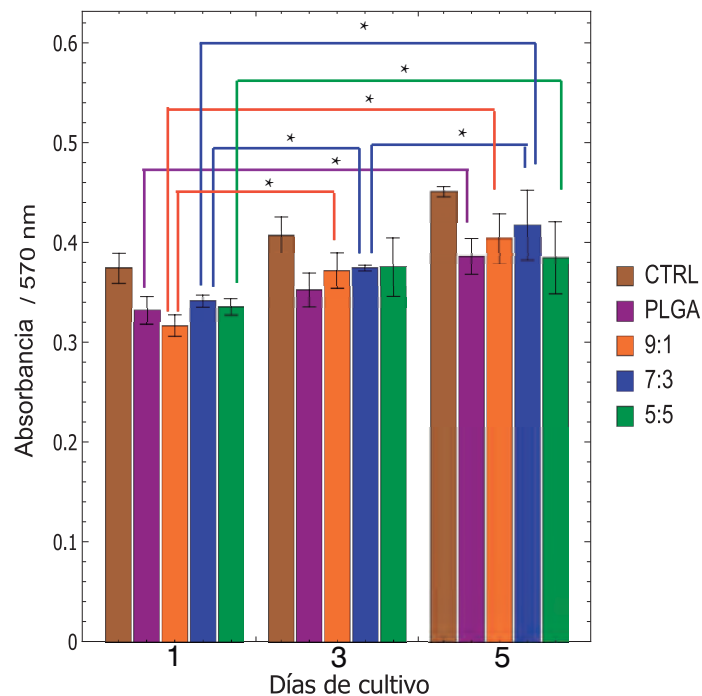
#### 4.3.3 Viabilidad y proliferación

Para evaluar la viabilidad de las células sembradas sobre los andamios de PLGA/Ge, se usó la tinción con calceína y homodímero de etidio. La prueba de viabilidad está basada en la actividad de la esterasa en células vivas y fue evaluada por la fluorescencia de la calceína. Además, consideramos la integridad de la membrana celular, por el acceso que pudiera tener el etidio en células muertas. Los resultados mostraron que los andamios en sus tres proporciones (9:1, 7:3 y 5:5) no presentaron efectos tóxicos en las CTM (Fig. 18).



**Figura 18.** Análisis de viabilidad de células troncales mesenquimales a los 3 días de cultivos sembradas sobre A) PLGA B) PLGA/Ge 9:1, C) PLGA/Ge 7:3, D) PLGA/Ge 5:5 y E) placa de cultivo. Las células vivas fueron teñidas en verde y las muertas en rojo. F) Evaluación cuantitativa de la viabilidad celular.

La tinción de las CTM con calceína también mostró indirectamente su adhesión por la morfología fusiforme que presentaron, complementando lo obtenido en los resultados por SEM (Fig. 18A-D). Los porcentajes de viabilidad de los andamios fueron 90% (9:1), 93 (7:3) y 91% (5:5). Por lo anterior, los resultados encontrados indican que los andamios de PLGA/ge podrían ser usados como un tratamiento de heridas crónicas, sin embargo, mayor investigación en el efecto de PLGA/Ge en células y tejidos es necesario.



**Figura 19.** Ensayo de proliferación. Absorbancia de la resazurina muestra indirectamente la proliferación de CTM en placa multipozos, andamios de PLGA, PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5 al día 1, 3 y 5 de cultivo.

Diferencias estadísticamente significativas son indicadas con asteriscos. (\*P <0.05).

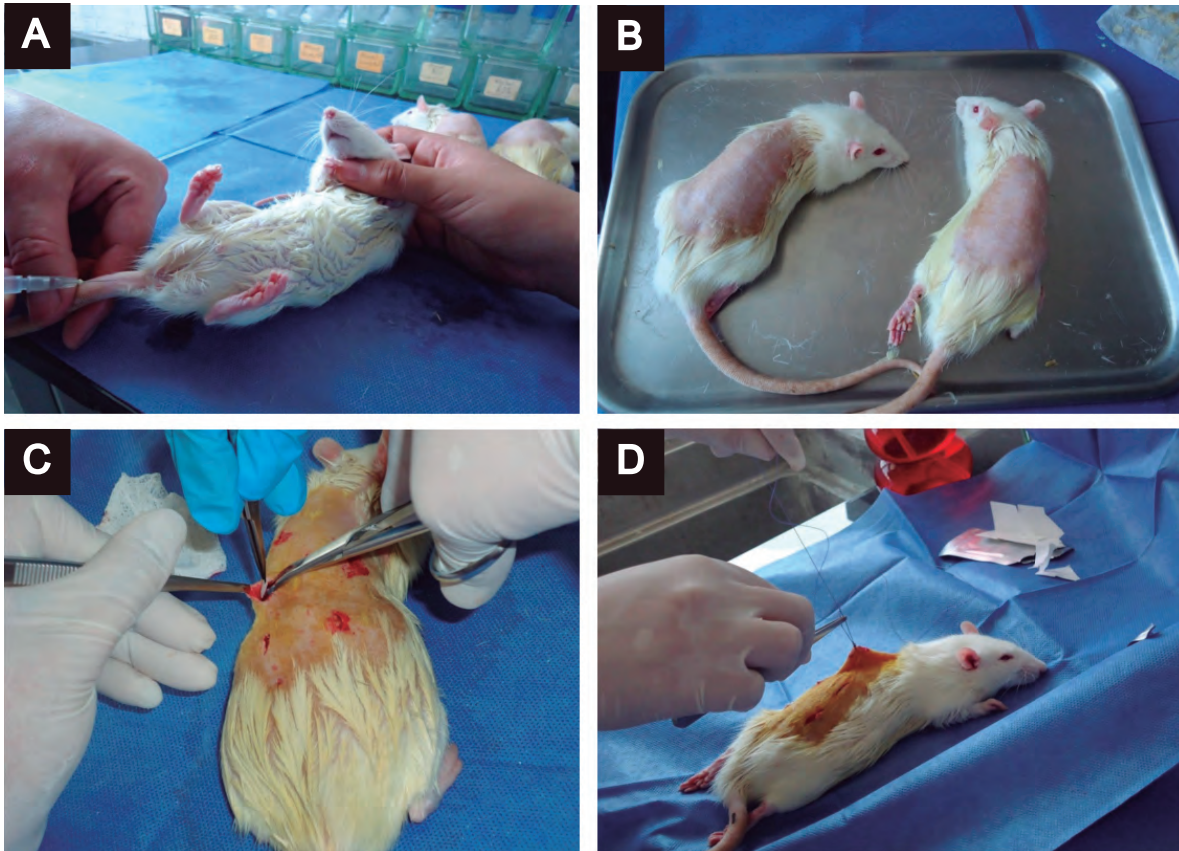
La proliferación celular fue evaluada por el ensayo Presto Blue, donde una solución basada en resazurina penetra en las células y funciona como un indicador de viabilidad celular mediante el uso del poder de reducción de las células vivas para medir cuantitativamente la proliferación de las células. Estas mediciones de absorbancia son directamente proporcionales al número de células viables. Como se muestra en la Fig.



22, la absorbancia incrementó proporcionalmente con respecto al número de días en los cultivos de CTM en los andamios. Para el día de cultivo 3, la proliferación se incrementó significativamente en el andamio de PLGA/Ge 9:1 y 7:3 comparadas con la proliferación en el día 1 (Fig. 19). Al día 5, la proliferación en el andamio 7:3 aumentó significativamente comparada con el día 1 y 3, mientras las células en los andamios de PLGA, PLGA/Ge 9:1 y 5:5 solo mostraron un incremento considerable en el día 1. Los resultados anteriores pudieran ser atribuidos a la adición de la gelatina a los andamios, indicando que altas proporciones de gelatina incrementan la proliferación celular, sugiriendo que es posible mantener la interacción andamio-células sin efectos tóxicos y que la proliferación fue mejorada en andamios PLGA/Ge después de al menos 5 días de cultivo.

#### **4.3.4 Evaluación de biocompatibilidad**

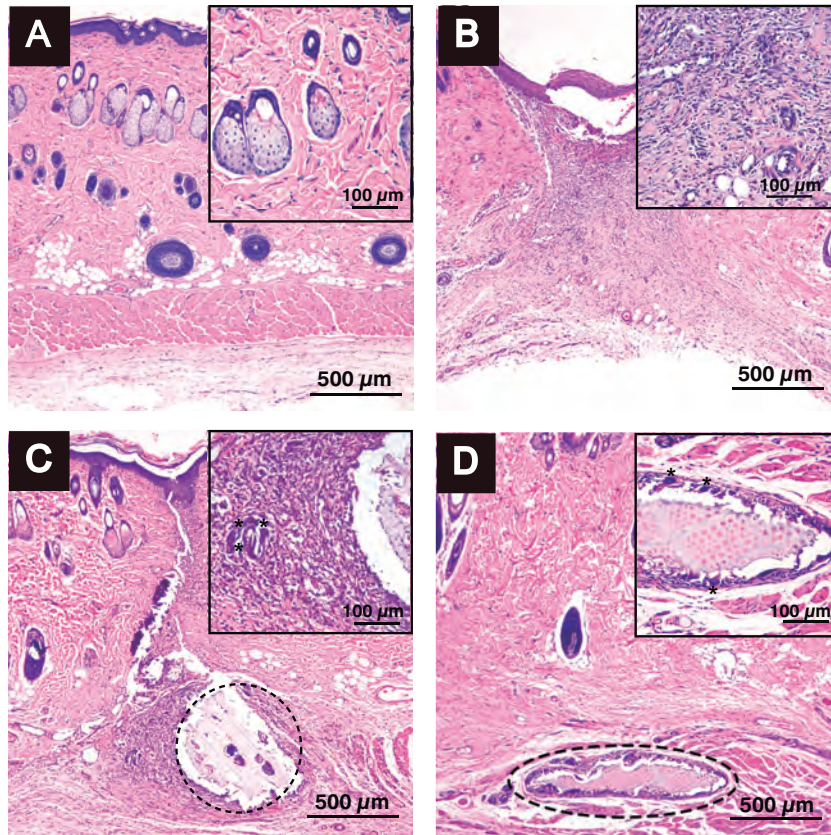
La biocompatibilidad de los andamios fue determinada por medio de un implante subcutáneo de los andamios en el dorso de 12 ratas (Fig. 20). Cada rata fue implantada con tres diferentes andamios de PLGA/Ge (9:1, 7:3 y 5:5) sin células para analizar el efecto de todos los andamios en la misma rata y evitar variabilidad en la respuesta biológica a los materiales entre individuos.



**Figura 20.** Implante subdérmico de los andamios de PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5 sin células en ratas Wistar. A) Administración de anestesia. B) Rasurado y asepsia del dorso de ratas. C) Implante de los andamios (lado izquierdo), astilla de madera y solo incisión (lado derecho). D) Sutura de las lesiones.

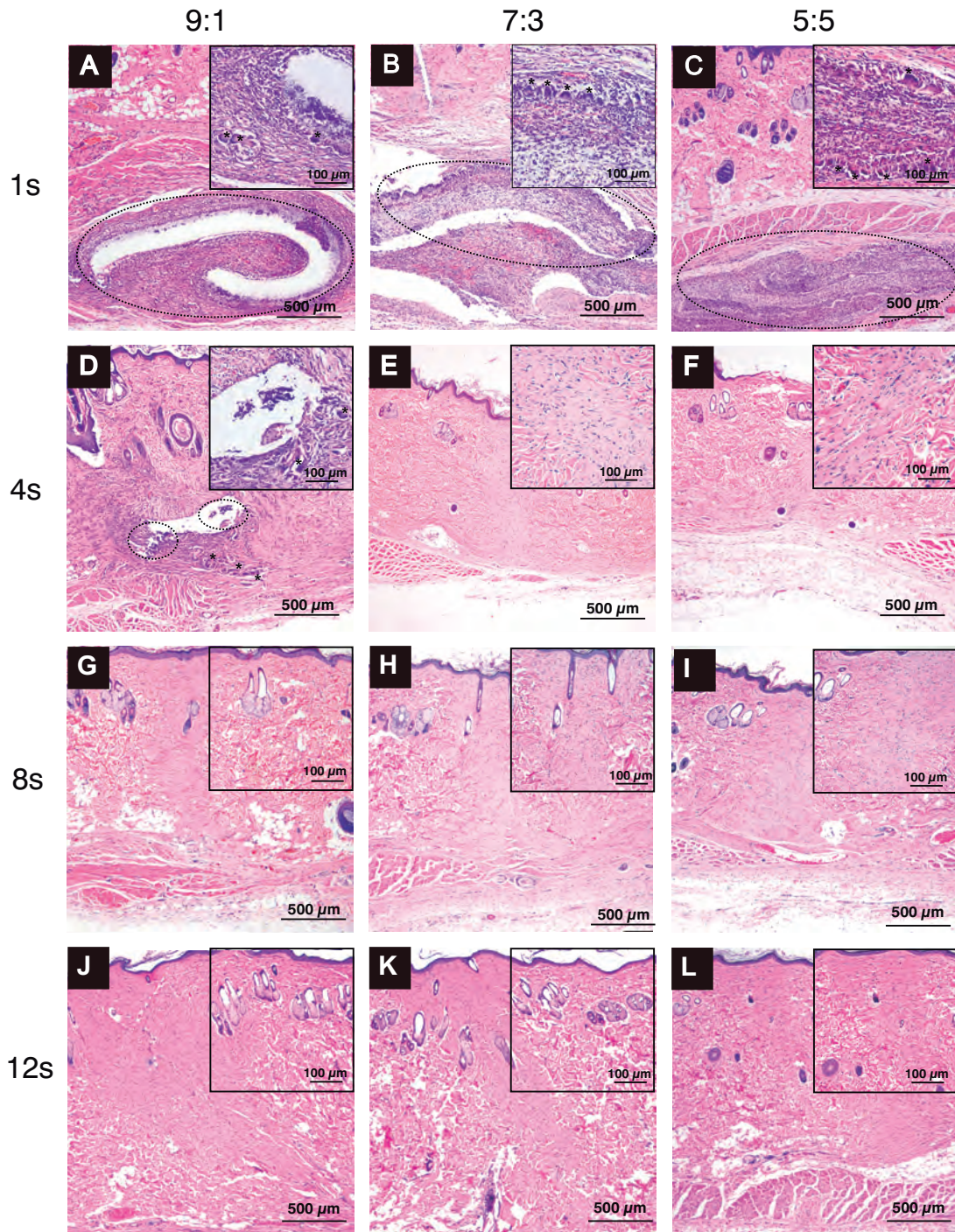
Muestras de piel sana de 12 ratas fueron teñidas con hematoxilina y eosina para comparar los cambios histopatológicos presentados en los implantes de los andamios de PLGA/Ge (Fig.21) El control negativo, que sólo recibió una incisión con el bisturí, mostró una inflamación aguda con una gran cantidad de neutrófilos y algunos macrófagos con ausencia de células de Langhans. (Fig. 21B). Esta reacción inflamatoria es parte del proceso de una normal cicatrización en heridas cutáneas. El control positivo (implante de una astilla de madera) indujo una inflamación aguda con la presencia de neutrófilos y macrófagos (Fig. 21C-D).





**Figura 21.** Cortes histológicos de los controles en las lesiones de rata teñidos con H&E. A) Piel sana, B) control negativo (sin andamio implantado, C) controles positivos de inflamación con implante de astilla de madera C) 1 semana y D) 8 semanas. Círculos punteados indican la astilla y los asteriscos las células de Langhans.

La evaluación histopatológica mostró que los andamios de PLGA/Ge en sus tres diferentes proporciones de gelatina indujeron una respuesta inflamatoria después de la primera semana después del implante (Fig. 22). Para el andamio 9:1 (Fig. 22A), un gran número de células inflamatorias rodearon el andamio, como números neutrófilos y células de Langhans, en contraste a los andamios 7:3 y 5:5 (Fig. 22 B-C).



**Figura 22.** Cortes histológicos de implantes subdérmicos de andamios de PLGA/Ge sin células en ratas Wistar. A) PLGA/Ge 9:1, B) PLGA/Ge 7:3 y C) PLGA/Ge 5:5 a 1 semana pos-implante. D) PLGA/Ge 9:1, E) PLGA/Ge 7:3 y F) PLGA/Ge 5:5 a 4 semanas pos-implante. G) PLGA/Ge 9:1, H) PLGA/Ge 7:3 e I) PLGA/Ge 5:5 a 8 semanas pos-implante. J) PLGA/Ge 9:1, K) PLGA/Ge 7:3 y L) PLGA/Ge 5:5 a 12 semanas pos-implante. Círculos punteados y asteriscos, indican los andamios implantados y las células de Langhans, respectivamente.

Para la cuarta semana pos- implante, los remanentes de los andamios PLGA/Ge 7:3 y 5:5 no fueron observados (Fig. 22E-F), sugiriendo que estos andamios fueron degradados. Además, el proceso inflamatorio cesó y solo fue posible apreciar la cicatriz de la cirugía identificándola por depósito de fibras de colágena de diferente orientación y densidad y la ausencia de apéndices cutáneos (folículos pilosos y glándulas) (Fig. 22E-F). En contraste, en la evaluación histopatológica del área de implantación del andamio 9:1, el biomaterial y las células inflamatorias persisten. En este caso, las células inflamatorias incluyen linfocitos y células de Langhans. Sin embargo, el andamio implantado y el área de inflamación fueron más pequeña que la de la primera semana después del implante (Fig. 22D).

A la semana 8 después del implante, ninguno de los tres andamios de PLGA/Ge fueron observados y la reacción inflamatoria se eliminó (Fig 22G-I). En contraste, la astilla de madera continuó subdérmicamente y fue rodeada por células epitelioides y macrófagos (Fig. 22D). Lo mismo sucedió a la semana 12 pos- implante, ya no fue posible identificar los andamios ni inflamación, solo se apreció la cicatriz de dónde se colocó el biomaterial (Fig. 22J-L)

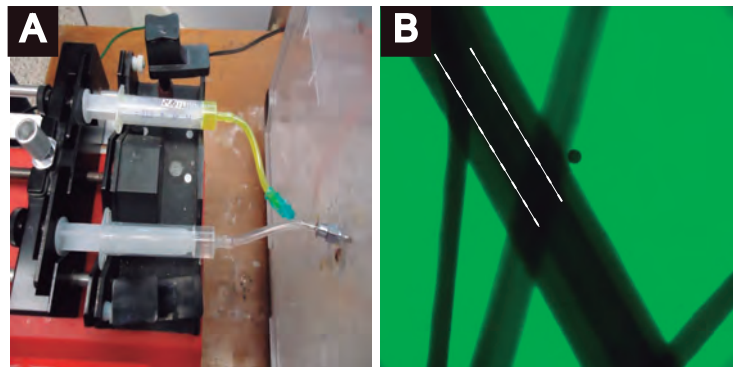
Por lo tanto, todos los andamios de PLGA/Ge examinados en este estudio fueron degradados y ninguno causó granulomas, induciendo sólo una reacción inflamatoria limitada. Estos resultados, sugieren que los andamios PLGA/Ge 7:3 y 5:5 exhibieron una más rápida degradación *in vivo* y una inflamación aguda de menor duración y por lo tanto, podrían ser usados de manera segura en tratamiento de heridas.



#### 4.4 Andamio funcionalizado con factores de crecimiento

Para incorporar los factores de crecimiento a las fibras se intentaron diferentes abordajes. De acuerdo con estudios previos, una de las maneras más efectivas de asegurar una protección a los factores y una liberación controlada de los mismos, es el electrohilado coaxial, en donde una fibra interna contiene el factor de crecimiento y es protegido por una fibra externa que deberá degradarse para que la molécula interna se pueda liberar.

Se implementó un dispositivo tratando de simular una jeringa coaxial, en donde dos jeringas en una misma bomba de inyección desembocarán en una sola aguja (Fig.23).



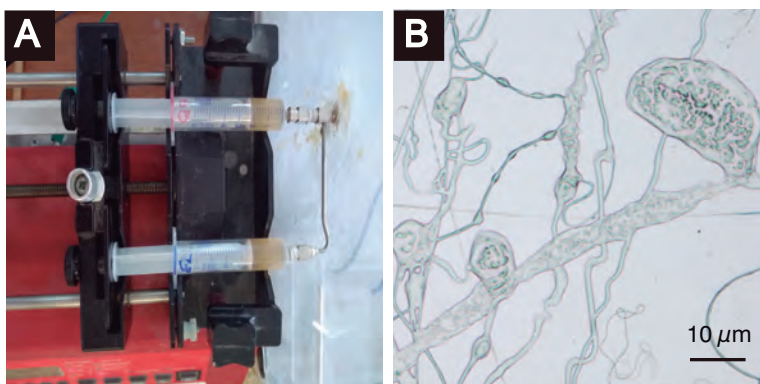
**Figura 23.** A) Dispositivo fabricado artesanalmente para la fabricación de fibras coaxiales y B) fotografía de fibras coaxiales obtenidas con este dispositivo. Con líneas punteadas está delimitada parte de la fibra interna.

Las fibras obtenidas fueron analizadas con Microscopía Electrónica de Transmisión para verificar si realmente se había formado una fibra interior y una exterior. De acuerdo con los resultados, en efecto fue posible evidenciar la formación de fibras coaxiales (Fig. 23B)

Sin embargo, la formación de fibras coaxiales con este dispositivo no era del todo eficiente ya que muy pocas de las fibras obtenidas guardaban esa doble estructura

fibrilar. Por otro lado, el dispositivo también presentaba fugas en la conexión de la jeringa y se perdía parte de la solución polimérica. Otra desventaja era que se necesitaba varios mililitros de solución polimérica con los factores para que se electrohilarán las fibras coaxiales.

Posteriormente, se utilizó una aguja coaxial comercial, eliminando las fugas y reduciendo la cantidad de solución a electrohilar. Sin embargo, se encontró con el inconveniente de que no se podía electrohilar a más de 5 kV debido a que todo el dispositivo era de metal (Fig. 24A) y se cargaba por completo produciendo chispas. De acuerdo con las condiciones de electrohilado establecidas para la obtención de fibras sencillas, era necesarios 10 kV que no se pudieron alcanzar con este dispositivo comercial.



**Figura 24.** A) Aguja coaxial Ramé-hart® y B) fibras obtenidas utilizando esta aguja. Nótese las fibras sencillas y con bulbos.

Por lo que las fibras electrohiladas con la aguja coaxial no eran homogéneas en su diámetro e inclusive algunas presentaban bulbos (Fig. 24B).

Considerando todas las limitantes, se optó por electrohilar en la misma solución de PLGA/Ge con los factores de crecimiento y monitorear que tan rápido se liberaban los

factores de crecimiento, porque sí bien es cierto que las fibras coaxiales guardaban una ventaja al liberar de manera controlada y sostenida los factores, para nuestra aplicación en lesiones cutáneas por el recambio de los apósitos quizás no era necesario que la liberación durará por muchas semanas. Finalmente, se electrohilaron las fibras funcionalizadas de PLGA/Ge 7:3 con FGFb a las condiciones de electrohilado ya establecidas anteriormente para esta proporción.

#### 4.4.1 Liberación del FGFb *in vitro*

Las absorbancias obtenidas de la curva de calibración con concentraciones conocidas del FGFb se graficaron para obtener la recta de regresión, la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), siendo éste último 0.99, muy cercano a 1, lo que indica que la mayoría de nuestros valores de absorbancia se ajustaron mucho a la recta y presentan una relación lineal. Las absorbancias obtenidas de los sobrenadantes de los andamios con FGFb a diferentes diluciones y tiempos de evaluación para ser sustituidos y despejados a partir de la ecuación de la recta para calcular la concentración de FGFb presentes en los sobrenadantes a las 6, 24 y 192 horas. La siguiente tabla indica las concentraciones de FGFb presentes en las muestras evaluadas

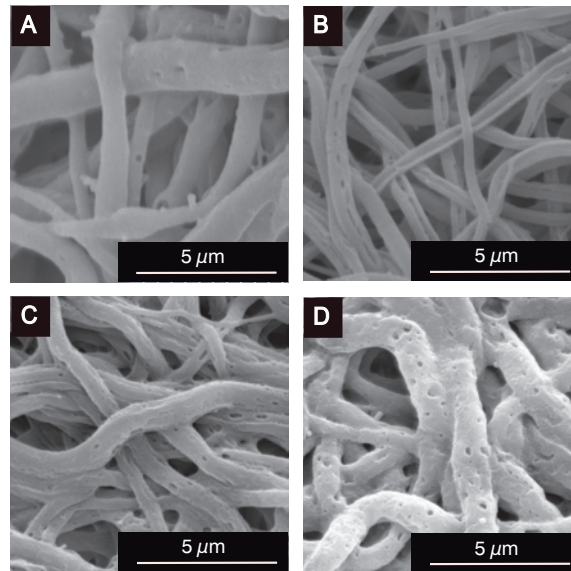
**Tabla 5.** Concentraciones de FGFb en sobrenadantes de andamio de PLGA/Ge 7:3 a 6,24 y 192 horas.

Horas	Dilución	Concentración de FGFb (ng)
6	1:200	--
24	1:10	--
24	1:200	20
192	1:10	--
192	1:200	1260

Con los resultados anteriores, es posible establecer la dilución en que se deben manejar los sobrenadantes a los diferentes días y conocer hasta que tiempo aún continúa liberándolos

#### 4.4.2 Morfología de las fibras durante la liberación de los factores

Los andamios de PLGA/Ge 7:3 funcionalizados con el factor de crecimiento FGFb sufrieron modificaciones en la superficie de las fibras evidenciando su degradación. La aparición de hoyos (Fig. 25) en las fibras desde los 2 primeros días de estar en incubación a 37°C en PBS mostró que mediante estos poros, el factor de crecimiento sea liberado al medio.



**Figura 25.** Fotomicrografías obtenidas por microscopía de barrido de morfología de las fibras de andamios de PLGA/Ge 7:3 funcionalizados con FGFb después de estar sumergidas en PBS a 37°C durante A)2, B)4, C)8 y D) 16 días. Nótese la cantidad y tamaño de hoyos en las fibras en cada uno de los días evaluados

Finalmente, electrohilar los andamios con PLGA proporción 50:50 (PLA/PGA) que presenta la menor tasa de degradación, combinarlo con gelatina, y no adicionar ningún tipo de entrecruzante, favoreció a que las fibras no se mantuvieran intactas y se asegure que el FGFb tenga por dónde ser liberado.

## 5 DISCUSIÓN

En la búsqueda de nuevas estrategias para la restauración de la funcionalidad de órganos o tejidos dañados, causados por accidentes o enfermedades, la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, en especial, el campo de los biomateriales ha mostrado un desarrollo importante al ofrecer soluciones acertadas y prácticas a este tipo de problemática. Ha sido una tarea en conjunto de distintas disciplinas trabajando en el diseño y la fabricación de andamios. De ahí que sea fundamental la caracterización de las propiedades de estas matrices de sostén con objeto de tener aquellas opciones que sean mejores para los fines que están destinadas. Por ello, es importante considerar de manera global todas las características (físicas, químicas y biológicas) que un andamio necesita de acuerdo con la aplicación deseada. Es decir, diseñar y fabricar un andamio teniendo en mente, desde el inicio, las características del tejido que se desea reparar. De ser posible, realizando a la par de la caracterización físico-química, pruebas biológicas básicas que un biomaterial necesita para ser considerado citocompatible para que, con base en esos resultados, se puedan realizar modificaciones a tiempo que optimicen las propiedades del mismo, o bien, encontrando otro tipo de aplicaciones para las cuales el andamio sea apto.

En este trabajo, se fabricaron andamios combinando polímeros naturales y sintéticos, justo para mejorar las propiedades de la matriz de sostén y se eligió a partir de tres proporciones de PLGA/Ge la más adecuada para el tratamiento de lesiones cutáneas con base a la caracterización completa del material y a partir de ahí funcionalizar ese andamio con FGFb para reducir el tiempo de reparación de las heridas.

Con respecto a la caracterización física de los andamios electrohilados de PLGA/Ge, se evaluó la morfología de los andamios. Se eligió la técnica de electrohilado debido a la



estructura fibrilar que presenta, permitiendo una mejor interconectividad y una mayor superficie de contacto, además de que este tipo de red de fibras se asemeja a la estructura que guarda la matriz extracelular. En algunos estudios se ha demostrado que las fibras de PLGA/Ge adicionadas con gelatina en andamios electrohilados redujeron sus diámetros [53, 74, 75] similar a nuestros resultados. Este efecto puede ser explicado por las características físicas de la gelatina debido a que, incrementando su concentración en solución, la viscosidad aumenta y a su vez la densidad de carga del chorro de solución polimérica que es eyectado se incrementa durante el proceso de electrohilado [30, 76]. Por otro lado, considerando únicamente las fibras hechas de PLGA en este estudio, éstas presentan diámetros de fibras distintos que las señaladas en otros trabajos siendo también de PLGA. Lo anterior pudiera atribuirse a dos factores: 1) la composición del PLGA en relación a la proporción de PGA:PLA con el que fueron fabricadas, su peso molecular y Odd la concentración de la solución polimérica; y 2) al tipo de colector en el que fueron depositadas las fibras. En este estudio, se empleó un PLGA con una proporción PLA:PGA de 50:50 respectivamente, mientras que los demás trabajos han sido electrohilados, PLGA con proporciones PLA:PGA de 85:15 y 75:25 [30, 53]. En nuestro caso, empleamos un colector plano y fijo y trabajos similares, usan colectores rotarios que modifican el diámetro de fibra debido a que se encuentran girando a ciertas revoluciones por minuto y eso repercute tanto en el diámetro como en la orientación de las fibras obtenidas [77-79].

Sin embargo, el contenido de gelatina no es el único factor que influye la morfología de las fibras. Por ejemplo, los parámetros de electrohilado, tales como la velocidad de flujo, la distancia aguja colector, el voltaje aplicado e inclusive la temperatura y la humedad relativa también podrían afectar la morfología de las fibras [80]. Con relación al tamaño

de poro, resultados previos de fibras de PLGA con diferentes proporciones de gelatina han reportado tamaños de poro aún menores [75] a los que encontramos ( $>10\mu\text{m}$ ), en donde las células han sido capaces de adherirse y proliferar sobre los andamios

La caracterización química mediante FTIR, evidenció que los espectros de los andamios de PLGA/Ge en sus diferentes proporciones, mantuvieron las bandas características del PLGA y gelatina como ya se había reportado en otros trabajos previos [30]. Dado que en el espectro obtenido de los andamios de PLGA/Ge no aparecieron nuevas bandas, estos resultados sugieren que ambos polímeros sólo se mezclaron físicamente lejos de haber formado un enlace químico. Lo anterior respalda el hecho de que no se utilizó ningún tipo de entrecruzante en la fabricación de estos andamios.

Con respecto al hinchamiento de los andamios, se encontró baja capacidad de absorción en las fibras de PLGA debido a su baja hidrofiliidad [81]. En contraste, cuando la gelatina fue adicionada a los andamios de PLGA, la capacidad de absorción aumentó. Este efecto es atribuido a los grupos aminos y carboxilos que tiene la estructura de la gelatina [30, 41]. Otros trabajos han mostrado resultados similares en comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio, lo que sugiere que mayores proporciones de gelatina aumentan la capacidad de hinchamiento. Ghorbani [82] sintetizó andamios que consistían en PLGA / Ge en una relación 8:2 y evaluó sus porcentajes de hinchamiento durante 7 horas, y los andamios alcanzaron un porcentaje de hinchamiento máximo del 260%. Hoveizi [74] mostró que los andamios PLA / Ge a una concentración de 7:3 alcanzaron un porcentaje de hinchamiento del 388% mientras que en nuestro caso para 7:3 fue de 354%. Sobre la explicación de que los andamios de PLGA/Ge 7:3 tuvieran un porcentaje de hinchamiento mayor que los de 5:5 puede

deberse a dos factores: la morfología /orientación de las fibras y el contenido de gelatina. Meng *et al.*[30] había mostrado que la orientación azarosa de las fibras tendía a presentar mayor capacidad de hinchamiento, pero dado que en el presente estudio no se utilizó un colector giratorio para alinear paralelamente las fibras y todas estaban depositadas aleatoriamente se puede sugerir que el diámetro de las fibras pudo haber repercutido en la capacidad de hinchamiento de los diferentes andamios. No obstante, los resultados obtenidos en la resonancia magnética mostraron que en los andamios de PLGA/Ge 5:5 se disuelve una mayor cantidad de gelatina en los sobrenadantes a comparación de los andamios PLGA/Ge 7:3 y PLGA/Ge 9:1. Con base a las micrografías de los andamios, las pruebas de hinchamiento y los datos del sobrenadante se evidencia que efectivamente el PLGA/Ge 7:3 hincha más porque hay mayor cantidad de gelatina permaneciendo en sus fibras que la que se disuelve. Además de que la presencia de hoyos o huecos en las fibras permite que el agua penetre y el hinchamiento sea mayor.

Una alta capacidad de absorción de agua es muy importante en los tratamientos de heridas ya que los andamios deben poder absorber el exudado [83]. Además, los andamios hinchados aseguran la supervivencia de las células sembradas en el biomaterial debido a la acumulación de nutrientes y humedad. En este sentido, se mostró que la relación PLGA / Ge de 7: 3 es la mejor proporción para la fabricación de andamios porque el andamio PLGA / Ge de 7: 3 mostró la mayor capacidad de absorción en el día 6. Por lo tanto, proponemos que el andamio PLGA / Ge 7: 3 podría usarse como tratamiento para heridas exudativas en pacientes.

Relacionado con la capacidad de absorción de agua de los andamios, está la mojabilidad de éstos de acuerdo con la naturaleza de su superficie: hidrofóbica o

hidrofilica. El PLGA es conocido por su relativa hidrofobicidad dependiendo de la proporción de PLA / PGA [81]. Por tal motivo, la adición de gelatina al PLGA mejoró la hidrofilicidad de los andamios debido a que ésta es hidrofílica, lo que probablemente se deba, como ya se mencionó antes, a la presencia de grupos funcionales amino y ácidos carboxílicos en la estructura de la gelatina [30, 41]. Así, la presencia de gelatina en los andamios redujo el ángulo de contacto y mejoró el carácter hidrofílico de los andamios. El método de esterilización UV/ozono que se empleó en este estudio, también pudo haber influido, en parte, en la hidrofilicidad presentada en los andamios. El tratamiento con UV/ozono modifica la superficie por la adición de grupos OH mejorando la hidrofilicidad del material y a su vez favoreciendo la adhesión celular [84]. Lavados con etanol al 70% fueron probados para esterilizar los andamios de PLGA/Ge sin embargo, los andamios se endurecían y encogían por lo que se descartó este método de esterilización. La exposición a UV/ozono brinda varias ventajas sobre otros métodos, como: 1) control preciso de las modificaciones de este método dependiendo del tiempo de exposición, 2) no es necesario el empleo de gases, solventes o soluciones y 3) no se requiere someter a altas temperaturas, por lo que se puede emplear para materiales inestables a estas condiciones [85]. Para esterilizar los andamios PLGA/Ge se expusieron con UV/ozono por 20 minutos, en este sentido, una manera de conocer los efectos de este tratamiento en nuestros andamios, podría ser el comparar los ángulos de contacto antes y después de la esterilización con el propósito de determinar si 20 minutos de exposición modifican significativamente el ángulo de contacto.

Estudios previos también encontraron el mismo comportamiento que se observó en nuestro estudio; donde la gelatina disminuye el ángulo de contacto y aumenta la hidrofilicidad [55, 75, 79]. Ghorbani [82] demostró que los andamios de PLGA mejoran

la viabilidad y la proliferación celular al agregar gelatina. Ángulos de contacto bajos, aumentan la mojabilidad y mejoran la biocompatibilidad; por lo tanto, la hidrofiliidad es una característica importante de los andamios porque si un andamio permite el crecimiento, la migración, la adhesión y la diferenciación de las células en su superficie, es un material útil para la ingeniería de tejidos [86].

Los andamios PLGA / Ge 7: 3 y 5: 5 (v / v) mostraron mejores características de mojabilidad que los andamios PLGA / Ge 9: 1 (v / v) y PLGA en condiciones secas ya que, en la condición húmeda, todos los andamios presentaron ángulos de contacto menores a 60°.

Es importante destacar que, de acuerdo con la revisión bibliográfica que se realizó, no hay estudios previos que hayan reportado valores de ángulo de contacto en húmedo, que es justo la condición en que las células interaccionaran con el andamio en cultivo y en situaciones clínicas. En este estudio, las condiciones secas y húmedas fueron comparadas simulando las situaciones en las que el andamio puede ser utilizado. Sólo los andamios PLGA / Ge 7: 3 y 5: 5 (v / v) fueron altamente hidrofílicos en ambas condiciones; por lo tanto, podrían usarse inmediatamente con éxito para tratar heridas crónicas de la piel.

La caracterización térmica incluyó la estabilidad de los andamios, en donde se encontró que la gelatina disminuyó la temperatura de descomposición de estos; sin embargo, ese decremento de temperatura fue por arriba de 300° C lo cual no representa ningún riesgo para que los andamios pueden ser aplicados clínicamente, ya que se mantienen estables a la temperatura corporal fisiológica.

En los análisis de calorimétrica diferencial de barrido, se enfocó únicamente a la determinación de la temperatura de transición vítrea que nos indica la temperatura a la

cual se presenta un cambio de conformación, debido a que ésta puede tener un efecto en la mecánica y degradación de los biomateriales. La Tg obtenida (47.69 °C) para PLGA coincide con la temperaturas reportadas previamente [87, 88] que la ubican entre los 40-60 °C. Para la Tg de los andamios en las diferentes proporciones de PLGA/Ge (47-43 °C), no encontramos trabajos que las hayan evaluado antes, sin embargo, se observó una ligera disminución en la temperatura de transición vítrea por la adición de la gelatina, que se encuentra cercana pero mayor a los 37 °C. En el caso de la Tg de la gelatina, hay gran disparidad en lo que se ha publicado. Mukherjee y cols [89] indicó que la Tg se encuentra entre los 77-80 °C y que el tipo de portamuestra utilizado influye bastante en la Tg encontradas, ya que generalmente no es posible visualizarla en los termogramas en este rango debido a la mayoría de los portamuestras que se usan dejan escapar material y lo único que se aprecia en ese rango, es la pérdida de agua. Sin embargo, otros estudios reportan una Tg de 191.2 °C y de 217 °C [90, 91], valor más parecido a los que se obtuvieron en este estudio (196.34 °C).

Con respecto a la caracterización mecánica, en las pruebas uniaxiales se observó que el módulo de Young se incrementó con la adición de gelatina en la condición seca mientras que en la húmeda disminuyó con una mayor proporción de este polímero natural. En la evaluación con indentación, los valores para el módulo de Young, son mucho menores a los obtenidos con la primera prueba, debido a la escala en que se realizó la medición. Los resultados de esta prueba mostraron gran variabilidad y no hay una tendencia tan clara relacionada al contenido de gelatina. Lo anterior se atribuye a la naturaleza fibrilar de los andamios en donde *per se* tenemos diferente tamaño de poro y diferentes diámetros de fibras además de una disposición aleatoria de las fibras,

que finalmente es con lo que está en contacto la punta con la que se realiza la prueba de indentación.

Existen pocos trabajos que consideran la evaluación en húmedo, sin embargo, las propiedades mecánicas en condiciones húmedas son necesarias e importantes porque las cubiertas cutáneas absorben agua y las propiedades mecánicas de los andamios de PLGA / Ge son diferentes en estado seco que en estado húmedo.

De acuerdo con diferentes estudios [92-94], la piel humana tiene una amplia gama de valores de módulo de Young, que dependen de varios factores, como la edad y la raza del paciente, la ubicación anatómica de la piel, las condiciones ambientales y el método de medición. Las propiedades mecánicas, particularmente el módulo de Young, son características esenciales para la biocompatibilidad. Las células son capaces de detectar el microambiente mecánico y modificar su comportamiento [95, 96]. Por lo tanto, los andamios deben ofrecer una superficie adecuada las células y conservar la integridad estructural y la estabilidad dimensional cuando los médicos manejen e implanten los andamios en el sitio dañado del huésped. Después del implante, un andamio en la lesión debe proporcionar suficiente soporte mecánico durante el proceso de regeneración tisular y degradación [97].

Jansen y Rottier [92] informaron sobre el módulo de Young para la piel humana en la región abdominal que oscila entre 2.9 y 54 MPa. Ni et al. [93] informaron valores de módulo de Young entre 15 y 150 MPa para diferentes regiones anatómicas del cuerpo humano, y Kalra et al. [98] encontraron que los valores del módulo de Young varían de 4-15 MPa o 14-100 MPa de acuerdo con la velocidad utilizada para realizar la prueba. Lo anterior respalda los factores ya mencionados a los que se debe la variación de estos valores. Teniendo en cuenta estos valores del módulo de Young reportados en la

literatura, está claro que los andamios PLGA / Ge pueden ser candidatos mecánicamente útiles para tratamientos cubiertas cutáneas.

La degradación de los andamios de PLGA/Ge fue evidenciada por cambios en la morfología de las fibras. En este caso, se observó una fusión de fibras, reportada en ciertas condiciones, como cuando el PLGA tiene un peso molecular bajo o cuando la temperatura usada para pruebas de degradación está próxima o supera la temperatura de transición vítrea (Tg) del polímero[99]. La temperatura en la que se realizó la prueba de degradación fue a 37 °C, la Tg del PLGA, como ya se había mencionado antes, fue de 47.69 °C y el peso molecular del PLGA fue de 38000-54000 g/mol. Los resultados obtenidos sugieren que la morfología fusionada de las fibras es debida a la proximidad de la Tg a la temperatura en que se llevó a cabo la degradación, no obstante, las fibras también se observaron más próximas una de la otra.

Sin embargo, no sólo la fusión de fibras fue el único efecto de la degradación de los andamios. También aparecieron hoyos en las fibras que se atribuyeron al contenido de gelatina de los andamios y su característica hidrofílica, que resulta en una alta solubilidad de la gelatina, evidenciada en los sobrenadantes con el análisis de resonancia magnética nuclear ya mostrado.

El encogimiento fue otra consecuencia de la degradación [99]. El encogimiento de los andamios fue probablemente debido a la relajación inducida térmicamente de las cadenas amorfas estiradas. Se ha observado que la relajación de las cadenas de polímeros provoca un encogimiento sustancial de la red de fibras electrohiladas. Durante este encogimiento, el diámetro de la fibra aumenta y la porosidad disminuye, dando como resultado una disminución en el área de contacto entre las fibras fundidas y el agua. En consecuencia, la tasa de degradación disminuye. Es posible que la tasa de



degradación podría ser menor debido a que el área de contacto entre las fibras y el agua fue limitada. Los resultados mencionados anteriormente pueden explicar por qué se observó que las fibras de los andamios tenían un diámetro mayor y, por lo tanto, una distancia menor entre las fibras que cuando las fibras estaban secas.

La degradación de los andamios implicó pérdida de peso de estos. De acuerdo con los resultados, un alto contenido de PLGA, que es un polímero hidrófobo y presenta una capacidad de absorción de agua reducida, induce una degradación hidrolítica muy limitada. Por lo que los andamios con proporciones de gelatina elevadas mostraron una mayor pérdida de peso porque eran más hidrófilos y absorbían más agua, lo que daba como resultado una mayor tasa de solubilización de la gelatina.

Existen factores que influyen en el proceso de degradación, como la composición del polímero y el pH del medio de degradación. En este estudio, utilizamos PLGA con una relación PLA / PGA de 50:50, y se ha demostrado que esta composición presenta una degradación más rápida que otros copolímeros de PLGA con diferentes proporciones de PLA / PGA [32]. Además, el PLGA utilizado para la fabricación de los andamios tiene extremos ácido carboxílico libres que mejoran la velocidad de degradación en comparación con PLGA con grupos terminales éster [100]. La disminución gradual del pH puede atribuirse a la formación de productos de degradación ácidos a partir de PLGA [32]. Estudios anteriores han indicado que la tasa de degradación aumenta en medios ácidos; sin embargo, las tasas más rápidas se han observado a pH 5 [101, 102]. En el presente estudio, el pH del PBS fue 7.4 antes de la prueba de degradación y se mantuvo por encima de pH 6 hasta la cuarta semana; sin embargo, este pH no fue suficiente para acelerar el tiempo de degradación y lograr una degradación completa. En condiciones *in vitro*, el medio de cultivo tiene un pH de 7.2 a 7.4, y el medio se cambia cada 2 o 3 días

para garantizar la viabilidad celular. *In vivo*, el cuerpo humano tiene un tampón biológico que regula y mantiene todos los fluidos en condiciones fisiológicas (pH = 7.4).

Con base a todos los resultados, los andamios de PLGA y PLGA / Ge 9: 1 no son favorables para su uso en ensayos clínicos, especialmente en tratamientos para heridas en la piel debido al alto nivel de contracción en una solución acuosa y baja tasa de degradación. En contraste, los andamios con altas proporciones de gelatina (PLGA / Ge 7: 3 y 5.5) mostraron altos índices de degradación y bajos niveles de encogimiento. Por lo tanto, es posible que los andamios de PLGA / Ge 7: 3 puedan ser útiles como dispositivos médicos para cubrir heridas crónicas debido a su tasa de degradación intermedia y bajo grado de encogimiento.

Finalmente, la caracterización biológica de los andamios de PLGA/Ge contempló pruebas tanto *in vitro* (citocompatibilidad) como *in vivo* (biocompatibilidad).

Con relación a las primeras, el primer parámetro evaluado fue la adhesión celular. Algunos estudios han demostrado que la adhesión celular puede ser regulada a través de la hidrofiliidad o hidrofobicidad de los andamios [103, 104]. Además, el tamaño de poro es otro factor que influye en la adhesión. Andamios con poros mayores a 100  $\mu\text{m}$  limitan la adhesión celular debido a los espacios entre las paredes de las fibras que las células tienen que cubrir. Lowery [105] reportó que el diámetro de poro adecuado para la adhesión y el crecimiento celular está 10-100  $\mu\text{m}$ . Los andamios 9:1, 7:3 y 5:5 mostraron tener distancia entre fibras menores a 10  $\mu\text{m}$ , CTM fueron capaces de adherirse a la superficie de los andamios. Nuestros resultados fueron similares a los registrados por Lowery, quien demostró que un tamaño de poro de 6-20  $\mu\text{m}$  facilitan la adhesión de fibroblastos a andamios electrohilados. La gelatina es un derivado de colágena, por lo tanto, presenta motivos formados por aminoácidos de arginina-glicina-

ácido aspártico (RGD), la cual es un ligando para integrinas localizadas en varias células, incluyendo las CTM [65]. Además, el reconocimiento de los motivos RGD por integrinas es necesario para la formación de tejidos y órganos y es también importante para la migración, crecimiento, proliferación, supervivencia y diferenciación de las células [106].

La viabilidad y proliferación son rasgos considerados para evaluar la citocompatibilidad. En este sentido, Son et al [55] estudiaron la proliferación celular en andamios tubulares en tres proporciones de PLGA/Ge. Ellos encontraron que los andamios con altas proporciones de gelatina aumentaban la proliferación en comparación con el de proporción más baja [55]. Nuestros resultados fueron similares porque los andamios con mayor cantidad de gelatina 7:3 y 5:5 tuvieron la proliferación más alta que los andamios de PLGA y PLGA/Ge 9:1. Como antes se mencionó, la gelatina posee motivos RGD para la adhesión que mejora la proliferación [107], por lo que la gelatina puede ser empleada como una estrategia disponible para el desarrollo experimental en ingeniería de tejidos. El estudio de la viabilidad y proliferación de células sembradas en andamios poliméricos es esencial para conocer la factibilidad de un andamio en el desarrollo de tejidos y órganos *in vitro*. Durante la caracterización biológica de un andamio, ensayos de viabilidad, proliferación y adhesión celular *in vitro* son indispensables para determinar la citocompatibilidad de un material, lo que dará la pauta para continuar con la caracterización biológica *in vivo* o no. En los ensayos *in vitro* antes señalados, cabe mencionar los posibles efectos que pudieran presentarse en los resultados por la presencia de vesículas extracelulares en el suero fetal de bovino con el cual es suplementado el medio de cultivo. Estas vesículas cargadas con proteínas y/o ARN pueden ser absorbidas por las células cultivadas y causar efectos en la viabilidad y

migración. Sin embargo, existen algunas alternativas para evitar esta contaminación, por ejemplo, la ultracentrifugación y el uso de medios libres de suero. En este trabajo, las condiciones de cultivo de las células sobre los andamios de PLGA/Ge fueron las mismas en las que se llevaron los controles cultivados sobre plástico, y no se observaron alteraciones con relación a la viabilidad y proliferación celular. Lo anterior sugiere, el efecto de los andamios sobre las células se debe a las propiedades del andamio y no a las condiciones de cultivo.

La biocompatibilidad de los andamios incluye la reacción de un organismo cuando interactúa con un material ajeno. La inflamación es uno de los mecanismos de defensa que el cuerpo desencadena durante una lesión o invasión. La presencia de células epiteloideas son características de granuloma y las células de Langhans son observadas habitualmente en las reacciones a cuerpo extraño induciendo la reparación de una lesión [108]. Los tres tipos de andamios a las tres diferentes proporciones de PLGA/Ge provocaron una reacción a cuerpo extraño en ratas. Sin embargo, la reacción a cuerpo extraño ha sido observada también en otros implantes experimentales, por ejemplo el ácido hialurónico, en pacientes de cirugías plásticas [109]

La reacción inflamatoria cesará hasta que la lesión sea reparada o el material externo haya sido eliminado. Los resultados obtenidos del implante, mostraron la degradación de los andamios más rápido a los observados en las pruebas de degradación *in vitro*. En este sentido, es necesario considerar que en un ambiente *in vivo*, la presencia de enzimas y células inflamatorias son capaces de acelerar el proceso de degradación de los andamios. Por otra parte, se ha demostrado que los andamios fabricados con PLGA

toman más tiempo en ser degradados que los que están contruidos con polímeros naturales [110]

Se ha mostrado que las células inflamatorias son responsables de la degradación de materiales implantados en la piel y que promueven la reparación de heridas. El andamio de PLGA/Ge 9:1 tomó más tiempo en ser degradado por el alto contenido de PLGA comparado con las proporciones 7:3 y 5:5. Ha sido reportada la vida media del PLGA aproximadamente de 3 meses en experimentos de degradación *in vitro*. De acuerdo a nuestros resultados, los andamios de PLGA/Ge 9:1, 7:3 y 5:5 produjeron inflamación en la primera semana pos-implante, reacción característica y frecuentemente observada cuando se realizan pruebas de biocompatibilidad. Sin embargo, sólo los andamios a concentraciones de 7:3 y 5:5 fueron completamente degradados a la cuarta semana, indicando que ambas son más biocompatibles que la 9:1. Este resultado, sugiere que los andamios PLGA/Ge 7:3 y 5:5 exhibieron una más rápida degradación *in vivo* que causa una inflamación aguda y, por lo tanto, podrían ser usados de manera segura en tratamiento de heridas.

Al considerar los resultados de la caracterización física, química y biológica de los andamios a diferentes proporciones de PLGA/Ge, se determinó que los andamios de PLGA/Ge 7:3 mostraron las mejores propiedades y fue a estas fibras a las que se les incorporó el FGFb. Uno de los aspectos que se consideró para liberación del factor de crecimiento, fue la degradación del andamio ya que se tenía que asegurar que el FGFb fuese liberado desde la primera semana en que estuviera en cultivo y aplicado en una herida. La morfología de las fibras evidenció que las fibras presentaban la aparición de

hoyos desde el segundo día de incubación en PBS. Tal evidencia, indicó que el factor tenía el medio por el cual ser liberado.

Finalmente, mediante la prueba de ELISA se analizaron los sobrenadantes donde estaban los andamios funcionalizados con FGFb y se determinó que las fibras electrohiladas estaban liberando de manera gradual el factor de crecimiento a lo largo de y hasta 8 días en contraste con otros trabajos en donde los factores de crecimiento se liberan rápidamente durante las primeras horas [111].

La incorporación de factores de crecimiento a un andamio es una estrategia de funcionalización que confiere varias ventajas al material. En primer lugar, da la opción al andamio de poder ser aplicado con células o sin ellas. Si el andamio es celular, los factores de crecimiento y las células sembradas potenciarían el efecto en la reparación tisular. Las células que pudieran ser sembradas en el andamio podrían ser fibroblastos o células troncales mesenquimales, en el caso de las segundas se tendría que considerar el tiempo para diferenciarlas en fibroblastos y las condiciones de cultivo para mantener este fenotipo en particular. Mientras que sí el andamio es acelular, el número de días para obtener las biopsias, aislar y cultivar disminuiría, además de que los andamios están libres de cualquier resto de suero fetal bovino que pudiera traer efectos adversos. También se abate el riesgo de rechazo en caso de ser células heterólogas o riesgo de hipersensibilidad por restos de componentes de origen animal con que pudieran haber estado en contacto durante el cultivo. El tiempo de espera para tener el andamio listo si el andamio es acelular y solo cuenta con los factores de crecimiento incorporados, su manipulación y almacenaje son más fáciles lo que representa una

ventaja para su aplicación, considerando que los pacientes se encuentran con la urgencia de ser atendidos.

## **6 CONCLUSIONES**

Se construyeron y caracterizaron los andamios de PLGA/Ge fabricados mediante electrohilado en las proporciones 9:1, 7:3 y 5:5 (v/v). La gelatina influyó en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los andamios. El promedio de diámetro de las microfibras disminuyó con la adición de la gelatina en los andamios de PLGA. Los andamios de PLGA/Ge incrementaron su módulo de Young en función del contenido de gelatina en condiciones secas mientras que, en condiciones húmedas, sucedió lo contrario.

Incrementando el contenido de gelatina, aumentó la hidrofiliidad y la capacidad de absorción de los andamios indicando que los andamios podrían ser útiles para el tratamiento de heridas cutáneas con exudado de moderado a severo. Las pruebas biológicas mostraron que los andamios en sus diferentes proporciones (9:1, 7:3 y 5:5) no fueron tóxicos y las CTM fueron viables y proliferaron en todos los andamios. Sin embargo, sólo en la proporción 7:3 se observó la más alta proliferación al día 1, 3 y 5. La tasa de degradación aumentó con el contenido de gelatina en los andamios tanto *in vitro* como *in vivo*. Los andamios de PLGA/Ge 7:3 y 5:5 fueron degradados completamente en la cuarta semana y sin inflamación. En contraste, los andamios 9:1 persistieron y produjeron una inflamación aguda por más de 4 semanas. Considerando las características físicas, químicas y biológicas, el andamio con la proporción 7:3 PLGA/Ge es el mejor candidato para uso como una cubierta cutánea en tratamiento de heridas crónicas potenciando su acción con la incorporación de factor

de crecimiento que se liberan hasta por 8 días para una más rápida reparación de heridas cutáneas.

## **7 PERSPECTIVAS**

La caracterización del andamio de PLGA/Ge puede ser complementada si se analiza a fondo el efecto de los andamios funcionalizados con dos factores de crecimiento a nivel *in vitro* e *in vivo*. Por lo que las perspectivas de este trabajo son:

1. Incorporar el factor de crecimiento epidérmico, además del FGFb en los andamios PLGA/Ge 7:3.
2. Determinar la cinética de liberación del FGFb y del EFG, monitoreando desde las primeras horas hasta más de una semana.
3. Sembrar con fibroblastos los andamios con FGFb y EGF y analizar su proliferación con el objetivo de corroborar que los factores después del proceso de electrohilado mantienen su bioactividad.
4. Aplicar los andamios funcionalizados con EGF y FGFb en ratas con una lesión cutánea y evaluar el tiempo de cicatrización con respecto a los andamios que contengan sólo EFG, sólo FGFb, ambos y aquellos que no contengan factores de crecimiento, así como comparándolos con una cubierta cutánea disponible comercialmente.



## 8 LITERATURA CITADA

- [1] Mosteller R 1987 Simplified calculation of body surface area *N Engl J Med* **317** 1098
- [2] Sontheimer R D 2014 Skin is not the largest organ *The Journal of investigative dermatology* **134** 581
- [3] Brohem C A, da Silva Cardeal L B, Tiago M, Soengas M S, de Moraes Barros S B and Maria-Engler S S 2011 Artificial skin in perspective: concepts and applications *Pigment Cell & Melanoma Research* **24** 35-50
- [4] Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R and Car J 2016 Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review *Systematic Reviews* **5** 152
- [5] Gómez Ayala A E 2008 Úlceras vasculares. Factores de riesgo, clínica y prevención *Farmacia Profesional* **22** 33-8
- [6] del Castillo Tirado R-A, López J A F and del Castillo Tirado F J 2015 *Guía de práctica clínica en el pie diabético*: iMedPub)
- [7] Stegensek Mejía E, Jiménez Mendoza A, Romero Gálvez L and Aparicio Aguilar A 2015 Úlceras por presión en diversos servicios de un hospital de segundo nivel de atención *Enfermería universitaria* **12** 173-81
- [8] Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R and Car J 2017 The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review *Systematic Reviews* **6** 15
- [9] G. F R and Jaminelli B 2015 Challenges in the Treatment of Chronic Wounds *Advances in Wound Care* **4** 560-82
- [10] Barrera Arenas J E, Pedraza Castañeda M d C, Pérez Jiménez G, Hernández Jiménez P, Reyes Rodríguez J A and Padilla Zárate M P 2016 Prevalencia de úlceras por presión en un hospital de tercer nivel, en México DF *Gerokomos* **27** 176-81
- [11] Sánchez-Cruz L Y, Martínez-Villarreal A A, Lozano-Platonoff A, Cárdenas-Sánchez A and Contreras-Ruiz J 2017 Epidemiología de las úlceras cutáneas en Latinoamérica *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana* **44** 183-97
- [12] Moctezuma-Paz L E, Páez-Franco I, Jiménez-González S, Miguel-Jaimes K D, Foncerrada-Ortega G, Sánchez-Flores A Y, González-Contreras N A, Albores-de la Riva N X and Nuñez-Luna V 2015 Epidemiología de las quemaduras en México *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* **20**
- [13] Guimarães Barbosa J A and Nogueira Campos L M 2010 Directrices para el tratamiento de úlcera venosa *Enfermería Global* **0-**
- [14] Pradhan S, Rajamani S, Agrawal G, Dash M and Samal S K 2017 *Characterization of Polymeric Biomaterials*, ed M C Tanzi and S Farè: Woodhead Publishing) pp 147-73
- [15] Metcalfe A D and Ferguson M W J 2007 Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration *Journal of the Royal Society, Interface* **4** 413-37
- [16] Damanhuri M, Boyle J and Enoch S 2011 Advances in tissue-engineered skin substitutes *Wounds Int* **2** 27-34
- [17] Langer R and Vacanti J 1993 Tissue engineering *Science* **260** 920-6
- [18] Polykandriotis E, Popescu L M and Horch R E 2010 Regenerative medicine: then and now—an update of recent history into future possibilities *J Cell Mol Med* **14** 2350-8
- [19] serrato Ochoa D, Aguilar R N and Méndez A A Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa Tissue engineering. A new discipline in regenerative medicine
- [20] Morrison J I 2014 Editing our way to regeneration *Cell and tissue research* **356** 533-7
- [21] Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S and Kenny J M 2010 Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review *Polymer Degradation and Stability* **95** 2126-46

- [22] Liu S-J, Kau Y-C, Chou C-Y, Chen J-K, Wu R-C and Yeh W-L 2010 Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing *Journal of Membrane Science* **355** 53-9
- [23] Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T and Kumar D S 2011 Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review *International journal of polymer science* **2011**
- [24] Sánchez L D, Rodríguez L and López M 2013 Electrospinning: La era de las nanofibras *Revista Iberoamericana de polímeros* **14** 10-27
- [25] Fang J, Wang X and Lin T 2011 *Functional applications of electrospun nanofibers*: InTech–Open Access Publisher)
- [26] Elahi M F, Lu W, Guoping G and Khan F 2013 Core-shell fibers for biomedical applications—A review *J. Bioeng. Biomed. Sci* **3** 1-14
- [27] Sill T J and von Recum H A 2008 Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering *Biomaterials* **29** 1989-2006
- [28] Ladd M R, Hill T K, Yoo J J and Lee S J 2011 *Nanofibers-Production, Properties and Functional Applications*: InTechOpen)
- [29] Wang X, Ding B and Li B 2013 Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering *Materials Today* **16** 229-41
- [30] Meng Z X, Wang Y S, Ma C, Zheng W, Li L and Zheng Y F 2010 Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering *Materials Science and Engineering: C* **30** 1204-10
- [31] Irani S, Hedayati M, Mohammad Atyabi S, Mahdi Saeed S, Salamian N and Zandi M 2013 A comparative study of cell behavior on PLGA, gelatin and PLGA/gelatin scaffolds *Nano Bulletin* **2**
- [32] Makadia H K and Siegel S J 2011 Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier *Polymers* **3** 1377-97
- [33] Hoque M E, Nuge T, Yeow T K, Nordin N and Prasad R 2015 Gelatin based scaffolds for tissue engineering-a review *Polymers Research Journal* **9** 15
- [34] Hulmes D J S 2008 *Collagen: Structure and Mechanics*, ed P Fratzl (Boston, MA: Springer US) pp 15-47
- [35] Malafaya P B, Silva G A and Reis R L 2007 Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications *Advanced Drug Delivery Reviews* **59** 207-33
- [36] Erenca M, Cano F, Tornero J A, Fernandes M M, Tzanov T, Macanás J and Carrillo F 2015 Electrospinning of gelatin fibers using solutions with low acetic acid concentration: Effect of solvent composition on both diameter of electrospun fibers and cytotoxicity *Journal of Applied Polymer Science* **132**
- [37] Gorgieva S and Kokol V 2011 *Biomaterials applications for nanomedicine*: IntechOpen)
- [38] Norouzi M, Shabani I, Ahvaz H H and Soleimani M 2015 PLGA/gelatin hybrid nanofibrous scaffolds encapsulating EGF for skin regeneration *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **103** 2225-35
- [39] Enrione J, Osorio F, López D, Weinstein-Oppenheimer C, Fuentes M A, Ceriani R, Brown D I, Albornoz F, Sánchez E, Villalobos P, Somoza R A, Young M E and Acevedo C A 2010 *Characterization of a Gelatin/Chitosan/Hyaluronan scaffold-polymer*
- [40] Morsy R, Hosny M, Reicha F and Elnimr T 2017 Developing a potential antibacterial long-term degradable electrospun gelatin-based composites mats for wound dressing applications *Reactive and Functional Polymers* **114** 8-12
- [41] Aldana A A and Abraham G A 2017 Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications *International Journal of Pharmaceutics* **523** 441-53
- [42] Rose J B, Pacelli S, Haj A J E, Dua H S, Hopkinson A, White L J and Rose F R A J 2014 Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering *Materials* **7** 3106-35

- [43] Huang Z-M, Zhang Y Z, Ramakrishna S and Lim C T 2004 Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers *Polymer* **45** 5361-8
- [44] Sajkiewicz P and Kołbuk D 2014 Electrospinning of gelatin for tissue engineering – molecular conformation as one of the overlooked problems *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **25** 2009-22
- [45] Zhang Y Z, Venugopal J, Huang Z M, Lim C T and Ramakrishna S 2006 Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers *Polymer* **47** 2911-7
- [46] Zhang Y, Ouyang H, Lim C T, Ramakrishna S and Huang Z-M 2005 Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **72B** 156-65
- [47] Zeugolis D I, Khew S T, Yew E S Y, Ekaputra A K, Tong Y W, Yung L-Y L, Hutmacher D W, Sheppard C and Raghunath M 2008 Electro-spinning of pure collagen nano-fibres – Just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials* **29** 2293-305
- [48] Choi S M, Lee K-M, Kim H J, Park I K, Kang H J, Shin H-C, Baek D, Choi Y, Park K H and Lee J W 2018 Effects of structurally stabilized EGF and bFGF on wound healing in type I and type II diabetic mice *Acta Biomaterialia* **66** 325-34
- [49] Akita S, Akino K, Yakabe A, Tanaka K, Anraku K, Yano H and Hirano A 2010 Basic fibroblast growth factor is beneficial for postoperative color uniformity in split-thickness skin grafting *Wound Repair and Regeneration* **18** 560-6
- [50] Garcia-Orue I, Pedraz J L, Hernandez R M and Igartua M 2017 Nanotechnology-based delivery systems to release growth factors and other endogenous molecules for chronic wound healing *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **42** 2-17
- [51] Welham N V, Montequin D W, Tateya I, Tateya T, Choi S H and Bless D M 2009 A rat excised larynx model of vocal fold scar *Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR* **52** 1008-20
- [52] Akita S, Akino K and Hirano A 2013 Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing *Advances in wound care* **2** 44-9
- [53] Meng Z X, Xu X X, Zheng W, Zhou H M, Li L, Zheng Y F and Lou X 2011 Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **84** 97-102
- [54] Hu J, Wei J, Liu W and Chen Y 2013 Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a drug delivery system by emulsion electrospinning *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **24** 972-85
- [55] Son S R, Franco R A, Bae S H, Min Y K and Lee B T 2013 Electrospun PLGA/gelatin fibrous tubes for the application of biodegradable intestinal stent in rat model *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **101B** 1095-105
- [56] Garnica-Palafox I M and Sánchez-Arévalo F M 2016 Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels *Carbohydrate Polymers* **151** 1073-81
- [57] Sánchez-Arévalo F, Muñoz-Ramírez L, Álvarez-Camacho M, Rivera-Torres F, Maciel-Cerda A, Montiel-Campos R and Vera-Graziano R 2017 Macro- and micromechanical behaviors of poly(lactic acid)-hydroxyapatite electrospun composite scaffolds *Journal of Materials Science* **52** 3353-67
- [58] Cui M, Liu L, Guo N, Su R and Ma F 2015 Preparation, Cell Compatibility and Degradability of Collagen-Modified Poly(lactic acid) *Molecules* **20** 595
- [59] Montesinos J, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzmán P, Hernández-Estévez E, Fajardo-Orduña G, Orozco S and Mayani H 2009 Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression *Cytotherapy* **11** 163-76

- [60] Chang H-I and Wang Y 2011 Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. In: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, ed D Eberli: IntechOpen)
- [61] Meng Z X, Zheng W, Li L and Zheng Y F 2011 Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold *Materials Chemistry and Physics* **125** 606-11
- [62] Cristallini C, Cibrario Rocchietti E, Gagliardi M, Mortati L, Saviozzi S, Bellotti E, Turinetto V, Sassi M P, Barbani N and Giachino C 2016 Micro- and Macrostructured PLGA/Gelatin Scaffolds Promote Early Cardiogenic Commitment of Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro *Stem Cells International* **2016** 16
- [63] Mazaki T, Shiozaki Y, Yamane K, Yoshida A, Nakamura M, Yoshida Y, Zhou D, Kitajima T, Tanaka M, Ito Y, Ozaki T and Matsukawa A 2014 A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering *Scientific Reports* **4** 4457
- [64] McDonald C C and Phillips W D 1967 Manifestations of the tertiary structures of proteins in high-frequency nuclear magnetic resonance *Journal of the American Chemical Society* **89** 6332-41
- [65] Agrawal G, Negi Y S, Pradhan S, Dash M and Samal S K 2017 *Characterization of Polymeric Biomaterials*, ed M C Tanzi and S Farè: Woodhead Publishing) pp 57-81
- [66] Rahman M, Dey K, Parvin F, Sharmin N, Khan R A, Sarker B, Nahar S, Ghoshal S, Khan M A, Billah M M, Zaman H U and Chowdhury A M S 2011 Preparation and Characterization of Gelatin-Based PVA Film: Effect of Gamma Irradiation *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **60** 1056-69
- [67] Palacios J, Albano C, González G, Castillo R V, Karam A and Covis M 2013 Characterization and thermal degradation of poly(d,l-lactide-co-glycolide) composites with nanofillers *Polymer Engineering & Science* **53** 1414-29
- [68] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D and Horwitz E 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement *Cytotherapy* **8** 315-7
- [69] Suto E G, Mabuchi Y, Suzuki N, Suzuki K, Ogata Y, Taguchi M, Muneta T, Sekiya I and Akazawa C 2017 Prospectively isolated mesenchymal stem/stromal cells are enriched in the CD73+ population and exhibit efficacy after transplantation *Scientific Reports* **7** 4838
- [70] Hendrickx A and Bossuyt X 2001 Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies *Cytometry* **46** 336-9
- [71] Tytherleigh L, Taparia M and Leahy M F 2001 Detection of hairy cell leukaemia in blood and bone marrow using multidimensional flow cytometry with CD45-PECy5 and SS gating *Clinical & Laboratory Haematology* **23** 385-90
- [72] McGrath J L 2007 Cell Spreading: The Power to Simplify *Current Biology* **17** R357-R8
- [73] Gentile P, Chiono V, Carmagnola I and Hatton P 2014 An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering *International Journal of Molecular Sciences* **15** 3640
- [74] Hoveizi E, Nabiuni M, Parivar K, Rajabi-Zeleti S and Tavakol S 2014 Functionalisation and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering *Cell Biology International* **38** 41-9
- [75] Mehrasa M, Asadollahi M A, Ghaedi K, Salehi H and Arpanaei A 2015 Electrospun aligned PLGA and PLGA/gelatin nanofibers embedded with silica nanoparticles for tissue engineering *International Journal of Biological Macromolecules* **79** 687-95
- [76] Kwon I K and Matsuda T 2005 Co-Electrospun Nanofiber Fabrics of Poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) with Type I Collagen or Heparin *Biomacromolecules* **6** 2096-105

- [77] Sadeghi-Avalshahr A, Nokhasteh S, Molavi A M, Khorsand-Ghayeni M and Mahdavi-Shahri M 2017 Synthesis and characterization of collagen/PLGA biodegradable skin scaffold fibers *Regenerative Biomaterials* **4** 309-14
- [78] Sadeghi-avalshahr A R, Khorsand-Ghayeni M, Nokhasteh S, Molavi A M and Naderi-Meshkin H 2016 Synthesis and characterization of PLGA/collagen composite scaffolds as skin substitute produced by electrospinning through two different approaches *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **28** 14
- [79] Sadeghi A R, Nokhasteh S, Molavi A M, Khorsand-Ghayeni M, Naderi-Meshkin H and Mahdizadeh A 2016 Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes *Materials Science and Engineering: C* **66** 130-7
- [80] Berteau A, Manea L R, Popa A and Berteau A 2017 The Influence of Process Parameters on the Characteristics of Electrospun 3D Nanostructures *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **209** 012074
- [81] Erbetta C D A C, Alves R J, Resende J M, de Souza Freitas R F and de Sousa R G 2012 Synthesis and characterization of poly (D, L-lactide-co-glycolide) copolymer *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **3** 208
- [82] Ghorbani F, Nojehdehyan H, Zamanian A, Gholipourmalekabadi M and Mozafari M 2016 Synthesis, physico-chemical characteristics and cellular behavior of poly (lactic-co-glycolic acid)/ gelatin nanofibrous scaffolds for engineering soft connective tissues *Advanced Materials Letters* **7** 163-9
- [83] Castellanos-Ramirez D K, Gonzalez-Villordo D and Gracia-Bravo L J 2014 Manejo de heridas *Cirujano general* **36** 112-20
- [84] Samsudin N, Hashim Y Z H-Y, Arifin M A, Mel M, Salleh H M, Sopyan I and Jimat D N 2017 Optimization of ultraviolet ozone treatment process for improvement of polycaprolactone (PCL) microcarrier performance *Cytotechnology* **69** 601-16
- [85] Clark T, Ruiz J D, Fan H, Brinker C J, Swanson B I and Parikh A N 2000 A New Application of UV-Ozone Treatment in the Preparation of Substrate-Supported, Mesoporous Thin Films *Chemistry of Materials* **12** 3879-84
- [86] Tzoneva R, Faucheux N and Groth T 2007 Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1770** 1538-47
- [87] Astete C E and Sabliov C M 2006 Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **17** 247-89
- [88] Silva A T C R, Cardoso B C O, e Silva M E S R, Freitas R F S and Sousa R G 2015 Synthesis, characterization, and study of PLGA copolymer in vitro degradation *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **6** 8
- [89] Mukherjee I and Rosolen M 2013 Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **114** 1161-6
- [90] Fakirov S, Cagiao M, Baltá Calleja F, Sapundjieva D and Vassileva E 1999 Melting of gelatin crystals below glass transition temperature: a direct crystal-glass transition as revealed by microhardness *International Journal of Polymeric Materials* **43** 195-206
- [91] Sobral P J d A, Habitante A and Monterrey-Quintero E S 2003 Effect of the conditioning time on gelatin phase transitions *Brazil Journal Food Technol* **6** 327-31
- [92] Jansen L and Rottier P 1958 Some mechanical properties of human abdominal skin measured on excised strips *Dermatology* **117** 65-83
- [93] Ní Annaidh A, Bruyère K, Destrade M, Gilchrist M D and Otténio M 2012 Characterization of the anisotropic mechanical properties of excised human skin *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **5** 139-48
- [94] Xu F and Lu T 2011 *Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg) pp 87-104

- [95] Draghi L 2017 *Characterization of Polymeric Biomaterials*, ed M C Tanzi and S Farè: Woodhead Publishing) pp 177-202
- [96] Xu F and Lu T 2011 *Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg) pp 105-54
- [97] Li W J, Laurencin C T, Caterson E J, Tuan R S and Ko F K 2002 Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* **60** 613-21
- [98] Kalra A, Lowe A and Al-Jumaily A 2016 Mechanical Behaviour of Skin: A Review *Journal of Material Sciences & Engineering* **5**
- [99] Dong Y, Liao S, Ngiam M, Chan C K and Ramakrishna S 2009 Degradation Behaviors of Electrospun Resorbable Polyester Nanofibers *Tissue Engineering Part B: Reviews* **15** 333-51
- [100] Deplaine H, Acosta-Santamaría V A, Vidaurre A, Gómez Ribelles J L, Doblaré M, Ochoa I and Gallego Ferrer G 2014 Evolution of the properties of a poly(L-lactic acid) scaffold with double porosity during in vitro degradation in a phosphate-buffered saline solution *Journal of Applied Polymer Science* **131**
- [101] Alexis F 2005 Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly (lactic acid) and poly [(lactic acid)-co-(glycolic acid)] *Polymer International* **54** 36-46
- [102] Pan Z and Ding J 2012 Poly (lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine *Interface focus* **2** 366-77
- [103] Kim C H, Khil M S, Kim H Y, Lee H U and Jahng K Y 2006 An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **78B** 283-90
- [104] Khalili A and Ahmad M 2015 A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications *International Journal of Molecular Sciences* **16** 18149
- [105] Lowery J L, Datta N and Rutledge G C 2010 Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) fibrous mats *Biomaterials* **31** 491-504
- [106] Sousa A, Neves S C, Gonçalves I C and Barrias C C 2017 *Characterization of Polymeric Biomaterials*, ed M C Tanzi and S Farè: Woodhead Publishing) pp 285-315
- [107] Davidenko N, Schuster C F, Bax D V, Farndale R W, Hamaia S, Best S M and Cameron R E 2016 Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **27** 148
- [108] Anderson J M, Rodriguez A and Chang D T 2008 Foreign body reaction to biomaterials *Seminars in Immunology* **20** 86-100
- [109] Lemperle G, Morhenn V and Charrier U 2003 Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation *Aesthetic plastic surgery* **27** 354-66
- [110] Ulery B D, Nair L S and Laurencin C T 2011 Biomedical Applications of Biodegradable Polymers *Journal of polymer science. Part B, Polymer physics* **49** 832-64
- [111] King W J and Krebsbach P H 2012 Growth factor delivery: how surface interactions modulate release in vitro and in vivo *Advanced drug delivery reviews* **64** 1239-56

## **9 APÉNDICE (ARTÍCULO REQUISITO PARA OBTENCIÓN DE GRADO)**

PAPER

## Influence of the PLGA/gelatin ratio on the physical, chemical and biological properties of electrospun scaffolds for wound dressings

To cite this article: Nadia Vázquez *et al* 2019 *Biomed. Mater.* **14** 045006

View the [article online](#) for updates and enhancements.



**IOP | ebooks™**

Bringing you innovative digital publishing with leading voices to create your essential collection of books in STEM research.

Start exploring the collection - download the first chapter of every title for free.



# Biomedical Materials



## PAPER


# Influence of the PLGA/gelatin ratio on the physical, chemical and biological properties of electrospun scaffolds for wound dressings

RECEIVED  
28 January 2019

REVISED  
2 April 2019

ACCEPTED FOR PUBLICATION  
8 April 2019

PUBLISHED  
7 May 2019

Nadia Vázquez<sup>1</sup>, Francisco Sánchez-Arévalo<sup>2</sup>, Alfredo Maciel-Cerda<sup>2</sup>, Itzel Garnica-Palafox<sup>2</sup>, Rodrigo Ontiveros-Tlachi<sup>1</sup>, Casandra Chaires-Rosas<sup>1</sup>, Gabriela Piñón-Zarate<sup>1</sup>, Miguel Herrera-Enríquez<sup>1</sup>, Mathieu Hautefeuille<sup>3</sup> , Ricardo Vera-Graziano<sup>2</sup> and Andrés Castell-Rodríguez<sup>1,4</sup> 

<sup>1</sup> Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, C.P. 04510, México

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, Ciudad de México, C.P. 04510, México

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad de México, C.P. 04510, México

<sup>4</sup> Author to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: [castell@unam.mx](mailto:castell@unam.mx)

**Keywords:** gelatin, scaffolds, electrospinning, chronic wounds, PLGA, tissue engineering

## Abstract

Chronic wounds are a global health problem, and their treatments are difficult and long lasting. The development of medical devices through tissue engineering has been conducted to heal this type of wound. In this study, it was demonstrated that the combination of natural and synthetic polymers, such as poly (D-L lactide-co-glycolide) (PLGA) and gelatin (Ge), were useful for constructing scaffolds for wound healing. The aim of this study was to evaluate the influence of different PLGA/gelatin ratios (9:1, 7:3 and 5:5 (v/v)) on the physical, chemical and biological properties of electrospun scaffolds for wound dressings. These PLGA/Ge scaffolds had randomly oriented fibers with smooth surfaces and exhibited distances between fibers of less than 10  $\mu\text{m}$ . The 7:3 and 5:5 PLGA/Ge scaffolds showed higher swelling, hydrophilicity and degradation rates than pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds. Young's moduli of the scaffolds were  $72 \pm 10$ ,  $48 \pm 6$ ,  $58 \pm 6$  and  $6 \pm 1$  MPa for the pure PLGA scaffold and the 9:1, 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds, respectively. Mesenchymal stem cells (MSCs) seeded on all the PLGA/Ge scaffolds were viable, and the cells were attached to the fibers at the different analyzed timepoints. The most significant proliferation rate was observed for cells on the 7:3 PLGA/Ge scaffolds. Biocompatibility analysis showed that all the scaffolds produced inflammation at the first week postimplantation; however, the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds were degraded completely, and there was no inflammatory reaction observed at the fourth week after implantation. In contrast, the 9:1 PLGA/Ge scaffolds persisted in the tissue for more than four weeks; however, at the eighth week, no traces of the scaffolds were found. In conclusion, the scaffolds with the 7:3 PLGA/Ge ratio showed suitable physical, chemical and biological properties for applications in chronic wound treatments.

## 1. Introduction

Currently, chronic wounds in humans have become an important worldwide health issue. Chronic wounds are the main complication in diabetic patients and can lead to limb amputation. The Wound Healing Society has classified this type of lesion as follows: pressure, neurotrophic and ischemic ulcers [1]. Chronic wounds have increased significantly worldwide, affecting a vast population. According to statistics, 1%–2% of people worldwide experience a chronic wound during their lives [1, 2]. In developed countries, the incidence of chronic wounds

ranges between 2%–6%, and in developing countries, the incidence has increased significantly from 12% to 41% [3, 4]. Autografts, allografts and xenografts have been reported as treatments for chronic wounds; however, there is a high risk of infection and immune rejection [5]. To address these issues, skin substitutes have been obtained through tissue engineering approaches [6]. However, it remains necessary to conduct research on tissue engineering alternatives for skin healing to benefit people who suffer chronic wounds.

Electrospinning is a technique that has been broadly used for the production of scaffolds in tissue

engineering. Due to its versatility, electrospinning is used to obtain fibers with different features; for instance, ordered, randomized, single or coaxial fibers based on single or multiple polymers can be readily prepared [7]. According to their characteristics, synthetic and natural polymers can be electrospun, and each polymer provides distinctive qualities to scaffolds; however, when natural and synthetic polymers are electrospun together, the characteristics of both polymers are enhanced, resulting in the development of suitable scaffolds for tissue engineering applications. Therefore, the combination of synthetic and natural polymers has become an alternative to obtain desirable properties for fabricating scaffolds that are used in diverse tissue engineering applications [8]. One of the most effective synthetic/natural polymer combinations is based on poly (D-L lactide-co-glycolide) (PLGA) and gelatin (Ge) [9].

PLGA is a synthetic, biocompatible and biodegradable polymer approved by the US Food and Drug Administration (FDA). This copolymer has been used in the biomedical field because of its mechanical properties [10] and its fine-tuned degradation ability based on the PLA:PGA ratio, and it does not generate toxic products [9]. However, cell adhesion on PLGA needs to be improved [11]. The cell adhesion ability of PLGA can be enhanced by combining PLGA with a natural polymer such as the collagen derivative Ge. Gelatin is a denaturalized form of collagen, the principal constituent of the extracellular matrix, and is an excellent alternative because it has suitable biocompatibility and biodegradability properties and has RGD motifs and other integrin recognition ligands that induce cellular adhesion [12, 13]. Furthermore, the main advantages of using Ge instead of collagen are its cheaper cost although they have similar low antigenicity [14–16]. Therefore, the addition of Ge to PLGA scaffolds improves the hydrophilicity and cell affinity [17]. Recent studies have demonstrated that the combination of natural and synthetic polymers enhances the hydrophilicity and degradation rate, optimizing the physical, chemical and biological properties of the scaffolds obtained for tissue engineering applications [18–21]. In addition, PLGA/Ge electrospun scaffolds have been produced for repairing different tissues, such as cartilage [22], bone [23], bowel [24], soft connective structures [25], and for drug delivery applications. [26, 27].

Although significant research has been conducted on PLGA/Ge electrospun scaffolds and their applications, only one study has focused on wound healing, in which one solution of PLGA with epidermal growth factor and another solution of Ge were electrospun separately and deposited on the same collector [28]. Furthermore, there has been a comparative study between PLGA, Ge and PLGA/Ge (1:1) electrospun scaffolds evaluating the viability and proliferation of fibroblasts; however, the physical and chemical properties and the *in vivo* biocompatibility characteristics

of scaffolds have not been fully explored and correlated [29]. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of PLGA/gelatin ratios on the physical, chemical and biological properties, including the *in vivo* biocompatibility of electrospun scaffolds for wound dressings.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Poly (D-L lactide-co-glycolide) (PLGA) with a molecular weight range between 38 000 and 54 000 g mol<sup>-1</sup> and a lactide:glycolide ratio of 50:50 was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Type B gelatin powder from bovine skin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used in this study. Gelatin is highly water soluble, but it can be modified by blending with other materials or crosslinked to slow its degradation rate. In the present study, PLGA and Ge were blended in the absence of a crosslinker to increase the degradation rate because the PLGA degradation time is approximately 1–2 months [30]. Hexafluoro-2-propanol (HFIP) was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and was used to synthesize the electrospun mats. Phosphate-buffered saline (PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F12 Ham, fetal bovine serum (FBS) and penicillin-streptomycin were obtained from Bio West. Additionally, trypsin and ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) from Gibco and Merck, respectively, were also used in the cell culture procedures. Finally, a LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit (for mammalian cells) and PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific) were used to evaluate the biological properties of the scaffolds.

### 2.2. Scaffold preparation by electrospinning

PLGA (18% w/v) and gelatin (10% w/v) solutions were prepared with HFIP by magnetic stirring for 36 h. Different ratios of PLGA/Ge solutions (9:1, 7:3 and 5:5 (v/v)) were obtained by mixing them by magnetic stirring for 24 h. Pure PLGA, 9:1, 5:5 (v/v) PLGA/Ge and pure gelatin solutions were electrospun separately using a 5 ml plastic syringe with a stainless steel blunt-end 21-gauge needle that was located 10 cm away from the collector. In addition, the flow rates of the solutions and the applied potential were set at 0.3 ml h<sup>-1</sup> and 10 kV, respectively. Furthermore, for the 7:3 (v/v) PLGA/Ge solution, the tip of the needle was located 20 cm away from the collector, the flow rate was set at 1 ml h<sup>-1</sup>, and a 10 kV voltage was applied to the system to avoid bead formation.

### 2.3. Scaffold characterization

#### 2.3.1. Fiber morphology

The morphology of the PLGA/Ge scaffolds was analyzed by a scanning electron microscope (JEOL model JSM-7600F) with an accelerating voltage of

20 kV. All samples were coated with gold using a sputter coater (JEOL JFC-1100). Fiber diameters and the distance between fibers were analyzed by digital image analysis using ImageJ software. Two hundred fibers were randomly selected from a series of images at the same magnification, and the diameters of pure PLGA and PLGA/Ge scaffold fibers were measured. To determine the distance between the fibers, SEM images were analyzed using ImageJ software. Three different images at 1000 $\times$  magnification for each type of material were used to estimate the distance between the fibers on first plane. These measurements included 100 different random fields on each image to obtain the average distance between fibers.

### 2.3.2. FTIR spectroscopy

The chemical characteristics of the pure PLGA and PLGA/Ge scaffolds were analyzed using attenuated total reflection (ATR)-FTIR spectroscopy with a Thermo Nicolet NEXUS 670 FTIR spectrophotometer. The spectra were obtained in the range of 500–4000  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  and an average of 32 scans.

### 2.3.3. Swelling ratio

The water absorption ability of the scaffolds was determined by the swelling ratio of the scaffolds [31]. Briefly, the scaffolds were cut into circles with a 0.7 cm diameter and weighed under dry conditions. All scaffolds were immersed in an Eppendorf tube with 1 ml of PBS at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 12 d, except pure gelatin scaffolds. It is noteworthy that these scaffolds tend to be completely dissolved in an aqueous solution. Thus, the experiments that involve hydrated conditions were not possible to be conducted on pure gelatin scaffolds.

Wet scaffolds were removed from the tubes, and excess PBS was removed from the samples with filter paper. Next, each scaffold was weighed. The assessed time points of swelling ratio test were 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 24, 48, 72, 144, 168, 192, 216 and 240 h. The swelling ratio was calculated according to the following equation:

$$\text{swelling ratio(\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} * 100, \quad (1)$$

where  $W_d$  is the initial weight (dry condition), and  $W_s$  is the wet weight of the sample. Each swelling experiment was repeated three times.

### 2.3.4. Nuclear magnetic resonance (NMR)

NMR samples were the supernatants of pure PLGA, pure gelatin and PLGA/Ge scaffolds after they were immersed in PBS for 3 h. 500  $\mu\text{l}$  of supernatant of each scaffold was mixed with 1 ml deuterium oxide (water- $\text{d}_2$  D2O) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).  $^1\text{H}$  spectra were obtained at 400 MHz on a Bruker Avance III. Tetramethylsilane (TMS) was used as internal reference. NMR analyses were conducted to observe

the presence of gelatin into the supernatants which were obtained from the swelling test after 3 h.

### 2.3.5. Contact angle

The hydrophilicity of the scaffolds was determined by contact angle measurements. A Rame-Hart Inc. model 100-07-00 contact angle goniometer, which can capture up to 25 images per second, was used. A drop of deionized water (0.5  $\mu\text{l}$ ) was carefully deposited onto the surface of the pure PLGA and PLGA/Ge scaffolds. Image acquisition was initiated 1 s before the drop was dispensed; therefore, the precise moment when the drop was dispensed on the scaffold was imaged. Then, the critical angles were determined using the drop analysis plugin in the ImageJ software. Five samples of each type of scaffold were used for the measurements in dry and wet conditions. For the wet condition, the scaffolds were immersed in PBS until swelling equilibrium was achieved (72 h for the pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds and 144 h for the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds), and the contact angle measurements were then conducted for this condition.

### 2.3.6. Thermal stability

Thermal stability was determined by thermogravimetric analysis (TGA 5000, TA Instruments, USA). The Ge, PLGA and PLGA/Ge (9:1, 7:3 and 5:5) electrospun scaffolds were cut using a circular jig to obtain samples with a diameter of 5 mm. Then, each sample was encapsulated in a platinum-HT pan. The thermal stability and decomposition rate of the scaffolds was evaluated under a mass flow rate of 25  $\text{ml min}^{-1}$  of dried nitrogen at a temperature rate of 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . The thermal spectra were analyzed using TA Instruments universal Analysis 2000 software.

### 2.3.7. Mechanical testing

The mechanical properties of the scaffolds were determined by uniaxial tensile tests using a custom-designed minitester according to previously reported protocols [31, 32]. Rectangular strips (1  $\times$  3 cm) from the pure PLGA and PLGA/Ge electrospun scaffolds were used as tensile specimens. The thickness of each sample was measured along three different points using a Mitutoyo micrometer (model MDC-1-SXF) to obtain an average measurement for the thicknesses of the samples. Each specimen was fixed between grips and tested at a crosshead speed of 0.16  $\text{mm s}^{-1}$  to acquire displacement and force data. Five samples of each type of scaffold were analyzed under dry and wet conditions. The wet samples were prepared by immersion in PBS in accordance with the critical swelling times that were determined by the swelling test for the pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds (72 h) and the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds (144 h). Stress versus strain curves were determined using the acquired data. Finally, Young's modulus was obtained

by linear square fitting, and the average Young's modulus was reported for each scaffold.

### 2.3.8. *In vitro* degradation

Degradation of the scaffolds was analyzed by the weight loss percentage method [33]. The scaffolds were cut into circles with a diameter of 0.7 cm and then weighed under dry conditions to obtain the initial weight ( $W_i$ ). Subsequently, the pure PLGA and PLGA/Ge scaffolds were placed into a 48-well plate containing 2 ml of PBS as degradation medium in each well and incubated at 37 °C for different amounts of time (1, 2, 3 and 4 weeks). PBS (pH = 7.4) was used to simulate physiological conditions. Weekly, the samples were washed and dried in a vacuum oven at room temperature for 24 h and were then weighed again to measure the final weight ( $W_f$ ). Finally, using equation (2), the weight percentage was determined for each scaffold in triplicate as follows:

$$\text{weight loss(\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_f} * 100. \quad (2)$$

Additionally, degradation medium was recovered each week, and pH measurements were conducted using a pH meter (Model 7, Corning).

### 2.4. Cell culture and phenotype characterization of MSCs

Mesenchymal stem cells (MSCs) from Wharton's jelly were isolated from explants seeded on complete medium. All samples were donated from patients with prior informed consent from the General Hospital in Tlahuac, which is managed by the Mexico City Government. First, the umbilical cord was cut into 5 cm fragments in length, and blood vessels were removed. Then, the tissue was cut into 1 cm<sup>2</sup> squares. The explants were cultured in DMEM-F12 medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was replaced every 2 d, and after 2 weeks of culture, the explants were removed. MSCs were cultured until reaching approximately 80% confluence, and the cells were detached with 0.05%/0.02% trypsin/EDTA.

To corroborate whether the obtained cells were MSCs, the cells were stained with the following antibodies: anti-CD73-Cy5, anti-CD105-Cy5 and anti-CD45-Cy5 (BD Biosciences, San Diego, CA) [34]. The samples were evaluated on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software.

To seed the PLGA/gelatin scaffolds with MSCs, the scaffolds were cut into circles with a 0.7 cm diameter and sterilized by UV/ozone radiation (UV Ozone ProCleaner™, Bioforce Nanosciences) for 10 min on each side. The samples were placed in 48-well culture plates. MSCs were seeded onto the scaffolds with a density of 26 000 cells cm<sup>-2</sup> and

maintained in culture for 1, 3 and 5 d for *in vitro* biological analyses.

### 2.5. Cell attachment

MSCs attachment was observed by field emission scanning electron microscopy (FSEM, model JEOL JSM-7600F). After 3 d in culture, the scaffolds seeded with MSCs were washed twice with PBS to remove unattached cells. Then, the cells were fixed using 2.5% glutaraldehyde solution for 1 h. The scaffolds were dehydrated with ethanol solutions with a series of different concentrations (20, 40, 60, 80, 90, and 100% v/v) for 10 min for each concentration. Finally, the samples were coated with gold for 90 s and characterized by FSEM.

### 2.6. Cytotoxicity and proliferation

The viability and proliferation of MSCs were evaluated with a live/dead cytotoxicity kit (Thermo Fisher Scientific) and PrestoBlue® (Thermo Fisher Scientific), respectively. Cell-seeded scaffolds were washed with PBS to remove the culture medium. To analyze cell viability, the samples were incubated with calcein AM and ethidium homodimer for 1 h. Live cells were stained green with calcein, while dead cells were stained red with ethidium. Then, the samples were washed with PBS and analyzed under a fluorescence microscope (NIKON, Eclipse 80i). The total number of cells (live and dead) was counted with ImageJ software. The viability ratio was calculated according to equation (3) as follows:

$$\text{viability ratio} = \frac{\text{live cells}}{\text{live cells} + \text{dead cells}}. \quad (3)$$

For the cell proliferation assay, the scaffolds were incubated with PrestoBlue reagent for 1 h, and then, supernatants were placed into 96-well plates. The absorbance of the content in each well was measured at a wavelength of 570 nm using a spectrophotometric plate reader (Thermo Multiskan Ascent Type 354). For both assays, scaffolds without cells were considered the negative controls, and MSCs seeded in plastic flasks were considered the positive control. Each experiment was conducted three times.

### 2.7. Subcutaneous implantation of the PLGA/gelatin scaffolds

To evaluate the biocompatibility of the scaffolds, subcutaneous implantation analysis was approved by the Commission of Ethics and Research of the Faculty of Medicine, UNAM (project 125/2017). All animals were handled according to the Official Mexican Norm NOM 062-200-199. Subcutaneous implantation analysis was performed in 9 male Wistar rats (weighing 300 g). The rats were divided into four groups ( $n = 3$ ) according to their evaluation time (1, 4 and 8 weeks). Inhaled anesthesia (2.5%–5.5% isoflurane) was administered before implantation. To identify the experimental groups, each animal was individually labeled



before it was treated with anesthesia. The rat dorsum was shaved, and aseptic procedures were performed. Five dermal incisions were made (1.5 cm each) as follows: three on the right side and two on the left side. Three experimental PLGA/Ge scaffolds (9:1, 7:3, and 5:5 v/v; circular implants; diameter: 7 mm; height: 0.2 mm) were implanted in the right side of the dorsum. On the right side, in one incision, a small wood splinter (5 mm) was implanted as a positive control for inflammation. The last incision was a sham control (no scaffold was implanted). All wounds were sutured with thread made composed of polyglycolic acid (PGA) (Atramat).

## 2.8. Histological evaluation

After implantation of the PLGA/Ge scaffolds, biopsies were obtained at 1, 4 and 8 weeks. Tissues were fixed in 4% formaldehyde, dehydrated in ethanol solutions, embedded in paraffin and sectioned into thin slices with a thickness of 5  $\mu\text{m}$  for histological evaluation. Finally, histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and further analyzed by optical microscopy.

## 2.9. Statistical analysis

Experimental data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Each experiment was conducted three times, except for the mechanical testing and contact angle measurements, where five independent experiments were performed. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test, and differences were considered statistically significant when  $P \leq 0.05$ .

# 3. Results and discussion

## 3.1. Scaffold characterization

### 3.1.1. Fiber morphology

Pure PLGA, pure gelatin, and PLGA/Ge scaffolds prepared with three different ratios (9:1, 7:3 and 5:5 v/v) consisted of fibers with smooth surfaces and an absence of bead defects (figures 1(A)–(D)). All samples contained randomly oriented fibers that formed interconnected mats. The fiber diameter decreased when gelatin was added to the PLGA scaffold. The average fiber diameters of the PLGA, PLGA/Ge (9:1), PLGA/Ge (7:3) and PLGA/Ge (5:5) and gelatin scaffolds were  $2.1 \pm 0.4$ ,  $0.5 \pm 0.2$ ,  $1.7 \pm 0.7$  and  $1.3 \pm 0.5$  and  $0.9 \pm 0.2$   $\mu\text{m}$ , respectively. In other studies, the addition of gelatin to electrospun scaffolds has been shown to reduce the diameter of the fibers [10, 26, 35], similar to our results. As mentioned above, this effect may be explained by the physical characteristics of Ge, increasing its concentration, and the viscosity of the polymeric solution decreased and the charge density of the jet increased during the electrospinning process [23, 36]. However, the Ge ratio was not a unique factor that influenced the fiber morphology. Additionally,

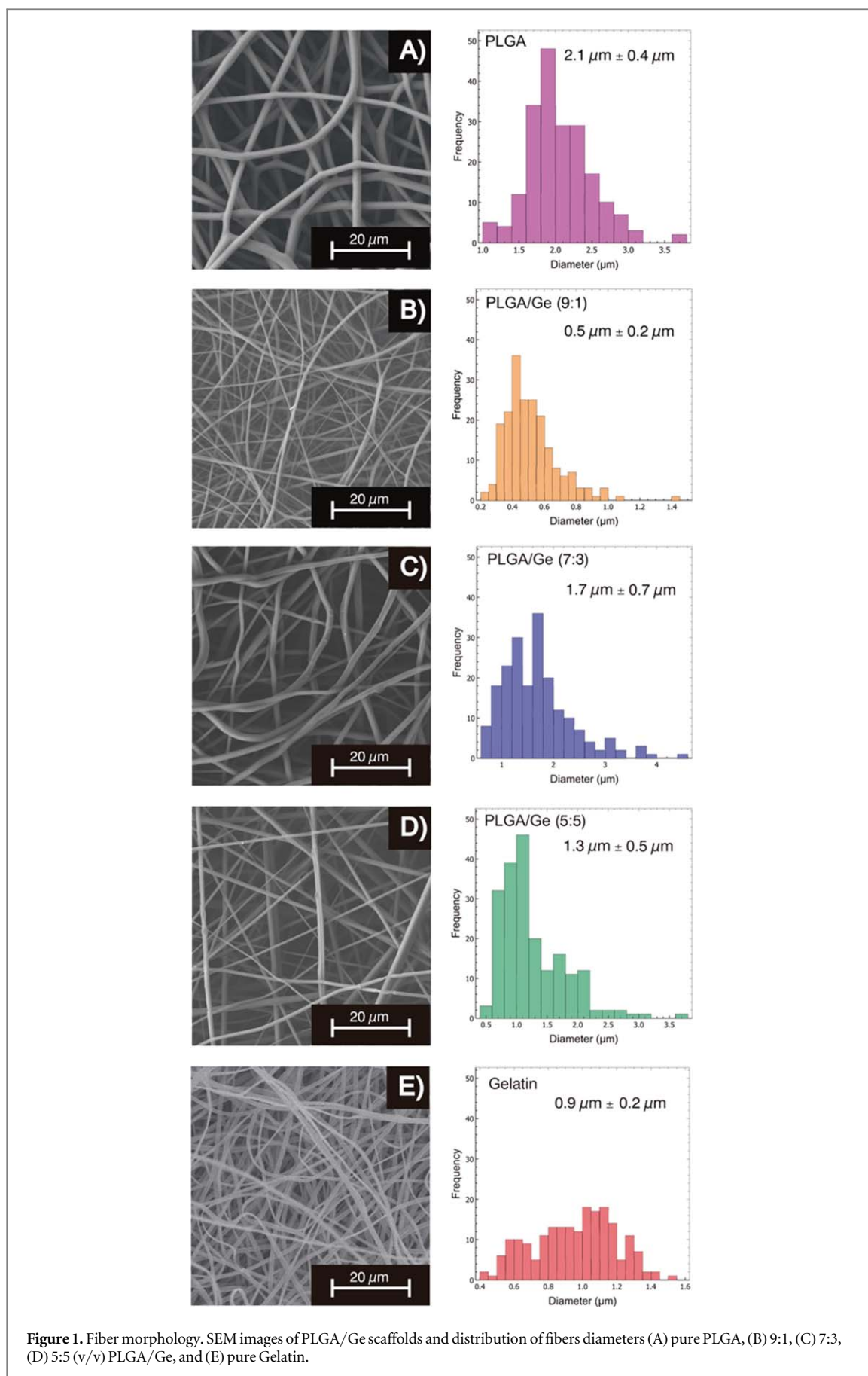
other electrospinning parameters, such as the flow rate, distance from the collector, applied voltage, room temperature and relative humidity, could affect the fiber morphology [37].

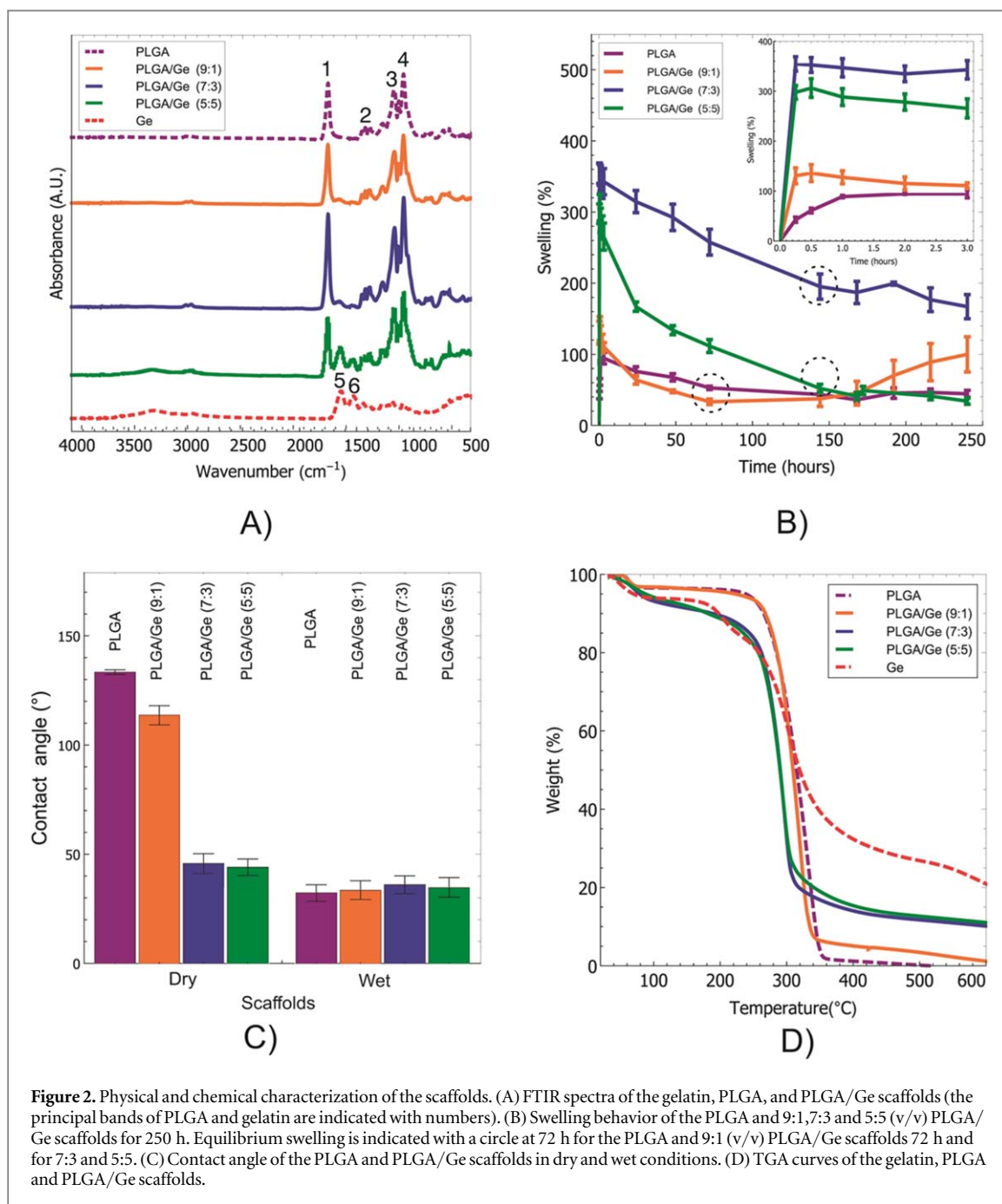
In particular, the diameter of the 7:3 (v/v) PLGA/Ge scaffold fibers was greater than that of the 5:5 scaffold fibers due to the electrospinning conditions (voltage, distance between the syringe and the collector and flow rate), which were different from those used in the manufacturing of the pure PLGA scaffolds and the 9:1 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds that were investigated. In the case of the 7:3 (v/v) PLGA/Ge scaffolds, the flow rate and distance to the collector were changed to avoid bead formation. In addition, the differences in PLGA and fiber diameters with other reports could be due to the PLGA and the drum employed. In this study, PLGA 50:50 (PGA:PLA ratio) and a fixed collector were used; in contrast, other reports used PLGA 85:15 or 75:25 and a rotating drum for collecting fibers [23, 26, 38–40].

Additionally, the distance between the fibers was apparently insufficient ( $>10$   $\mu\text{m}$ ) to allow the migration of cells into the fiber network. The distance between the fibers was considered the greatest distance between superficial fibers in each type of scaffold. The average distances between the fibers for each scaffold were  $8.9 \pm 2.4$   $\mu\text{m}$  for PLGA,  $3.1 \pm 0.1$   $\mu\text{m}$  for PLGA/Ge (9:1),  $6.3 \pm 0.1$   $\mu\text{m}$  for PLGA/Ge (7:3),  $6.8 \pm 0.2$   $\mu\text{m}$  for PLGA/Ge (5:5) and  $2.6 \pm 1.4$   $\mu\text{m}$  for gelatin. However, previous results of PLGA fibers with different gelatin ratios have reported smaller pore sizes [35] than those observed in our scaffolds; nonetheless, cells were able to attach and proliferate on the scaffolds.

### 3.1.2. Functional group analysis by FTIR spectroscopy

FTIR analysis of biomaterials was used to determine the chemical functional groups present in the scaffolds. Some functional groups, such as  $\text{CH}_3$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ , and  $-\text{NH}_2$  groups, are necessary for a proper biological response and for the biocompatibility and biodegradability of scaffolds [41, 42]. The FTIR spectra of the scaffolds with different ratios of PLGA/Ge are shown in figure 2(A). The principal bands are numbered for identification. The PLGA/Ge blends showed bands at  $1752$   $\text{cm}^{-1}$  (1) assigned to the stretching vibration of the C-O bond,  $1452$   $\text{cm}^{-1}$  (2) for the methyl group,  $1182$   $\text{cm}^{-1}$  (3) is attributed to the C-O-C ether group stretching vibration, and  $1130$   $\text{cm}^{-1}$  (4) is associated to the C-O bond [43]. Furthermore, other bands at  $1650$   $\text{cm}^{-1}$  (5) assigned to amide I resulted from C-O stretching vibrations of peptide linkages, and  $1532$   $\text{cm}^{-1}$  (6) corresponded to amide II, resulting from the combination of N-H in-plane bending and C-N stretching vibrations [44]. The pure PLGA spectrum did not contain any bands in the 1530–1660 region (amide I and amide II peaks) because these functional groups are characteristic of proteins, such as gelatin. Therefore, these results indicated the characteristic bands for pure PLGA and Ge, as previously reported [23].





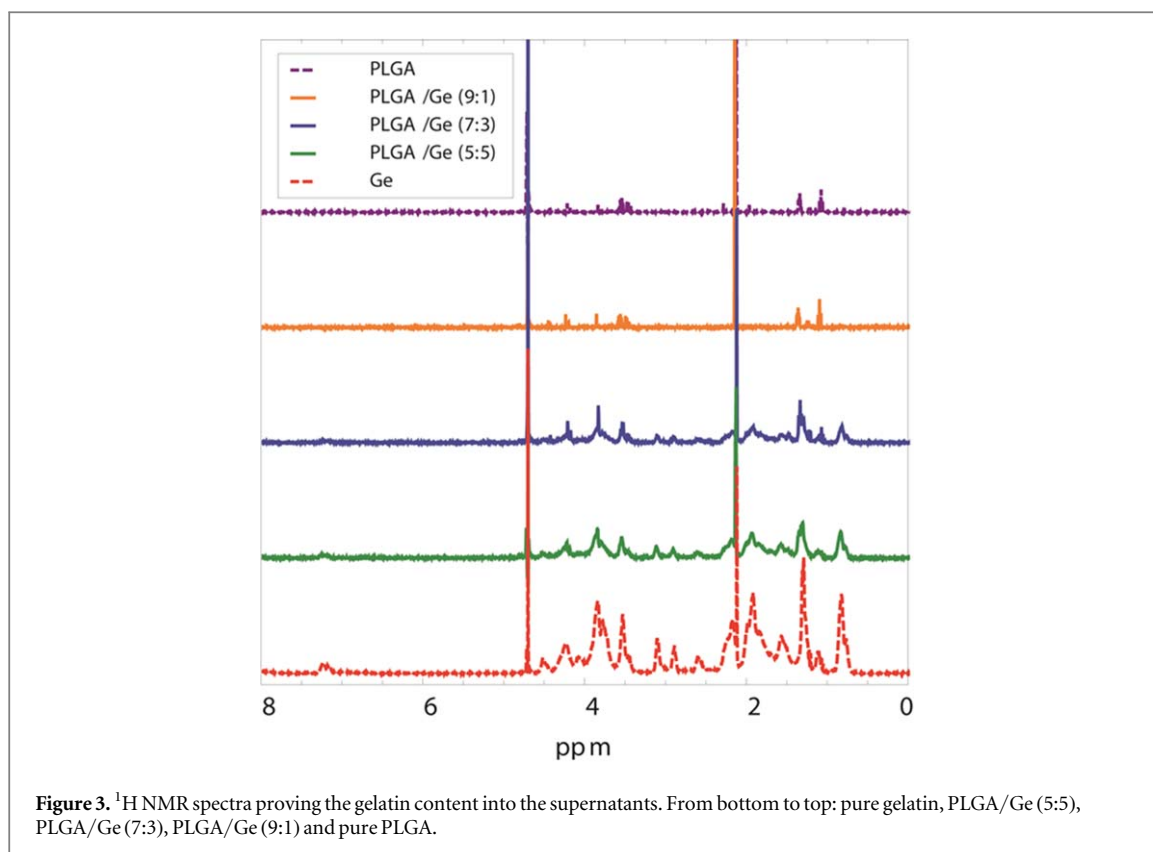
**Figure 2.** Physical and chemical characterization of the scaffolds. (A) FTIR spectra of the gelatin, PLGA, and PLGA/Ge scaffolds (the principal bands of PLGA and gelatin are indicated with numbers). (B) Swelling behavior of the PLGA and 9:1, 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds for 250 h. Equilibrium swelling is indicated with a circle at 72 h for the PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds 72 h and for 7:3 and 5:5. (C) Contact angle of the PLGA and PLGA/Ge scaffolds in dry and wet conditions. (D) TGA curves of the gelatin, PLGA and PLGA/Ge scaffolds.

Scaffolds that were prepared using different ratios of PLGA/Ge showed similar representative bands of PLGA and those corresponding to amide I and amide II functional groups, which are characteristic of gelatin. Moreover, the peaks of amides I and II increased along with the increasing proportion of gelatin. Since the main characteristic peaks of PLGA and gelatin scaffolds were observed in the IR spectra together with the absence of new peaks, these results suggest that both polymers formed a physical blend and that the polymers did not form new chemical bonds.

### 3.1.3. Swelling ratio

Physical and chemical modifications of the polymers in the scaffolds in aqueous media are of interest in tissue engineering. Water absorption capability was

analyzed by the swelling ratio. Figure 2(B) shows the water swelling behavior of PLGA/Ge scaffolds in PBS in terms of the percent of water absorption as a function of time. The pure PLGA scaffolds had the lowest swelling capability because these scaffolds exhibited a maximum percentage of swelling at 3 h (94.5%). The percentage of swelling of the PLGA scaffolds decreased to 52% until equilibrium at 72 h. The hydrophilicity had a proportional influence on the swelling capability, and a more hydrophilic material corresponded to a higher water absorption capability. The poor swelling behavior of the PLGA scaffold was due to its low hydrophilicity. In summary, the observed scaffold water absorption capacity was low. In contrast, when Ge was added to the scaffolds, the swelling capacity increased. This effect was



attributed to the amine and carboxylic functional groups in the Ge structure, as mentioned above. The 9:1 PLGA/Ge scaffolds showed an increased swelling percentage after the initial few minutes (130%) and reached the maximum swelling capacity at 0.5 h. Furthermore, the equilibrium phase was reached at 72 h, similar to the pure PLGA scaffolds. The 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds exhibited the highest swelling percentages (354% and 306%, respectively) at 0.25 h.

After 144 h, the maximum water uptake percentage decreased until equilibrium was reached (190% and 50%, respectively) at day 6. The hydrophilicity of gelatin allowed improved and faster water uptake. It is possible that the swelling ratio of 7:3 PLGA/Ge scaffolds was higher than 5:5 PLGA/Ge scaffolds due to two factors: the morphology/orientation of the fibers and the gelatin ratio on the scaffolds. It has been observed [23], that electrospun fibers with random orientation tend to present high swelling ratios. In our case, there were no differences between the orientation of the fibers in all scaffolds, but there were differences between diameters of the fibers and this fact could have influence on the swelling behavior. Fibers of 7:3 PLGA/Ge scaffolds had higher diameters than fibers of 5:5 PLGA/Ge scaffolds and this condition allowed that 7:3 PLGA/Ge scaffold increasing its water uptake capability with respect to 5:5 PLGA/Ge. The second factor is related to the ratio of gelatin on each scaffold. Once the scaffolds were immersed into an aqueous solution (PBS) the gelatin began to be dissolved in;

therefore, the scaffolds with a higher ratio of gelatin could also suffered a high loss of gelatin. To prove this,  $^1\text{H}$  NMR measurements were conducted and the spectra are shown in figure 3. From the RMN spectra for all scaffolds, it is clear that gelatin is being dissolved into PBS. The 5:5 PLGA/Ge RMN spectrum showed a stronger signal which is related with gelatin; proving the presence of gelatin into the supernatant of the measured scaffolds. Hence a minor dissolution of gelatin in 7:3 PLGA/Ge with respect to 5:5 PLGA/Ge scaffolds, resulted in a higher swelling ratio for 7:3 PLGA/Ge than 5:5 PLGA/Ge scaffolds.

Other reports have shown similar results compared to the results shown in this study, suggesting that higher proportions of gelatin increase the swelling capability. Ghorbani [25] synthesized scaffolds consisting of 8:2 PLGA/Ge and evaluated their swelling percentages for 7 h, and the scaffolds reached a maximum swelling percentage of 260%. Hoveizi [10] showed that 7:3 PLA/Ge scaffolds reached a swelling percentage of 388%. A high water absorption capability is very important in wound treatments since scaffolds should be able to absorb the exudate [45]. Additionally, swollen scaffolds ensure the survival of cells seeded on the biomaterial because of the accumulation of nutrients and humidity. In this regard, the 7:3 (v/v) PLGA/Ge ratio was shown to be the best proportion to manufacture scaffolds because the 7:3 (v/v) PLGA/Ge scaffold showed the highest absorption capacity at 0.25 h. Therefore, we propose that the 7:3



(v/v) PLGA/Ge scaffold could be used as a treatment for exudative wounds in patients.

#### 3.1.4. Contact angle

Wettability is a prerequisite for ensuring desired biological responses, such as the interaction of cells and tissues with a substrate. Wettability is estimated by contact angle measurements of a predetermined liquid, such as water. Our results showed that the water contact angle values of PLGA scaffolds under dry conditions decreased with the addition of gelatin (figure 2(C)). However, the pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds had average contact angles of  $133.4^\circ \pm 1^\circ$  and  $113.5^\circ \pm 4.4^\circ$ , respectively, indicating their hydrophobic character. In contrast, the results observed for the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds were  $45.6^\circ \pm 4.5^\circ$  and  $44^\circ \pm 3.8^\circ$ , respectively, indicating their hydrophilic character. Surfaces with contact angles below  $90^\circ$  are considered hydrophilic, and surfaces with contact angles above  $90^\circ$  are considered hydrophobic [46].

The addition of gelatin to PLGA enhanced the hydrophilicity of the scaffolds because this natural polymer is highly hydrophilic, which is likely due to the presence of amine and carboxylic functional groups in the gelatin structure [23, 47]. For this reason, the presence of gelatin in the scaffolds reduced the contact angle and improved the hydrophilic character of the scaffolds. PLGA is known for its relative hydrophobicity depending on the PLA/PGA proportion [48]. Previous studies have also reported the same behavior as observed in our study; gelatin decreases the contact angle and increases hydrophilicity [24, 35, 40]. Ghorbani [25] showed that PLGA scaffolds enhance cellular viability and proliferation upon the addition of gelatin. Enhanced wettability with a low contact angle results in improved biocompatibility; therefore, hydrophilicity is an important characteristic of scaffolds because if a scaffold allows the growth, migration, adhesion and differentiation of cells on its surface, it is a useful material for tissue engineering [49]. The 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds showed better features for cell interactions than the 9:1 (v/v) PLGA/Ge and pure PLGA scaffolds.

In the case of wet conditions, all scaffolds had contact angle values of less than  $90^\circ$ . Therefore, these scaffolds were considered to have hydrophilic surfaces. Importantly, to the best of our knowledge, there are no previous studies that have reported contact angle values in wet conditions, that is, the condition that the cells have interactions with the scaffold in culture and in clinical situations. In this study, dry and wet conditions were compared to mimic situations where scaffolds may be used as treatment for skin wounds: before and after the scaffolds are applied. All proportions of PLGA/Ge in the scaffolds under wet conditions had hydrophilic surfaces. Furthermore, the hydrophobic scaffolds (pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge) became hydrophilic after 3 d in PBS. Therefore, it is possible

that pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds could delay the possibility of cellular adhesion, viability and proliferation. Furthermore, the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds were highly hydrophilic in both conditions; therefore, they could be successfully used to treat chronic skin wounds.

#### 3.1.5. Thermal stability

According to the TGA thermograms, the thermal stability of the scaffolds was affected by Ge content (figure 2(D)). The TGA results showed that the pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds were stable up to  $270^\circ\text{C}$ , but below that temperature, they exhibited an abrupt decomposition in the range of  $270^\circ\text{C}$ – $330^\circ\text{C}$ , where 90% of material was lost. However, the pure gelatin scaffolds resulted in a curve with two zones of weight loss. One zone was between  $70^\circ\text{C}$  and  $90^\circ\text{C}$ , with approximately 6% weight loss due to the loss of water and a second zone that started at  $180^\circ\text{C}$  and ended at  $260^\circ\text{C}$ , where 80% of the material remained. After this point, an abrupt decomposition ended at approximately  $350^\circ\text{C}$ , where 50% of the material remained. Finally, thermal degradation continued at a lower rate up to  $600^\circ\text{C}$ , where 20% of the material remained [50]. The 7:3 and 5:5 PLGA/Ge scaffolds also showed a first region of weight loss at approximately  $100^\circ\text{C}$  attributed to loss of water and a second region caused by degradation of PLGA and gelatin, and their curves were intermediate, between those of pure PLGA and pure gelatin (see figure 2(D)) [51]. In summary, gelatin reduced the thermal stability of the scaffolds; however, the scaffolds were stable up to extreme physiological temperatures.

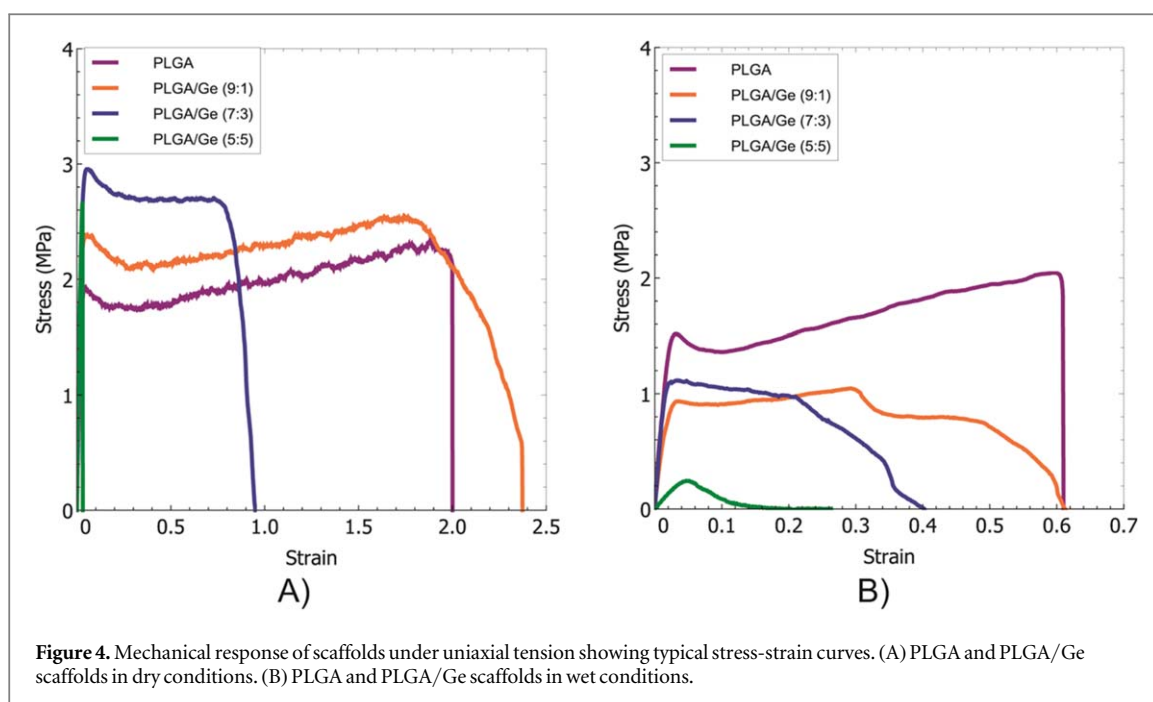
#### 3.1.6. Mechanical behavior

The stress versus strain curves of the scaffolds under uniaxial tension in both dry and wet conditions are shown in figures 4(A) and (B), respectively. The plots show a linear behavior before the yield point for both conditions, following Hooke's law. However, the yield points in dry conditions were greater than those observed in wet conditions.

Tables 1 and 2 show the Young's modulus, yield stress ( $Y_p$ ) and the associated strain in dry and wet conditions. The average results of 5 tests on each type of scaffold including the standard deviations are shown.

These results show that for increasing gelatin contents on PLGA scaffolds under dry conditions, Young's modulus and the yield point were considerably greater than those of pure PLGA. Furthermore, strain values associated with the yield stress did not show important changes. Therefore, in dry conditions, gelatin blended with PLGA for the 9:1, 7:3 and 5:5 ratios scaffolds increased Young's moduli, making the scaffolds more rigid by 18%, 33% and 46%, respectively.

The mechanical properties of the PLGA and PLGA/Ge scaffolds in wet conditions were also evaluated to mimic the environment of chronic human



**Table 1.** Mechanical behavior of PLGA and PLGA/Ge scaffolds in dry conditions.

Scaffold	Young's modulus (MPa)	Yield point $Y_p$ (MPa)	Associated strain at $Y_p$ (%)
PLGA	$69 \pm 7$	$1.9 \pm 0.3$	$2.8 \pm 0.4$
9:1	$81 \pm 5$	$2.2 \pm 0.2$	$3.1 \pm 0.5$
7:3	$91 \pm 19$	$3.1 \pm 0.4$	$3.7 \pm 0.6$
5:5	$101 \pm 18$	$2.6 \pm 0.5$	$2.8 \pm 0.5$

**Table 2.** Mechanical properties of PLGA/Ge scaffolds in wet conditions.

Scaffold	Young's modulus (MPa)	Yield point $Y_p$ (MPa)	Associated strain at $Y_p$ (%)
PLGA	$72 \pm 10$	$1.5 \pm 0.2$	$1.9 \pm 0.2$
9:1	$48 \pm 6$	$1.1 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.3$
7:3	$58 \pm 6$	$1.2 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.3$
5:5	$6 \pm 1$	$0.2 \pm 0.03$	$4.3 \pm 0.5$

skin wounds. Notably, the mechanical properties in wet conditions are required and are very important because, in wound dressing procedures, scaffolds absorb water, and the mechanical properties of the PLGA/Ge scaffolds are different in dry or wet conditions.

In wet conditions, the scaffolds also exhibited a linear mechanical behavior in the elastic region (up to the yield point), as shown in the stress versus strain plots (see figure 4(B)). These data show Young's modulus, yield stress and its associated strain values that were determined following the same procedure used in dry conditions. As shown in table 2, after increasing the content of gelatin on PLGA scaffolds, Young's modulus and the yield point decreased up to 91% and 85%, respectively, compared with pure PLGA. Regarding the associated strain at the yield point, it

remained without important changes for the 9:1 and 7:3 ratios with respect to pure PLGA; however, when the ratio of PLGA and gelatin was 5:5, the strain increased more than two-fold with respect to pure PLGA.

According to different studies [52–54], human skin has a wide range of Young's modulus values, which depend on several factors, including the age and race of the patient, the anatomic location of the skin and even environmental conditions. Mechanical properties, particularly Young's modulus, are essential characteristics for biocompatibility. Cells are able to detect the mechanical microenvironment and modify their behavior [55, 56]. Therefore, scaffolds must offer an adequate surface for cell residence and must retain structural integrity and dimensional stability when physicians handle and implant scaffolds into the damaged site of the host. After implantation, a scaffold at an implant site must provide sufficient biomechanical support during the process of tissue regeneration and structural degradation [57]. Jansen and Rottier [52] reported Young's modulus for human skin in the abdominal region ranging between 2.9 and 54 MPa. Ni *et al* [53] reported Young's modulus values between 15 and 150 MPa for different anatomic regions of the human body, and Kalra *et al* [58] found that Young's modulus values vary from 4 to 15 MPa or 14 to 100 MPa according to the crosshead speed used for the test. Considering these values of Young's modulus reported in the literature, it is clear that the PLGA/Ge scaffolds can be mechanically useful candidates for wound dressing treatments.

### 3.1.7. *In vitro* degradation

The scaffold degradation rate is a fundamental parameter because it provides the approximate time that a

scaffold is in contact with the body until it fulfills its function. To investigate the half-life of the scaffolds, a degradation assay was performed to evaluate the fiber morphology and the weight of the PLGA/Ge scaffolds with different ratios and incubation times at 37 °C in PBS.

The *in vitro* degradation results showed that fiber morphology changed notably during degradation (figure 5). For the pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds, the fibers lost their individuality since in both cases, the fibers lost their shape and were observed to have a melted-like morphology (figures 5(A)–(B)). For the 7:3 (v/v) PLGA/Ge scaffolds, a few fibers with a melted-like morphology were observed. This melted-like morphology has been observed for two conditions as follows: the first was observed when the PLGA had a low molecular weight, and the second was observed when the temperature used for degradation experiments was near or greater than the glass transition temperature of the polymer [59]. In our study, the degradation temperature was 37 °C, the T<sub>g</sub> of the polymer was 46 °C, and the molecular weight of the PLGA was 38 000–54 000 g mol<sup>-1</sup>. The results shown in figures 5(A)–(B) suggest that the melted-like morphology is due to the proximity of the T<sub>g</sub> and degradation temperatures; furthermore, the fibers were observed closer.

Numerous hollow structures were observed in both the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds (figures 5(C)–(D)). Notably, the hollow structure on the surface of the polymeric fibers indicated superficial erosion. The analysis showed that the 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffold had a 10% greater erosion degree than the 7:3 PLGA/Ge scaffold. This is possible due to the gelatin content of the scaffolds and its hydrophilic characteristic, which results in high solubility.

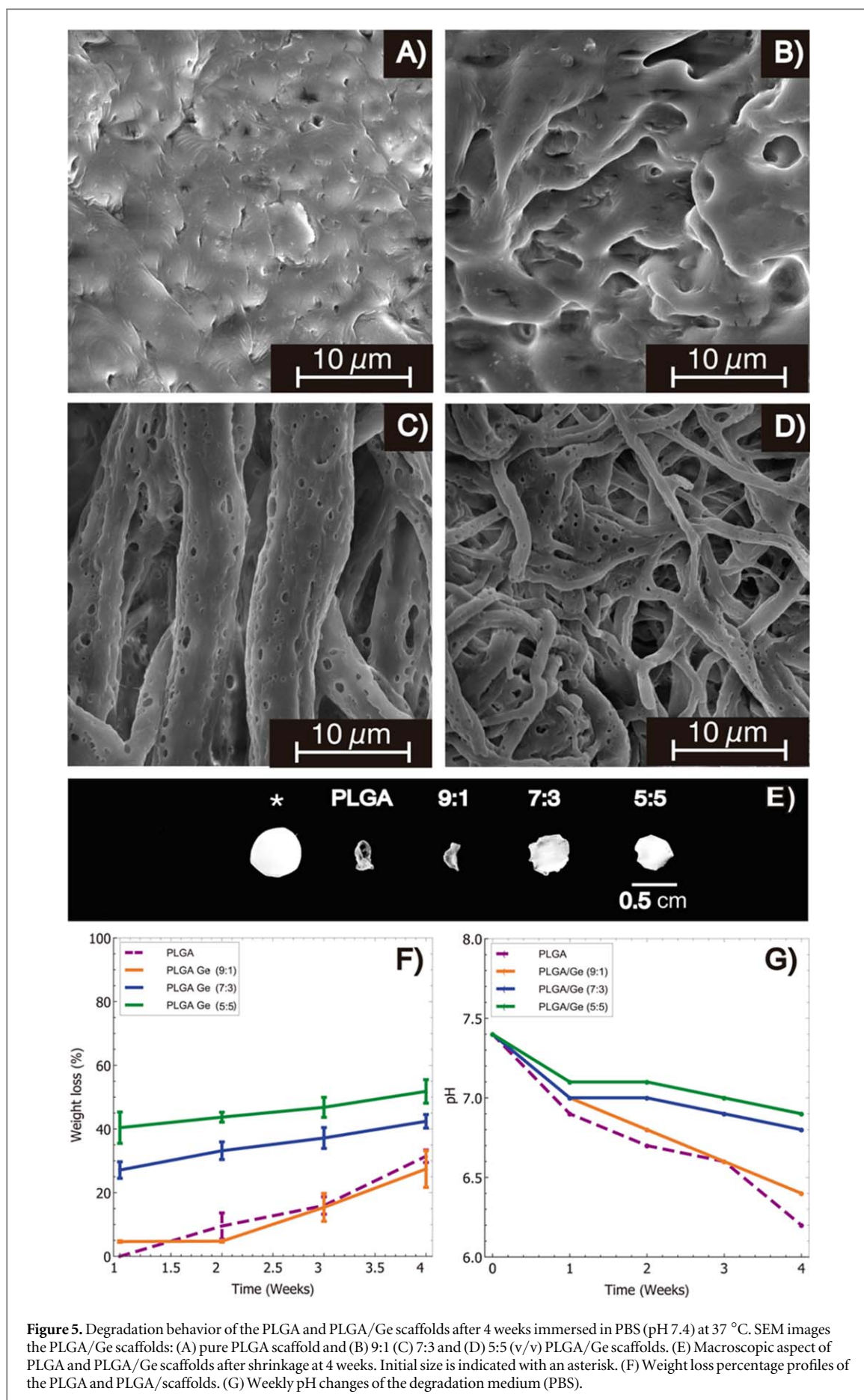
An evident effect of scaffold degradation is shrinkage [59]. All PLGA/Ge scaffolds shrunk, but the shrinkage was greater in the pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds in comparison with the other scaffolds. The macroscopic aspect of scaffolds is showed in figure 5(E). Additionally, the pore size changed because the pores disappeared completely in the PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds, while in the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds, the pore size decreased by more than 50%. The fiber shrinkage was likely due to the thermally induced relaxation of stretched amorphous chains. It has been observed that the relaxation of polymer chains causes substantial shrinkage of electrospun mesh. During shrinkage, the fiber diameter increases and the porosity decreases, resulting in a decrease in the contact area between the melted fibers and water; consequently, the degradation rate decreases. It is possible that the degradation rate could be lower because of the contact area between the fibers and water was limited. The abovementioned results may explain why the fibers of the scaffolds were observed to have a larger diameter and therefore a

lower distance between the fibers than when the fibers were dry (figures 5(A)–(D)).

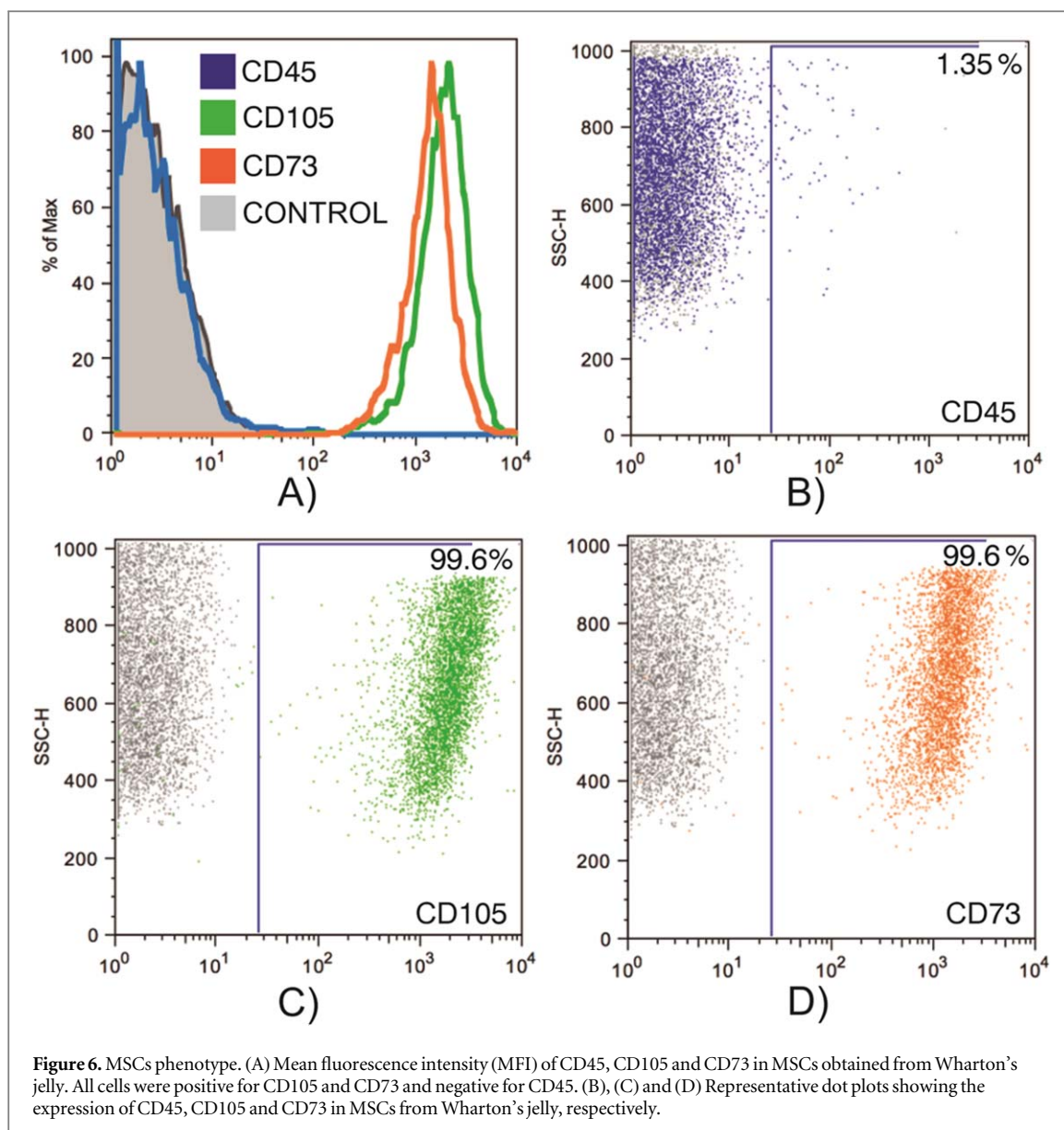
The PLGA/Ge scaffolds had different weight loss percentages in accordance with the gelatin ratio. The pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds showed lower weight loss percentages (0% and 5%, respectively) than the 7:3 and 5:5 PLGA/Ge scaffolds (27% and 40%, respectively) after the first week of incubation in PBS, while at the fourth week, the weight loss percentages were 31% for PLGA, 27% for 9:1 PLGA/Ge, 42% for 7:3 PLGA/Ge and 52% for 5:5 PLGA/Ge (figure 5(E)). According to the abovementioned result, a high content of PLGA, which is a hydrophobic polymer and exhibits a reduced water absorption capacity, induces very limited hydrolytic degradation. In conclusion, scaffolds with elevated gelatin ratios showed higher weight loss because they were more hydrophilic and absorbed more water, resulting in a higher gelatin solubilization rate.

There are some factors that influence the degradation process, such as polymer composition and the pH of the degradation medium. In this study, we used PLGA with a 50:50 PLA/PGA ratio, and it has been demonstrated that this composition exhibits faster degradation than other PLGA copolymers with different PLA/PGA ratios [60]. Additionally, PLGA used for the fabrication of the scaffolds has free carboxylic acid ends that improve the degradation rate compared with PLGA with ester end groups [61]. Furthermore, an *in vitro* degradation test was conducted without PBS replacement; therefore, the slight decrease in pH over four weeks may have affected the scaffold degradation rates. The pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds showed a greater decrease in pH degradation medium (6.3–6.4) than the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds, which exhibited a slight change in pH (6.9–6.8) at the fourth week (figure 5(F)). The gradual decrease in pH can be attributed to the formation of acidic degradation products from PLGA [60]. Previous reports have indicated that the degradation rate increases in acidic medium; however, the fastest rates have been observed at pH 5 [62, 63]. In the present study, the pH of PBS was 7.4 before the degradation test and was maintained above pH 6 until the fourth week; however, this pH was not sufficient to accelerate the degradation time and achieve complete degradation. In *in vitro* conditions, culture medium has a pH of 7.2–7.4, and the medium is changed every 2 or 3 days to ensure cell viability. *In vivo*, the human body has a biological buffer that regulates and maintains all fluids under physiological conditions (pH = 7.4).

Based on all the results, the pure PLGA and 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffolds are not favorable for use in clinical trials, especially as treatments for skin wounds due to the high level of shrinkage in an aqueous solution and the low degradation rate. In contrast, scaffolds with high gelatin ratios (the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds) showed high degradation rates and low levels of shrinkage. Therefore, it is possible that the 7:3







(v/v) PLGA/Ge scaffolds could be useful as medical devices for covering chronic wounds due to their intermediate degradation rate and low degree of shrinkage.

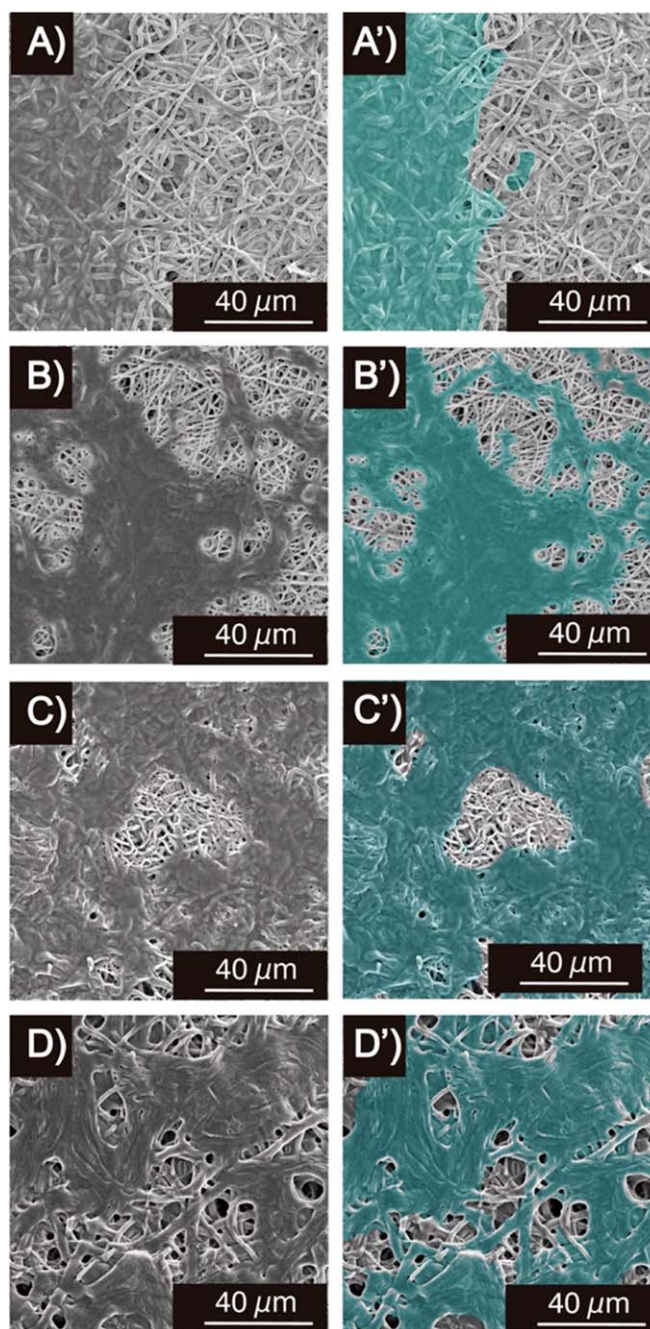
### 3.2. Phenotypic characterization of MSCs

In this study, we used MSCs to conduct biological assays (cell adhesion, cytotoxicity and proliferation) because of their high differentiation capability, including the ability to differentiate into skin cells [64, 65], making MSCs a fundamental element in tissue engineering. Cells obtained from Wharton's jelly were strongly positive for CD73 and CD105. In contrast, the cells were negative for CD45. The percentages of CD73+ and CD105+ cells were similar (figure 6). The International Society for Cellular Therapy has established the specific criteria for MSCs identification [66]. MSCs must express specific surface markers, such as CD73 and CD105, which are characteristic markers of mesenchymal cells in different niches and species,

including humans [67]. In contrast, MSCs must be negative for leukocyte, hematopoietic cell, and monocyte/macrophage markers, such as CD45 [68, 69]. Therefore, cells obtained from Wharton's jelly of the umbilical cord were mesenchymal stem cells.

### 3.3. Cell attachment

Polymeric scaffold characteristics, such as morphology, chemical composition, surface and hydrophilicity, are essential for cell adhesion and proliferation. Scaffolds fabricated through electrospinning seem to mimic the extracellular matrix, improving the adhesion and proliferation of seeded cells. Cell adhesion capability was evaluated indirectly by means of morphology observation, considering that spreading and flat morphology are characteristics of adhered cells; furthermore, rounded cell morphology suggests the absence of cell attachment to the substrate [70]. Figure 7 shows MSCs seeded on pure PLGA and the different PLGA/Ge scaffolds by SEM. Interactions

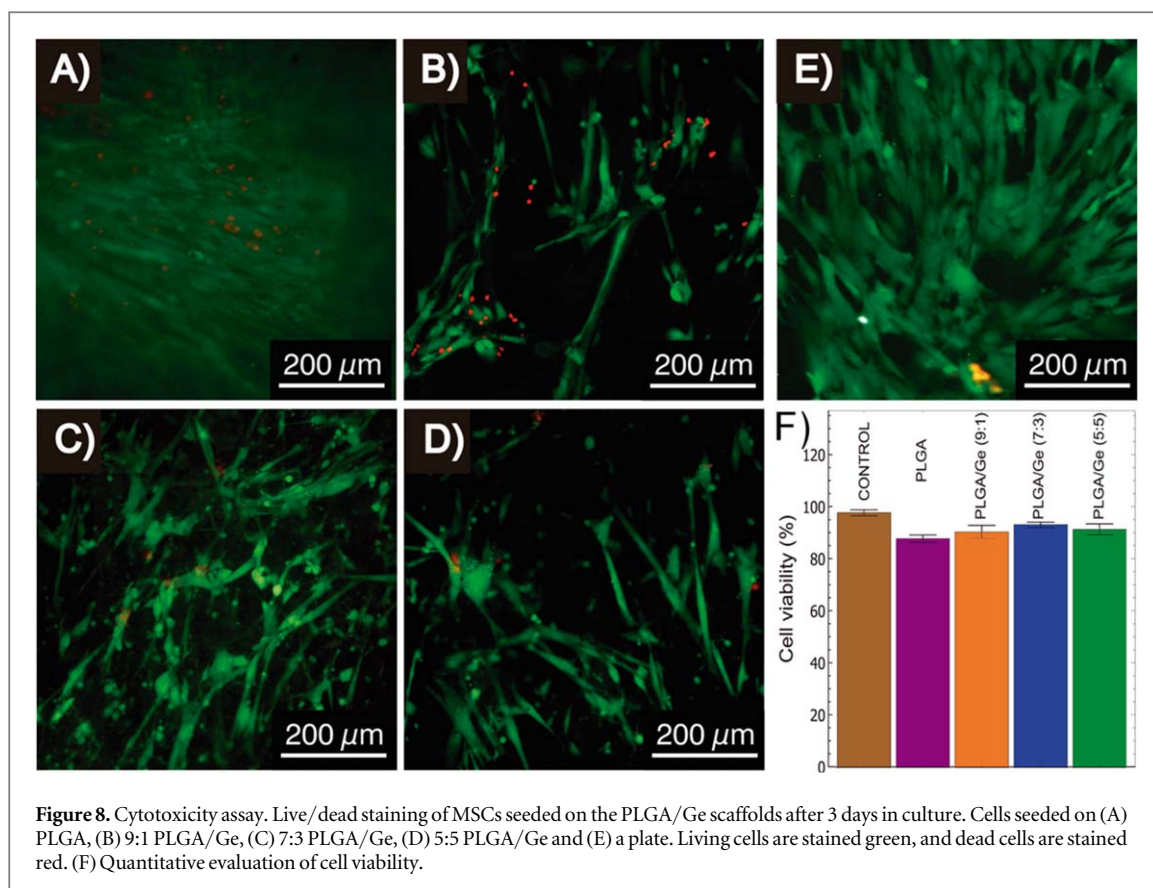


**Figure 7.** MSCs attachment on the PLGA/Ge scaffolds at 3 d of culture. SEM images of MSCs on (A) PLGA (B) 9:1 (C) 7:3 and (D) 5:5 PLGA/Ge scaffolds. Cells were colored in green in order to highlight them on each scaffold (A')–(D').

between MSCs and the scaffold were observed. After 3 d of culture, a high density of MSCs with a flattened and extended morphology was observed in green color (figures 7(A')–(D')). For the hydrophilic scaffolds (7:3 and 5:5 PLGA/Ge) (figures 7(C) and (D)), MSCs exhibited greater cell flattening and confluence with respect to the hydrophobic scaffolds (pure PLGA and 9:1 PLGA/Ge) (figure 7(B)). Some studies have demonstrated that cell adhesion can be regulated through the hydrophilicity or hydrophobicity of scaffolds [71, 72]. Additionally, pore size is another factor that influences cell adhesion. Scaffolds with pores larger than 100  $\mu\text{m}$  limit cell adhesion due to the

spaces between pore walls that the cells must cover. Lowery [73] reported that the suitable pore diameter for adhesion and growth of cells typically ranges 10–100  $\mu\text{m}$ . The pure PLGA, 9:1, 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds showed a distance between fibers less than 10  $\mu\text{m}$ ; therefore, MSCs were able to adhere to the scaffold surface. Our results were similar to those reported by Lowery, who demonstrated that a pore size of 6–20  $\mu\text{m}$  facilitated the adhesion of fibroblasts on electrospun scaffolds.

Furthermore, the type of polymer used for the fabrication of scaffolds has an effect on cell adhesion. In our study, the presence of a natural polymer, such as



gelatin, conferred greater adhesive capability to scaffolds than a synthetic polymer, such as PLGA, that possesses low cell affinity [74]. Gelatin is a derivative of collagen; therefore, it has peptide motifs formed by the amino acids arginine-glycine-aspartic acid (RGD), which is a ligand for integrins located on various cells, including MSCs [46]. In addition, the recognition of RGD motifs by integrins is necessary for the formation of tissues and organs and is also necessary for the migration, growth, proliferation, survival, death and differentiation of cells [75]. The scaffolds consisting of the 7:3 and 5:5 PLGA/Ge ratios tended to have greater cell adhesion and cytocompatibility than scaffolds consisting of the 9:1 PLGA/Ge ratio and pure PLGA.

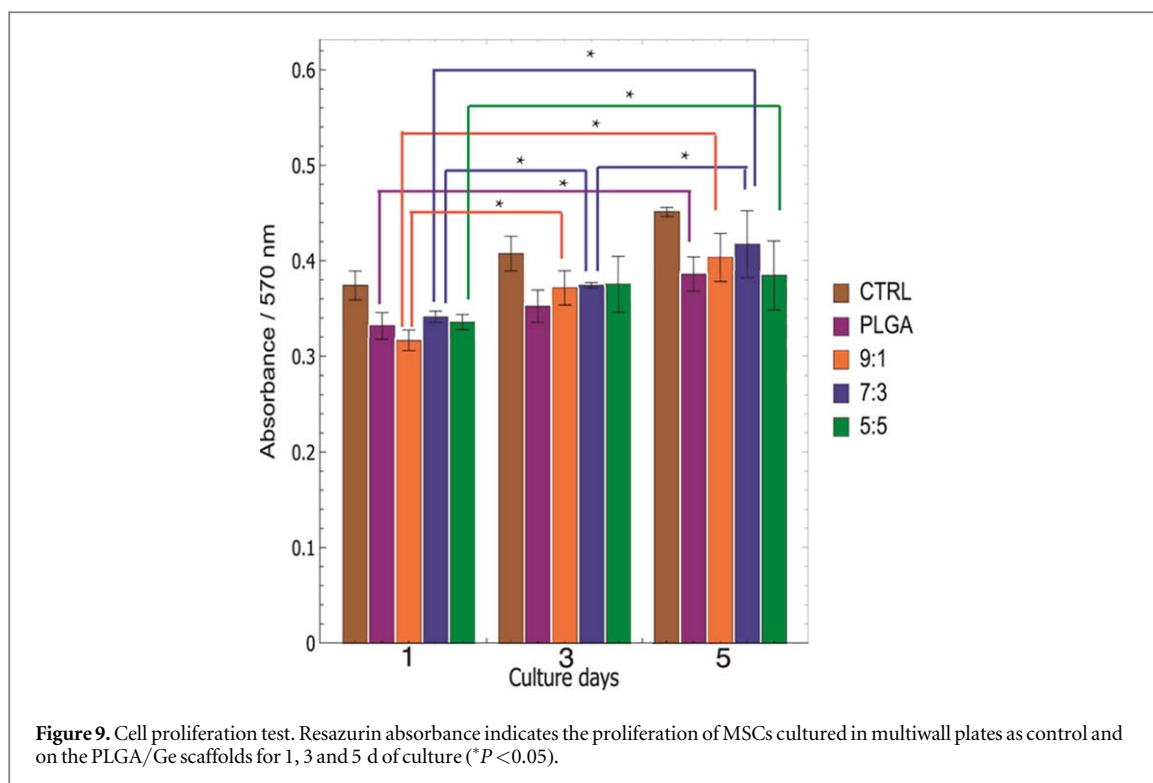
### 3.4. Cytotoxicity and proliferation assays

To evaluate the cytotoxicity of the PLGA/Ge scaffolds, calcein and ethidium homodimer staining were used. The viability assay is based on the esterase activity in cells and was evaluated by the fluorescence of calcein. In addition, to evaluate cell membrane permeability, ethidium homodimer was also used. The results showed that scaffolds consisting of the three different ratios of PLGA/Ge did not have toxic effects on MSCs (figures 8(B)–(D)). The lowest viability percentage (87%) was observed in pure PLGA scaffolds (figure 8(A)). The calcein fluorescence also showed a fusiform MSCs morphology, supporting the results obtained by SEM (figures 7(A)–(D)). The technique also showed that MSCs were attached to the PLGA/Ge

scaffolds. Quantification of viability of the different scaffolds were as follows: 98% control, 87% (PLGA), 90% (9:1), 93% (7:3), and 91% (5:5) (figure 8(F)). Therefore, all of the above findings indicate that the PLGA/Ge scaffolds may be used as a treatment for chronic wounds; however, more research on the effect of PLGA/Ge on cells and tissues is needed.

Moreover, cell proliferation was evaluated by a PrestoBlue assay, where the absorbance is directly proportional to cell proliferation. As shown in figure 9, the absorbance increased proportionally with respect to the number of days in culture for the MSCs on scaffolds. Furthermore, on culture day 1, there were no differences in the proliferation rate for the three scaffolds. For culture day 3, cell proliferation significantly increased on the 9:1 and 7:3 PLGA/Ge scaffolds compared with cell proliferation at day 1. At culture day 5, cell proliferation on the 7:3 PLGA/Ge scaffolds significantly increased compared with days 1 and 3, while cells on the pure PLGA, 9:1 and 5:5 PLGA/Ge scaffolds only showed a significant increase on day 1. All the above results may be attributed to the addition of gelatin to the scaffolds, suggesting that a higher ratio of gelatin increases cell proliferation. In this respect, Son *et al* [24] studied cell proliferation on tubular scaffolds consisting of three proportions of PLGA/Ge. They found that scaffolds with a higher proportion of gelatin increased cell proliferation compared with the lowest gelatin proportions [24]. Our results were similar because scaffolds with higher ratios of gelatin (7:3 and





5:5 PLGA/Ge) had higher cell proliferation than scaffolds with pure PLGA and 9:1 PLGA/Ge ratio. As previously mentioned, gelatin possesses RGD motifs for cell adhesion, improving cell proliferation [76]; therefore, gelatin can be employed as a suitable strategy for the experimental development of tissues or organs by tissue engineering.

The study of the viability and proliferation of cells seeded on polymeric scaffolds is essential because scaffolds may be used for developing tissues or organs *in vitro*. In addition, some scaffolds without cells may be used as a treatment for different types of wounds, making the cell viability and proliferation analyses indispensable to scaffolds that will be used for medical treatments. In conclusion, the results obtained suggested that it is possible to maintain a cell-biomaterial interaction without cytotoxic effects, and cell proliferation was improved on the PLGA/Ge scaffolds after at least 5 d of culture.

### 3.5. Biocompatibility evaluation

Scaffolds biocompatibility were determined by subcutaneous implantation in the dorsum of 9 rats. Notably, every rat was implanted with the three different scaffolds (9:1, 7:3 and 5:5 PLGA/Ge scaffolds) to analyze the effect of all scaffolds in the same rat and avoid the variability of the biological response to biomaterials between individual rats.

Samples of healthy skin from nine rats were stained with H&E (figure 10(A)) in order to compare histopathological changes regarding PLGA/Ge scaffolds implants. The sham group, (only received an incision with a scalpel), showed acute inflammation with a large number of neutrophils and some

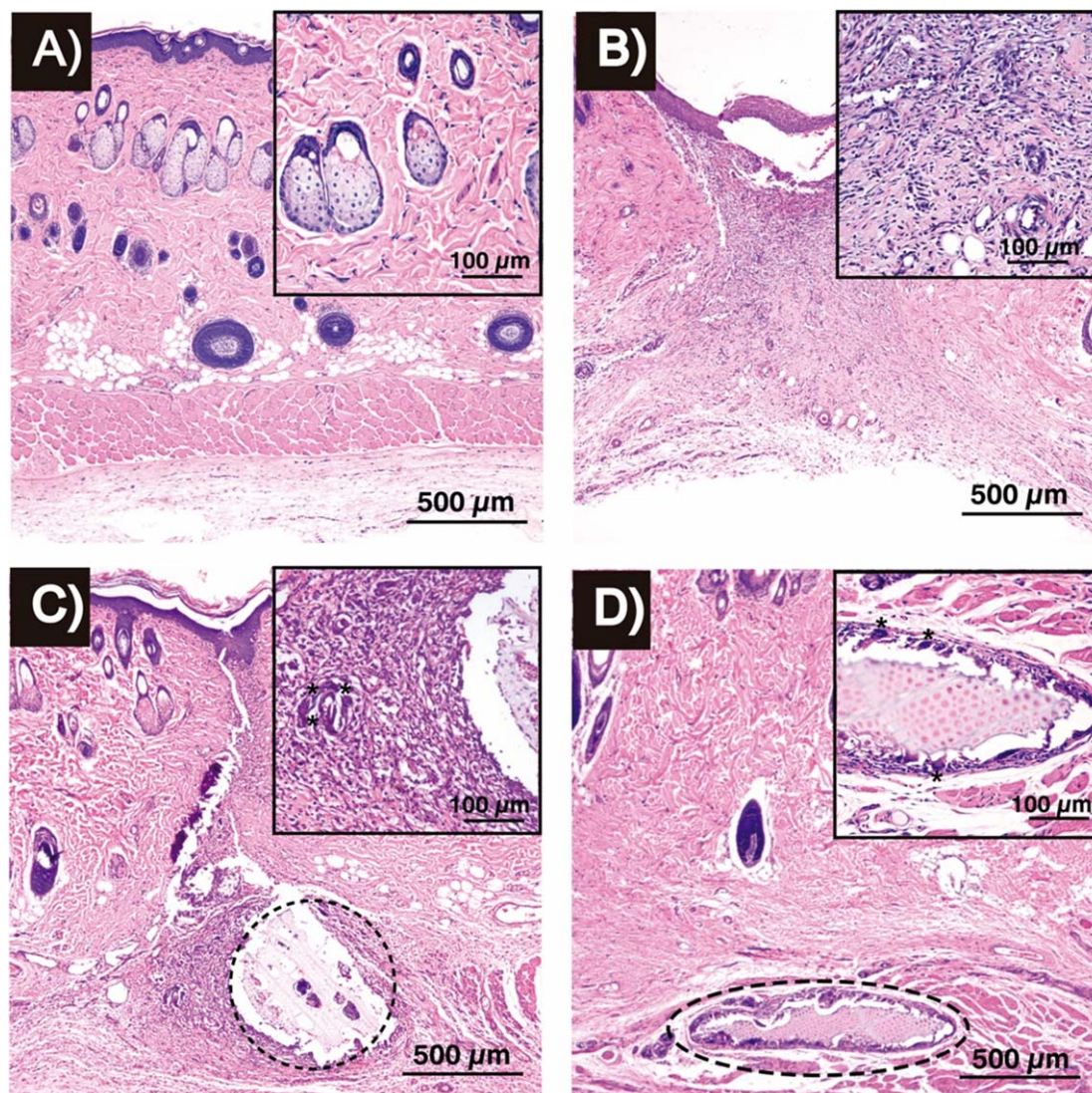
macrophages with an absence of Langhans cells (figure 10(B)). This inflammatory reaction is part of the phases of the normal healing process of skin wounds. Furthermore, positive control (subcutaneous implantation of a wood splinter) induced acute inflammation characterized by the presence of neutrophils and macrophages (figures 10(C) and (D)).

The histopathological evaluation showed that the three scaffolds with PLGA/Ge in different proportions induced an acute inflammatory response after the first week following implantation (figure 11). Notably, for the 9:1 PLGA/Ge scaffolds (figure 11(A)), a vast number of inflammatory cells surrounded these scaffolds, such as numerous neutrophils and Langhans cells, in contrast to the 7:3 and 5:5 PLGA/Ge scaffolds (figures 11(B)–(C)).

Four weeks following scaffold implantation, the remains of the 7:3 and 5:5 scaffolds were not observed (figures 11(E)–(F)), suggesting that the scaffolds were degraded. Additionally, no inflammatory process was observed, and only the scar of the surgical procedure was observed, where collagen fiber deposition was different, and there was an absence of cutaneous appendages (figures 11(E)–(F)). In contrast, in the histopathological evaluation of the implantation area of the 9:1 PLGA/Ge scaffolds, the biomaterial and inflammatory cells remained. In this case, inflammatory cells mainly consisted of lymphocytes and Langhans cells. However, the implant and the inflammation area were smaller during the first week after implantation (figure 11(D)).

Epithelioid cells are characteristic of granuloma, and Langhans cells are typically observed in a foreign body reaction that tends to induce healing of a lesion





**Figure 10.** Controls of rat skin. Histological sections stained with H&E. (A) Healthy skin, (B) negative control (sham), the positive control of inflammation consists of a wood splinter implanted (C) at 1 week, and (D) at 8 weeks postimplantation. Dashed circles and asterisks indicate implants and Langhans cells, respectively.

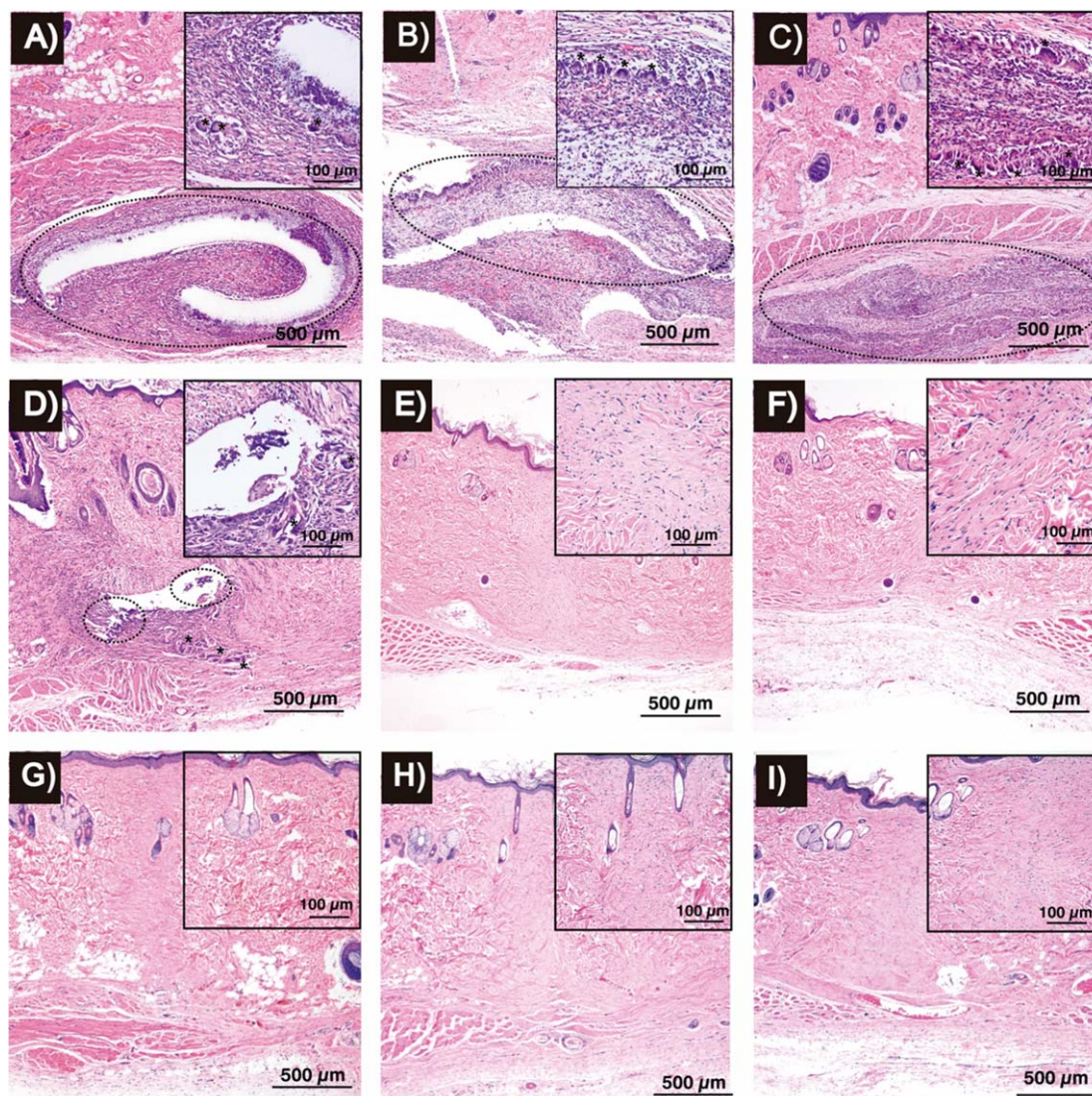
[77]. The three types of scaffolds consisting of three different ratios PLGA/Ge induced a foreign body reaction in rats. The foreign body reaction has also been observed in other experimental implants, such as hyaluronic acid implants, in patients undergoing plastic surgery [78].

Notably, the scaffolds with 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge ratios were completely degraded prior to four weeks postimplantation, while *in vitro* degradation of the 9:1 PLGA/Ge scaffold required more than four weeks for degradation. In this sense, it is necessary to consider that in an *in vivo* environment, the presence of enzymes and inflammatory cells are able to accelerate the degradation process of scaffolds. Furthermore, it has been demonstrated that scaffolds fabricated with pure PLGA take a longer time to be degraded than those based on natural polymers [79]. At 8 weeks postimplantation, the 9:1, 7:3 and 5:5 PLGA/Ge scaffolds were not observed, nor inflammatory reactions were showed (figures 11(G)–(I)). In

contrast, the wood splinter persisted subdermally and was surrounded with Langhans cells and macrophages (figure 10(D)). Therefore, all implanted electrospun scaffolds with different ratios of PLGA/Ge examined in the present study were degraded and did not cause a granuloma, inducing only a limited inflammatory reaction. It has been shown that inflammatory cells are responsible for the degradation of materials that are implanted in the skin and promote the healing of wounds. The implanted 9:1 (v/v) PLGA/Ge scaffold took longer to be degraded due to the high PLGA content compared to the other proportions (7:3 and 5:5). It has been shown that PLGA has a half-life of approximately 3 months in *in vitro* degradation experiments.

In accordance with the results, the 9:1, 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds produced an acute inflammatory reaction at the first week postimplantation, a frequently observed characteristic when a biocompatibility test is conducted. However, only the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds were completely degraded at





**Figure 11.** Subdermal implantation of the PLGA/Ge scaffolds in Wistar rats. (A) 9:1 PLGA/Ge scaffold, (B) 7:3 PLGA/Ge scaffold, and (C) 5:5 PLGA/Ge scaffold at 1 week postimplantation. (D) 9:1 PLGA/Ge scaffold, (E) 7:3 PLGA/Ge scaffold, and (F) 5:5 PLGA/Ge scaffold at 4 weeks postimplantation. (G) 9:1 PLGA/Ge scaffold, (H) 7:3 PLGA/Ge scaffold, and (I) 5:5 PLGA/Ge scaffold at 8 weeks postimplantation. Dashed circles and asterisks indicate implants and Langhans cells, respectively.

4 weeks, indicating that both are more biocompatible than the 9:1 PLGA/Ge scaffold. This result suggests that the 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge scaffolds exhibit a faster *in vivo* degradation and cause a slight inflammatory reaction; therefore, they can be used as a safe wound treatment.

#### 4. Conclusions

This study demonstrated the influence of gelatin on PLGA/Ge scaffolds manufactured by electrospinning at 9:1, 7:3 and 5:5 (v/v) ratios. Gelatin influenced the physical, chemical and biological properties of the scaffolds. The average microfiber diameter decreased with the addition of gelatin to the pure PLGA fibers. The PLGA/Ge scaffolds increased Young's moduli as a function of gelatin content in dry conditions. Furthermore, in wet conditions, the opposite result was

observed. Increasing the gelatin content increased the hydrophilic and water absorption capability of the scaffolds, indicating that the scaffolds may be useful for the treatment of skin wounds with moderate to severe exudate. *In vitro* biological tests showed that the PLGA/Ge scaffolds with the three different ratios (9:1, 7:3 and 5:5) were nontoxic, and MSCs showed viability and proliferation in all the scaffolds. However, only the 7:3 PLGA/Ge ratio showed the highest proliferation at 1, 3 and 5 d. Degradation rates increased with high gelatin content both *in vitro* and *in vivo*. Scaffolds with 7:3 and 5:5 (v/v) PLGA/Ge ratios were degraded completely by the fourth week without inflammation. In contrast, the 9:1 PLGA/Ge scaffolds persisted and produced an acute inflammatory reaction for more than 4 weeks. Considering the physical, chemical and biological behavior, the scaffold consisting of the 7:3 PLGA/Ge ratio is the most promising candidate for use as a dressing in chronic wound treatments.

## Acknowledgments

This research was partially supported by project PAPIIT—DGAPA UNAM IN218315, IN108116 and IA207917. Nadia Vázquez acknowledges to Program in Biological Sciences at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and her scholarship (# 270063) provided by CONACyT. Authors thank to Katia Jarquín Yáñez, Beatriz Hernández Téllez, Raquel Guerrero Alquicira and Erick Robles Hurtado for expert technical assistance. Berenit Mendoza Garfias, Josue Romero Ibarra, Omar Novelo Peralta, and Silvia Antuna (SEM), Karla Eriseth Reyes Morales (TGA), Dr José Saninger, Selene Islas and José Ocotlán Flores (FTIR, LUCE ICAT) and Gerardo Cedillo Valverde (NMR) for helpful technical assistance. We also thank Dr Annie Pardo for her academic assistance. Finally, Dr Francisco Sánchez-Arévalo acknowledges all help provided by the Professor Castell's Laboratory during his sabbatical stay at the Faculty of Medicine, UNAM.

## ORCID iDs

Mathieu Hautefeuille  <https://orcid.org/0000-0003-3918-0320>

Andrés Castell-Rodríguez  <https://orcid.org/0000-0003-2881-2759>

## References

- Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R and Car J 2016 Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review *Systematic Rev.* **5** 152
- Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R and Car J 2017 The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review *Systematic Rev.* **6** 15
- Frykberg R G and Banks J 2015 Challenges in the treatment of chronic wounds *Adv. Wound Care* **4** 560–82
- Barrera Arenas J E, Pedraza Castañeda M D C, Pérez Jiménez G, Hernández Jiménez P, Reyes Rodríguez J A and Padilla Zárate M P 2016 Prevalencia de úlceras por presión en un hospital de tercer nivel, en México *DF Gerokomos* **27** 176–81
- Han G and Ceilley R 2017 Chronic wound healing: a review of current management and treatments *Adv. Ther.* **34** 599–610
- Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, Dixit S, Sahu R, Pillai S, Dennis V A and Singh S R 2017 Advances in skin regeneration using tissue engineering *Int. J. Mol. Sci.* **18** 789
- Agarwal S, Wendorff J H and Greiner A 2008 Use of electrospinning technique for biomedical applications *Polymer* **49** 5603–21
- Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S and Kenny J M 2010 Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review *Polym. Degrad. Stab.* **95** 2126–46
- Zhao W, Li J, Jin K, Liu W, Qiu X and Li C 2016 Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering *Mater. Sci. Eng. C* **59** 1181–94
- Hoveizi E, Nabiuni M, Parivar K, Rajabi-Zeleti S and Tavakol S 2014 Functionalisation and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering *Cell Biol. Int.* **38** 41–9
- Wan Y, Qu X, Lu J, Zhu C, Wan L, Yang J, Bei J and Wang S 2004 Characterization of surface property of poly(lactide-co-glycolide) after oxygen plasma treatment *Biomaterials* **25** 4777–83
- Chen J, Liu Z, Chen M, Zhang H and Li X 2016 Electrospun gelatin fibers with a multiple release of antibiotics accelerate dermal regeneration in infected deep burns *Macromol. Biosci.* **16** 1368–80
- Elzoghby A O 2013 Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research *J. Control. Release* **172** 1075–91
- Elzoghby A O, Samy W M and Elgindy N A 2012 Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems *J. Control. Release* **161** 38–49
- Kommareddy S, Shenoy D B and Amiji M M 2007 Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization *Nanotechnologies for the Life Sciences* ed C S Kumar (New York: Wiley)
- Ratanavaraporn J, Damrongsakkul S, Sanchavanakit N, Banaprasert T and Kanokpanont S 2006 Comparison of gelatin and collagen scaffolds for fibroblast cell culture *J. Met., Mater. Miner.* **16** 31–6
- Kim H-W, Yu H-S and Lee H-H 2008 Nanofibrous matrices of Poly(Lactic Acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses *J. Biomed. Mater. Res. A* **87A** 25–32
- Chen G, Sato T, Ohgushi H, Ushida T, Tateishi T and Tanaka J 2005 Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA–collagen hybrid mesh *Biomaterials* **26** 2559–66
- He W, Ma Z, Yong T, Teo W E and Ramakrishna S 2005 Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth *Biomaterials* **26** 7606–15
- Hu Y, Zhang C, Zhang S, Xiong Z and Xu J 2003 Development of a porous Poly(L-Lactic Acid)/hydroxyapatite/collagen scaffold as a BMP delivery system and its use in healing canine segmental bone defect *J. Biomed. Mater. Res. A* **67A** 591–8
- Zhang Y, Ouyang H, Lim C T, Ramakrishna S and Huang Z-M 2005 Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds *J. Biomed. Mater. Res. B* **72B** 156–65
- Thiem A, Bagheri M, Große-Siestrup C and Zehbe R 2016 Gelatin-Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) scaffolds with oriented pore channel architecture—from *in vitro* to *in vivo* testing *Mater. Sci. Eng. C* **62** 585–95
- Meng Z X, Wang Y S, Ma C, Zheng W, Li L and Zheng Y F 2010 Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering *Mater. Sci. Eng. C* **30** 1204–10
- Son S R, Franco R A, Bae S H, Min Y K and Lee B T 2013 Electrospun PLGA/gelatin fibrous tubes for the application of biodegradable intestinal stent in rat model *J. Biomed. Mater. Res. B* **101B** 1095–105
- Ghorbani F, Nojehdehyan H, Zamanian A, Gholipourmalekabadi M and Mozafari M 2016 Synthesis, physico-chemical characteristics and cellular behavior of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)/gelatin nanofibrous scaffolds for engineering soft connective tissues *Adv. Mater. Lett.* **7** 163–9
- Meng Z X, Xu X X, Zheng W, Zhou H M, Li L, Zheng Y F and Lou X 2011 Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system *Colloids Surf. B* **84** 97–102
- Hu J, Wei J, Liu W and Chen Y 2013 Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a drug delivery system by emulsion electrospinning *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **24** 972–85
- Norouzi M, Shabani I, Ahvaz H H and Soleimani M 2015 PLGA/gelatin hybrid nanofibrous scaffolds encapsulating EGF for skin regeneration *J. Biomed. Mater. Res. A* **103** 2225–35
- Irani S, Hedayati M, Mohammad Atyabi S, Mahdi Saeed S, Salamian N and Zandi M 2013 A comparative study of cell behavior on PLGA, gelatin and PLGA/gelatin scaffolds *Nano Bull.* **2** 130213



- [30] Sun X, Xu C, Wu G, Ye Q and Wang C 2017 Poly(Lactic-co-Glycolic Acid): applications and future prospects for periodontal tissue regeneration *Polymers* **9** 9
- [31] Garnica-Palafox I M and Sánchez-Arévalo F M 2016 Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels *Carbohydrate Polym.* **151** 1073–81
- [32] Sánchez-Arévalo F, Muñoz-Ramírez L, Álvarez-Camacho M, Rivera-Torres F, Maciel-Cerda A, Montiel-Campos R and Vera-Graziano R 2017 Macro- and micromechanical behaviors of Poly(Lactic Acid)-hydroxyapatite electrospun composite scaffolds *J. Mater. Sci.* **52** 3353–67
- [33] Cui M, Liu L, Guo N, Su R and Ma F 2015 Preparation, cell compatibility and degradability of collagen-modified Poly(Lactic Acid) *Molecules* **20** 595
- [34] Montesinos J, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzmán P, Hernández-Estévez E, Fajardo-Orduña G, Orozco S and Mayani H 2009 Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression *Cytotherapy* **11** 163–76
- [35] Mehra M, Asadollahi M A, Ghaedi K, Salehi H and Arpanaei A 2015 Electrospun aligned PLGA and PLGA/gelatin nanofibers embedded with silica nanoparticles for tissue engineering *Int. J. Biol. Macromol.* **79** 687–95
- [36] Kwon I K and Matsuda T 2005 Co-Electrospun nanofiber fabrics of poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) with type I collagen or heparin *Biomacromolecules* **6** 2096–105
- [37] Berteza A, Manea L R, Popa A and Berteza A 2017 The influence of process parameters on the characteristics of electrospun 3D nanostructures *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **209** 012074
- [38] Sadeghi-Avalshahr A, Nokhasteh S, Molavi A M, Khorsand-Ghayeni M and Mahdavi-Shahri M 2017 Synthesis and characterization of collagen/PLGA biodegradable skin scaffold fibers *Regen. Biomater.* **4** 309–14
- [39] Sadeghi-Avalshahr A R, Khorsand-Ghayeni M, Nokhasteh S, Molavi A M and Naderi-Meshkin H 2016 Synthesis and characterization of PLGA/collagen composite scaffolds as skin substitute produced by electrospinning through two different approaches *J. Mater. Sci., Mater. Med.* **28** 14
- [40] Sadeghi A R, Nokhasteh S, Molavi A M, Khorsand-Ghayeni M, Naderi-Meshkin H and Mahdizadeh A 2016 Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes *Mater. Sci. Eng. C* **66** 130–7
- [41] Pradhan S, Rajamani S, Agrawal G, Dash M and Samal S K 2017 *Characterization of Polymeric Biomaterials* ed M C Tanzi and S Farè (Cambridge: Woodhead Publishing) pp 147–73
- [42] Chang H-I and Wang Y 2011 Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds *Regenerative Medicine and Tissue Engineering – Cells and Biomaterials* ed D Eberli (London: InTechOpen)
- [43] Meng Z X, Zheng W, Li L and Zheng Y F 2011 Fabrication, characterization and *in vitro* drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold *Mater. Chem. Phys.* **125** 606–11
- [44] Cristallini C, Cibrario Rocchietti E, Gagliardi M, Mortati L, Saviozzi S, Bellotti E, Turinetto V, Sassi M P, Barbani N and Giachino C 2016 Micro- and macrostructured PLGA/gelatin scaffolds promote early cardiogenic commitment of human mesenchymal stem cells *in vitro Stem Cells Int.* **2016** 16
- [45] Castellanos-Ramirez D K, Gonzalez-Villordo D and Gracia-Bravo L J 2014 Manejo de heridas *Cirujano general* **36** 112–20
- [46] Agrawal G, Negi Y S, Pradhan S, Dash M and Samal S K 2017 *Characterization of Polymeric Biomaterials* ed M C Tanzi and S Farè (Cambridge: Woodhead Publishing) pp 57–81
- [47] Aldana A A and Abraham G A 2017 Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications *Int. J. Pharmaceutics* **523** 441–53
- [48] Erbetta C D A C, Alves R J, Resende J M, de Souza Freitas R F and de Sousa R G 2012 Synthesis and characterization of poly(D, L-lactide-co-glycolide) copolymer *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **3** 208
- [49] Tzoneva R, Faucheux N and Groth T 2007 Wettability of substrata controls cell–substrate and cell–cell adhesions *Biochim. Biophys. Acta* **1770** 1538–47
- [50] Rahman M et al 2011 Preparation and characterization of gelatin-based PVA film: effect of gamma irradiation *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **60** 1056–69
- [51] Palacios J, Albano C, González G, Castillo R V, Karam A and Covis M 2013 Characterization and thermal degradation of poly(d,l-lactide-co-glycolide) composites with nanofillers *Polym. Eng. Sci.* **53** 1414–29
- [52] Jansen L and Rottier P 1958 Some mechanical properties of human abdominal skin measured on excised strips *Dermatology* **117** 65–83
- [53] Ni Annaidh A, Bruyère K, Destrade M, Gilchrist M D and Otténio M 2012 Characterization of the anisotropic mechanical properties of excised human skin *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **5** 139–48
- [54] Xu F and Lu T 2011 Skin mechanical behaviour *Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain* (Berlin: Springer) pp 87–104
- [55] Draghi L 2017 *Characterization of Polymeric Biomaterials* ed M C Tanzi and S Farè (Cambridge: Woodhead Publishing) pp 177–202
- [56] Xu F and Lu T 2011 skin biomechanics experiments: measurement and influence of different factors *Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain* (Berlin: Springer) pp 105–54
- [57] Li W-J, Laurencin C T, Catterson E J, Tuan R S and Ko F K 2002 Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering *J. Biomed. Mater. Res.* **60** 613–21
- [58] Kalra A, Lowe A and Al-Jumaily A 2016 Mechanical behaviour of skin: a review *J. Mater. Sci. Eng.* **5**
- [59] Dong Y, Liao S, Ngiam M, Chan C K and Ramakrishna S 2009 Degradation behaviors of electrospun resorbable polyester nanofibers *Tissue Eng. B* **15** 333–51
- [60] Makadia H K and Siegel S J 2011 Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier *Polymers* **3** 1377–97
- [61] Deplaine H, Acosta-Santamaría V A, Vidaurre A, Gómez Ribelles J L, Dobarlaré M, Ochoa I and Gallego Ferrer G 2014 Evolution of the properties of a Poly(L-Lactic Acid) scaffold with double porosity during *in vitro* degradation in a phosphate-buffered saline solution *J. Appl. Polym. Sci.* **131**
- [62] Frank A 2005 Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of Poly(Lactic Acid) and Poly[(Lactic Acid)-Co-(Glycolic Acid)] *Polym. Int.* **54** 36–46
- [63] Pan Z and Ding J 2012 Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine *Interface Focus* **2** 366–77
- [64] Harada N, Watanabe Y, Sato K, Abe S, Yamanaka K, Sakai Y, Kaneko T and Matsushita T 2014 Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold *Biomaterials* **35** 7800–10
- [65] Lee S H, Jin K S, Bang O Y, Kim B J, Park S J, Lee N H, Yoo K H, Koo H H and Sung K W 2015 Differential migration of mesenchymal stem cells to ischemic regions after middle cerebral artery occlusion in rats *PLoS One* **10** e0134920
- [66] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D and Horwitz E 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement *Cytotherapy* **8** 315–7
- [67] Suto E G, Mabuchi Y, Suzuki N, Suzuki K, Ogata Y, Taguchi M, Muneta T, Sekiya I and Akazawa C 2017 Prospectively isolated mesenchymal stem/stromal cells are enriched in the CD73<sup>+</sup> population and exhibit efficacy after transplantation *Sci. Rep.* **7** 4838
- [68] Hendrickx A and Bossuyt X 2001 Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies *Cytometry* **46** 336–9

- [69] Tytherleigh L, Taparia M and Leahy MF 2001 Detection of hairy cell leukaemia in blood and bone marrow using multidimensional flow cytometry with CD45-PECy5 and SS gating *Clin. Lab. Haematol.* **23** 385–90
- [70] McGrath J L 2007 Cell spreading: the power to simplify *Curr. Biol.* **17** R357–8
- [71] Kim C H, Khil M S, Kim H Y, Lee H U and Jahng K Y 2006 An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation *J. Biomed. Mater. Res. B* **78B** 283–90
- [72] Khalili A and Ahmad M 2015 A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications *Int. J. Mol. Sci.* **16** 18149
- [73] Lowery J L, Datta N and Rutledge G C 2010 Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) fibrous mats *Biomaterials* **31** 491–504
- [74] Gentile P, Chiono V, Carmagnola I and Hatton P 2014 An overview of Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering *Int. J. Mol. Sci.* **15** 3640
- [75] Sousa A, Neves S C, Gonçalves I C and Barrias C C 2017 *Characterization of Polymeric Biomaterials* ed M C Tanzi and S Farè (Cambridge: Woodhead Publishing) 285–315
- [76] Davidenko N, Schuster C F, Bax D V, Farndale R W, Hamaia S, Best S M and Cameron R E 2016 Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry *J. Mater. Sci., Mater. Med.* **27** 148
- [77] Anderson J M, Rodriguez A and Chang D T 2008 Foreign body reaction to biomaterials *Semin. Immunol.* **20** 86–100
- [78] Lemperle G, Morhenn V and Charrier U 2003 Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation *Aesthetic Plast. Surg.* **27** 354–66
- [79] Ulery B D, Nair L S and Laurencin C T 2011 Biomedical applications of biodegradable polymers *J. Polym. Sci. B* **49** 832–64