



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES
“FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS
ELECTROHILADOS DE POLI(ϵ -CAPROLACTONA)/GELATINA
DE FIBRAS ALINEADAS PARALELAMENTE PARA SU
APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

SARA JACQUELINE HERRERA DOMÍNGUEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. RICARDO VERA GRAZIANO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2019

octubre



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

A los técnicos del Instituto de Investigaciones en Materiales por su apoyo en el análisis de las muestras:

Al Dr. Omar Novelo Peralta por las sesiones de microscopía electrónica de barrido, al M. en C. Miguel Ángel Canseco Martínez por los análisis de FTIR, a la M. en C. Adriana Tejeda Cruz por su apoyo en la obtención de los difractogramas de DRX, a la I.Q. Karla Eriseth Reyes Morales responsable del Laboratorio de Análisis Térmico.

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT), Laboratorio de Micro y Nanotecnología (uNTec):

A la Biol. Alejandra Jiménez Escobar por su apoyo en la realización de pruebas de cultivo celular y al Fís. Diego Zamarrón Hernández por su apoyo en la realización de pruebas mecánicas sobre los andamios electrohilados.

A la Lic. María Esther Carrillo Espinosa y María Isabel Gómez Romero por todo su apoyo durante mis trámites en el Posgrado.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	1
Introducción	5
1. Marco teórico	8
1.1. Tejidos	8
1.1.1. Tejido conjuntivo	9
1.1.2. Tejido muscular	9
1.2. Ingeniería de tejidos	11
1.2.1. Biomateriales	13
1.2.1.1. Poli(ϵ -caprolactona)	14
1.2.1.2. Colágena y gelatina	16
1.3. Electrohilado	17
1.3.1. Andamios de fibras alineadas	19
1.4. Estado del arte	22
1.5. Justificación	25
1.6. Hipótesis	26
1.7. Objetivo general	27
1.7.1. Objetivos particulares	27
2. Metodología	28
2.1. Materiales	28
2.2. Métodos	29
2.2.1. Preparación de la solución polimérica	29
2.2.2. Proceso de electrohilado	29
2.2.2.1. Uso de colector rotatorio para electrohilado de fibras alineadas .	33
2.2.2.2. Uso de electrodos para electrohilado de fibras alineadas	34

2.3.	Caracterización físico-química	35
2.3.1.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	35
2.3.2.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	36
2.3.3.	Difracción de rayos X (DRX)	37
2.3.4.	Análisis térmico	38
2.3.4.1.	Análisis termogravimétrico (TGA)	38
2.3.4.2.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	39
2.3.5.	Microscopía electrónica de barrido	39
2.3.6.	Medición de ángulo de contacto	40
2.3.7.	Caracterización mecánica	42
2.4.	Cultivo celular	45
3.	Resultados y análisis	49
3.1.	Caracterización de poli(ϵ -caprolactona)	49
3.1.1.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	49
3.1.2.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	51
3.1.3.	Transiciones térmicas de la PCL	52
3.2.	Caracterización de andamios de PCL/gelatina	54
3.2.1.	Análisis de fabricación de andamios de fibras aleatorias	54
3.2.1.1.	Cristalinidad de los andamios	55
3.2.1.2.	Transiciones térmicas	56
3.2.1.3.	Microestructura y morfología	57
3.2.1.4.	Hidrofilicidad de los andamios poliméricos	60
3.2.1.5.	Propiedades mecánicas	61
3.2.2.	Análisis de fabricación de andamios de fibras alineadas	62
3.2.3.	Fibras alineadas con colector rotatorio	62
3.2.4.	Fibras alineadas con electrodos de plata	66
3.2.4.1.	Cristalinidad de los andamios	68
3.2.4.2.	Transiciones térmicas	69
3.2.4.3.	Microestructura y morfología	70
3.2.4.4.	Hidrofilicidad de los andamios poliméricos	73
3.2.4.5.	Propiedades mecánicas	74
3.3.	Cultivo celular en los andamios electrohilados de fibras alineadas y aleatorias . .	75
3.4.	Conclusiones	79
	Bibliografía	81

Resumen

La elaboración de andamios poliméricos que mimeticen la matriz extracelular de un tejido específico, surge tras la necesidad de recrear tejidos del cuerpo humano que ayuden a aliviar las distintas enfermedades que los afectan.

Entre los muchos métodos para crear estos andamios artificiales se encuentra el electrohilado, un proceso de fabricación fácil y accesible que fabrica fibras poliméricas nanométricas que se enlazan unas con otras de forma aleatoria para crear una delgada película polimérica.

Es necesario que estos andamios artificiales tengan características favorables para el cultivo celular, que sean biocompatibles, biodegradables, con una estructura tridimensional, área superficial grande y altamente porosos, donde los poros estén interconectados.

Aunque el electrohilado fabrica estos andamios con relativa facilidad, enfrenta otro reto importante, que es construir andamios de estructura morfológica controlada, es decir, controlar la forma en que se 'tejen' las fibras poliméricas y conforman el andamio. La importancia es que, muchos de los tejidos del cuerpo humano necesitan que sus células sigan un arreglo estructural específico, por ejemplo, en la piel, el tejido muscular esquelético, tendón, córnea, entre muchos otros, las células mantienen una alineación paralela entre ellas para desarrollar funciones como resistencia, contracción y fuerza en el cuerpo humano.

Existen diversas modificaciones al arreglo convencional de electrohilado (que 'teje' fibras poliméricas de orientación azarosa) para fabricar nanofibras alineadas, sin embargo, pueden ser muy costosas o no muy exitosas. En esta investigación se presenta un método de fabricación fácil, de bajo costo, rápido y reproducible que presenta mejores resultados que otro método más usual (descritos en el marco teórico); y que consiste en la implementación de dos electrodos de plata paralelos como colector.

El objetivo de la presente investigación es fabricar andamios electrohilados de fibras alineadas para estudiar la influencia de la alineación de las fibras en el andamio, sobre la orientación y esparcimiento celular de fibroblastos humanos inmortalizados extraídos de piel.

Se usaron gelatina y poli(ϵ -caprolactona) (PCL) como biomateriales para fabricar andamios

de fibras desordenadas, usando la técnica de electrohilado. También se usaron dos electrodos de plata para crear el colector y se acoplaron fácilmente al arreglo experimental del electrohilado para crear andamios de fibras alineadas paralelamente.

Se hicieron estudios de FTIR, DSC y TGA para analizar si el electrohilado cambia las propiedades del material y son óptimas para su uso en el cultivo celular. Así como mediciones de las propiedades mecánicas, difracción de rayos X, ángulo de contacto y análisis de morfología y estructura en los andamios usando SEM, para entender su impacto en el cultivo celular.

La combinación de los biomateriales PCL y gelatina, mejoró las propiedades biológicas del andamio, ya que la gelatina mejora la hidrofiliidad del andamio que a su vez resulta en una mejor adherencia celular, ya que los andamios de PCL de fibras al azar tienen un ángulo de contacto de $121.2^\circ \pm 1.809$, mientras que los de PCL/gelatina de fibras al azar uno de $114.05^\circ \pm 1.806$, y los de PCL/gelatina de fibras alineadas uno de $18.75^\circ \pm 1.92$, es decir, los andamios de PLC/gelatina de fibras alineadas son hidrofílicos.

Se observó que las propiedades mecánicas de los andamios dependen de su arreglo estructural, es decir, el módulo elástico de los andamios cambia según la orientación de las fibras que los conforman. Para los de fibras desordenadas se obtuvo un módulo de Young de $E = 674.61 \text{ kPa} \pm 94.55$, mientras que para las fibras alineadas paralelamente el módulo elástico fue $E = 28.05 \text{ kPa} \pm 4.29$, es decir, disminuye la rigidez del material y es más fácilmente deformable.

Del cultivo se obtuvo adherencia celular de fibroblastos sobre los andamios de PCL/gelatina, y se observó un arreglo particular del citoesqueleto según el patrón de las fibras, es decir, al controlar el arreglo de las fibras en los andamios, es posible controlar la morfología celular.

Los resultados del cultivo celular muestran que el arreglo geométrico de las nanofibras poliméricas influye en el comportamiento celular, ya que las células adoptan la forma que les confiere el patrón de las fibras, es decir, la orientación paralela de las nanofibras inducen la alineación celular. Además se observa que el arreglo del citoesqueleto de los fibroblastos adquiere la forma del poro del andamio donde se encuentra.

Abstract

The manufacture of polymeric scaffolds that mimic the extracellular matrix of a specific tissue arises from the need to recreate tissues of the human body that help solve the various diseases that affect them. Among the many methods for creating artificial scaffolds, electrospinning is an easy and accessible manufacturing process. Nanometric polymeric fibres are randomly bonded together to create a thin polymeric film.

These synthetic scaffolds have favourable characteristics for cell culture, are biocompatible, biodegradable, have a three-dimensional structure, with a large surface area and are highly porous, where the pores are interconnected.

Although electrospinning makes these scaffolds relatively easily, it faces another critical challenge, which is to build scaffolds with a controlled morphological structure, that is, to control how the polymeric fibres are 'woven' and form the scaffold. Many cells in the human body need to follow a specific structural arrangement, for example, in the skin, skeletal muscle tissue, tendon, cornea, among many others. The cells maintain a parallel alignment between them to develop functions such as resistance, contraction and strength in the human body.

There are several modifications to the conventional electrospun arrangement (which 'weaves' randomly oriented polymeric fibres) to make aligned nanofibres; however, they can be expensive or not very successful. This research presents an easy, low cost, fast and reproducible manufacturing method that offers better results than another more usual method (described in the theoretical framework), and that consists of the implementation of two parallel silver electrodes as the collector.

The present investigation has as objective to study the influence of the alignment of the fibres in the scaffold, on the orientation and cellular spread of human epithelial fibroblasts.

Gelatin and poly (*epsilon*-caprolactone) as biomaterials, were used to produce disordered fibre scaffolds using the electrospinning technique. For comparison, two silver electrodes were also used to create the collector and were easily attached to the experimental electrospinning arrangement to create parallel aligned fibre scaffolds.

FTIR, DSC and TGA studies were carried out to analyze whether electrospinning changes the properties of the material and are optimal for use in cell culture. As well as measurements of mechanical properties, X-ray diffraction, contact angle, and morphology and structure analysis on scaffolds using SEM, to understand their impact on cell culture.

The combination of the PCL and gelatin improved the biological properties of the scaffold since gelatin enhances the hydrophilicity which in turn results in better cell adhesion since the random fibre PCL scaffolds have an angle of contact of $121.2^\circ \pm 1.809$, while those of PCL / random fibre gelatin one of $114.05^\circ \pm 1.806$, and those of PCL / lined fibre gelatin one of $18.75^\circ \pm 1.92$, that is, the aligned fibre PLC/gelatin scaffolds become hydrophilic.

It was observed that the mechanical properties of scaffolds depend on their structural arrangement, that is, the elastic modulus of the scaffolds changes according to the orientation of the fibres that make it up. For those with disordered fibres, a Young's modulus of $E = 674.61 \text{ kPa} \pm 94.55$ was obtained, while for the parallel aligned fibres the elastic modulus was $E = 28.05 \text{ kPa} \pm 4.29$, that is, the stiffness of the material and is more easily deformable.

In cell culture, fibroblast cell adhesion was observed on PCL / gelatin scaffolds, and a particular arrangement of the cytoskeleton was observed according to the pattern of the fibres, that is, by controlling the arrangement of the fibres in the scaffolds, it is possible to control cell morphology. The results of the cell culture show that the geometric arrangement of the polymeric nanofibres influences the cellular behavior, since the cells adopt the shape that gives them the pattern of the fibres, that is, the parallel orientation of the nanofibres induces cell alignment. Furthermore, it is observed that the arrangement of the cytoskeleton of the fibroblasts takes the shape of the pore of the scaffold where it is located.

Introducción

En México actualmente, las enfermedades y traumatismos que afectan al sistema musculoesquelético, son considerados como un grave problema de salud pública, debido a su magnitud, impacto y trascendencia, ya que pueden generar una discapacidad temporal o permanente en las personas [1].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los trastornos musculoesqueléticos (TME) como problemas de salud del aparato locomotor que abarcan: músculos, tendones, esqueleto óseo, cartílagos, ligamentos y nervios. Éstos son consecuencia de sobrecarga muscular en actividades realizadas con exceso de fuerza, por tiempos prolongados, repetitivos y frecuentes; por trabajar en posturas perjudiciales, esfuerzo muscular estático, inactividad muscular, exposición a vibraciones, factores ambientales, riesgos físicos y factores psicosociales [2].

La OMS y el Banco Mundial, en su Informe Mundial sobre la Discapacidad 2011, estima que en el mundo existen más de 1,000 millones de personas con discapacidad, donde las enfermedades y lesiones que afectan el sistema musculoesquelético y al tejido conjuntivo, son una de las causas más frecuentes [1].

Además, los TME son las enfermedades laborales más frecuentes en la población trabajadora en México. Donde factores como la desigualdad social, la falta de normatividad y la pobreza, contribuyen a la gravedad de la discapacidad, que no sólo afecta a la persona que la sufre, sino a aquellos que la cuidan, a los familiares, a la comunidad y a cualquiera que apoye. También el elevado costo económico que representa debido a incapacidades, ausencia laboral, jubilaciones anticipadas, y gastos médicos y de tratamiento [1,2].

Para enfrentar las enfermedades y traumatismos que afectan al sistema musculoesquelético se establecen estrategias de prevención, diagnóstico, tratamiento, y rehabilitación oportuna y eficiente. Sin embargo dichas acciones de solución son establecidas en función de la enfermedad o traumatismo a tratar, debido a que en éstas se ve afectado un órgano o tejido específico. En el presente trabajo se considera una acción de tratamiento: la ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos se define como un campo multidisciplinario que aplica principios de física, química, ingeniería y de ciencias de la salud para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un órgano o un tejido [4].

Así, la ingeniería de tejidos ofrece a los pacientes enfermos la promesa de crear soluciones para aliviar su enfermedad, y existen numerosos procedimientos para crearlas. Para lograrlo se consideran los conceptos y aspectos más importantes de cada tejido, porque si bien, la célula es la unidad funcional del organismo, son en realidad los tejidos los responsables de la funcionalidad del cuerpo humano. Esto es, se debe considerar a las células como un conjunto organizado, y para ello también se debe considerar la matriz extracelular.

La matriz extracelular (ECM, siglas en inglés) se define como todas las moléculas secretadas que están inmovilizadas fuera de una célula, incluidos los factores de crecimiento, las citocinas y las moléculas de adhesión celular, aunque las macromoléculas son las principales responsables de la arquitectura extracelular específica del tipo de tejido. La ECM se compone principalmente de dos clases de macromoléculas: proteínas fibrosas (incluidos colágenos y elastina) y glucoproteínas (incluidas fibronectina, proteoglicanos y laminina) [60]. Entonces para un tejido específico es necesario considerar no sólo a las células y a su matriz extracelular, sino también su composición y su organización, ya que de esto dependerá que las células cumplan con la función específica del tejido.

Esto nos conduce a un procedimiento en la ingeniería de tejidos que permite fabricar andamios que simulan la matriz extracelular: el electrohilado.

El electrohilado es una técnica de procesamiento eficiente y asequible que permite fabricar nanofibras con diámetros de entre 0.01 a 10 micrómetros (μm). El término fibra viene de la palabra francesa fibre, en latín fibra que significa hilo o filamento [5].

La adecuada modificación de esta técnica, permite controlar la orientación de las fibras y lograr un patrón específico en el andamio, lo que es útil durante el cultivo celular ya que la correcta estructura en los andamios facilita la adherencia, diferenciación y proliferación celular, además la orientación de las células permite un crecimiento similar al del tejido natural y los andamios sirven de estructura a las células hasta que ellas producen la propia.

La presente investigación se inspira en aquellos tejidos que necesitan una orientación celular particular para funcionar. Se usa la convencional técnica de electrohilado, y su modificación para crear fibras poliméricas alineadas entre ellas paralelamente con el uso de electrodos paralelos de plata de fácil fabricación y bajo costo. Se fabricaron andamios de polímeros biocompatibles y biodegradables, poli(ϵ -caprolactona)/gelatina, y se realizó una comparación

de las propiedades físicas, químicas y biológicas en andamios de fibras alineadas paralelamente y fibras desordenadas, para analizar los cambios en el esparcimiento y arreglo del citoesqueleto de las células cuando son cultivadas sobre dichos andamios.

Capítulo 1

Marco teórico

1.1. Tejidos

La célula es la unidad fundamental del organismo, y un conjunto de células organizadas que realizan una función específica se llama tejido, palabra que viene del latín *texere* y significa tejer.

Existen cuatro tipos básicos de tejido que componen a los órganos del cuerpo humano: el tejido conjuntivo, epitelial, muscular y nervioso. Éstos a su vez se clasifican principalmente según su morfología (tejidos epitelial y conjuntivo) o según sus propiedades funcionales (tejidos muscular y nervioso) [3]. A continuación se describe el tejido conjuntivo y el tejido muscular, debido a que presentan una organización celular ordenada.

La ECM se encarga de sostener físicamente a las células y de darle estructura al tejido, ya que sus moléculas determinan su composición, organización y topografía. Es una barrera bioquímica que regula las funciones metabólicas de las células. Se compone principalmente de agua, proteínas y polisacáridos, que incluye dos clases principales de macromoléculas: proteínas fibrosas (colágenas y elastina) y glucoproteínas (fibronectina, proteoglicanos y laminina); además de todas las moléculas secretadas que están inmovilizadas fuera de una célula, incluidos los factores de crecimiento, las citocinas, y las moléculas de adhesión celular [60].

Por su única arquitectura (composición y topografía), la ECM es específica para cada tejido, debido a que cada uno posee células específicas que interactúan dinámicamente de forma bioquímica y biofísica. Cada una de sus moléculas es capaz de interactuar con otras a fin de llevar a cabo la función del tejido como soporte estructural, transmisión de fuerzas y filtración macromolecular.

1.1.1. Tejido conjuntivo

Este tejido es de gran importancia debido a que sustenta a los otros tres tipos básicos de tejido, los conecta, de allí su nombre. La característica que define al tejido conjuntivo es su matriz extracelular [3]. Por lo que su clasificación principal es:

- tejido conjuntivo laxo: las fibras de su matriz extracelular tienen una distribución laxa y desordenada, con abundantes células.
- tejido conjuntivo denso, subclasificado como modelado y no modelado: las fibras son abundantes y las células son pocas. Si las fibras se organizan de forma ordenada se llama denso modelado y si se encuentran de forma azarosa o irregular se llama denso no modelado.

Un ejemplo de tejido conjuntivo denso no modelado es la capa reticular que se encuentra en la dermis, y que es resistente contra el desgarro como consecuencia de las fuerzas de estiramiento aplicadas desde distintas direcciones [3].

Los tendones (cordones que unen el músculo al hueso), ligamentos (que unen un hueso a otro) y aponeurosis (membrana que recubre los músculos y los fija a otras partes del cuerpo) son ejemplos de tejido conjuntivo denso modelado, ya que sus fibras están organizadas de forma compacta, ordenada y paralela para lograr la resistencia máxima que necesitan esos tejidos.

El tendón es principalmente un tejido conectivo transmisor de fuerza uniaxial, sus células características son los fibroblastos y sólo estas células son las que producen las fibras en la matriz extracelular, que conectan el hueso con el músculo [60].

El tejido óseo es un tejido especializado del tejido conjuntivo, y es un principal constituyente de los huesos en los vertebrados, se compone de células y otros componentes extracelulares calcificados que forman la matriz ósea.

1.1.2. Tejido muscular

La contractilidad es la característica que define al tejido muscular [5], y es debido a que las células musculares se estructuran de forma ordenada y paralela, por lo que son responsables del movimiento de un organismo.

Existen tres tipos de tejido muscular, el liso, el esquelético y el cardiaco, ya que este tejido se clasifica entre otras cosas por el aspecto de sus células, como dos tipos principales:

- Tejido muscular liso: las células no presentan estriaciones transversales.
- Tejido muscular estriado: las células presentan estriaciones transversales. A su vez el estriado se divide en:

- tejido muscular estriado esquelético: fijado a los huesos, es el responsable de mantener la postura y del movimiento de los esqueletos axial y apendicular.
- tejido muscular estriado visceral: su morfología es como la del esquelético pero se especializa en las funciones de fonación, respiración y deglución, por lo que sólo está en lengua, faringe, porción lumbar del diafragma y segmento superior del esófago.
- tejido muscular estriado cardiaco: se encuentra en la pared del corazón y en sus grandes venas.

El músculo esquelético es un tejido dinámico que nos permite tener movimiento, mantener una postura y darnos soporte. Es el tejido más abundante en el cuerpo humano, representa un 40 % de su masa, y se caracteriza por conjuntos de largas células especializadas, dispuestas de forma ordenada y paralela, cuya función principal es la contracción [3]. Ver figura 1.1. La unidad estructural del músculo esquelético es la miofibra, una célula de músculo multinucleada, con un diámetro de entre 10-100 micrómetros y longitud que varía desde varios centímetros hasta un par de milímetros. Se forman cuando las células mioblastos proliferan y se fusionan para formar estructuras cilíndricas llamadas miotubos, que al madurar forman las fibras musculares, consideradas como las células musculares [3].

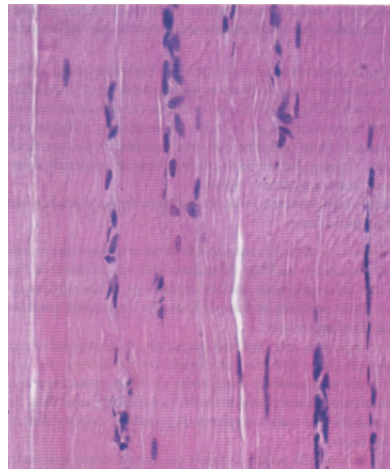


Figura 1.1: Micrografía de un músculo esquelético. Las células musculares se disponen paralelas, su orientación es vertical y la longitud de cada fibra es tal que se extiende más allá de los bordes superior e inferior de la foto. Figura tomada de [3]

Las fibras musculares esqueléticas están innervadas por neuronas motoras que se ubican en la médula espinal. Los axones de las neuronas se ramifican conforme se acercan al músculo y originan ramificaciones terminales que finalizan sobre fibras musculares individuales [3].

Una unidad motora se forma de una neurona más las fibras musculares que inerva. El número de fibras musculares que cada neurona puede inervar depende del tipo de músculo. Si es pequeño tendrá menos (un par) fibras musculares por cada unidad motora y al contrario si el músculo

es grande tendrá varias centenas de fibras musculares por unidad motora. La neurona motora no sólo instruye a las células musculares para que se contraigan sino que también ejerce una influencia trófica sobre el músculo, es decir, el trofismo depende del movimiento e inervación de los músculos por lo que puede aumentar o disminuir el volumen de éstos. Si se destruye la inervación de un músculo, las células musculares sufren alteraciones [3, 6].

La organización axial y longitudinal especializada de fibroblastos y mioblastos en tendón y músculo esquelético, respectivamente, son una característica importante de dichos tejidos ya que sus principales funciones son tener una alta resistencia tensora y la contracción. En conjunto, el sistema musculoesquelético humano sigue una compleja estructura, como lo muestra el esquema general de la figura 1.2.

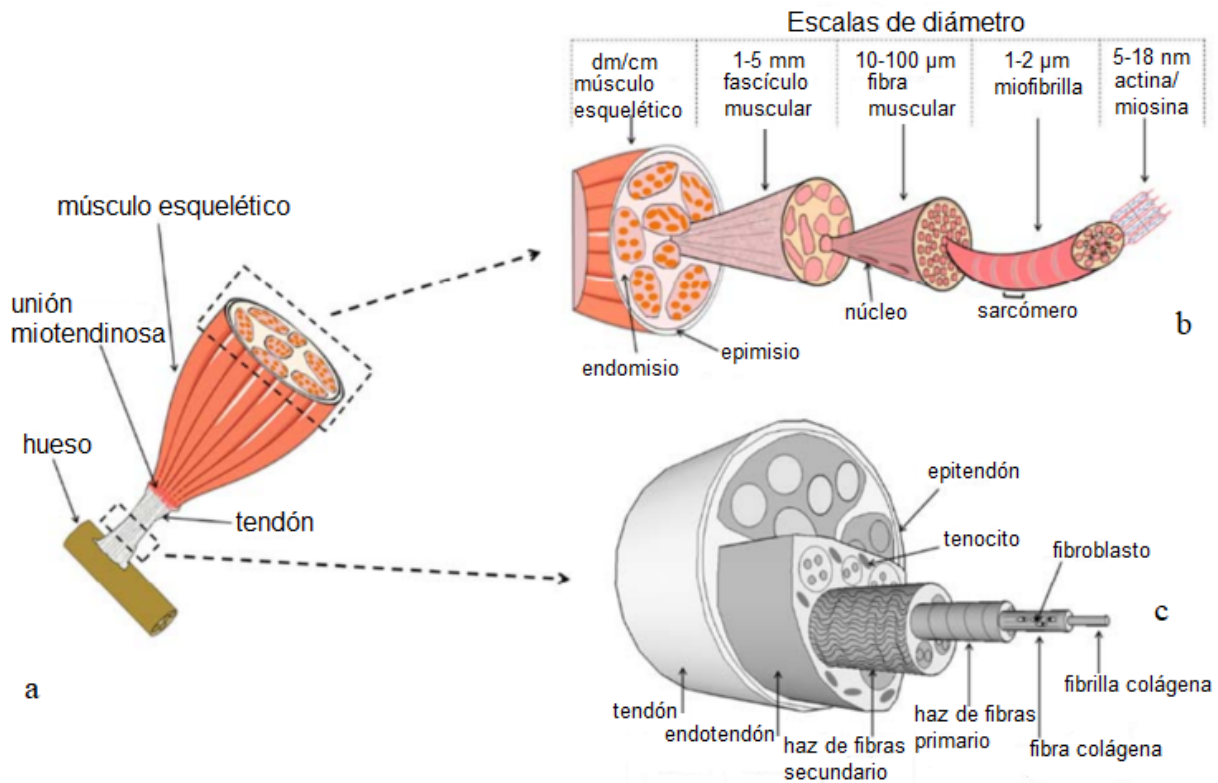


Figura 1.2: a) Visión general de hueso-tendón-músculo en el sistema músculo-esquelético humano, b) músculo esquelético, c) tendón. Figura tomada y modificada de [4]

1.2. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario que aplica principios de física, química, ingeniería y de ciencias de la salud para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido, un órgano, extremidad o parte anatómica [4].

Se construye con tres pilares, las células, los biomateriales y el ambiente (estímulos físicos y químicos) [7]. La ingeniería de tejidos busca crear soluciones para pacientes heridos o enfermos a partir de la regeneración de órganos o tejidos mediante el cultivo de células.

En particular, la ingeniería de tejido muscular esquelético y de tendón, presentan grandes retos debido a que son numerosos los parámetros que influyen en la respuesta biológica; es decir, la alineación celular es la característica principal de estos tejidos para que realicen sus funciones, sin embargo, existen otras variables que intervienen, por ejemplo, en el músculo esquelético intervienen estímulos eléctricos y mecánicos, además de químicos, que completan su funcionamiento. Como se observa en la figura 1.2, el músculo esquelético está ligado al tendón que a su vez se mantiene fijo al hueso. Por lo que se complica la elaboración de un protocolo experimental para la regeneración de estos tejidos.

El proceso para fabricar andamios para ingeniería de tejidos (ver figura 1.3) consiste en: seleccionar un material biocompatible con el cuerpo humano, para elaborar un andamio que tenga la forma, estructura y propiedades mecánicas similares a las de los tejidos de interés, ya que esto influye en el comportamiento de las células sobre el andamio [7].

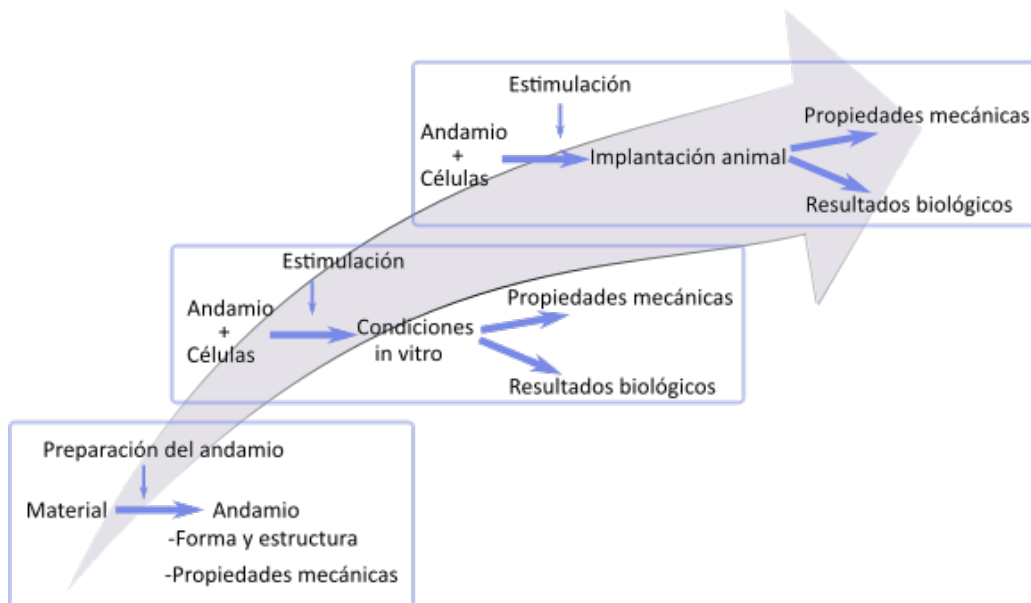


Figura 1.3: Diseño experimental a seguir en la ingeniería de tejidos. Para la preparación del andamio se selecciona el material óptimo que le dé la forma, estructura y propiedades mecánicas necesarias para su posterior uso en el cultivo celular. Tomado y modificado de [7].

1.2.1. Biomateriales

En el apartado anterior se describió a la matriz extracelular y su importancia, como ésta se encarga de darle soporte mecánico y estructural a cada tejido, en la ingeniería de tejidos es necesario fabricar una matriz extracelular artificial que sostenga a las células y les permita después crear una propia, además de que permita la interacción entre las células y el paso de nutrientes y otros productos. Para ello se eligen biomateriales.

La selección de los biomateriales para construir andamios celulares se hace de tal forma que se maximice la proliferación y diferenciación celular para lograr la regeneración del tejido, es decir, deben tener las adecuadas características químicas, físicas y biológicas.

Los biomateriales son materiales que se usan en aplicaciones médicas destinados para interactuar en sistemas biológicos. Se usan para aumentar, reparar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo que se haya perdido por traumatismo, enfermedad o lesión [9]; es decir, son materiales biocompatibles y biodegradables.

El término biocompatible hace referencia a la compatibilidad célula-material, como se haría en un proceso natural célula-matriz extracelular, es decir, el material debe ser capaz de realizar su función según su aplicación sin dañar ni a las células ni al sistema, además de no generar rechazo. Mientras que el término biodegradable se refiere a que lo ideal es que esta matriz extracelular artificial denominada andamio se degrade y sea reemplazado por tejido nativo.

Los biomateriales se clasifican en: polímeros, metales, cerámicos y compuestos. Todos éstos tienen importantes aplicaciones en la ingeniería de tejidos, sin embargo, los más usados son los polímeros porque gracias a sus propiedades, pueden ser rígidos o flexibles, biodegradables, bioinertes, se pueden funcionalizar con diferentes biomoléculas y pueden procesarse a través de diferentes métodos para lograr una variedad de estructuras. Y así lograr aplicaciones en tejidos blandos y duros en el campo de la ingeniería de tejidos, y en el área farmacéutica [9].

Los polímeros son largas cadenas de moléculas de alto peso molecular, razón por la que se conocen como macromoléculas. Se componen de monómeros que son las unidades básicas que se repiten y que se unen covalentemente. Debido a la unión covalente, la mayoría de los polímeros no son conductores. Para que una sustancia sea llamada polímero debe tener un peso molecular de por lo menos 25,000 g/mol [8,9].

Los biomateriales también se clasifican en sintéticos o naturales, degradables o no degradables, e incluso en híbridos que son la combinación de otros con el fin de mejorar las

propiedades del andamio [4, 7].

Entre los biomateriales biológicos más usados están colágena, fibroína, quitosano y alginatos, mientras que en los sintéticos aparecen poliésteres biodegradables como la poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico) (PLA) y el poli (ácido D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA), por mencionar algunos.

Sin embargo, para que un material se aplique en la ingeniería de tejidos debe aprobarse clínicamente por la FDA (Food and Drug Administration) que es una agencia del gobierno de Estados Unidos de América que se encarga de regular productos y alimentos. La importancia de esta aprobación es que protege la salud y brinda seguridad al consumo humano. Esto garantiza que el material se puede aplicar medicamente en humanos.

1.2.1.1. Poli(ϵ -caprolactona)

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) de grado médico es un polímero que es de especial interés en la ingeniería de tejidos por sus características, es sintético, está certificado por la FDA así que es biocompatible, también es biodegradable, semicristalino, hidrofóbico, y es miscible con otros polímeros [10].

La PCL tiene una temperatura de descomposición (T_d) de entre 200°C y 220°C, una entalpía de fusión ΔH_m de 8.9 kJ/mol [11], una temperatura de fusión (T_m) de entre 59°C y 64°C, una temperatura de transición vítrea (T_g) de -60°C [12]. Su fórmula molecular es $(C_6H_{10}O_2)_n$, cuya estructura molecular se puede observar en la figura 1.4.

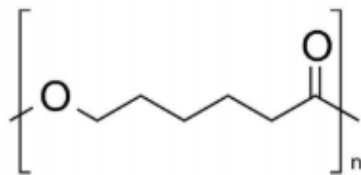


Figura 1.4: Estructura química de poli(ϵ -caprolactona) (PCL)

Sus propiedades físicas, térmicas y mecánicas dependen de su peso molecular (que puede ser muy bajo como M_w : 1250 o muy alto como M_w : 80000, [62]) y también de su grado de cristalinidad (su cristalinidad disminuye con el aumento de su peso molecular). Además, el peso molecular y la concentración de la solución controlan la viscosidad de la solución, que es un parámetro importante en el electrohilado.

Posee una lenta tasa de degradación, desde meses hasta 3 o 4 años en presencia de agua, aunque esto depende de su peso molecular, cristalinidad y morfología. Su principal inconveniente es su

hidrofobicidad que se supera en muchos casos al ser mezclado con otros biomateriales.

El peso molecular de la PCL es importante para ingeniería de tejidos, pero depende de cada aplicación. Generalmente varía de 3,000 a 80,000 g/mol [73] y se usa en el electrohilado para la ingeniería de tejidos por su biocompatibilidad, su bajo costo, su no toxicidad, por su alta resistencia a la tensión, una tasa de biodegradación lenta que favorece el crecimiento celular durante un período más largo, lo que permite reproducir la matriz extracelular [63]. Para aplicaciones en músculo, tendón, cartílago y hueso, donde se requiere alta resistencia mecánica se prefieren pesos moleculares iguales o mayores a 80,000 g/mol [7], ya que la PCL puede lograr una resistencia última a la tracción mayor a 16 MPa y un módulo de elasticidad mayor a 0.4 GPa [10, 12, 72].

Además tiene otras aplicaciones como para fabricar material odontológico, como apósito de heridas, anticonceptivos, envasados de alimentos, por mencionar algunos.

La PCL se sintetiza principalmente por polimerización de apertura de anillo ϵ -caprolactona por catalizadores iónicos o metálicos, por polimerización de apertura de anillo de 2-metileno-1,3-dioxepano por radical libre y sobre la condensación de ácido 6-hidroxicaproico [10]. Ver figura 1.5.

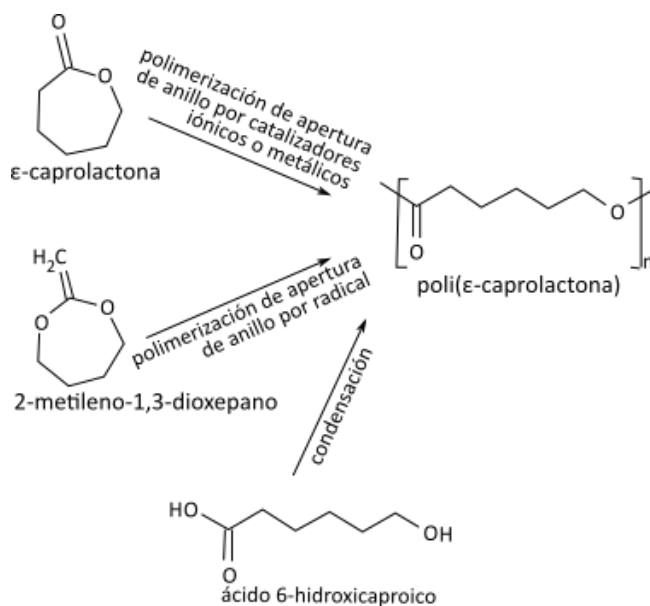


Figura 1.5: Rutas para sintetizar la PCL. Figura tomada y modificada de [10].

1.2.1.2. Colágena y gelatina

El uso de la colágena en la ingeniería de tejidos es muy favorable porque es una de las principales proteínas de la matriz extracelular. Representa del 25 % al 35 % de la proteína total en el cuerpo humano, ya que se encuentra en tendones, ligamentos, piel, tejido muscular, córneas, etc; y es sintetizada por los fibroblastos que son parte del tejido conjuntivo [13].

La colágena es biodegradable, biocompatible, no citotóxica, y puede procesarse de muchas formas, promueve la adhesión y proliferación celular. Sin embargo su uso único en la fabricación de andamios para ingeniería de tejidos no es recomendable ya que los resultados no son muy reproducibles porque dependen del aislamiento de la colágena, también por su baja resistencia mecánica y poca elasticidad, tiene un alto costo y además, la colágena se desnaturaliza cuando es electrohilada (técnica que interesa en la presente tesis) [15].

La gelatina es una proteína fibrosa que se obtiene por hidrólisis de la colágena, es decir, se produce un cambio estructural de la proteína. Su composición química es similar a la colágena que se compone de tres cadenas alfa, distribuidas en forma de hélice. Estas cadenas forman estructuras tridimensionales con la geometría correcta para intercambiar enlaces de hidrógeno. La estructura molecular de la gelatina se compone principalmente de múltiples repeticiones de la secuencia gli-x-y, donde 'x' es prolina, y 'y' es hidroxiprolina [13, 14].

Las gelatinas comerciales se extraen principalmente de piel y huesos de ganados porcinos y bovinos, y de pescados. La gelatina es biocompatible, biodegradable, provee baja inmunogenicidad, se asegura la seguridad física, química, bacteriológica y virológica de la gelatina que es procesada por numerosos pasos de esterilización, se puede electrohilar, promueve la adhesión y proliferación celular; y además tiene un bajo costo [13, 15].

La colágena y la gelatina son excelentes polímeros naturales, se mezclan fácilmente con otros polímeros sin cambiar su composición química por lo que no dañan a las células y promueven su adhesión y diferenciación [16]. Tienen limitaciones como el que no se pueden electrohilar; por lo que es ideal combinarlos con otros biomateriales, naturales o sintéticos que mejoren sus propiedades y se adapten a las necesidades de cada aplicación.

Ambos son biocompatibles, biodegradables, promueven la adhesión y proliferación celular; sin embargo, a diferencia de la colágena, la gelatina es de bajo costo, presenta menor inmunogenicidad, mejor solubilidad en sistemas acuosos y es de fácil procesamiento para modificar sus propiedades mecánicas y bioquímicas [64], al contrario de la colágena que es difícil de manipular sin alterar su estructura.

1.3. Electrohilado

Los biomateriales son de gran importancia para construir andamios para cultivo celular, pero además es necesario considerar el diseño, y esto se logra con el método de fabricación.

El electrohilado es una técnica de procesamiento fácil, eficiente y de bajo costo, que permite fabricar nanofibras con diámetros de entre 0.01 a 10 micrómetros.

La palabra fibra viene del latín *fibra* que significa hilo o filamento [17].

Las nanofibras de polímero elaboradas con esta técnica tienen muchas aplicaciones, como en las áreas farmacéutica y médica, en la elaboración de material médico, en la filtración y los sistemas de administración de fármacos, así como en los andamios para ingeniería de tejidos.

La primera patente del proceso de electrohilado la presentó John Francis Cooley a principios del siglo XX, y fue hasta 1964 que Sir Geoffrey Ingram Taylor creó un modelo matemático para explicar la forma del cono (ahora llamado cono de Taylor, en honor de Sir Geoffrey) que presenta la gota del fluido que es sometida a un intenso campo eléctrico, y que es la responsable de la creación de las nanofibras [18].

Son numerosos los parámetros que se deben considerar para fabricar un andamio con la técnica de electrohilado. Las condiciones óptimas se dan según tres puntos esenciales:

a) Considerar que los parámetros ambientales como temperatura, humedad y presión influyen enormemente en el proceso de electrohilado. Para humedades relativas (RH, siglās en inglés) mayores a 70 % es difícil la formación de fibras y empiezan a aparecer defectos en su morfología [69,74]. Usualmente se trabaja a temperatura ambiente [75] a menos que se presenten dificultades para electrohilar en términos de calidad de las fibras. También se acostumbra operar a presión ambiental.

b) La solución polimérica: Se compone del polímero y el solvente usados, y se consideran sus propiedades como el peso molecular del polímero, tensión superficial, la viscosidad y conductividad de la solución.

c) El proceso de electrohilado [17, 18] (ver figura 1.6), que se describe a continuación:

- i) En la punta de la aguja de una jeringa (que contiene la solución polimérica y que está fija sobre una bomba para controlar su salida) se concentra una gota de solución polimérica. En el lado opuesto y perpendicular a la aguja se coloca un colector que usualmente es de aluminio.
- ii) Entre la aguja y el colector se aplica un alto voltaje de 10 a 30 kV, el intenso campo eléctrico

ocasiona que la gota se deforme en forma cónica (conocida como cono de Taylor) hasta que las fuerzas eléctricas superan su tensión superficial y se expulsa un chorro de solución polimérica. iii) A su salida, el chorro expulsado mantiene una pequeña trayectoria recta hasta que debido a numerosos factores (como la viscosidad y la tensión superficial de la solución polimérica, las fuerzas electrostáticas, la fricción del aire y la gravedad) adopta una trayectoria caótica, lo que provoca que el chorro se estire y alcance diámetros submicrométricos. Así, la solución polimérica llega al colector en forma de fibras ya que durante su trayecto todos los solventes se evaporaron. iv) Debido a la trayectoria caótica del chorro, las fibras se depositan en el colector de manera aleatoria, aunque existen numerosos procesos reportados para depositar fibras alineadas o con patrones específicos.

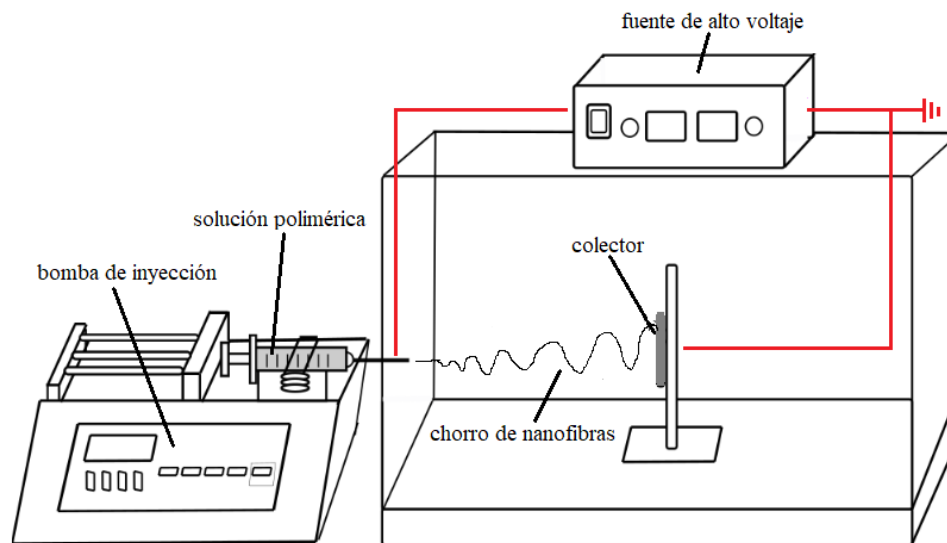


Figura 1.6: Arreglo convencional del electrohilado. En este proceso, las variables: velocidad de flujo, el voltaje, la distancia de la aguja al colector, el tipo de colector y su geometría, se pueden controlar y son necesarias para estandarizarlo. La figura muestra el alto voltaje que se aplica entre la aguja de la jeringa y el colector, condición que forma las nanofibras que conforman el andamio electrohilado.

Los andamios producidos por esta técnica son membranas de estructura tridimensional con gran área superficial, alta porosidad, poros interconectados, buenas propiedades mecánicas, que promueven el movimiento celular y el transporte de nutrientes y desechos metabólicos [16].

Para lograr esto es necesario considerar los puntos a, b y c mencionados, ya que aunque el electrohilado es un proceso de fabricación relativamente fácil, se trata de un flujo tridimensional con superficies libres que varía con el tiempo [17].

1.3.1. Andamios de fibras alineadas

Los andamios electrohilados apoyan la creación de nuevos tejidos y matriz extracelular [16], por lo que su fabricación se inspira en biomimetizar el tejido de interés, desde estructura, funciones y propiedades [7]. El electrohilado convencional fabrica andamios de fibras orientadas al azar, pero en ciertas ocasiones son necesarios andamios con patrones específicos como fibras alineadas, que son útiles en la ingeniería de tejido muscular esquelético y de tendón, córnea, entre muchos otros.

En la Figura 1.6 se muestra el arreglo común para el electrohilado, en el que las fibras obtenidas están depositadas de forma azarosa sobre el colector. Sin embargo es posible obtener fibras alineadas por varios métodos, como se puede observar en la figura 1.7 [7, 18, 19]. Ya sean mecánicos en los que se usan agujas, discos o colectores rotatorios, a través de imanes para generar un intenso campo magnético, con el uso de electrodos, modificando la geometría del colector, a través de fuerza centrífuga, con el uso de electrohilado de campo cercano, usando electrodos auxiliares como anillos o con patrones específicos para manipular la trayectoria que debe seguir el chorro polimérico, o con la combinación de éstos métodos; sólo por mencionar algunos [20, 21].

Todos los métodos mencionados para elaboración de andamios electrohilados de fibras alineadas tienen sus ventajas y desventajas, en general, según la investigación realizada por este trabajo y con la experiencia en la técnica de electrohilado, se decidió probar dos métodos para lograr la alineación de fibras: colector rotatorio y electrodos (ver figura 1.7, A y E), mismos que se describen a continuación.

Los colectores rotatorios, que usualmente son cilindros de dimensiones variadas, son muy usados en el electrohilado porque pueden producir fibras desordenadas y alineadas. Esto es debido a que, para lograr la alineación de fibras poliméricas el colector debe girar a velocidades angulares superiores a 1000 rpm, pero menores a 5000 rpm [7], ya que fuera de este rango el colector se desestabiliza por la alta velocidad y las fibras se electrohilan de forma desordenada. Otro método usual para producir fibras de orientación alineada y paralela consiste en sustituir el colector del electrohilado convencional por un colector plano aislante y en sus extremos colocar electrodos paralelos entre ellos. De tal forma que las fibras poliméricas se depositan entre los electrodos sobre el colector aislante.

Tanto los cilindros rotatorios como los electrodos son excelentes opciones para lograr la alineación de fibras poliméricas, y existen varios artículos que reportan el uso de PCL y gelatina [47]- [55] . Sin embargo, el proceso de diseñar, armar y estandarizar el funcionamiento

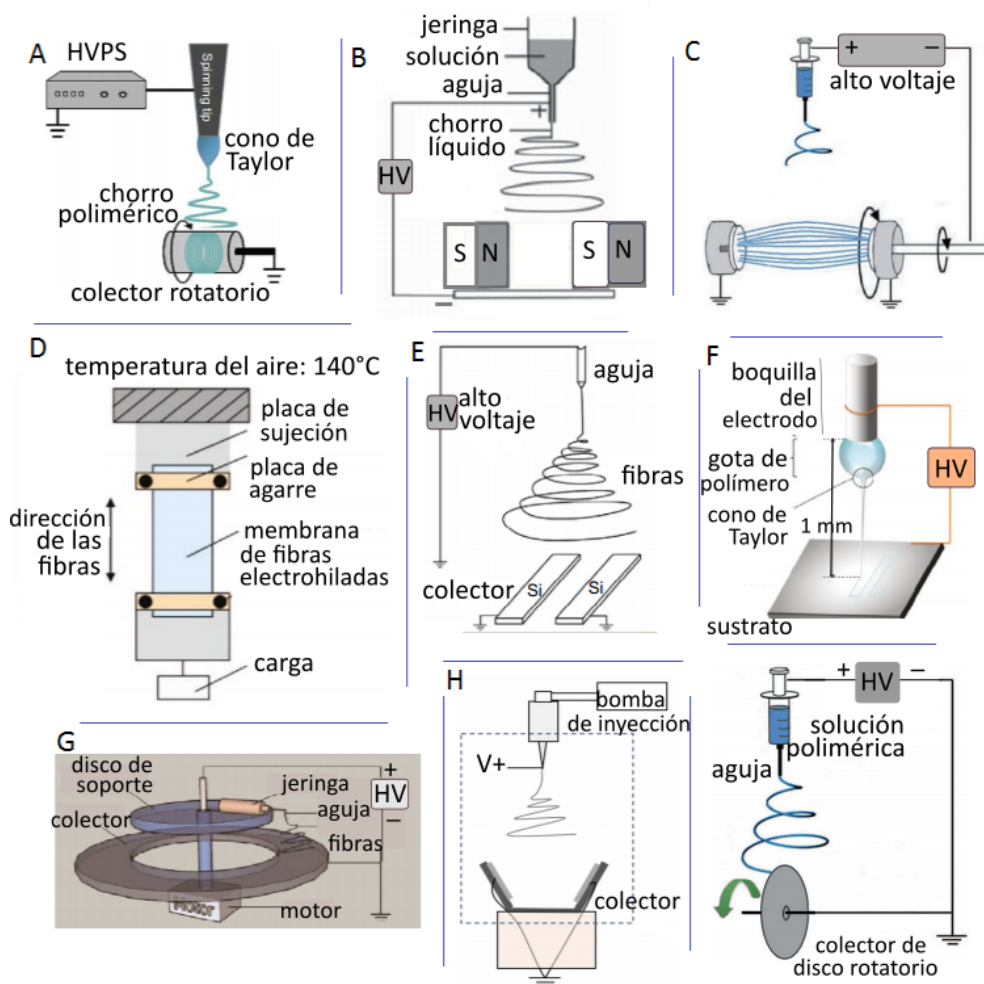


Figura 1.7: Tomadas y modificadas de [19,21,58], estas imágenes muestran algunos de los métodos reportados para fabricar andamios de fibras alineadas paralelamente usando electrohilado. A) muestra un colector rotatorio que gira perpendicularmente al eje de la aguja de la jeringa y colecta a las fibras alineadas paralelamente sobre su eje de rotación, B) uso de imanes para coleccionar las fibras alineadas paralelamente entre los polos norte y sur de dos imanes, C) cilindros giratorios colocados paralelamente entre ellos y perpendicularmente a la aguja de la jeringa, uno de los cilindros gira para generar las fibras alineadas paralelamente entre ambos cilindros, E) electrodos de silicio paralelos perpendiculares a la aguja, paralelos entre ellos para coleccionar las fibras poliméricas y lograr una alineación paralela, F) electrohilado de campo cercano (NFES por sus siglas en inglés) que permite controlar el depósito de las nanofibras, disminuyendo la distancia de separación entre el electrodo y el colector a menos de 5 mm, evitando así las inestabilidades de flexión por chorro, G) Discos colectores que giran alrededor de un eje central, sobre el superior se encuentra la jeringa con la solución polimérica y sobre el inferior se coleccionan las fibras alineadas paralelamente, H) modificación de la geometría del material aislante que colecciona las fibras alineadas en su centro, el material conductor está en los extremos, I) colector de disco rotatorio que gira en dirección perpendicular a la aguja y colecta las fibras alineadas.

de un colector rotatorio resulta demasiado costoso si se compara con el uso de electrodos, cuyo costo puede variar enormemente dependiendo de la técnica con la que se fabrica y los materiales que se usan para ello.

Un electrodo es un material conductor (plata, oro, grafito, acero inoxidable) que permite hacer contacto eléctrico con un medio no metálico. Su costo depende del conductor y su método de fabricación, por ejemplo los procesos fotolitográficos son los más costosos, ya que requieren numerosas etapas, equipos y materiales de costos elevados.

Sin embargo, existen otras técnicas menos costosas que pueden emplearse en la fabricación de electrodos. La más sencilla de estas usa la técnica de 'Doctor blading', que consiste en depositar material conductor dentro de un zurco pre-fabricado en el material aislante, para posteriormente retirar el exceso con una navaja, de forma que se obtiene un electrodo de geometría específica [29]; ver figura 1.8. La geometría del electrodo y sus características están en función de su aplicación, así para fabricar el zurco o molde que le dará forma se usa desde, procesos controlados como maquinado CNC (control numérico computarizado) hasta procesos simples como enmascarar el sustrato aislante con cinta adhesiva formando la geometría deseada.

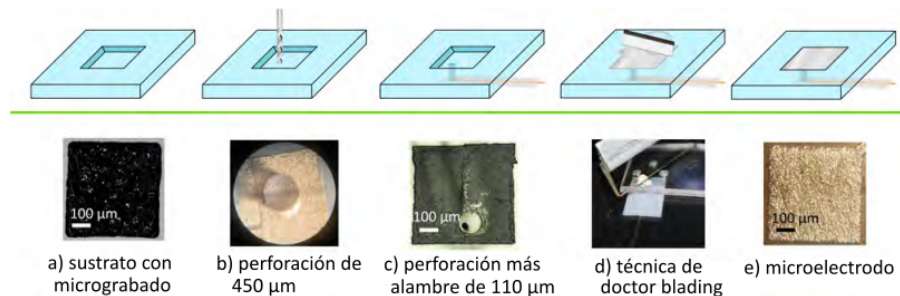


Figura 1.8: Uso de la técnica de Doctor blading (d) en la fabricación de microelectrodos, que consiste en rellenar con material conductor un molde pre-fabricado y retirar el exceso con una espátula. Tomada de [29].

1.4. Estado del arte

El objetivo de este apartado es orientar al lector sobre los trabajos realizados en el electrohilado como método de fabricación de andamios poliméricos que funcionen como una matriz extracelular artificial para ingeniería de tejidos. En particular, la presente investigación se inspira en tejidos humanos cuyo arreglo celular presenta un patrón de células alineadas paralelamente para cumplir sus funciones, como el tejido muscular esquelético y tendón.

A continuación se presentan los retos, avances, alcances e impacto del tema. Se analizan los principales métodos para alinear fibras poliméricas con la técnica de electrohilado y los materiales usados para lograr la regeneración de tejidos que necesitan un arreglo celular específico. También se muestra la importancia de la orientación que tienen las fibras poliméricas que forman el andamio sobre los cambios en el esparcimiento y arreglo del citoesqueleto de las células cuando son cultivadas sobre dichos andamios.

La técnica de electrohilado es muy usada porque fabrica membranas poliméricas de estructura tridimensional que simulan una matriz extracelular artificial. Tienen una gran área superficial, alta porosidad, poros interconectados, buenas propiedades mecánicas, que promueven el movimiento celular y el transporte de nutrientes y desechos metabólicos [16].

Sin embargo, el arreglo experimental convencional de electrohilado crea andamios de fibras poliméricas de orientación azarosa. Para alinear las fibras es necesario entender el proceso de electrohilado, ver metodología, y modificarlo. Existen tres formas de hacerlo, a través de fuerzas mecánicas, eléctricas o magnéticas; esto es, modificando el tipo o geometría del colector, o incluyendo materiales adiciones [18, 19].

Se han probado diferentes métodos para mejorar dicha alineación, y algunos artículos sugieren que el uso de colector rotatorio es la forma más directa y más simple de fabricar fibras alineadas, más aún, que fue la primera forma de hacerlo [20]. A partir del año 2000 inician los artículos que reportan la alineación de fibras electrohiladas. Muchos reportan colectores rotatorios [39] que se colocan de forma perpendicular a la aguja que contiene el polímero y que giran a velocidades de entre 1000 - 4000 rpm [7]. Otros reportan el uso de discos rotatorios [40]. Otros usan electrodos, en forma de alambres de acero que están separados entre ellos [41], o en forma de tubos que también están separados pero giran para remover el exceso de polímero sobre ellos [42], o en forma de placas paralelas [43]. Y en otros más reportan colectores que usan la fuerza centrífuga, o imanes para crear un intenso campo magnético, o el uso de electrodos adicionales [7, 21]. Varios de estos estudios reportan el estudio de cultivo celular para distintas aplicaciones, donde la de tendón es la más usual [7].

Por lo que se entiende que el proceso de alineación de fibras nanométricas en andamios electrohilados no es algo novedoso, pero sí demasiado complejo debido principalmente a la inestabilidad del chorro polimérico. Sin embargo, en este trabajo se presenta una modificación al electrohilado que consiste en implementar electrodos paralelos para lograr la alineación. Este procedimiento, a diferencia de muchos otros que usan electrodos paralelos [20] es de bajo costo, fácil, rápido, reproducible y se ha usado en otras investigaciones como sensores bioquímicos [29]. Más aún, en el Laboratorio de nanofibras para ingeniería de tejidos del Instituto de Investigaciones en Materiales sólo se ha probado la alineación de fibras con colector rotatorio cuyas desventajas se explican en el apartado de resultados.

Los materiales que se han usado para fabricar los andamios poliméricos son amigables con las células por lo que se dice que son biomateriales biocompatibles que se refiere a la compatibilidad célula-material sin dañar a las células o al sistema y no generar rechazo, y biodegradables ya que se espera que esta matriz extracelular artificial se degrade y sea reemplazada por tejido nativo. Estos biomateriales, que pueden ser naturales o sintéticos, se seleccionan por sus propiedades físicas y químicas, y a veces se combinan con otros para mejorar las propiedades del andamio [4, 7]. Entre los más usados para fabricar andamios de fibras alineadas paralelamente se encuentran la colágena, gelatina, quitosano, fibroína, alginatos, poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico) (PLA) y el poli (ácido D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA), acetato de poli(vinilo) (PVA), poli(ácido-láctico) (PLA), entre muchos otros.

La poli(ϵ -caprolactona) y la gelatina, son biomateriales que se usan en el presente trabajo, pero su uso se extiende a numerosos artículos [7], [15], [47] - [55]. Generalmente se combinan los polímeros porque uno solo difícilmente tiene las propiedades que requiere el andamio.

La gelatina es un biopolímero natural con composición y propiedades biológicas casi idénticas a las de la colágena que es la principal proteína de la matriz extracelular y de la cual se deriva, pero con la ventaja de ser mucho más barato. La gelatina es soluble en agua, pero la disolución gelatina - agua no puede procesarse por electrohilado. Además, cuando se disuelve en agua a una temperatura de alrededor de 37 °C, la gelatina se convierte en una especie de solución coloidal y, por lo tanto, sin un tratamiento especial no es adecuada para la aplicación de andamios de tejido [16]. La gelatina se puede mezclar con otros polímeros para mejorar las propiedades del andamio, además se ha demostrado que ayuda a mejorar la adhesión y proliferación celular, y muestra falta de antigenicidad [13, 16].

Por otro lado, la PCL es un polímero sintético, biodegradable, biocompatible, con alta resistencia mecánica. Pero su poca hidrofiliidad dificulta la adhesión y proliferación celular. También es muy reportado su uso [47]- [55].

Con la combinación de estos materiales es posible crear un andamio que promueva la adhesión

y proliferación celular y que tenga buena resistencia mecánica [65]. La PCL se disuelve en la mayoría de los solventes orgánicos, y también se ha reportado el uso de hexafluoroisopropanol (HFIP) [12] para crear andamios electrohilados, al igual que la combinación PCL-gelatina, [65]- [80].

El uso de HFIP, aunque es costoso, tóxico y daña el medio ambiente, muestra buenos resultados en los cultivos celulares. Es cierto que muchos estudios sólo consideran los residuos del solvente sobre el andamio electrohilado y su efecto en las células, y no existen muchos estudios que permitan comprender la interacción de las moléculas de ambos polímeros con el disolvente y la respuesta celular en el andamio [66].

El uso de PCL y gelatina para elaborar andamios electrohilados de fibras alineadas y cultivo celular se encuentra reportado [7], sin embargo, los resultados dependen del conformado del andamio, que a su vez depende de la modificación a la técnica de electrohilado para fabricar las fibras poliméricas alineadas. El procedimiento que se presenta en este trabajo, permite fabricar fibras alineadas paralelamente de forma controlada, sencilla, reproducible y además de bajo costo. Más aún, en el Laboratorio de nanofibras para ingeniería de tejidos del Instituto de Investigaciones en Materiales, aunque se han fabricado andamios de fibras orientadas paralelamente con el uso de colector rotatorio [67], no se han realizado comparaciones de algunas de las propiedades entre andamios electrohilados de fibras alineadas paralelamente y de orientación azarosa, como grupos funcionales, análisis térmico, ángulo de contacto, propiedades mecánicas, estructura cristalina y morfología. Tampoco se han comparado los cambios en el esparcimiento y arreglo del citoesqueleto de estos fibroblastos sobre dichos andamios.

1.5. Justificación

En México actualmente, las enfermedades y traumatismos que afectan al sistema musculoesquelético, son considerados como un grave problema de salud pública, debido a su magnitud, impacto y trascendencia, ya que pueden generar una discapacidad temporal o permanente en las personas [1].

Al formar parte del aparato locomotor, el tendón y el tejido muscular esquelético desarrollan funciones importantes y específicas en el cuerpo humano. Si se dañan, la solución es aplicar un tratamiento que permita al tejido autoregenerarse y posteriormente dar terapia de recuperación. Sin embargo, en siniestros como incendios, se llegan a producir quemaduras de hasta tercer grado, que dañan epidermis, dermis, tejido subcutáneo, músculo y tendón. Es en estos casos en los que aplicar un andamio que ayude al tejido a regenerarse adecuadamente, será mejor que sólo colocar un apósito que hidrate y proteja la herida.

El electrohilado es una valiosa técnica para fabricar andamios para cultivo celular, sin embargo, su arreglo experimental produce andamios de fibras al azar. Como el propósito de la ingeniería de tejidos es producir andamios que mimeticen la matriz extracelular, es importante considerar que muchos de los tejidos del cuerpo humano tienen arreglos específicos como el tendón y el músculo esquelético.

Así que, con la correcta modificación del electrohilado, se pueden producir andamios de fibras alineadas, que no sólo tienen aplicaciones en piel, tendón y músculo esquelético, sino en otros tantos tejidos como la córnea del ojo humano, que se encuentra formado de fibras de colágeno dispuestas en capas alineadas y ordenadas, sobrepuestas entre ellas en ángulos de 90° , razón por la que es transparente [3].

La presente investigación se interesa por estudiar la influencia del patrón de las fibras electrohiladas sobre la orientación y esparcimiento celular en membranas con fibras alineadas paralelamente y de orientación al azar. Se pretende que la fabricación de estos andamios tenga un potencial uso en otros experimentos en los que los tejidos muestran una alineación particular. Los andamios se fabrican de poli(ϵ -caprolactona) que es un polímero biocompatible y biodegradable, con un largo periodo de degradación, de bajo costo, y un gran uso en la ingeniería de tejidos [7]. Sin embargo, se agrega gelatina para mejorar algunas de las propiedades del andamio como su hidrofiliidad y la adherencia celular, ya que según lo descrito en el marco teórico, es equivalente a usar colágena, la proteína con mayor presencia en los tejidos humanos y que es base fundamental de la matriz extracelular.

1.6. Hipótesis

En la ingeniería de tejidos, la técnica de electrohilado permite fabricar andamios de fibras de orientación azarosa para cultivo celular, sin embargo, con la adecuada modificación a este proceso, a través de un colector de electrodos paralelos de plata, se espera fabricar andamios electrohilados de fibras alineadas, de forma estandarizada, fácil y rápida. Ya que muchos tejidos en el cuerpo humano, exigen que sus células mantengan una orientación alineada para llevar a cabo sus funciones de forma correcta; se espera que al realizar el cultivo celular de fibroblastos humanos inmortalizados extraídos de piel sobre los andamios poliméricos de fibras alineadas, se podrá analizar la influencia que tiene el patrón de las fibras en el andamio sobre la orientación y esparcimiento de las células que son cultivadas. Realizando a su vez una comparación con los andamios poliméricos de fibras de orientación al azar. Se espera que los fibroblastos se adhieran y muestren una orientación controlada según la orientación que tienen las fibras poliméricas que forman el andamio. Además estos andamios serán fabricados con los biomateriales poli(ϵ -caprolactona) y gelatina, que son biocompatibles y biodegradables, lo que los hace adecuados para su uso en la fabricación de andamios para ingeniería de tejidos. Se espera que la combinación de estos biomateriales resulte en un andamio electrohilado de poli(ϵ -caprolactona)/gelatina con mejores propiedades para el cultivo celular, como mayor hidrofiliidad.

1.7. Objetivo general

Fabricar y caracterizar andamios electrohilados de poli(ϵ -caprolactona)/gelatina, de fibras de orientación al azar y alineadas paralelamente; para estudiar la influencia de la alineación de las fibras en el andamio, sobre la orientación y esparcimiento celular de fibroblastos humanos inmortalizados extraídos de piel.

1.7.1. Objetivos particulares

i) Fabricar andamios poliméricos de poli(ϵ -caprolactona)/gelatina de fibras alineadas y al azar, usando la técnica de electrohilado.

ii) Caracterizar las propiedades morfológicas de los andamios electrohilados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM); microestructurales mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR); hidrofílicas mediante medición de ángulo de contacto; térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA); mecánicas mediante un ensayo de indentación; y difracción de rayos X para observar el estado cristalino de los andamios electrohilados.

iii) Cultivar la línea celular de fibroblastos humanos inmortalizados extraídos de piel BJ (ATCC® CRL-2522™) sobre los andamios fabricados, para caracterizarlos biológicamente mediante la técnica de inmunomarcaje por fluorescencia.

iv) Realizar un análisis comparativo de las propiedades caracterizadas en ii) de los andamios electrohilados de fibras alineadas paralelamente y al azar.

v) Realizar un análisis comparativo de los cambios en el esparcimiento y arreglo del citoesqueleto de fibroblastos humanos inmortalizados extraídos de piel, en andamios electrohilados de fibras alineadas paralelamente y al azar.

Capítulo 2

Metodología

En este capítulo se describen los procedimientos que se usaron para fabricar los andamios electrohilados de fibras aleatorias y de fibras alineadas paralelamente, también se describen las técnicas de caracterización para analizar algunas de sus propiedades físico-químicas y las relacionadas al cultivo celular sobre los andamios poliméricos fabricados.

2.1. Materiales

Los materiales que se usaron para fabricar los andamios electrohilados fueron: poli(ϵ -caprolactona) (PCL) con un peso molecular número promedio (M_n) de 80,000 g/mol (Sigma Aldrich), este polímero seleccionado es biocompatible, biodegradable, de bajo costo, y se ha comprobado su alta eficacia como andamio en la ingeniería de tejidos. Al igual que la gelatina (gelatin from cold water fish skin) (Sigma Aldrich), que permitirá mejorar las propiedades del andamio como la hidrofiliidad debida al carácter hidrofóbico de la PCL, además de mejorar la mimetización de la matriz extracelular. Dado que la gelatina sólo es soluble en agua y algunos alcoholes, se ha reportado su buena solubilidad en 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro2-Propanol (HFIP) (Sigma Aldrich), mismo que es buen solvente para la PCL [66].

Para la fabricación del colector de fibras de electrodos se seleccionó tinta conductora de plata líquida (Chemtronics), que se usa comúnmente para reparar o unir componentes electrónicos, ya que es de bajo costo, tiene buena conductividad, se puede manipular fácilmente, y depositarse y adherirse sobre polímeros, como poli(metil-metacrilato) (PMMA). Esta tinta se puede depositar uniformemente en forma de película delgada y se evapora casi inmediatamente.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparación de la solución polimérica

En una balanza analítica se midió PCL y gelatina en una proporción 80:20 w/w. Luego en un vial de 5 ml se agregó la PCL+gelatina y HFIP en una proporción de 10 % w/v; y se introdujo un agitador magnético. Después la solución se agitó en un baño ultrasónico con agua durante 45 minutos, cuidando que no aumentara la temperatura, esto para disolver más rápido el polímero. Enseguida se colocó el vial sobre un vortex durante 5 minutos para homogeneizar la mezcla e inmediatamente se colocó el vial sobre una parrilla con agitación magnética durante 1 hora para eliminar las burbujas de aire generadas.

El porcentaje de gelatina se eligió durante la estandarización del electrohilado, en el que de las pruebas se observó que un alto porcentaje de gelatina (mayor a 40 %) dificultan el electrohilado por la alta viscosidad de la solución, es decir, no se forman las nanofibras poliméricas; mientras que un muy bajo porcentaje (menor a 10%) no contribuye a mejorar la hidrofiliidad del andamio. Además, al aumentar la concentración en la solución polimérica, aumenta la viscosidad y se obtienen nanofibras más gruesas [69]. La gelatina que se reporta ha sido caracterizada en el Laboratorio de Nanofibras para Ingeniería de Tejidos [86]. En el espectro de FTIR se observa la banda de la amida-A que aparece entre 3500 y 3000 cm^{-1} , también se observan los picos de amida tipo I en 1532 cm^{-1} y tipo II en 1635 cm^{-1} , que son característicos para este tipo de gelatina [86,87]. Presenta dos etapas de pérdida de masa, la primera entre 65-135 °C relacionada con el agua absorbida, y la segunda entre 266-343 °C que se asocia a la degradación térmica de la proteína [86,88]. Tiene una $T_g = 77-80$ °C y una $T_m = 102-104$ °C [89]. Además, la gelatina tiene reportado un módulo de elasticidad de 15-20 kPa [84].

2.2.2. Proceso de electrohilado

A continuación se describe el proceso general de electrohilado para crear andamios poliméricos de PCL/gelatina. En este proceso, como se describe enseguida, ciertos parámetros se pueden mantener fijos y otros pueden variar y afectar bruscamente el electrohilado. La estandarización de este proceso se logró al realizar numerosas pruebas hasta encontrar los parámetros óptimos que son los que se reportan a continuación. El arreglo experimental se observa en la figura 2.1.

- i) El colector (que puede ser estático o rotatorio) se mantiene aislado en una caja de plástico

a temperatura ambiente (temperatura promedio de 26°C) y humedad relativa constante (HR), que se mantiene al agregar sílica (se logró entre un 2% y un 8% de HR).

El colector se conecta al negativo de la fuente de alto voltaje.

ii) En la bomba que dosifica el líquido se coloca una jeringa que contiene la solución polimérica y se fija de forma que quede orientada perpendicularmente al colector.

La aguja de la jeringa se conecta al positivo de la fuente de alto voltaje.

iii) En la bomba de inyección se fija la velocidad de inyección de la solución polimérica: 1 ml/hr y el diámetro de la jeringa: 4.69mm (Jeringa HSW).

iv) Se fija la distancia desde la punta de la aguja al colector: 15 cm.

v) Se aplica un voltaje de 15 kV entre la aguja de la jeringa y el colector.

vi) Conforme la bomba expulsa la solución polimérica se forma una gota de polímero en la punta de la aguja que se distorsiona en forma cónica conocida como cono de Taylor, que enseguida se desestabiliza formando un fino y continuo filamento polimérico. El fluido se acelera y debido a la inestabilidad su trayectoria se vuelve caótica.

vii) Enseguida las fibras poliméricas formadas impactan en el colector, que según su tipo, estático o rotatorio formará un andamio de fibras de orientación aleatoria o de orientación paralela y alineada, respectivamente.



Figura 2.1: Arreglo experimental convencional del proceso de electrohilado para obtener andamios electrohilados de fibras de orientación aleatoria. En la imagen se observa en el extremo derecho, la fuente de alto voltaje, que se aplica entre la punta de la jeringa y el colector, para formar las nanofibras poliméricas; en el centro se observa una caja de poli(metil-metacrilato) que contiene en su interior el colector (donde impactan las nanofibras), las conexiones (cables y caimanos) para aplicar el alto voltaje entre la aguja y el colector y sílica para mantener constante la humedad; en el extremo izquierdo se observa la bomba que dosifica la solución polimérica, y es sobre la que se encuentra la jeringa, cuya aguja entra en la caja de acrílico a través de una pequeña perforación.

El proceso de electrohilado antes descrito se aplica en la fabricación de cualquier andamio polimérico, sin embargo, al ser un proceso multiparamétrico, es recomendable entender el efecto que cada causa cada variable durante su fabricación, ver tabla 2.2.

Estos parámetros pueden o no ser controlados, pero definirán las características de cada andamio polimérico. Como es de esperarse, dichos parámetros dependen de la solución polimérica con la que estemos trabajando, y será en base a ésta que podremos modificarlos y obtener las características deseadas para el andamio. Lo ideal es que el andamio esté formado de fibras homogéneas, regulares, sin bulbos, sin poros en las nanofibras y sin gotas de polímero o solvente.

<i>Parámetro</i>		<i>Característica que aporta</i>
Concentración de la solución de polímero	↑	Dificulta el paso de la solución a través del capilar.
	↓	Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector.
Tensión Superficial	↑	Aparición de defectos (beads) en las fibras.
	↓	Obtención de fibras lisas, para disminuir la tensión superficial se pueden adicionar solventes con baja tensión como el etanol.
Conductividad de la solución	↑	Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución, fibras más delgadas.
	↓	Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución, fibras más gruesas.
Voltaje	↑↑	Fibras gruesas, distorsión del jet, aparición de beads.
	↓	Poco impulso para llegada de la solución al plato colector.
Flujo de Salida	↑	Fibras más gruesas, beads con mayores tamaños.
	↓	Mayor tiempo para evaporación del solvente, fibras sin defectos.
Distancia aguja-colector	↑	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, obtención de fibras delgadas
	↑↑	Aparición de defectos (beads) en las fibras al trabajar con muy altas o muy bajas distancias
	↓↓	
	↓	Poco tiempo para la evaporación del solvente por tanto, las fibras llegan húmedas al plato colector.
Humedad Relativa	↑	Aparición de poros en las nanofibras.

Tabla 2.2: Parámetros en el electrohilado y su efecto sobre las fibras en los andamios. Estos constituyen una guía en la fabricación de los andamios poliméricos. Figura tomada de [56].

Existen muchos diseños experimentales para mejorar la selección de los parámetros en procesos complejos como el electrohilado, donde se realizan análisis de varianza y aleatoriedad, y se busca simplificar procesos estadísticos examinando simultáneamente todas las variables

involucradas. Un ejemplo de esto es el diseño Taguchi [46]. Sin embargo, el electrohilado es un proceso complejo en el que intervienen variables que se pueden controlar como la concentración del polímero, el voltaje aplicado, la distancia aguja-colector, la velocidad de flujo de la solución; pero existen otras que no se pueden controlar precisamente como los parámetros ambientales (temperatura, humedad y presión) que influyen enormemente en el proceso de electrohilado.

Para encontrar los parámetros óptimos de fabricación de andamios de PCL/gelatina, como referencia, se hizo una revisión bibliográfica ([47] a [55], [65] a [80]) sobre algunos de los artículos que usan estos biopolímeros y esta técnica en ingeniería de tejidos. Las publicaciones que se tomaron en cuenta se encuentran en la tabla de la figura 2.3.

Publicación/Año	Polímero/Solvente	Distancia aguja-colector [cm]	Voltaje [kV]	Velocidad de flujo [ml/h]	Velocidad angular colector rotatorio [rpm]	Diámetro azar/alineadas [nm]	Módulo elástico azar/alineadas [MPa]
47/2013	PCL/ácido acético y piridina	15	10	0.42	1000	265 ± 97 / 354 ± 156	7 ± 4 / 17 ± 8
48/2017	PCL/cloroformo	18	12-25	0.3	2000	800 - 1000 / 400 - 700	----
49/2009	PCL/HFP	20	12-15	1	----	516 ± 117	6.8 / 1.2
50/2015	PCL/HFIP	15	12	1	----	600 - 900	----
51/2017	PCL/tetrafluoroetileno	15	7	0.5	----	----	----
52/2011	PCL/diclorometano, dimetilformamida	12	9-18	5	3000	----	---- / 29.2 a 40.7
53/2007	PCL/tetrahidrofurano dimetilformamida	20	15	----	7000	438 ± 71.56 / 519 ± 71.27	2.17 ± 0.4 / 11.6 ± 7.31
54/2014	PCL/HFIP	20	20	1	6000	----	----
55/2008	PCL/HFP	10	20	3	2350	334 ± 125 / 281 ± 68	4.07 ± 0.29 / 2.93 ± 0.66
65/2013	PCL/cloroformo metanol gelatina/ácido acético	10	22	0.2	----	782 ± 145 / ----	----
66/2018	PCL, gelatina/HFIP ácido acético	15	17	0.6	----	----	----
76/2017	PCL, gelatina/ tetrafluoroetileno	18	20	3	----	200 - 600	----
77/2019	PCL, gelatina/ tetrafluoroetileno	13	13	1	----	234 ± 52 / ----	12.52 ± 2.84 / ----
78/2015	PCL, gelatina/ HFIP	12	10	1	----	335 ± 41.4 / 363.8 ± 50.5	33.4 ± 7.3 / 36.4 ± 6.5
79/2019	PCL, gelatina/ tetrafluoroetileno cloroformo	9	7.3	1.2	1400	425.3 ± 48.1 / 427.8 ± 57	19.5 ± 0.8 / 64.5 ± 6.9
80/2016	PCL, gelatina/ tetrafluoroetileno ácido acético	17	20	0.5	----	----	----

Tabla 2.3: Revisión bibliográfica ([47] - [55], [65] - [80]) sobre algunos de los artículos que usan PCL/gelatina en ingeniería de tejidos. Estos artículos se usaron como referencia para acotar los valores de los parámetros en el electrohilado y en el estado del arte.

Una de las hipótesis de este trabajo sugiere que elaborar un andamio electrohilado de fibras alineadas paralelamente permite imitar la organización natural de células como mioblastos y fibroblastos para que lleven a cabo sus funciones en los tejidos.

Uno de los parámetros que se pueden ajustar en el electrohilado es el tipo de colector en el que se recolectan las fibras poliméricas. Según la literatura [53], la velocidad a la que gira el colector influye en la anisotropía del andamio, que a su vez influye en sus propiedades mecánicas.

Para la elaboración de fibras alineadas paralelamente se siguieron dos métodos experimentales:

a) usando un colector cilindro-rotatorio; porque es el más usado para elaborar andamios electrohilados de fibras alineadas [7].

b) colector con electrodos paralelos; porque el que se presenta en este trabajo es fácil, de bajo costo y permite la estandarización en la fabricación de las fibras alineadas [29].

2.2.2.1. Uso de colector rotatorio para electrohilado de fibras alineadas

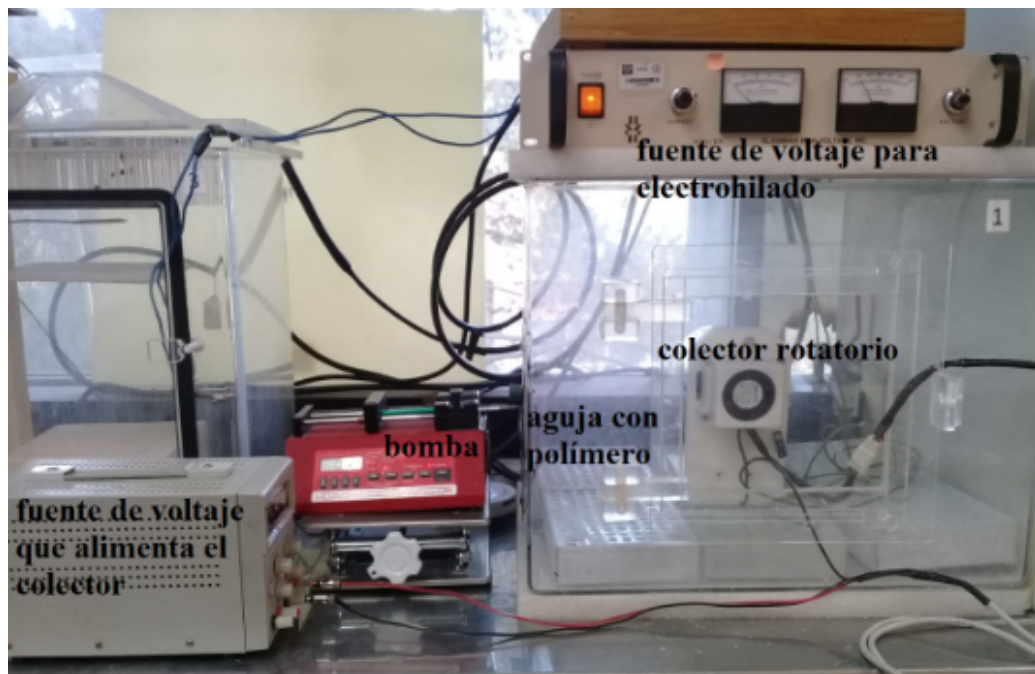


Figura 2.4: Arreglo experimental del electrohilado para obtener andamios de fibras alineadas paralelamente con colector rotatorio. En la figura se observa del lado derecho, una caja de plástico que contiene el colector cilindro-rotatorio y una fracción de la aguja de la jeringa, con sus conexiones (cables y caimanes), y sílica para el control de humedad; en la esquina superior derecha, una fuente de alto voltaje que se aplica entre la aguja de la jeringa que contiene la solución polimérica y el cilindro rotatorio; en el centro la bomba dispensadora que controla el flujo de la solución polimérica a través de la jeringa; y en la esquina inferior izquierda se observa la fuente de voltaje para el cilindro.

La figura 2.4 muestra el arreglo experimental para obtener fibras alineadas usando un colector rotatorio, es básicamente el mismo que el arreglo convencional, donde sólo se sustituye el colector estático por el cilindro rotatorio. Sobre dicho cilindro rotatorio se coloca una lámina de aluminio que colecte las fibras, además este se conecta a otra fuente de voltaje para que gire.

El colector rotatorio debe girar a una velocidad angular de entre 1000 rpm y 5000 rpm para lograr la alineación de las fibras poliméricas, por lo que fue necesario realizar numerosas pruebas para la estandarización del proceso. Para medir y controlar la velocidad a la que gira el colector, se usó un sensor de efecto Hall, controlado a través de un arduino nano, como se puede observar en la figura 2.5. Esto es básicamente un contador, el arreglo consiste en fijar un imán de neodimio sobre el colector rotatorio de manera que al girar, pasa por el sensor Hall y éste detecta el campo magnético. Esto permite cuantificar las revoluciones por minuto que da el cilindro en función del voltaje aplicado, es decir, esto permite realizar pruebas para estandarizar la velocidad angular del cilindro en la que se forman fibras alineadas paralelamente sobre el colector.

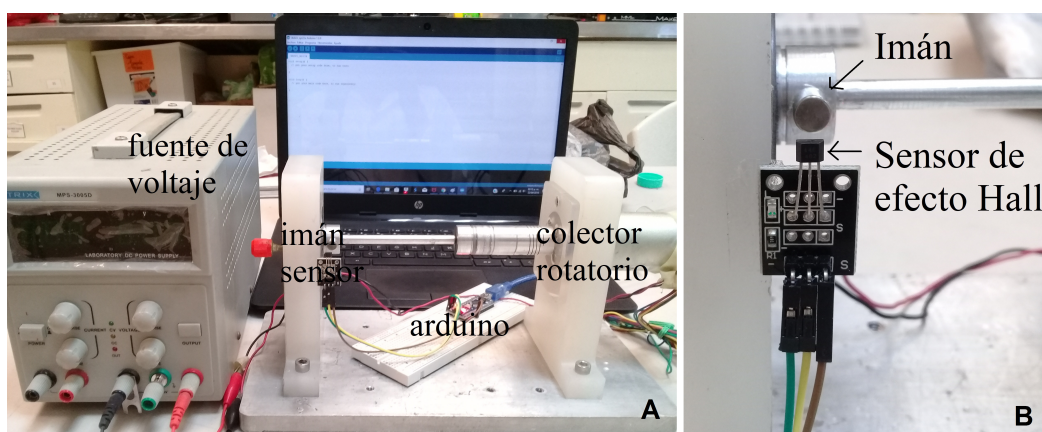


Figura 2.5: A) Arreglo del colector rotatorio con el sensor de efecto Hall y arduino nano, para cuantificar la velocidad angular del cilindro, B) Zoom en sensor; cada vuelta que completa el cilindro, se registra cuando el imán pasa frente al sensor de efecto Hall.

2.2.2.2. Uso de electrodos para electrohilado de fibras alineadas

El segundo método reportado para alinear fibras poliméricas fue a través de electrodos. Este método de fabricación ya se ha probado antes [29] y es reproducible. Su fabricación es sencilla y de bajo costo, cuya preparación se describe a continuación y se puede observar en la figura 2.6.

- i) Se usó una placa de poli(metil-metacrilato) de 2.5 x 7.5 cm y se perforó en los extremos con una broca de 1/32" logrando una perforación de aproximadamente 800 micrómetros de diámetro.
- ii) A través de cada perforación se insertó una aguja de 21G como las que se usa para el electrohilado convencional y se fijó con cinta industrial.
- iii) Se enmascaró el acrílico, formando dos rectángulos de aproximadamente 2.5 x 0.7 cm.
- iv) Se usó la técnica de Dr. Blade para depositar la plata líquida sobre esa área, retirando el

excedente con una espátula.

v) Se retiraron las cintas adhesivas.

vi) Se limpió cuidadosamente con alcohol isopropílico para retirar la plata excedente y los residuos de pegamento de la cinta adhesiva.

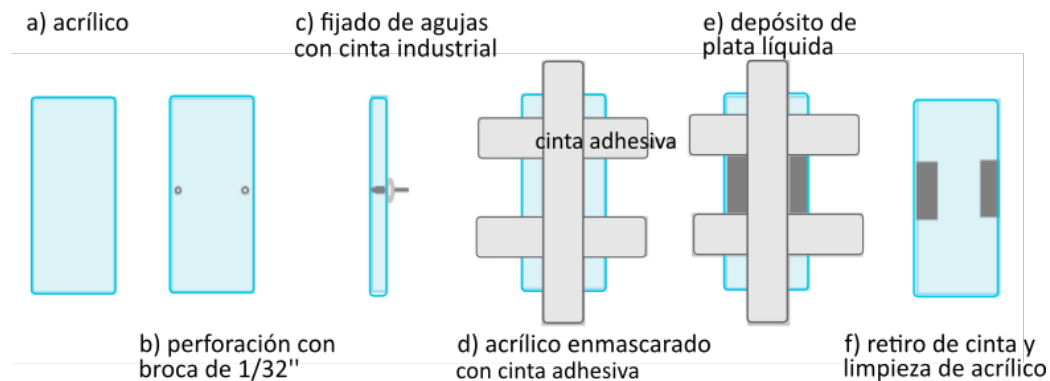


Figura 2.6: Preparación del colector de electrodos de plata para elaborar andamios de PCL/gelatina de fibras alineadas paralelamente.

2.3. Caracterización físico-química

2.3.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica de espectroscopia en la que la materia interacciona con radiación infrarroja.

En esta técnica, la radiación infrarroja atraviesa una muestra, que puede ser sólida, líquida o gaseosa. Debido a la absorción de energía, ocurren transiciones energéticas en los grupos funcionales de las moléculas, que pasan a un nivel de energía más alto [23].

La energía que absorbe (en el rango de frecuencias infrarrojo), genera vibraciones atómicas, razón por la que esta técnica también recibe el nombre de espectroscopia vibracional.

Las vibraciones generadas son características de cada grupo funcional que está presente en la molécula orgánica, es decir, los grupos funcionales muestran bandas de absorción características en el espectro infrarrojo [24, 25].

Los espectros de infrarrojo se visualizan en un gráfico que contiene muchos picos que corresponden a una transición vibratoria específica, es decir, corresponden a bandas de grupos funcionales específicos. Esto permite caracterizar una muestra identificando de forma única su

estructura molecular. Sus espectrogramas muestran la absorbancia o transmitancia de radiación infrarroja en función de la energía, expresada como frecuencia o longitud de onda de la radiación [22].

Para obtener los espectros de FTIR se usó un espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), acoplado con el accesorio de diamante para reflexión total atenuada (ATR) Smart Orbit (Thermo Fisher). Todos los espectros se obtuvieron del promedio de 18 corridas en el rango del infrarrojo cercano ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$). Se usó el software OMNIC (Thermo Fisher Scientific) durante la recolección de datos.

2.3.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear es una técnica que nos permite conocer la presencia, posiciones, uniones, números de coordinación e intensidades de los átomos presentes en una muestra, es decir, sirve principalmente para determinar estructuras químicas [22].

Cuando una muestra se somete a un campo magnético, algunos núcleos atómicos, aquellos con momento magnético distinto de cero, absorben radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio. Entre los núcleos más importantes en química orgánica encontramos al ^1H y ^{13}C . Los niveles de energía magnética se dividen según si los espines están alineados paralelos o antiparalelos al campo magnético aplicado, donde la diferencia de energía entre estos estados es pequeña. Al variar la intensidad del campo magnético aplicado, el cambio de energía y la frecuencia de absorción es diferente para cada elemento y su entorno químico, por lo que se puede determinar la estructura molecular [22]. Estos cambios producen resonancia y se expresan generalmente en desplazamientos de una parte por millón (ppm) de la frecuencia y se toma como referencia al tetrametilsilano. Por ejemplo, en los grupos funcionales de las moléculas orgánicas, se pueden distinguir los átomos de hidrógeno ya que absorben a frecuencias diferentes. Los espectrogramas muestran picos que proporcionan información estructural de la muestra, considerando que las resonancias pueden tener multiplicidad debido a que núcleos iguales se acoplan, por lo que su magnitud da información precisa de la estructura.

Los espectros de RMN de (^1H) y (^{13}C) se midieron con un espectrómetro Avance III HD de 400 MHz (Bruker, Fällanden, Suiza), equipado con una sonda para soluciones tipo BBI con gradiente en Z. Para ello, se disolvieron muestras de 50 mg de cada compuesto en cloroformo deuterado (CDCl_3) (pureza 99.5 %; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que sirve de referencia para asignar las señales en los espectros; y se transfirieron las soluciones a tubos de vidrio de 5

mm. Para el procesamiento de espectros, se utilizó el software MestReNova 12 (MestreLab Research S.L., España). Con esta técnica se obtuvieron espectros de 1H y ^{13}C , donde se asignaron las señales a cada uno de los núcleos correspondientes de las unidades repetitivas del polímero.

2.3.3. Difracción de rayos X (DRX)

Los materiales también se pueden clasificar según su estructura cristalina, como cristalinos, semicristalinos y amorfos.

Un cristal es una disposición periódica de átomos o moléculas en el espacio y su unidad fundamental es la celda unitaria, que se define por su forma tridimensional según las posiciones de sus átomos. Si la celda unitaria se repite en las tres direcciones en un orden de largo alcance, se dice que el material es cristalino. Si la celda unitaria no se repite o se repite en las tres direcciones en un orden de corto alcance, se dice que el material es amorfo. Si el material es parcialmente cristalino y parcialmente amorfo, se dice que es un material semicristalino, por ejemplo los polímeros [9].

La difracción de rayos X es una técnica en la que un haz monocromático de rayos X incide sobre una muestra y se difracta. Este estudio es útil para identificar la estructura cristalina, las fases cristalinas y composición de una muestra cristalina [22], es decir, propiedades como grado de cristalinidad, orientación preferencial, estructura del cristal, cambios estructurales debidos a fuerzas externas o temperatura y defectos en el material, entre muchos otros.

Para que los rayos X que inciden sobre una muestra se difracten, la distancia interplanar en el sólido cristalino debe coincidir con la longitud de onda de la radiación incidente.

La difracción produce un patrón de difracción, resultado de la interacción entre los rayos X y el sólido. Al tratarse de un sólido cristalino, cada celda unidad del cristal refleja las ondas de la radiación en cierta dirección, si todas las ondas están en fase, la amplitud de éstas se suma y se produce una interferencia constructiva, que muestra las posiciones de los átomos del sólido cristalino particular. Esta interferencia constructiva produce picos de difracción de diferentes intensidades (que se miden en función del ángulo de incidencia) asociados a los átomos del cristal, que dan información sobre su estado cristalino, su celda unitaria y su simetría [26].

Es decir, para que exista difracción de rayos X y se muestren los picos de difracción en una muestra sólida, ésta debe ser cristalina o semicristalina.

Los difractogramas se obtuvieron con un equipo XRD (Siemens D-500), con radiación de Cu K_{α} , $\lambda = 1.5406$ Amstrongs. Con estos se determinó el porcentaje de cristalinidad de un andamio de PCL/gelatina C_T , mediante la ecuación:

$$C_T = \frac{A_C}{A_C + A_A} * 100 \quad (2.1)$$

Donde A_C y A_A son el área bajo la curva de los picos cristalinos y de la zona amorfa, respectivamente. Determinadas con el Software Evaluation 11.0 del paquete Diffract Plus 2005.

2.3.4. Análisis térmico

El análisis térmico se encarga del estudio de los cambios en las propiedades físicas y químicas de una muestra, como función de la temperatura.

Las principales técnicas de análisis térmico con son la termogravimetría (TGA, siglás en inglés), y la calorimetría diferencial de barrido (DSC, siglás en inglés) [22, 27], mismas que se explican a continuación. Estas técnicas son muy usadas ya que son sencillas, rápidas y arrojan información relevante sobre las propiedades térmicas del material, además la muestra que se requiere para su análisis es muy pequeña (miligramos). Los gráficos de esta técnica llamados termogramas muestran dicha información.

2.3.4.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas de TGA se midieron con un analizador termogravimétrico Q5000-IR de TA Instruments, Inc. (New Castle, DE, EUA). Se recolectaron mediciones de pérdida de masa en función de la temperatura en atmósfera de nitrógeno con una rampa de calentamiento de 20 °C/min. Para el procesamiento de termogramas, se utilizó el software Advantage 5 (TA Instruments).

El análisis termogravimétrico estudia los cambios de masa de una muestra, en función de la temperatura o el tiempo. Se elige un rango de temperatura para calentar la muestra, conforme aumenta la temperatura el material empieza a descomponerse, y a una temperatura característica se observa el cambio de masa como un decaimiento de la misma hasta una segunda temperatura, en la que la masa residual se mantiene constante.

La descomposición de la muestra es una característica de ésta, mientras que las temperaturas inicial y final dependen de la muestra, de la razón de calentamiento y de la atmósfera a la que se somete el estudio [27]. Esta pérdida de masa se puede dar por descomposición, oxidación o evaporación de otros como humedad o solventes.

2.3.4.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido estudia los cambios de calor en una muestra, detectando los eventos térmicos sobre ciclos de frío y calor [22]. Esta técnica mide la diferencia de calor entre una muestra y un material de referencia inerte en función de la temperatura, lo que permite conocer transiciones térmicas como puntos de fusión, temperatura de cristalización y transición vítrea. El resultado muestra una curva de flujo calorífico en función de la temperatura o el tiempo.

Los termogramas de DSC se obtuvieron con un calorímetro diferencial de barrido Q2000 (TA Instruments, Inc., New Castle, DE, EUA). Se recolectaron mediciones de flujo de calor en función de la temperatura con una rampa de calentamiento de 20 °C/min. Para el procesamiento de termogramas, se utilizó el software Advantage 5 (TA Instruments).

2.3.5. Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido (SEM) de JEOL-JSM-7600F con filamento de tungsteno, equipado con un cañón de electrones de emisión de campo de tipo schottky, que aplicó una diferencia de voltaje de 20kV, que alcanza una resolución de 1 nanómetro. Las imágenes obtenidas se analizaron con el Software Image J (Image Processing and Analysis in Java) para obtener el diámetros de las fibras en los andamios y su grado de alineación.

La microscopía electrónica de barrido (SEM, siglas en inglés) es una técnica de caracterización física que se usa para estudiar la microestructura y morfología de los materiales a través de la superficie de las imágenes [26].

Donde el análisis morfológico [28] se refiere a la caracterización del tamaño, forma, fases y distribución espacial de los elementos de la muestra.

Los microscopios electrónicos usan electrones para obtener grandes aumentos en la muestra, de alrededor de 1 a 2 millones de veces [28]. En SEM, se usan lentes electromagnéticas para enfocar un haz de electrones, en un punto de diámetro nanométrico, este haz de electrones de baja energía (de unos cientos de electronVolts (eV) a 50keV), irradia el material y escanea o 'barre' su superficie. Como resultado de las interacciones que ocurren, se emiten electrones y fotones cerca de la superficie de la muestra (electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones Auger, rayos-x característicos, catodoluminiscencia, etc), que recoge un detector específico y que permiten caracterizarla, ya que dan información sobre su superficie,

microestructura y morfología. La resolución que se alcanza depende del microscopio electrónico, por ejemplo, el que se encuentra en el Instituto de Investigaciones en Materiales está equipado con un cañón de electrones de emisión de campo de tipo schottky, que aplica una diferencia de voltaje de 20kV, y alcanza una resolución de 1 nanómetro.

Esta técnica es muy útil para caracterizar los andamios de biomateriales, sin embargo, para observar en SEM la muestra debe ser conductora y si no lo es, como el caso de los polímeros, ésta debe ser recubierta con una película delgada de material conductor (por ejemplo, grafito, oro, plata, platino, etc) con un grosor del orden de unos pocos nanómetros hasta 100 nanómetros. El depósito de las delgadas capas se logra con pulverización catódica que consiste en usar iones de alta energía para retirar los átomos de un blanco y depositarlos sobre un sustrato.

2.3.6. Medición de ángulo de contacto

Las imágenes para medir ángulo de contacto se tomaron con un goniómetro Ramehart, Inc, modelo 100-07-00, y una cámara de video de 1080px. Se procesaron con el software Pinnacle Studio, y se analizaron las imágenes con el Software Image J (Image Processing and Analysis in Java) con el complemento (plugin) Drop Analysis.

La medición de ángulo de contacto se realiza para conocer las propiedades superficiales del andamio, ya que durante el cultivo celular, éste estará en contacto con medios fisiológicos y células. Esta medición sirve para conocer la hidrofobicidad de la superficie de un material. Además, cuando se reduce el tamaño de un sistema, su razón área superficial-volumen aumenta, lo que provoca que los efectos superficiales dominen sobre los efectos volumétricos [29, 30]. A continuación se mencionan las propiedades más importantes para realizar esta medición adecuadamente.

Los líquidos tienen varias propiedades que los definen, como volumen, densidad, tensión superficial y viscosidad. Sus fuerzas moleculares no son tan fuertes, lo que les permite fluir y deformarse si se les aplica una fuerza. Además, son incompresibles, es decir, su volumen no cambia con la presión aplicada. La viscosidad es la medida de la resistencia interna del flujo a la deformación dada a cierta temperatura [29].

Denotada por γ , la tensión superficial es la fuerza de tensión por unidad de longitud [Nm^{-1}] que se refiere a la cohesión de las moléculas del líquido en una interfaz, y su valor numérico depende de las interacciones moleculares.

La cantidad de energía necesaria para romper la superficie y esparcir la gota, aumentando la

superficie de contacto es la tensión superficial [29, 31, 32].

Siempre que un líquido está en contacto con una superficie sólida, sus moléculas se adhieren a esta, pero también mantienen una fuerza de cohesión entre ellas. Sin embargo, no todas las superficies sólidas “se mojan” de la misma forma con todos los líquidos, esto depende de la energía libre superficial del material en el que fluye el líquido y de la viscosidad del mismo, además influye la topografía de la superficie, la dirección de mojabilidad y la dinámica [29, 33].

Para medir la mojabilidad de la superficie se mide el ángulo de contacto que forma la gota del líquido respecto de la superficie sólida, lo que permite clasificar a un material como hidrofóbico o hidrofílico, si el ángulo de contacto es mayor o menor a 90° , respectivamente, como se puede observar en la Figura 2.10 [29].

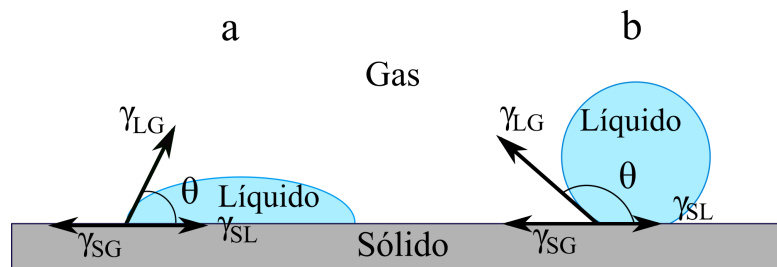


Figura 2.7: Esta figura muestra que a) si las fuerzas adhesivas dominan sobre las cohesivas, el líquido moja la superficie y se clasifica como superficie hidrofílica, $\theta < 90^\circ$; b) si las fuerzas cohesivas dominan sobre las adhesivas, el ángulo de contacto aumenta y se clasifica como superficie hidrofóbica, $\theta > 90^\circ$. En la figura se visualizan las tensiones superficiales (denotadas por γ), interfaces: LG (líquido-gas), SL (sólido-líquido), SG (sólido-gas). Figura tomada de [29].

Cuando la gota del líquido se adhiere a una superficie sólida, las fuerzas cohesivas y adhesivas buscan el equilibrio en el cual la energía superficial es mínima, es decir, las tensiones superficiales γ_{LG} , γ_{SL} y γ_{SG} se equilibran, generando una pendiente entre las superficies LG y SL, que indica el ángulo de contacto θ [29, 32].

Debido a lo anterior, se entiende que la energía superficial del andamio es la responsable de interacciones biológicas como la adhesión celular [28], y para cuantificarla es necesario realizar mediciones de ángulo de contacto, que además es un método sencillo y barato. La ECM es hidrofílica y permite la interacción entre las células y el transporte de nutrientes a través de ella.

2.3.7. Caracterización mecánica

En un tejido cada célula se encuentra en la ECM con las características mecánicas necesarias para que el tejido cumpla sus funciones. Por lo que, además del biomaterial, es necesario considerar el método de fabricación y su diseño, ya que éstos influyen en el comportamiento mecánico de los andamios para ingeniería de tejidos.

De las muchas propiedades mecánicas de un material, una de las más importantes es el módulo de elasticidad que define la rigidez mecánica del material.

Los materiales sólidos se deforman cuando se someten a una carga externa. Si al retirar la carga el sólido recupera su forma inicial se dice que tiene un comportamiento elástico, de lo contrario su comportamiento es plástico, es decir, el material se deforma de forma permanente. Usualmente los polímeros, así como tejidos y células, presentan un comportamiento viscoelástico [18], es decir, se combina el comportamiento de un sólido elástico y un líquido viscoso (un sólido elástico sigue la ley de Hooke donde el esfuerzo es proporcional a la deformación, mientras que un líquido viscoso sigue la ley de Newton donde el esfuerzo es proporcional a la razón de cambio en la tensión). En los polímeros, propiedades como cristalinidad, estado conformacional, resistencia mecánica y elasticidad, dependen de su peso molecular. Conforme se aumenta el número de monómeros, el material se vuelve más tenaz, debido a los enlaces que se forman, es decir, un polímero con menor peso molecular será más deformable que uno con mayor peso molecular [8].

Cuando un material es sometido a una acción mecánica, sus propiedades mecánicas sirven para determinar su comportamiento. Dichas propiedades se caracterizan mediante esfuerzos y deformaciones cuando se aplican cargas y desplazamientos en el material [34], ya que al aplicar una fuerza a un material, éste tiende a deformarse.

Cuando se aplica una carga P sobre el material, la tensión σ normal al plano y el área transversal A siguen la relación 2.2, considerando que la tensión se distribuye uniformemente sobre dicha área [35].

$$\sigma = \frac{P}{A} \quad (2.2)$$

Si el comportamiento es elástico, la deformación es proporcional a la carga, cuya relación se da por la ley de Hooke, ecuación 2.3.

$$\frac{\sigma}{\epsilon} = E = \text{constante} \quad (2.3)$$

donde σ es la tensión media, E es el módulo elástico o de Young que es una medida de la rigidez del material [Pa], y ϵ es la deformación media.

Algunas propiedades como el módulo elástico de cada material, está relacionado con su estructura atómica, es decir, se puede intuir el comportamiento del material si se consideran las fuerzas de enlace y la estructura atómica y molecular del material.

Por ejemplo, los polímeros tienen fuertes enlaces covalentes entre los átomos dentro de una molécula, pero débiles enlaces de Van der Waals entre las moléculas, lo que resulta en un bajo módulo elástico y resistencia (comparado con otros materiales). Sin embargo, si se modifica la influencia de esas uniones, como con reticulación o alineación de moléculas grandes en el polímero, se puede aumentar la resistencia del material ya que se forman enlaces covalentes o iónicos [34]. Dicha reticulación impide a las cadenas poliméricas moverse, así que entre mayor sea, más rígido será el material.

Existen diferentes métodos para caracterizar mecánicamente a los biomateriales, según el tipo de material, es decir, entender su comportamiento cuando se les aplican esfuerzos y éstos se deforman. En el caso de los polímeros son usuales el ensayo de tensión uniaxial y pruebas de microindentación, que se describen a continuación.

En la prueba de tensión uniaxial, una probeta de geometría estándar, se somete a una fuerza de tensión axial que aumenta progresivamente hasta que se produce la rotura en la probeta. Durante esta prueba, la carga y el alargamiento se miden en intervalos frecuentes y se expresan como tensión media y deformación media [35].

Durante este ensayo se genera un gráfico que muestra una curva de esfuerzo-deformación (figura 2.8), que se calcula a partir de la carga y la deformación medidas durante el transcurso de una prueba cuasiestática (independiente del tiempo) como se describió anteriormente. Donde el módulo de elasticidad se identifica como la pendiente E y se relaciona mediante la ecuación 2.3 con el esfuerzo que se aplica a la probeta y la deformación de la misma.

Sin embargo, ésta es una prueba destructiva, que requiere más material que una prueba de microindentación, y no es totalmente precisa ya que las probetas no siempre se rompen por la mitad.

La microindentación es una prueba no destructiva, se usa menor cantidad de material y sólo es necesario que tenga el espesor suficiente para lograr una medición correcta. Aunque sí deja una deformación permanente en el área donde se realiza, pero es mínima.

En esta prueba, se usa un microindentador que en la punta cuenta con una esfera de geometría

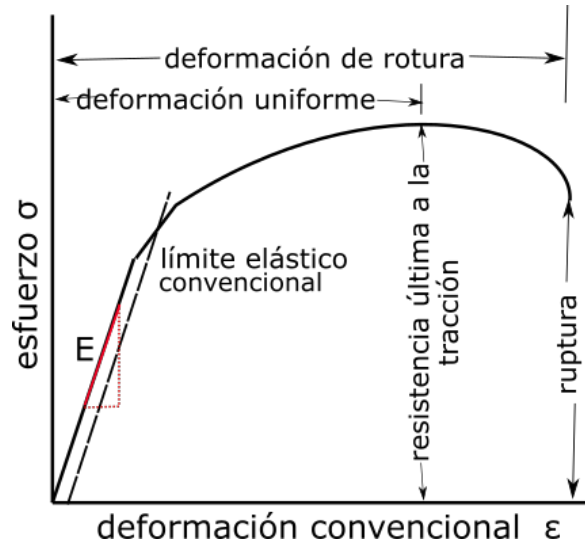


Figura 2.8: Diagrama de tracción convencional que muestra una curva típica de esfuerzo-deformación. La recta continua que parte del origen corresponde a la región elástica cuya pendiente es el módulo elástico (E). Enseguida el límite elástico convencional define la tensión máxima que es capaz de resistir el material sin experimentar deformación permanente. Después el material entra en la región plástica donde el material se ha deformado permanentemente hasta romperse. Tomado y modificado de [35].

específica que genera una deformación al aplicar una fuerza sobre la muestra. Como esta punta se encuentra suspendida, cuando se aplica la fuerza se genera un desplazamiento de la misma, lo que da una relación de carga y desplazamiento. Además, esta prueba mide la dureza (resistencia a la deformación permanente) del material y la relaciona con propiedades como el módulo elástico [34]. La geometría del indentador permite aplicar el modelo correcto para el análisis de pruebas mecánicas. Cuando el contacto se da entre sólidos elásticos, el modelo de Hertz estudia la interacción entre una esfera y una superficie plana de cierto espesor y relaciona el radio de la esfera con la fuerza que aplica sobre el material, el área de contacto y los módulos elásticos de ambos. Esto mediante la ecuación 2.4, donde F es la fuerza aplicada, E es el módulo elástico, ν el coeficiente de Poisson, R_i el radio del indentador y h la profundidad de indentación [82].

$$F = \frac{4}{3} \frac{ER_i^{1/2}h^{3/2}}{(1-\nu^2)} \quad (2.4)$$

El módulo de elasticidad se calcula ajustando el modelo de Hertz a los datos obtenidos de la curva de fuerza contra desplazamiento, y la gráfica típica que ilustra este comportamiento se puede observar en la figura 2.9 [83].

La medición del módulo de elasticidad se realizó en el centro de la muestra, en un arreglo de 3 x 3, sobre una área de 1.5 cm^2 , con un equipo FT-MTA03 (Femto Tools) con una punta FT-S200 y una esfera de vidrio de 50 μm de diámetro en la punta. Para cada muestra se realizaron diez mediciones de indentación, y para encontrar el módulo de elasticidad los resultados se analizaron

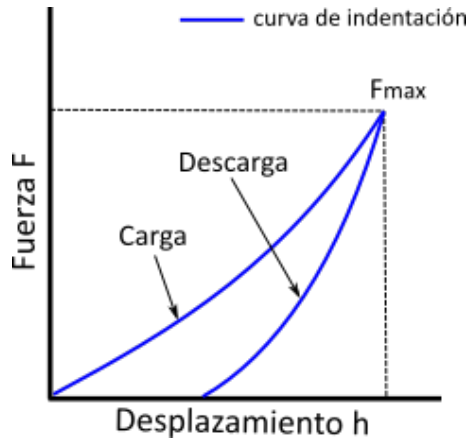


Figura 2.9: Curva típica de fuerza contra desplazamiento para un microindentador esférico. El modelo de Hertz se aplica en la porción de carga. Tomado y modificado de [83].

con el modelo de Hertz tomando en cuenta una profundidad de indentación menor a las $7.5 \mu m$ (profundidad máxima) y usando la ecuación 2.4, resolviendo para E.

2.4. Cultivo celular

La caracterización biológica es la prueba fundamental para conocer si los andamios fabricados realmente funcionan en aplicaciones de ingeniería de tejidos, y se realiza después de la caracterización de los biomateriales y de los andamios, es decir, se analiza el comportamiento de las células sobre el andamio electrohilado.

Para realizar el cultivo es necesario verificar que los andamios sean compatibles con las células, y para ello se realizan pruebas biológicas que determinan si las células sobreviven en el andamio, si se adhieren y posteriormente si hay proliferación.

En la caracterización biológica existen dos procesos a seguir. Primero, con las células adecuadas según la aplicación o el estudio de interés, se realiza el cultivo celular y se analiza la compatibilidad cito-estructural de los materiales del andamio con la línea celular seleccionada. El segundo proceso estudia las interacciones células-andamio como función del tiempo, es decir, analiza la unión celular, proliferación celular y diferenciación celular, dependiendo de la aplicación y sus objetivos.

Para visualizar el comportamiento de las células cuando se encuentran en contacto con el material se usan técnicas de imagenología como microscopía de fluorescencia, microscopio de contraste de fases, confocal, entre otros [36].

Un procedimiento útil a seguir para observar moléculas específicas y estructura celular, es el inmunomarcaje o detección por fluorescencia, acoplado un fluorocromo a una molécula que detecta una estructura en particular. Así, se localizan proteínas específicas mediante el marcaje con un anticuerpo a través de fluorescencia [38].

Las propiedades mecánicas y la adecuada arquitectura de los andamios, permiten su resistencia estructural, la intrusión celular, el paso de nutrientes y otros productos, y la transferencia de estrés y carga. Una alta porosidad, poros interconectados y gran área superficial permitirá que existan mayor número de interacciones celulares y favorecerá la proliferación celular. Además, in vivo, durante la primera etapa de la reconstrucción del tejido, las fuerzas de contracción de la herida actúan contra el proceso y se requiere suficiente resistencia mecánica y rigidez del andamio. Así como la tasa de degradación del andamio debe de garantizar el soporte requerido durante la formación del tejido [68].

Por naturaleza, en la mayoría de los tejidos blandos como piel o músculo, son las células y la matriz extracelular, las que contribuyen para establecer un microambiente relativamente elástico. Macroscópicamente, esa elasticidad es evidente en el tejido como la capacidad que tiene para recuperar su forma cuando se le ha aplicado algún esfuerzo como un pellizco.

Cuando las células se cultivan sobre los andamios, responden a la resistencia del sustrato, y ajustan sus adherencias, citoesqueleto y estado general. La resistencia intrínseca que presenta un sólido a una tensión se mide mediante el módulo de elasticidad E del material [71]. Algunos artículos mencionan que el módulo de elasticidad del andamio debe ser similar al del tejido que se desea regenerar, pero otros demuestran que las células se adhieren bien y proliferan sobre andamios que están lejos de tener ese módulo de elasticidad [7].

A continuación se describe el procedimiento para cultivar fibroblastos humanos inmortalizados extraídos de piel sobre los andamios electrohilados.

i) Esterilización de andamios electrohilados para cultivo celular.

El primer paso para realizar el cultivo celular fue esterilizar los andamios con luz UV (radiación ultravioleta), ya que tiene propiedades germicidas), con una exposición de 20 minutos para cada andamio en un solo lado. Esto se hizo con una incubadora UVP UI 950 de Analytik Jena AG, que tiene tubos de UV de una longitud de onda de 254 nm y 8 watts de potencia eléctrica.

ii) Siembra de células en andamios electrohilados.

Se usó la línea celular de fibroblastos humanos inmortalizados extraídos de piel BJ (ATCC®)

CRL-2522™). Se cultivaron 50,000 células por membrana cultivadas en medio medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y se mantuvieron bajo condiciones de cultivo celular (a 37°C, 5 % CO_2 y 90 % de humedad).

iii) Inmunomarcaje por fluorescencia de núcleo y fibras de estrés de actina.

El siguiente paso fue hacer el inmunomarcaje o detección por fluorescencia de moléculas acopladas a fluorocromos que detectan particularmente núcleos y citoesqueletos de actina de las células. Este proceso se ilustra en la figura 2.10.

Se usó el reactivo faloidina Alexa Fluor™ 488 cuya excitación/emisión se da en longitudes de onda de 495/518 nm, que permite teñir filamentos de actina visualizados mediante fluorescencia verde. Se usó el reactivo Hoechst 33342 cuya excitación/emisión se da en longitudes de onda de 361/497 nm, que permite teñir núcleos celulares visualizados mediante fluorescencia azul.

Tras 24 horas de cultivo celular, se removió el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS (agitando breve y suavemente la placa) a 37°C para remover el exceso de medio en los pozos. Luego se fijaron las células con paraformaldehído 4 % y se incubaron en condiciones de cultivo celular (a 37°C, 5 % CO_2 y 90 % de humedad) durante 20 minutos; y se hicieron tres lavados con PBS para remover el exceso del agente entrecruzante.

Luego se permeabilizó la membrana celular con PBS-Tritón X-100 al 0.1 %; y se hicieron tres lavados con PBS para remover el exceso de detergente.

Posteriormente se hizo una dilución 1:200 del reactivo faloidina Alexa Fluor® 488 en PBS. Se añadió a la membrana 500 μ L de esta dilución y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. También se hizo una dilución 1:100 del reactivo Hoechst en PBS. Se añadió 10 μ L de esta dilución y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Finalmente se hicieron tres lavados con PBS para remover el exceso de reactivo y un lavado con agua desionizada para remover las sales del PBS.

Para realizar el montaje de las muestras se agregó 100 μ L de Mowiol® 4-88 a un portaobjetos previamente lavado con etanol. Luego se colocó un cubreobjetos con la cara de las células en contacto con el Mowiol y se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente, esto para que el Mowiol polimerice ya que fija las células al portaobjetos, preservando el marcate.

iv) Observación del marcate.

El Microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE CI-L se usó para obtener las imágenes.

El marcate se observa dependiendo de la longitud de onda que produzca el fluorocromo al anticuerpo.

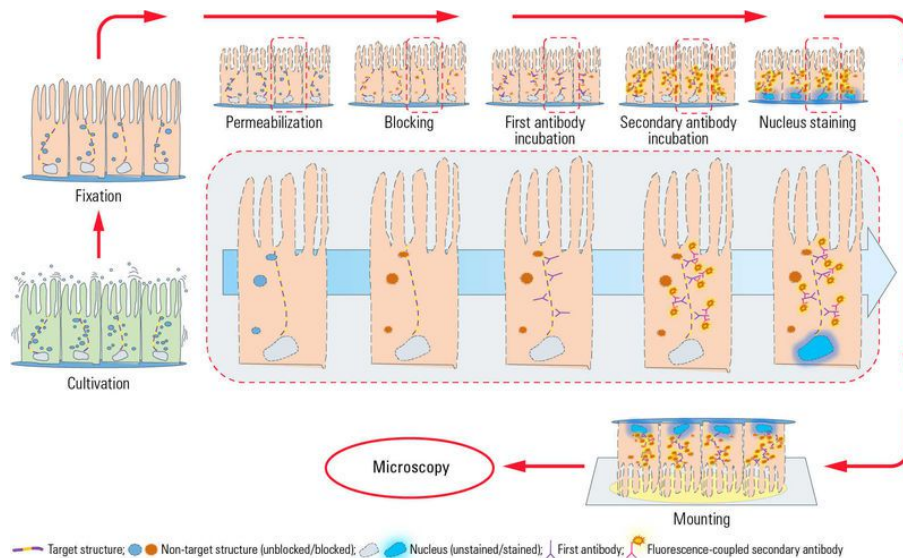


Figura 2.10: La figura ilustra el flujo de trabajo típico de inmunomarcaje por fluorescencia con células epiteliales adheridas. Después de ser cultivadas, las células se fijan con un químico entrecruzador (por ejemplo paraformaldehído). Después se realiza un paso de permeabilización con detergentes para permitir el paso de los anticuerpos al interior de la célula. El bloqueo con suero, albúmina o leche en polvo permite evitar el bloqueo inespecífico de los anticuerpos para minimizar falsos positivos. El anticuerpo primario une a sitios específicos con el antígeno a estudiar. El anticuerpo secundario, unido a un fluorocromo particular, une al anticuerpo primario y permite la visualización de las estructuras deseadas. El montaje permite estabilidad de la fluorescencia y, finalmente, la visualización de la muestra se realiza a través de microscopía. Tomada de [59].

Capítulo 3

Resultados y análisis

3.1. Caracterización de poli(ϵ -caprolactona)

En la poli(ϵ -caprolactona) se identificaron sus grupos funcionales mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), se corroboró su estructura molecular con resonancia magnética nuclear (RMN). Usando análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) se determinó el comportamiento térmico de la muestra a través de sus eventos térmicos, y se estudió su cristalinidad con difracción de rayos X (DRX).

3.1.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El espectro de FTIR de PCL, que se observa en la figura 3.1, muestra las bandas características de estiramiento simétrico y asimétrico y deformación de tijera y rocking de los grupos metileno CH_2 , las bandas de estiramiento simétrico y asimétrico del grupo C–O–C del éster, y también la banda intensa de estiramiento del grupo carbonilo C=O a 1730 cm^{-1} .

En la tabla 3.2 se muestra la asignación de sus grupos funcionales. Así, la espectroscopía FTIR corroboró la composición química de la muestra de PCL comercial, donde se observa que las bandas medidas experimentalmente debido al polímero PCL están en acuerdo con los espectros publicados en la literatura [44], no sólo en cuanto a las frecuencias de las bandas, sino también a sus respectivas intensidades relativas, ver figura 3.3. Además no se encontraron señales de impurezas.

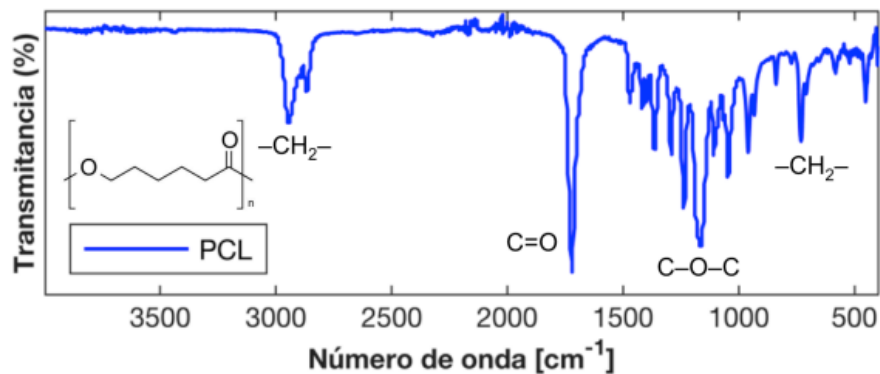


Figura 3.1: Espectro de FTIR-ATR de PCL. Se muestran los grupos funcionales que originan algunas de las bandas características.

frecuencia (1/cm)	unidad de vibración	tipo de vibración	grupo funcional
2950	-CH ₂ -	estiramiento asimétrico	alquilo
2870	-CH ₂ -	estiramiento simétrico	alquilo
1730	C=O	estiramiento	carbonilo (éster)
1470	-CH ₂ -	deformación (tijera)	alquilo
1290	C-O-C	estiramiento asimétrico	éster
1170	C-O-C	estiramiento simétrico	éster
730	-(CH ₂) _n - n>4	deformación (rocking)	alquilo

Tabla 3.2: Asignación de grupos y tipos de vibración a las bandas observadas en el espectro FTIR-ATR de PCL.

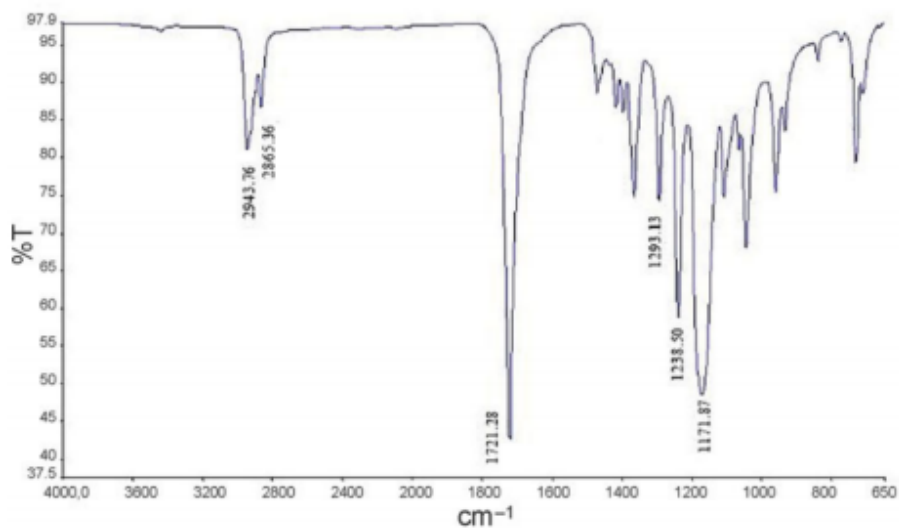


Figura 3.3: Espectro de FTIR de PCL como referencia. Tomado de [44].

3.1.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Para el caso de 1H -RMN (ver figura 3.4), se identificó la posición de referencia, un singulete (señal debida a cloroformo no deuterado ($CDCl_3$)) en $\delta = 7.28$ ppm, según lo reportado en la literatura [45]. Se usó integración en los picos para relacionarla con la cantidad de protones que originan esa señal y poderlos identificar.

Para el caso de ^{13}C -RMN (ver figura 3.5), se identificó la posición de referencia, un triplete (señal debida a impurezas no deuteradas del cloroformo disolvente ($CDCl_3$)) en $\delta = 77.23$ ppm, según lo reportado en la literatura [45]. Para hacer la asignación, se usó la posición de las señales por correlación con la magnitud de desprotección por átomos electronegativos cercanos (oxígeno).

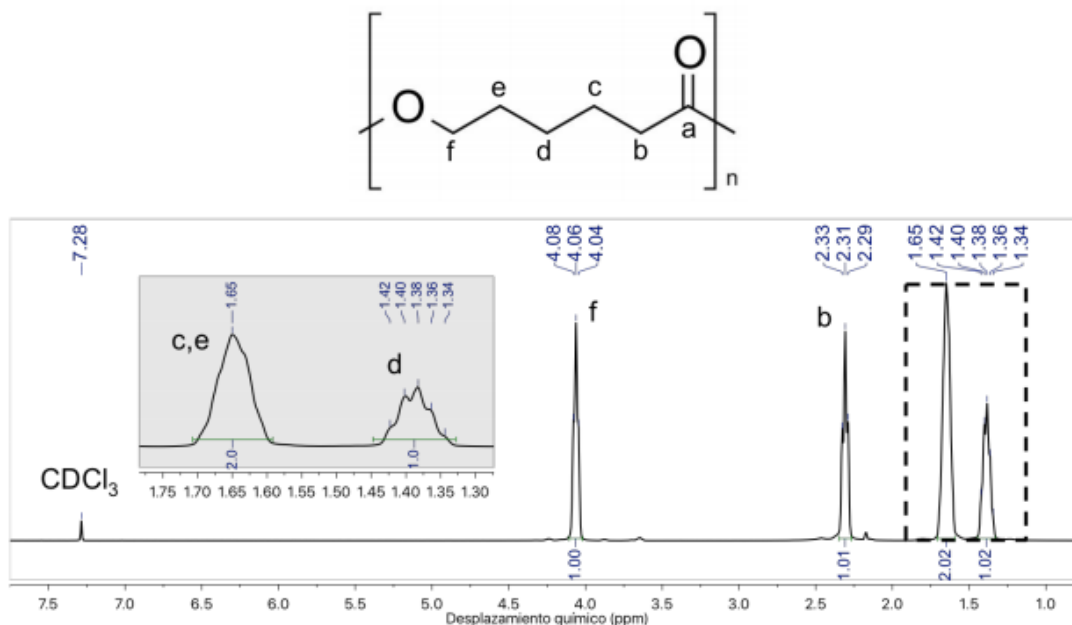


Figura 3.4: Espectro 1H - NMR de PCL. El campo magnético en cada hidrógeno depende de la densidad electrónica circundante. Debido al apantallamiento electrónico, entre mayor sea la densidad electrónica cercana al hidrógeno éste aparece con pequeños desplazamientos químicos. En el espectro se identifica la señal de referencia del $CDCl_3$ como un singulete, y cuatro picos, donde el área de cada uno indica el número de hidrógenos que aparecen. Por simetría de la molécula, algunos hidrógenos aparecen en el mismo desplazamiento químico, por ejemplo, sobre 'c,e' se integran dos protones.

Se observó que tanto los espectros medidos de PCL como sus asignaciones están en acuerdo con lo reportado en la literatura, es decir, se cumple su estructura química [45].

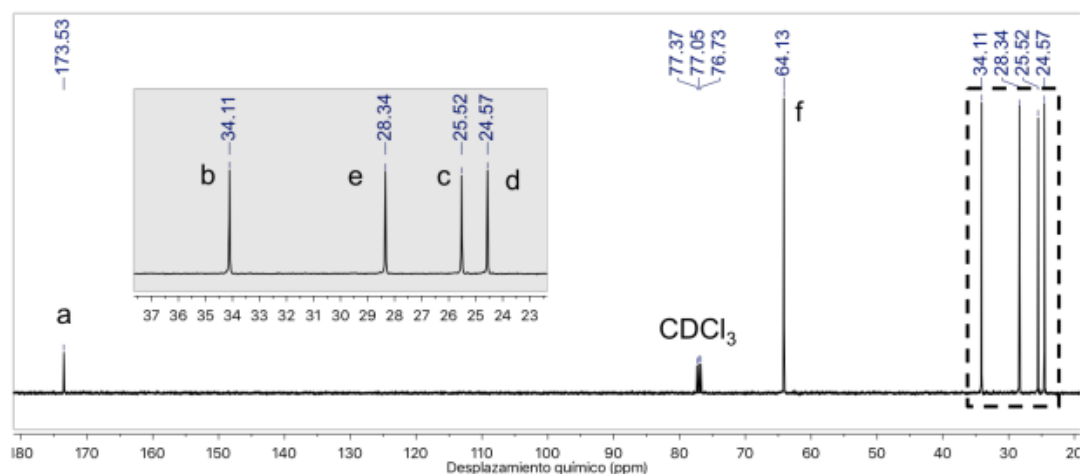


Figura 3.5: Espectro ^{13}C - NMR de PCL. En el espectro se identifica la señal de referencia del CDCl_3 como un triplete, todas las demás señales son singuletes y en este caso la intensidad de la señal no corresponde al número de carbonos, es decir, no se integra. Los átomos de carbono que presentan mayor desplazamiento químico son 'a' y 'f' que se encuentran más cercanos a los oxígenos que son más electronegativos, después b, e, c, d, según la estructura química de la PCL.

3.1.3. Transiciones térmicas de la PCL

Para la muestra de PCL se hizo una primera prueba de DSC con una rapidez de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, pero no se observó su transición vítrea, por lo que se repitió la prueba a $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, que sí permitió observarla (ver figura 3.6). Esto es porque cuando se calienta el polímero a una rapidez baja, experimenta una relajación molecular. Por el contrario, a una mayor rampa de calentamiento, el polímero cinéticamente no tiene tanta oportunidad de relajarse durante la transición vítrea, por lo que en el termograma se observa su cambio de absorción de calor y su transición vítrea.

Los resultados de análisis térmico por TGA y DSC de PCL muestran (ver figura 3.7) una temperatura de transición vítrea de -55°C , de fusión de 69°C y de descomposición de 365°C , que corresponden con las encontradas en la literatura [11], que son de T_g : -60°C a -72°C y T_m : 58°C a 63°C .

El bajo punto de fusión de este biomaterial permite procesarlo con facilidad y usarlo además como andamio, en la fabricación de complejas piezas plásticas. Su muy bajo punto de transición vítrea se debe a que al disminuir la temperatura, sus segmentos en la cadena se limitan a pequeñas rotaciones debido a su estructura, es decir, se limita su movimiento molecular. Al ser un polímero semicristalino se comprueba la presencia de la temperatura de transición vítrea y la temperatura de fusión, a diferencia de los polímero amorfos que sólo presentan la T_g .

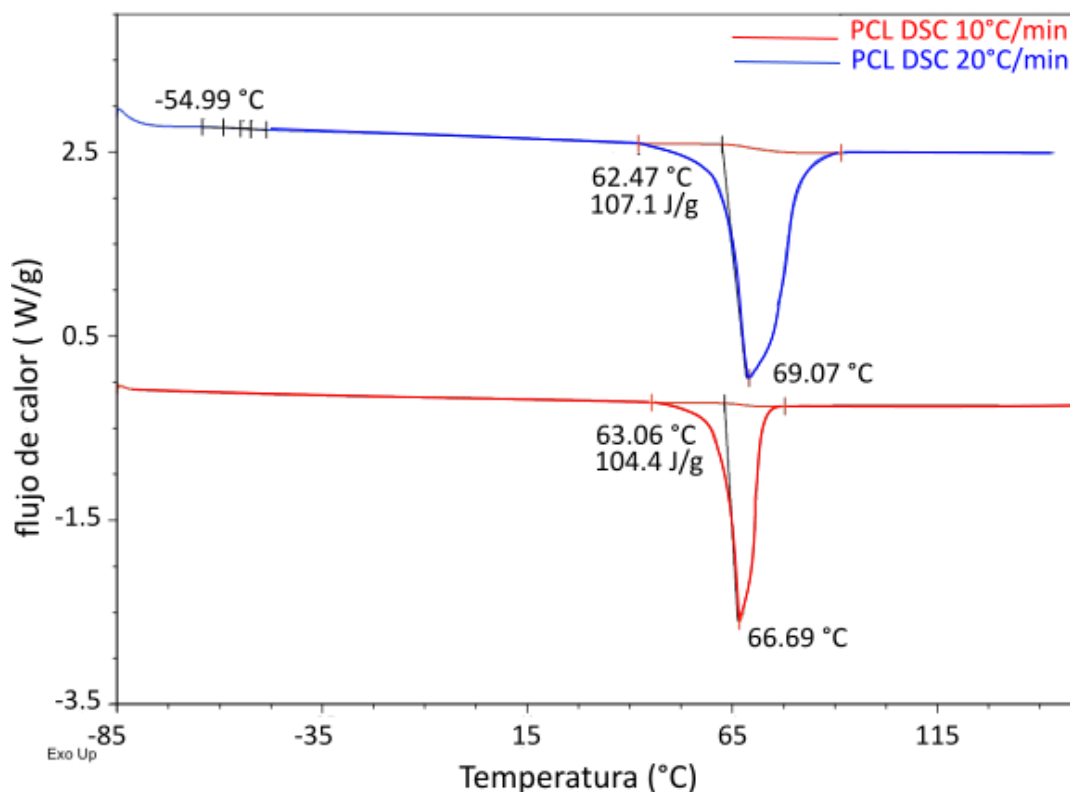


Figura 3.6: Termograma DSC de PCL con rampas de calentamiento de 10 °C/min (rojo) y 20 °C/min (azul). Sólo se observa la transición vítrea con la rampa de 20 °C/min.

La temperatura de descomposición de 365 °C que obtuvo la muestra de PCL, se puede relacionar con su alta cristalinidad, principalmente porque se trata de un homopolímero de alto peso molecular.

El carácter homopolimérico le permite a la PCL cristalizar hasta un grado mayor. Se requiere mayor energía térmica para cambiar el régimen de vibración molecular (transición debida a la fusión del material) y para vencer las atracciones intermoleculares. Además, el alto peso molecular de PCL se relaciona con su alta cristalinidad porque sus largas cadenas tienen mayor oportunidad de formar dominios cristalinos de mayor extensión que en cadenas cortas. Por tanto, una PCL de alto peso molecular tiende a alcanzar mayor grado de cristalinidad, aunque esto también depende de la historia térmica y de procesamiento [12].

Así, mediante FTIR, NRM, TGA y DSC, se confirmaron las propiedades químicas y térmicas de la PCL, de lo cual se concluye que el polímero es apto para aplicaciones biomédicas.

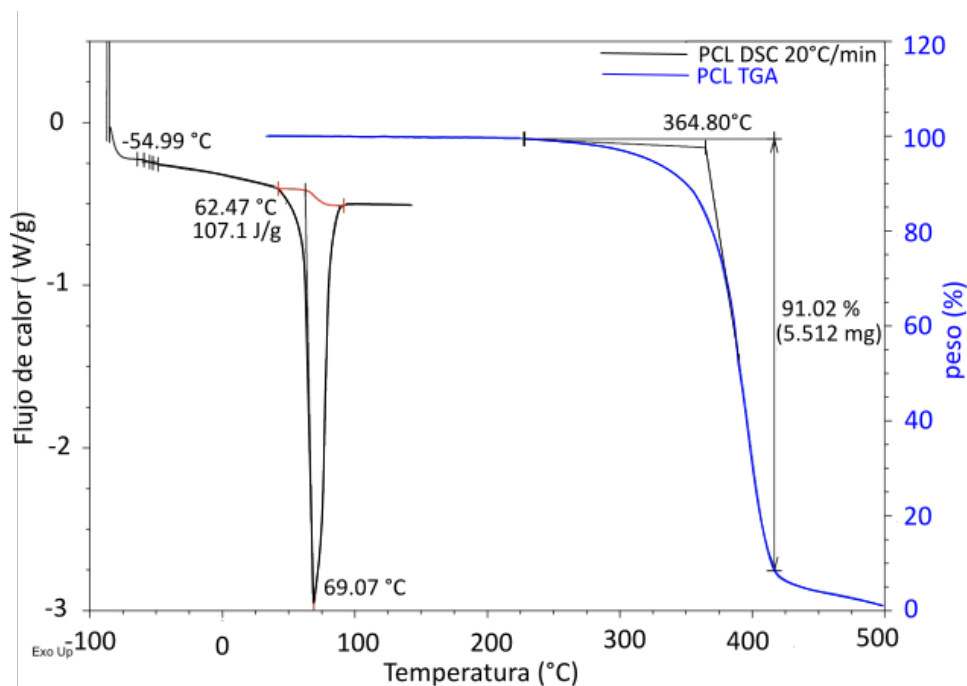


Figura 3.7: Termogramas TGA (derecha de la gráfica) y DSC (izquierda de la gráfica) de PCL. La prueba de TGA se realizó a 20 °C/min. Se muestran las temperaturas de transición vítrea ($T_g = -55^\circ\text{C}$), de fusión ($T_m = 69^\circ\text{C}$) y de descomposición ($T_d = 365^\circ\text{C}$).

3.2. Caracterización de andamios de PCL/gelatina

Se caracterizaron los andamios de poli(ϵ -caprolactona)/gelatina para determinar su estructura cristalina a través de DRX, conocer sus transiciones térmicas con TGA y DSC, observar su microestructura y morfología a través de SEM, conocer su grado de hidrofobicidad midiendo su ángulo de contacto y determinar sus propiedades mecánicas usando la técnica de indentación. Estos resultados se muestran a continuación con el propósito de conocer si el electrohilado cambia las propiedades del polímero cuando ha sido procesado como fibras, y así verificar que los andamios fabricados pueden usarse para lograr los objetivos planteados.

3.2.1. Análisis de fabricación de andamios de fibras aleatorias

La solución polimérica se preparó como se describió en la metodología experimental y el proceso de electrohilado para lograr un andamio de fibras aleatorias de PCL se siguió según se explicó en metodología.

3.2.1.1. Cristalinidad de los andamios

En el análisis de estructura cristalina por DRX para el andamio de fibras al azar (ver figura 3.8), se observa en el difractograma que la muestra es semicristalina, sin embargo, no se marcan los patrones de referencia por falta de ficha para hacer la comparación. Razón por la que se compara con las reportadas en la literatura [57] y se verifica que los picos corresponden a los reportados, ver figura 8.8, los picos que se observan están a $d[\text{Å}] = 4.148, 4.046, 3.748, 2.981, 2.226$; que corresponden a los planos cristalográficos (110), (111), (200), (210), (310) respectivamente, [61].

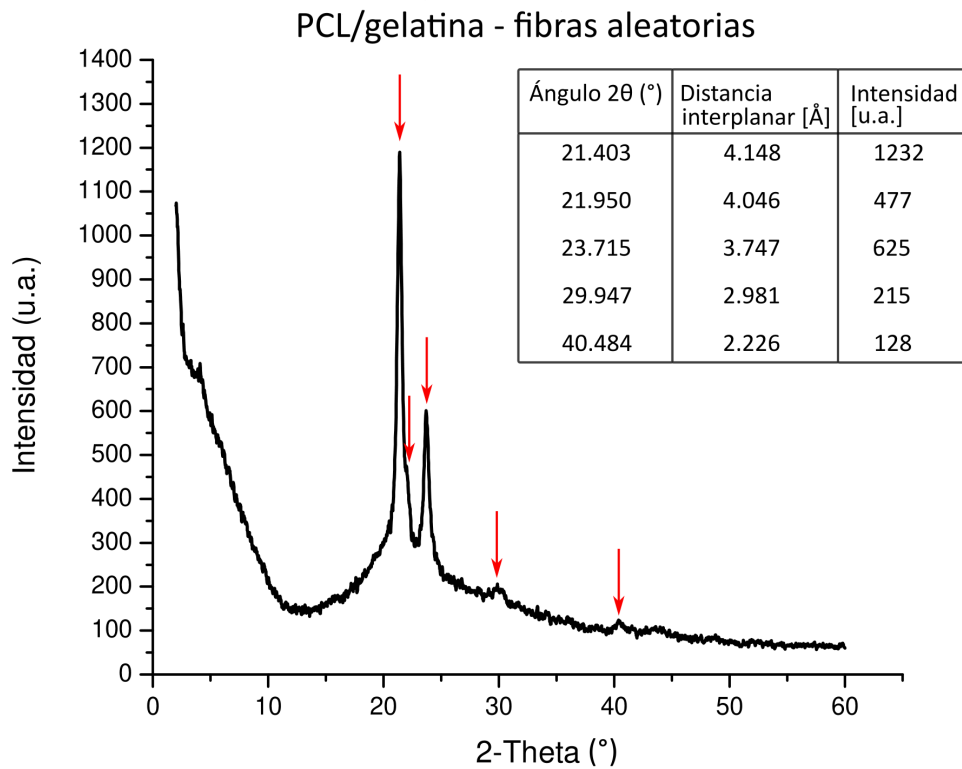


Figura 3.8: Difractograma del andamio de PCL/gelatina de fibras al azar.

De acuerdo al difractograma obtenido para andamios de fibras al azar, el porcentaje de cristalinidad de la muestra es del 42 %, ver figura 3.9, que se calcula con el software del equipo, donde el porcentaje de cristalinidad corresponde al área de los picos del espectro y el porcentaje amorfo corresponde al resto del área.

Este análisis demuestra la semicristalinidad del andamio de PCL/gelatina de fibras aleatorias.

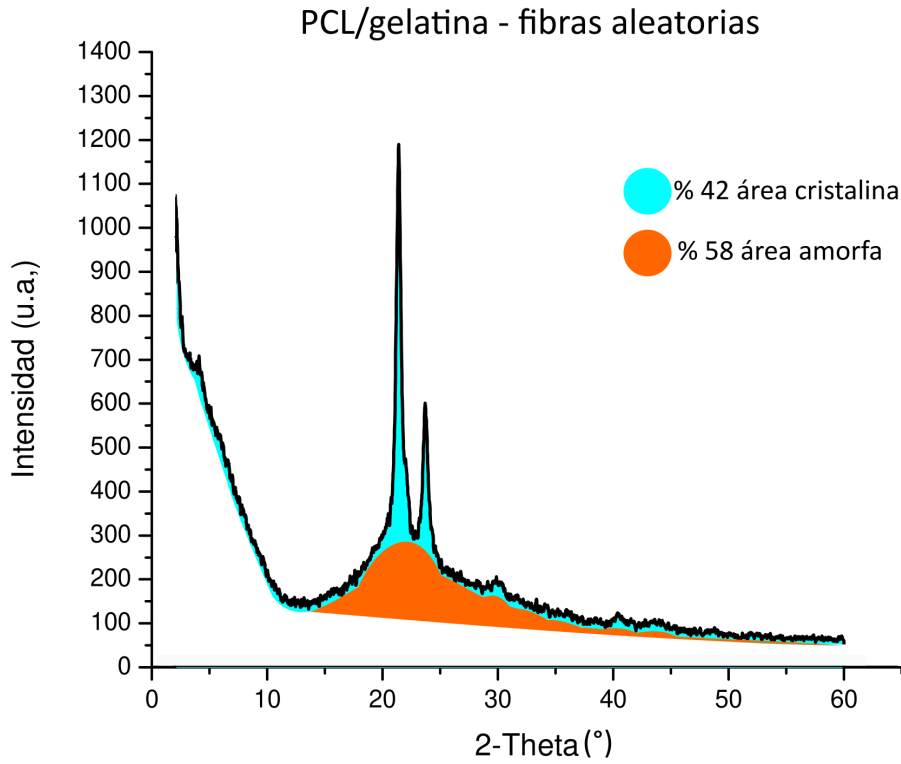


Figura 3.9: Difractograma del andamio de PCL/gelatina de fibras al azar que muestra un porcentaje de cristalinidad de 42 %.

3.2.1.2. Transiciones térmicas

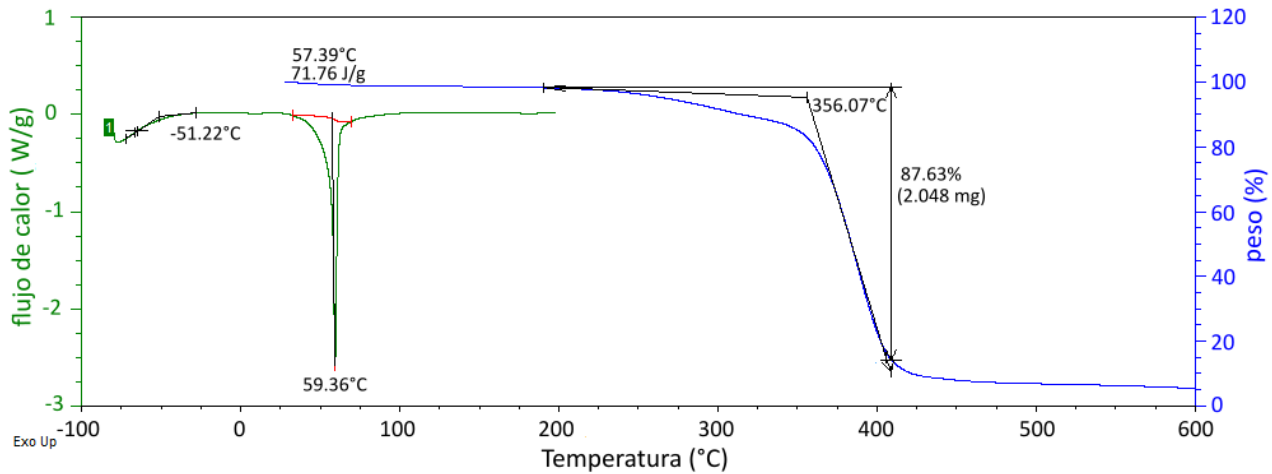


Figura 3.10: Termogramas TGA y DSC del andamio de PCL/gelatina. Las pruebas se realizaron con una rampa de calentamiento de 20 °C/min. Se muestran las temperaturas de transición vítrea T_g , de fusión T_m y de descomposición T_d .

Los resultados de análisis térmico por TGA y DSC de PCL muestran (ver figura 3.10) una

temperatura de transición vítrea de -51.22°C , de fusión de 59.36°C y de descomposición de 356.07°C , que corresponden con el rango esperado reportado en la literatura [11], que son de (T_g): -60°C a -72°C y (T_m): 58°C a 63°C . Lo que significa que el electrohilado no cambia las propiedades del material durante su conformación, ya que no se muestran cambios significativos a los encontrados antes con la PCL.

3.2.1.3. Microestructura y morfología

Las imágenes obtenidas por SEM (ver figura 3.11) muestran andamios electrohilados de fibras homogéneas, regulares, no presentan bulbos ni rastros de solvente y no se observan defectos, lo que crea un andamio adecuado para mimetizar la matriz extracelular.

Estas imágenes se analizaron con ImageJ para obtener el promedio de diámetro de fibras del andamio de PCL/gelatina, que se observa en la tabla 3.12, en el que se consideraron seis andamios, realizando 100 mediciones en cada uno, es decir, la medición de 100 diámetros de 100 fibras diferentes en cada andamio. Se obtuvo un diámetro de fibra de 0.854 micrómetros ± 0.094 , que está dentro de lo reportado en la literatura para ingeniería de tejido muscular esquelético y tendón [7].

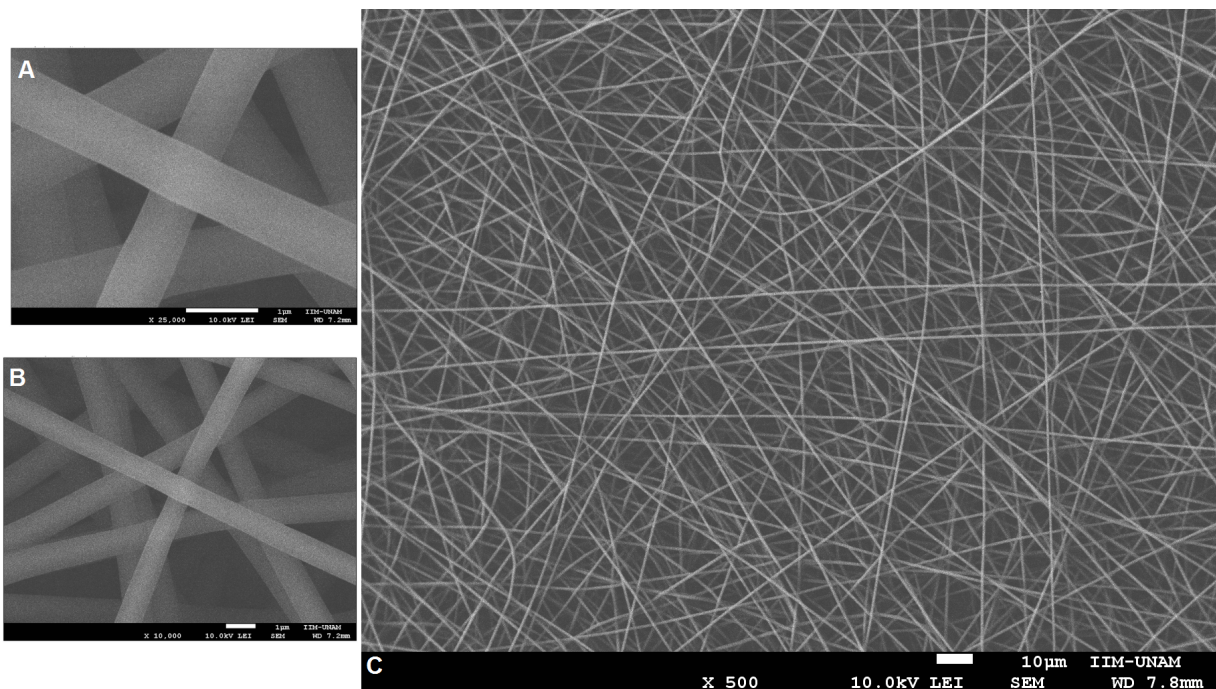


Figura 3.11: C) Andamio de PCL/gelatina de fibras de orientación al azar visto en SEM x500; A) Fibras de andamio en SEM x25,000; B) Fibras de andamio en SEM x10,000.

Más aún, según la misma revisión bibliográfica, se ha comprobado que el diámetro de las fibras no influye en la respuesta celular de los fibroblastos (en el caso de tendón) ni en

# andamios	Diámetro de fibras [um]	Desviación e.
1	0.867	0.083
2	0.845	0.117
3	0.857	0.062
4	0.843	0.098
5	0.831	0.129
6	0.880	0.074
Promedio	0.854	0.094

Tabla 3.12: Diámetro promedio de fibras al azar de PCL/gelatina, obtenido del promedio de 100 mediciones sobre seis andamios a partir de las imágenes obtenidas por SEM.

miofibroblastos (en el caso de tejido musculoesquelético) [7]. Esto se puede deber a que su arreglo geométrico es la variable que más influye en el comportamiento de las células durante su cultivo en el andamio, debido a su función contráctil.

También se elaboró un histograma para observar la frecuencia y distribución de diámetros de las fibras sobre uno de los andamios, usando el Software 'R' de análisis estadístico. Se usó el número 2 de la tabla 3.12, y en la gráfica se observa (ver figura 3.13) que la mayoría de las fibras medidas tienen un diámetro de entre 0.750 y 0.900 micrómetros. También muestra que efectivamente, de acuerdo con el resultado promedio obtenido de los distintos andamios (ver tabla 3.12), la mayor frecuencia de diámetro de fibra está en 0.850 micrómetros aproximadamente.

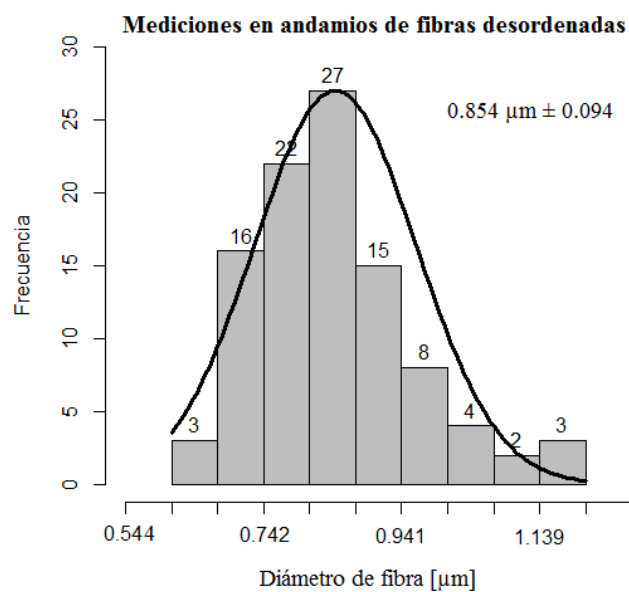


Figura 3.13: Distribución de diámetros de fibras sobre andamios de fibras desordenadas.

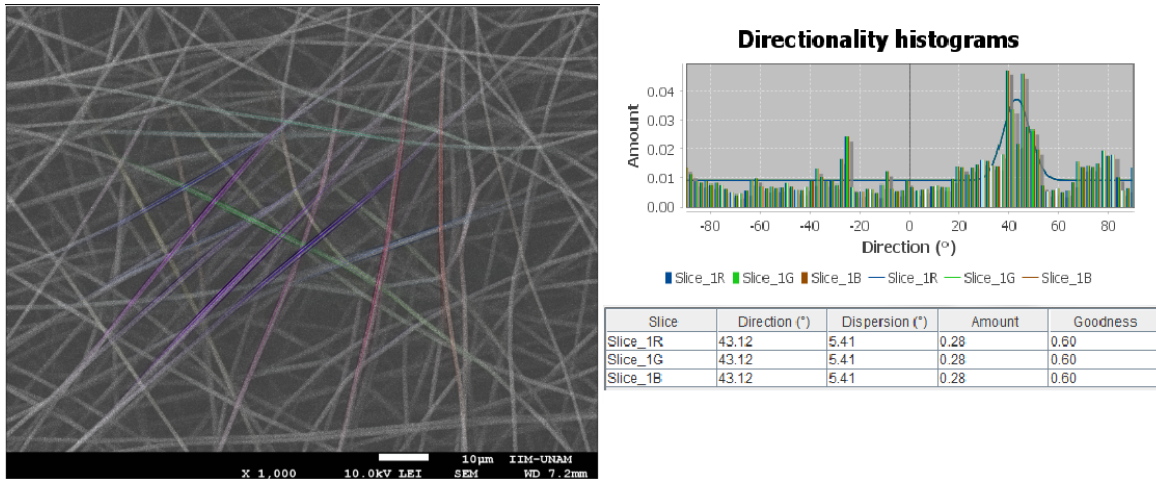


Figura 3.14: Análisis de aleatoriedad en andamio de PCL/gelatina de fibras al azar visto en SEM 1,000X

El grado de aleatoriedad de las fibras en el andamio se midió usando ImageJ (Java) con el complemento Directionality. En la imagen las estructuras muestran una orientación preferencial generando un patrón periódico, y a través del análisis del espectro de Fourier, la imagen es analizada en coordenadas polares para cuantificar el ángulo preferencial de sus estructuras. Los resultados muestran (ver figura 3.14) que en general no existe una orientación preferencial de las fibras en el andamio, aunque el histograma marca un pico en 43.12° resultado de la ligera alineación de las fibras más superficiales de la imagen.

También se graficó la superficie del andamio de fibras al azar para observar el arreglo superficial de sus fibras, como se puede observar (figura 3.15) las fibras se tejen con orientación aleatoria unas respecto a otras. Esto se hizo con ayuda del software ImageJ usando una de las imágenes de SEM del andamio y se hizo sólo para ilustrar la forma en que se enlazan las fibras.

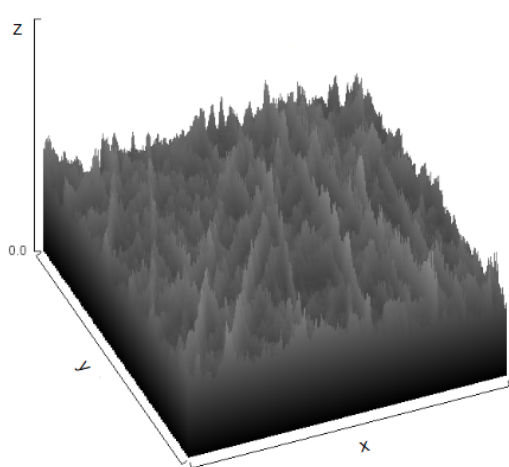


Figura 3.15: Gráfico de la superficie de andamio de fibras desordenadas.

3.2.1.4. Hidrofilicidad de los andamios poliméricos

La medición de ángulo de contacto permite medir el grado de mojabilidad del andamio. Estudios del comportamiento celular sobre sustratos hidrofóbicos muestran que las superficies hidrofílicas (con un ángulo de contacto $\theta < 90$) promueven la adhesión celular [81]. Como se trata de un análisis superficial se espera que el ángulo de contacto entre una gota de agua y los andamios de PCL/gelatina sea diferente para las fibras aleatorias y alineadas.

La PCL es un polímero muy hidrofóbico [11] por lo que es muy grande el ángulo de contacto que forma un andamio de este material con una gota de agua destilada, para corroborarlo se realizaron mediciones sobre cinco andamios de PCL de 1cm^2 en dos puntos, resultados que se muestran en la tabla 3.16, que indican un ángulo de contacto de $121.2^\circ \pm 1.809$, es decir, este material clasifica como hidrofóbico ya que su ángulo de contacto es mayor a 90° [29].

#Andamio	PCL	
	Ángulo de contacto [°]	desv. est.
1	122.87	
1	121.96	
2	124.17	
2	121.86	
3	118.89	
3	121.37	
4	121.45	
4	118.07	
5	121.33	
5	119.95	
Promedio	121.19	1.809

Tabla 3.16: Mediciones de ángulo de contacto sobre andamio de PCL de fibras al azar.

También se midió el ángulo de contacto en andamios de PCL/gelatina para analizar la influencia de la gelatina en la hidrofobicidad de los andamios de fibras desordenadas. Se midió el ángulo de contacto de cinco andamios de PCL/gelatina de 1cm^2 en dos puntos, resultados que se muestran en la tabla 3.18, que indican un ángulo de contacto de $114.05^\circ \pm 1.806$. Además, en la figura 3.17 se observa una de las mediciones hechas.



Figura 3.17: Figura que muestra una de las mediciones de ángulo de contacto, en andamio PCL/gelatina.

El resultado muestra que el ángulo de contacto disminuye aproximadamente un 6% en el caso de los andamios de PCL/gelatina en comparación con los de PCL. Aún así, este material clasifica como hidrofóbico, esto podría deberse a que el porcentaje de gelatina que se usó es bajo en comparación con el de PCL (20:80) y éste último es un material muy hidrofóbico.

En el cultivo celular se espera que las células se adhieran mejor, aunque varios artículos reportan el uso de la PCL y una respuesta biológica satisfactoria [7, 13].

PCL/gelatina		
#Andamio	Ángulo de contacto [°]	desv. est.
1	115.98	
1	112.02	
2	114.42	
2	113.93	
3	114.13	
3	110.25	
4	116.24	
4	113.84	
5	114.24	
5	115.48	
Promedio	114.05	1.806

Tabla 3.18: Mediciones de ángulo de contacto sobre andamio de PCL/gelatina de fibras al azar.

3.2.1.5. Propiedades mecánicas

Para los andamios de fibras al azar se obtuvo un módulo de Young de $E = 674.61 \text{ kPa} \pm 94.55$, que se obtuvo al aplicar el modelo de Hertz a los datos de fuerza vs distancia, ver figura 3.19. Esta prueba es importante porque permite tener una relación sobre el comportamiento mecánico del andamio y su conformación, es decir, el módulo de elasticidad cambiará dependiendo de la orientación de las fibras, que en el caso de las azarosas, el andamio muestra una resistencia mayor por el enmarañamiento físico que se produce por las fibras desordenadas.

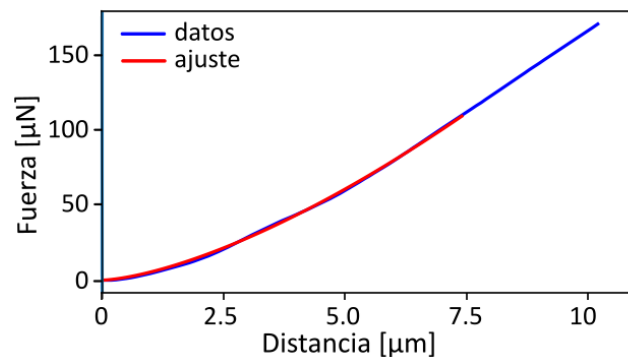


Figura 3.19: Gráfica de fuerza contra distancia para andamio de fibras alineadas paralelamente.

3.2.2. Análisis de fabricación de andamios de fibras alineadas

La solución polimérica se preparó como se describió en la metodología experimental, y el proceso de electrohilado para lograr un andamio de fibras alineadas es básicamente el mismo que para obtener andamios de fibras aleatorias, sólo cambiando el tipo de colector. A continuación se describen los resultados obtenidos con el colector cilindro-rotatorio y el colector de electrodos paralelos de plata.

3.2.3. Fibras alineadas con colector rotatorio

En esta sección se analiza la fabricación de las fibras alineadas paralelamente usando un colector cilindro - rotatorio. Se realizó una caracterización de la velocidad angular del colector en función del voltaje aplicado y se obtuvo la siguiente relación, ver tabla 3.20 y figura 3.21. Estos valores permitirían caracterizar el grado de alineación de las fibras, es decir, saber a qué velocidad angular del colector se fabrican fibras alineadas paralelas.

Voltaje [V]	Velocidad angular [rpm]	Voltaje [V]	Velocidad angular [rpm]
1	104	10	2000
1.5	172	10.5	2140
2	248	11	2304
2.5	320	11.5	2500
3	400	12	2608
3.5	488	12.5	2724
4	588	13	2856
4.5	680	13.5	3000
5	776	14	3156
5.5	880	14.5	3332
6	1000	15	3528
6.5	1108	15.5	3728
7	1248	16	4000
7.5	1360	16.5	4140
8	1460	17	4296
8.5	1576	17.5	4400
9	1712	18	4544
9.5	1816		

Tabla 3.20: Relación velocidad angular-voltaje en el colector rotatorio.

En la figura 3.21 se observa la relación gráfica de la función angular en función del voltaje aplicado en el colector rotatorio, que sigue una tendencia lineal. Para comprobar el correcto funcionamiento del sensor en la medición de la velocidad angular del colector se realizó una caracterización del mismo usando un aparato comercial, como se describe enseguida.

Se usó una bomba peristáltica de rodillos Master Flex L/S modelo 77202-60 que se usa para

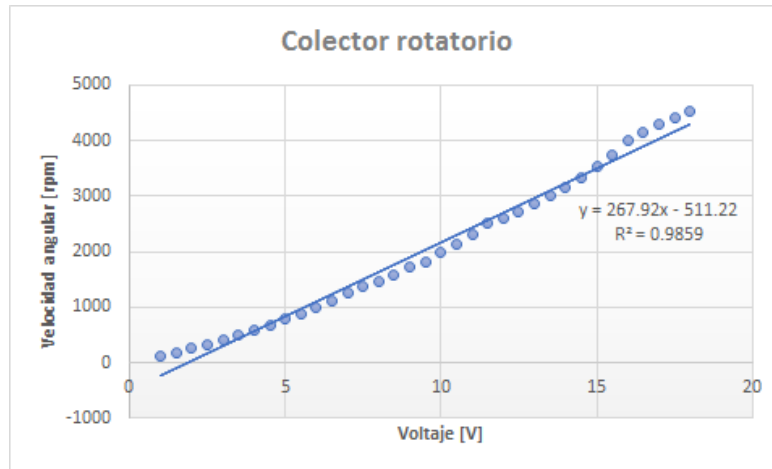


Figura 3.21: Gráfica de la velocidad angular en función del voltaje, según los datos obtenidos en la figura 8.19

bombear diferentes líquidos. La prueba se hizo en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales (ver figura 3.22), y mostró una coincidencia del 100% en las revoluciones por minuto que tiene el aparato comercial, en comparación con el sistema diseñado con el sensor de efecto Hall.

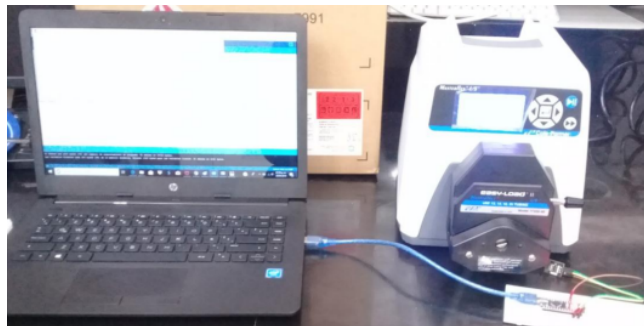


Figura 3.22: Caracterización de sistema de medición de velocidad angular, usando un aparato comercial.

Para fabricar los andamios electrohilados con el colector rotatorio se usó la caracterización de velocidad angular vs voltaje (tabla 3.20). También se tomaron como referencia los valores reportados en la literatura para lograr alineación de fibras electrohiladas (de 1000 rpm a 5000 rpm) [7]; así que se realizaron distintas mediciones variando la velocidad angular del colector y a continuación se reportan los resultados desde 1460 rpm a 4000 rpm, que es el rango en el que se observa mayor grado de alineación en las fibras. Posteriormente se midió el grado de alineación de las fibras usando el software 'Image J' sobre las microfotografías obtenidas por SEM.

En las figuras 8.23 a 8.27 se observan los resultados del electrohilado de fibras alineadas en el colector rotatorio. La hipótesis esperada para este método de fabricación se cumplió, observando que para valores 'bajos' y 'altos' de velocidad angular, las fibras se electrohilan de forma azarosa.

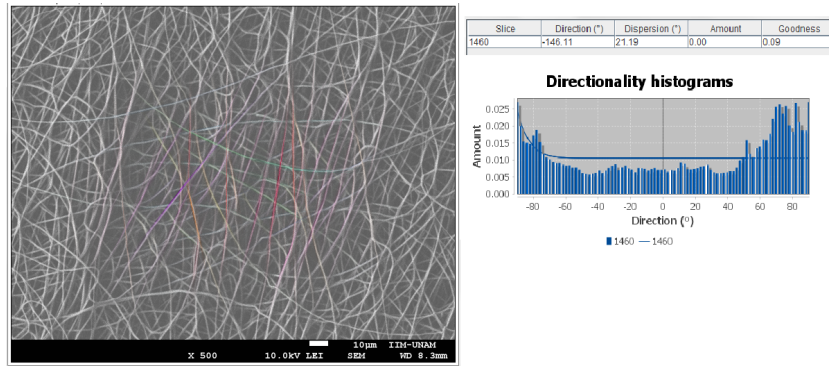


Figura 3.23: Andamio electrohilado con colector rotatorio a 1460 rpm.

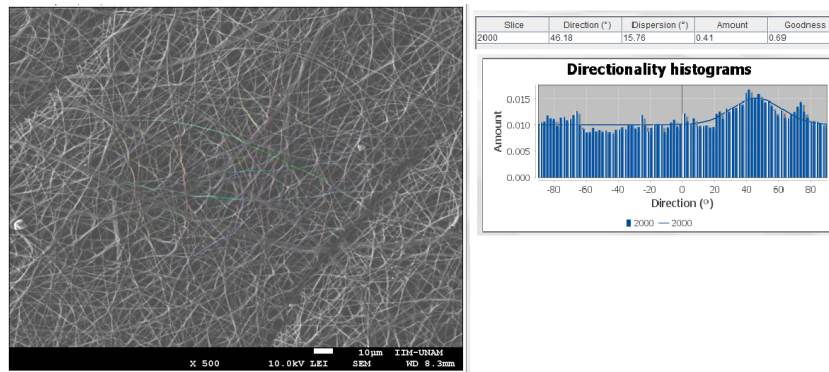


Figura 3.24: Andamio electrohilado con colector rotatorio a 2000 rpm.

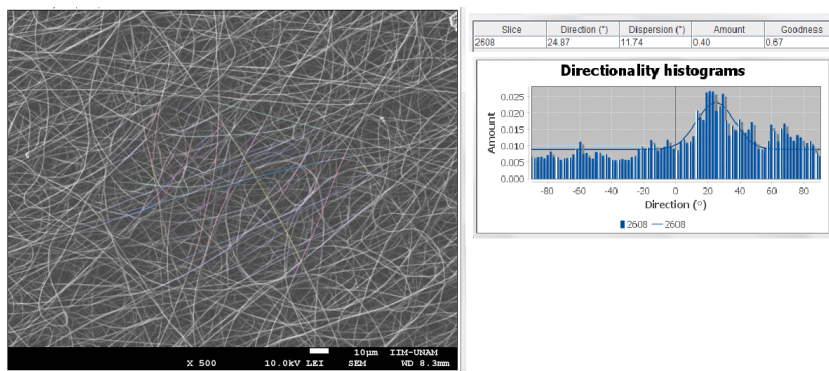


Figura 3.25: Andamio electrohilado con colector rotatorio a 2608 rpm.

Las imágenes fueron analizadas a través de un histograma de direccionalidad que usa un análisis de Fourier para medir la preferencia de dirección de las estructuras en una imagen. Según este análisis, las imágenes con fibras completamente aleatorias mostrarán un histograma plano, mientras que las imágenes con fibras de orientación preferencial mostrarán un pico en esa dirección.

Con esto en la primera figura (8.23) que corresponde a un andamio electrohilado a 1460 rpm, el histograma muestra que las fibras sobre el andamio no siguen una tendencia de alineación

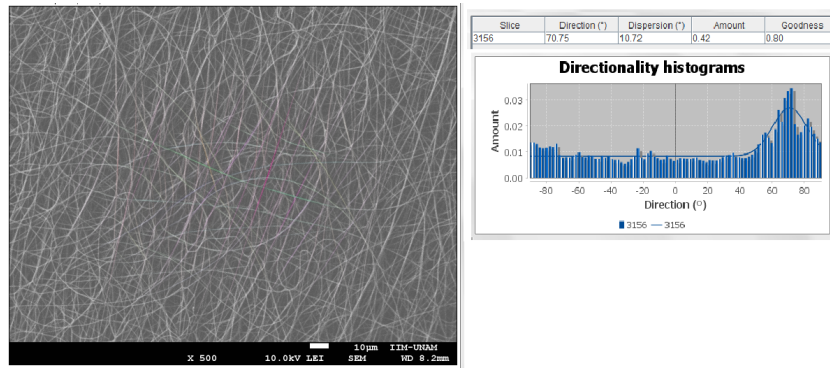


Figura 3.26: Andamio electrohilado con colector rotatorio a 3156 rpm.

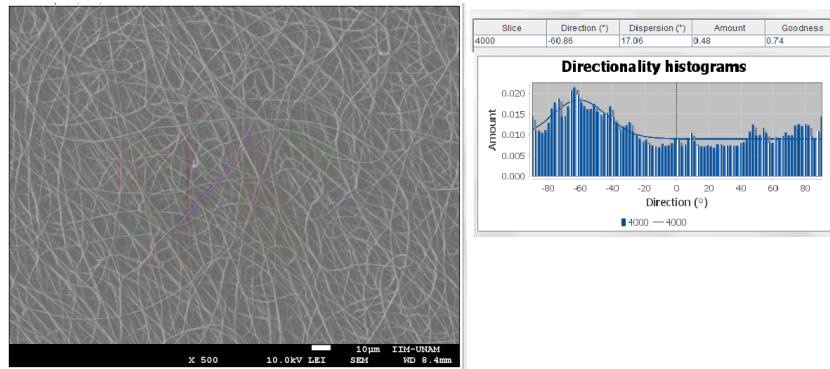


Figura 3.27: Andamio electrohilado con colector rotatorio a 4000 rpm.

preferencial, y mide un ángulo de dirección de $-146.11^\circ \pm 21.19^\circ$, sin embargo, la calidad del ajuste es de 0.09, lo que indica que la medición no es tan buena, es decir, ese grado de dirección se cuantificó con algunas de las fibras del andamio (las más superficiales) mientras que el resto de las fibras se promedió por debajo.

La segunda figura (8.24) que corresponde a un andamio electrohilado a 2000 rpm, muestra un menor grado de alineación en las fibras, ya que el histograma en su mayoría es plano, mostrando un ligero pico en la dirección $46.18^\circ \pm 0.41^\circ$, con una calidad de ajuste de 0.69, es decir, un valor más homogéneo que para el caso anterior.

La tercera figura (8.25) que corresponde a un andamio electrohilado a 2608 rpm, muestra una ligera tendencia de alineación en las fibras. La medición indica una orientación de $24.87^\circ \pm 11.74^\circ$, con una calidad de ajuste de 0.67, es decir, se observan más fibras alineadas que promedian en esa dirección, en comparación con la primera figura.

La cuarta figura (8.26) que corresponde a un andamio electrohilado a 3156 rpm, muestra la mayor tendencia de alineación en las fibras que cualquiera de las mediciones, con un ángulo direccional de $70.75^\circ \pm 10.12^\circ$, y una calidad de ajuste de 0.8, es decir, este valor cuantifica la mayoría de las fibras, que en efecto siguen una tendencia preferencial.

La última figura (8.27) que corresponde a un andamio electrohilado a 4000 rpm, muestra un

promedio de fibras con menor direccionalidad que en el caso anterior, con un ligero ángulo de tendencia de $-60.86^\circ \pm 17.05^\circ$ y una calidad de ajuste de 0.74, es decir, a esta velocidad angular las fibras en los andamios han sido electrohiladas con mayor grado de aleatoriedad, y no muestran una alineación significativa, medición que se corrobora con la figura 8.20.

Después de este análisis se concluyó que las fibras en los andamios electrohilados con colector rotatorio no muestran una alineación significativa para usarlos en el cultivo celular, ya que en su mayoría, las fibras están colocadas de forma azarosa, y sólo algunas capas se disponen de forma alineada en minoría. Por esta razón no se realizó la caracterización de las propiedades de estos andamios y enseguida se probó la alineación de fibras poliméricas con electrodos, resultados que se muestran a continuación.

3.2.4. Fibras alineadas con electrodos de plata

Para alinear paralelamente a las fibras poliméricas varios artículos [20,21] reportan el uso de electrodos paralelos, pero su fabricación puede ser muy costosa según el material conductor que se use y la forma en que se deposite sobre el sustrato o puede ser no muy exitosa. En este trabajo se presenta un método de fabricación de electrodos fácil, de bajo costo, rápido, controlado, reproducible y que se ha implementado en otras investigaciones como sensores bioquímicos [29]. Los electrodos de plata se fabricaron siguiendo el procedimiento detallado en metodología y para su fabricación se analizó de forma cualitativa la relación dimensión de electrodos / alineación de fibras.

El campo eléctrico que se genera entre la aguja de la jeringa que contiene la solución polimérica y los electrodos, permite que las fibras que se electrohilan, se depositen de forma alineada entre los electrodos. El grado de alineación de las fibras está en función del campo eléctrico generado, que puede modificarse de dos formas, aumentando el voltaje aplicado o modificando el tipo de colector (material y/o geometría); y de la distancia entre los electrodos.

El voltaje aplicado en este arreglo experimental fue igual al aplicado en la obtención de andamios de fibras aleatorias, esto es, de 15kV.

La geometría de los electrodos se eligió cuadrada por simplicidad en su elaboración, con dimensión de 1.5cm^2 y una separación entre ellos de 1.5cm. Se observó que conforme aumenta la separación de los electrodos, las fibras disminuyen su alineación.

El proceso de electrohilado se siguió según lo describe la metodología y en la figura 3.28 se observan las fibras alineadas (en el centro capa transparente de polímero) y los electrodos (en los extremos) que están cubiertos de polímero.

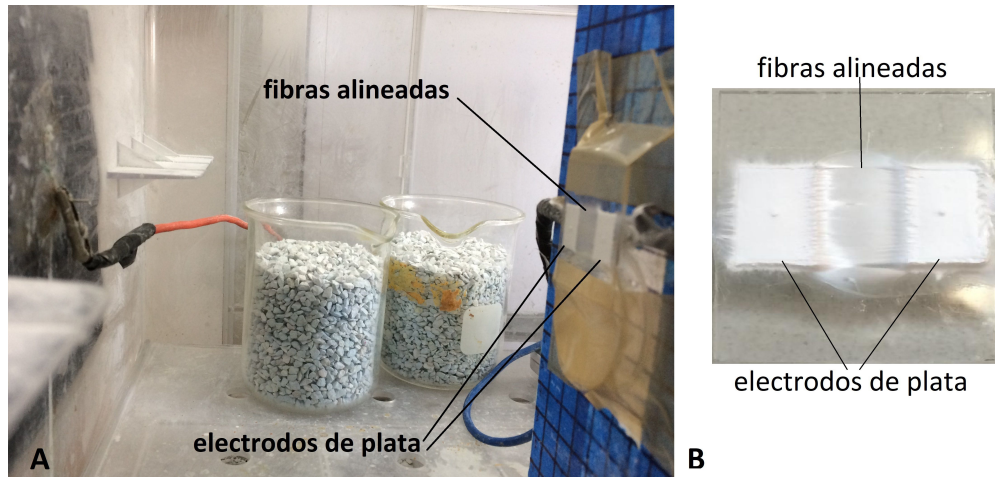


Figura 3.28: A) Electrohilado de fibras paralelas, B) Resultado del andamio electrohilado con electrodos paralelos de plata. En las figuras se observan en los extremos los electrodos cubiertos con polímero y en el centro una capa delgada de fibras alineadas paralelamente.

Antes de caracterizar estos andamios, se colocaron en el microscopio óptico para observar el grado de alineación de las fibras de forma cualitativa y posteriormente cuantificar con SEM. Las fibras se pueden observar en la figura 3.29, que muestran una alineación considerablemente mayor a las fabricadas con el colector rotatorio, por lo que se procedió a caracterizar las propiedades físicas y químicas de estos andamios como se describe en las siguientes secciones.

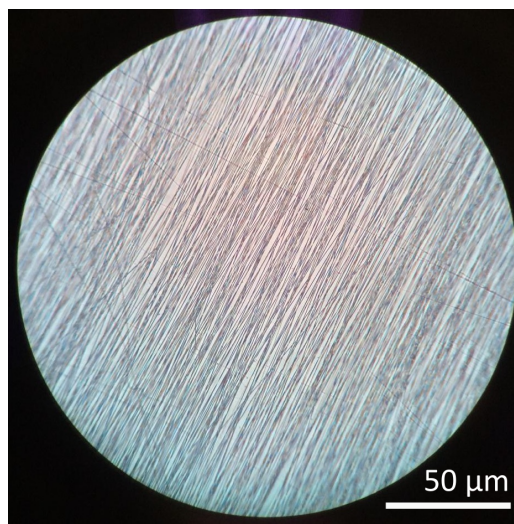


Figura 3.29: Andamio de fibras alineadas paralelamente con colector de electrodos de plata, observadas en un microscopio óptico 20X.

3.2.4.1. Cristalinidad de los andamios

En el difractograma obtenido por DRX para estudiar la estructura cristalina del andamio de fibras alineadas, se observa que la muestra es semicristalina, con un 51 % de cristalinidad. También se hace la comparación de los picos cristalinos con los de la literatura [57], los que se observan están a $d[\text{Å}] = 4.152, 3.751, 2.996, 2.23, 2.072$; que corresponden a los planos cristalográficos (110), (200), (210), (310) y (220) respectivamente, [61] (ver figura 3.30).

Una de las hipótesis planteadas en el presente trabajo y que se confirma con los resultados obtenidos es que las fibras alineadas paralelamente presentan un mayor grado de cristalinidad respecto de las fibras de orientación azarosa, representando un 51 % contra un 42 % de cristalinidad en los andamios, esto se sugiere debido a que las fibras poliméricas se alinean y también lo hacen sus moléculas, es decir, siguen una disposición ordenada entre ellas (ver figura 3.31). Este andamio es semicristalino, aunque el porcentaje de cristalinidad aumentó un 9 % respecto del andamio de fibras aleatorias.

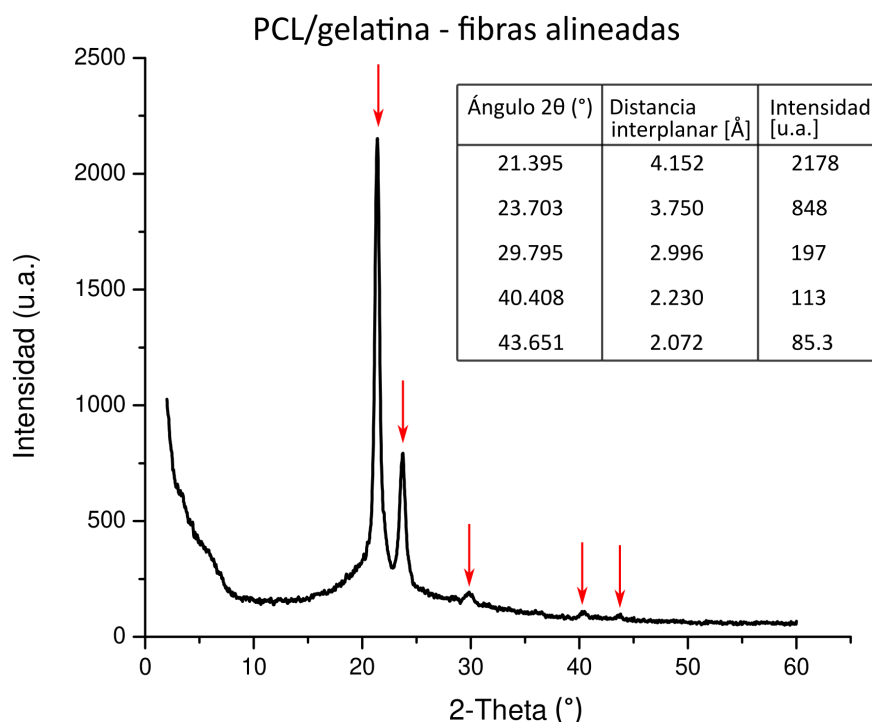


Figura 3.30: Difractograma del andamio de PCL/gelatina de fibras alineadas.

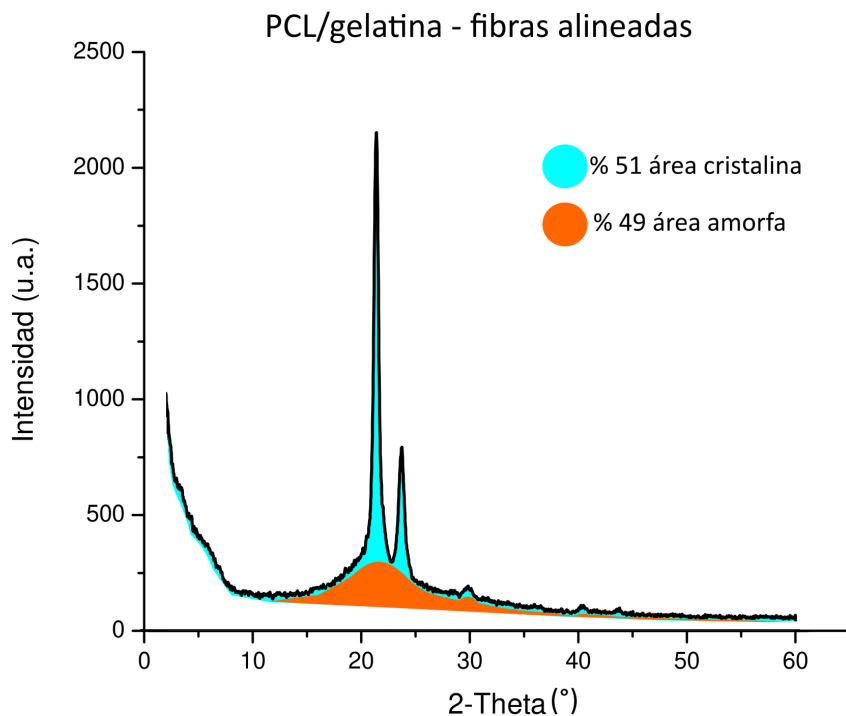


Figura 3.31: Difractograma del andamio de PCL/gelatina de fibras alineadas.

3.2.4.2. Transiciones térmicas

Los resultados de análisis térmico por TGA y DSC de PCL/gelatina muestran (ver figura 3.32) una temperatura de fusión de 59.21°C y de descomposición de 361.12°C , aunque la temperatura de transición vítrea no se identifica, las otras dos corresponden con el rango esperado reportado en la literatura [11]. Esto significa que el electrohilado tampoco cambia las propiedades del material durante su conformación al alinear las fibras mediante electrodos, como era esperado. Ya que aunque los andamios de fibras alineadas presentan 51 % de fase cristalina, sólo representa un 9 % más que los andamios de fibras aleatorias, y la temperatura de fusión no depende del grado de cristalinidad para un mismo material con el mismo peso molecular [8]. La diferencia en las temperaturas de fusión de los dos tipos de andamios de fibras aleatorias y alineadas es del 0.25 %, esta mínima diferencia se puede deber a la sensibilidad del equipo y entra dentro del rango de error experimental. Más aún, el uso de la gelatina como biopolímero para mejorar la hidrofiliidad del andamio y la adherencia celular, no influye tampoco y no se muestran cambios significativos a los encontrados antes con la PCL y en el otro andamio.

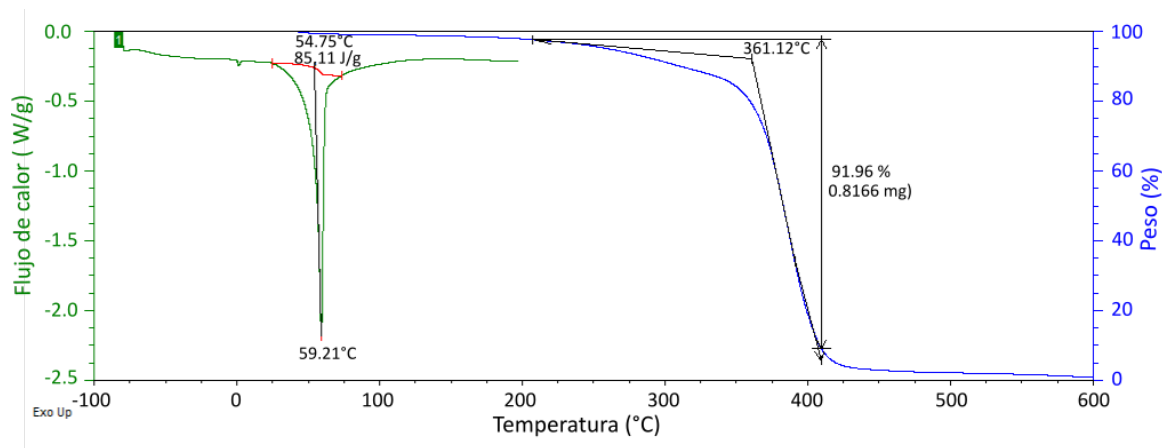


Figura 3.32: Termogramas TGA y DSC del andamio de PCL/gelatina. Las pruebas se hicieron con rampas de calentamiento de 20 °C/min. Se muestran las temperaturas de fusión (T_m) y de descomposición (T_d).

3.2.4.3. Microestructura y morfología

Después de realizar numerosas pruebas para lograr la estandarización de este proceso, los andamios electrohilados con electrodos paralelos se observan en general, de fibras alineadas, regulares, sin bulbos y homogéneas.

En la figura 3.33 se observa uno de los andamios electrohilados de fibras alineadas paralelamente con las características descritas, y en la figura 3.34 se aprecia un zoom del mismo.

La microestructura y morfología de los andamios se analizó con ImageJ, se usaron cinco andamios de PCL/gelatina para medir sobre cada uno el diámetro de sus fibras alineadas. Esto se logró realizando 100 mediciones sobre cada uno, ver tabla 3.35.

Se obtuvo un diámetro de fibra de 0.647 micrómetros \pm 0.116. Esto es, el diámetro promedio de las fibras alineadas disminuyó un 25 % respecto del diámetro de las fibras desordenadas, aún con las mismas condiciones de electrohilado. Esto se puede deber a la menor dimensión del andamio por la pequeña distancia de separación entre los electrodos.

Además, usando el programa estadístico "R" se visualizó con un histograma, la frecuencia de diámetros sobre uno de los andamios (número 1 de la tabla 3.35) para analizar su predominancia. En el caso graficado se observa que la mayoría de las fibras medidas tienen un diámetro de entre 0.600 y 0.800 micrómetros. Efectivamente, de acuerdo con el resultado obtenido de los distintos andamios (ver tabla 3.35), el diámetro promedio de las fibras es 0.650 micrómetros aproximadamente, ver figura 3.36.

En la figura 3.37 se muestra el resultado del grado de alineación de las fibras, se muestra que las fibras siguen una dirección de $88.70^\circ \pm 4.55$, y una calidad de ajuste del 0.57, es decir, las fibras muestran una considerable mayor alineación en comparación con los andamios creados

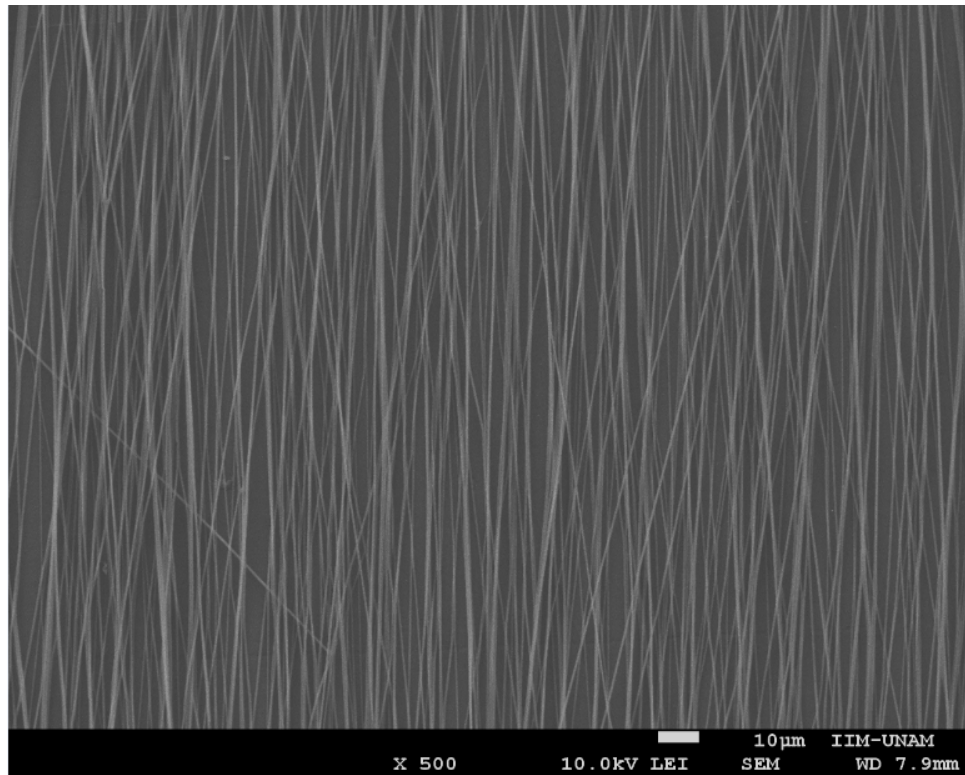


Figura 3.33: Andamio de fibras alineadas paralelamente, observadas con SEM 500X, obtenidas con colector de electrodos paralelos de plata.

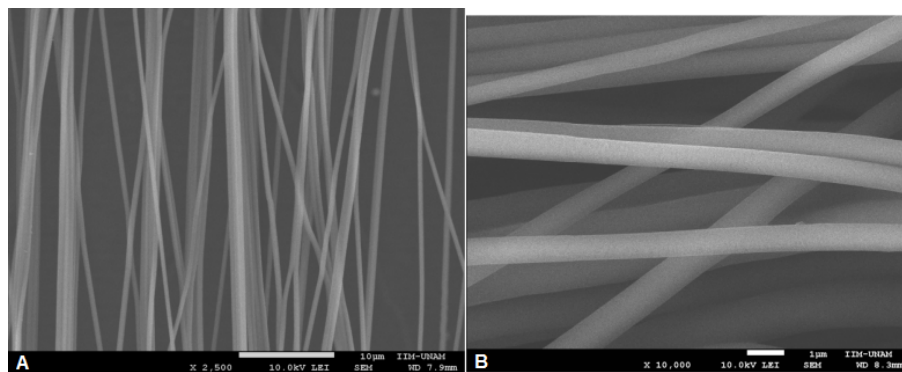


Figura 3.34: Fibras poliméricas alineadas paralelamente, observadas con SEM A) 2,500X; B) 10,000X.

# andamios	Diámetro de fibras [um]	Desviación e.
1	0.695	0.101
2	0.753	0.203
3	0.585	0.047
4	0.575	0.120
5	0.627	0.106
Promedio	0.647	0.115

Tabla 3.35: Diámetro promedio de fibras alineadas en andamios de PCL/gelatina.

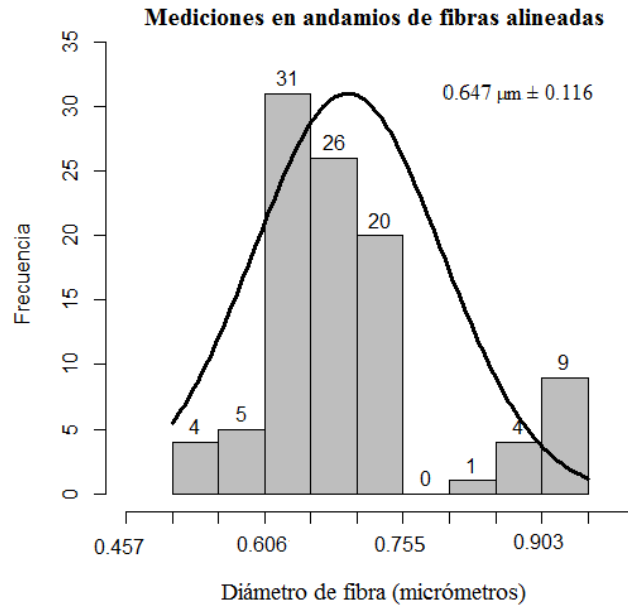


Figura 3.36: Distribución de diámetro de fibras alineadas sobre uno de los andamios.

con el colector rotatorio; además esto se puede observar en el histograma direccional, que se muestra casi nulo en su mayoría, ya que la mayor cantidad de fibras están alineadas en una dirección preferencial.

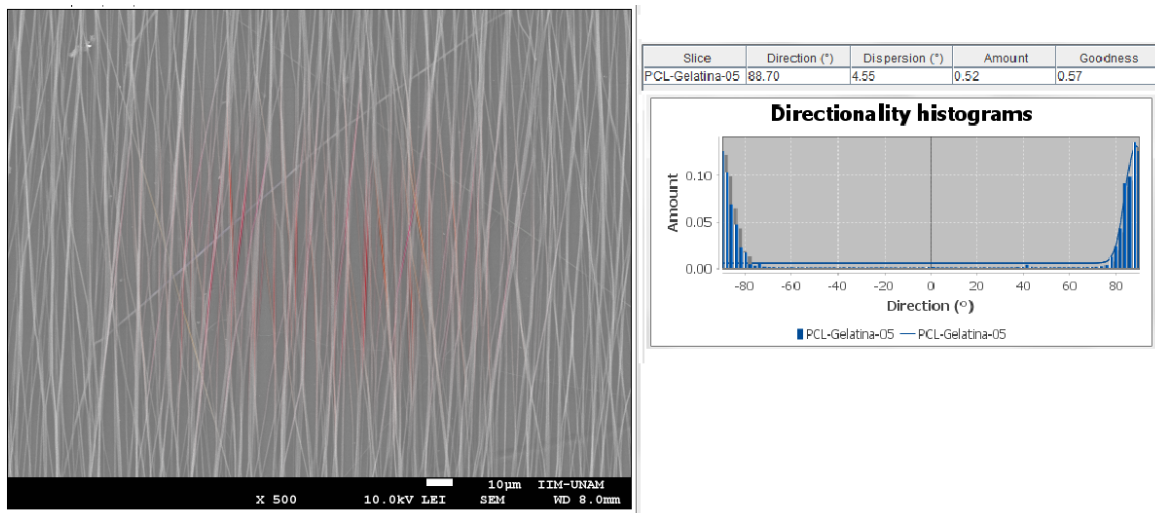


Figura 3.37: Grado de alineación de fibras poliméricas obtenidas con colector de electrodos paralelos de plata, mediante análisis de direccionalidad con Image J, que muestra que la mayoría de las fibras siguen una dirección preferencial.

Usando el software Image J y una de las imágenes obtenidas por SEM, se graficó la superficie del andamio de fibras alineadas paralelamente, para observar su arreglo superficial. La figura

3.38 sugiere que las fibras poliméricas se alinean unas respecto a otras de forma paralela pero que no siguen un ordenamiento empaquetado, es decir, entre las fibras se observan espacios donde se colocarán las células cuando se realice el cultivo celular.

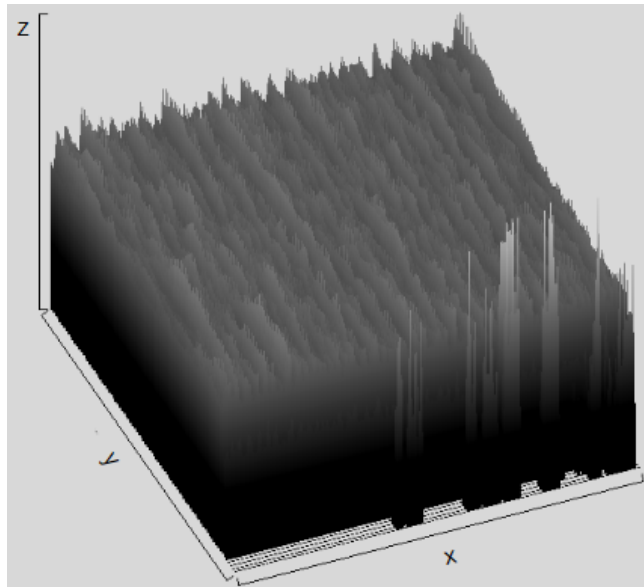


Figura 3.38: Gráfico de la superficie de andamio de fibras alineadas paralelamente, elaborado con colector de electrodos paralelos.

3.2.4.4. Hidrofilicidad de los andamios poliméricos

Se realizaron diez mediciones sobre diez andamios diferentes de PCL/gelatina de 1 cm^2 . Las mediciones se tomaron en dirección perpendicular a la dirección de las fibras poliméricas. Los resultados muestran que los andamios de fibras alineadas tienen un ángulo de contacto promedio de $18.75^\circ \pm 1.92$, ver tabla 3.40.



Figura 3.39: Figura que muestra una de las mediciones de ángulo de contacto, en andamio de PCL/gelatina de fibras alineadas.

En la sección anterior se mostró que los andamios de fibras desordenadas se clasifican como hidrofóbicos, porque el ángulo de contacto que se forma es mayor a 90° . Para este caso el ángulo de contacto disminuye drásticamente (en comparación con los andamios de fibras de orientación azarosa), al punto de lograr una superficie hidrofílica, según la clasificación [29]. Esto es debido a que las fibras poliméricas en todo el andamio siguen una dirección preferencial (alineadas y

paralelas). Al tratarse de un fenómeno superficial, el ángulo de contacto se ve afectado por la conformación superficial del andamio, que tiene una geometría paralela y ordenada según la dirección de las fibras. En la figura 3.39 se observa una de las mediciones realizadas en un andamio de este tipo.

alineados	PCL/gelatina	desv. est.
#Andamio	Ángulo de contacto [°]	
1	18.171	
2	18.759	
3	20.347	
4	20.316	
5	21.001	
6	19.714	
7	14.51	
8	17.355	
9	17.689	
10	19.667	
Promedio	18.7529	1.92135759

Tabla 3.40: Mediciones de ángulo de contacto sobre andamios de PCL/gelatina de fibras alineadas.

3.2.4.5. Propiedades mecánicas

Usando un equipo de fuerzas micromecánicas, se obtuvo para los andamios de fibras alineadas paralelamente, un módulo de Young de $E = 28.05 \text{ kPa} \pm 4.29$, ver figura 3.41.

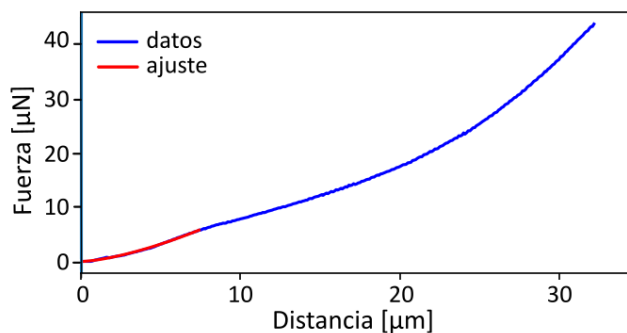


Figura 3.41: Gráfica de fuerza contra distancia para andamio de fibras alineadas paralelamente.

El módulo de elasticidad indica la rigidez de un material, por lo que en este caso, el módulo elástico es considerablemente menor que el de los andamios de fibras de orientación azarosa. La razón de la disminución del módulo elástico sobre el mismo material se debe al conformado, ya que en este caso las fibras están dispuestas de forma ordenada, alineadas unas con otras, lo que le confiere mayor elasticidad al andamio, es decir, mayor deformación. Como el módulo de elasticidad se relaciona con el esfuerzo aplicado y la deformación según la ecuación 2.2, al aplicar un esfuerzo sobre el andamio de fibras alineadas la deformación será mayor, al

contrario del andamio de fibras de orientación azarosa cuya deformación es menor debido al 'tejido desordenado' de las fibras poliméricas.

3.3. Cultivo celular en los andamios electrohilados de fibras alineadas y aleatorias

Uno de los objetivos de esta etapa es analizar los cambios en el esparcimiento y arreglo del citoesqueleto de los fibroblastos humanos inmortalizados extraídos de piel cuando son cultivados sobre andamios electrohilados; y según lo ya justificado, se espera que los fibroblastos se adhieran y muestren una orientación controlada según la orientación que tienen las fibras poliméricas que forman el andamio.

A continuación se muestran los resultados cualitativos del cultivo celular sobre los andamios electrohilados, para analizar cuantitativamente es necesario realizar varias pruebas (por lo menos tres) que permitan cuantificar el número de células adheridas, que describan la reproducibilidad del andamio y el comportamiento de las células con el tiempo.

Los andamios electrohilados de fibras alineadas tienen un módulo de elasticidad de $E = 28.05 \text{ kPa} \pm 4.29$, mientras que los de fibras aleatorias uno de $E = 674.61 \text{ kPa} \pm 94.55$; lo que indica que este último es más rígido que el de fibras alineadas paralelamente. Aunque la diferencia es significativa, cualitativamente se observa que en ambos tipos de andamios, de fibras aleatorias y de fibras alineadas, se observa adherencia celular, ya que las células aparecen extendidas sobre las fibras, esta capacidad de las células se muestra ya que con nula adherencia, aparecerían de forma redonda [85].

Se observó también que las características físicas superficiales del andamio, es decir, su topografía, influyen en el arreglo del citoesqueleto de los fibroblastos ya que en ambos tipos de andamios las células adquieren la geometría del poro donde se encuentran.

El diámetro de fibras para el andamio de fibras alineadas fue de $0.647 \text{ micrómetros} \pm 0.116$, mientras que para el andamio de fibras aleatorias fue de $0.854 \text{ micrómetros} \pm 0.094$, es decir, este último tiene fibras que son un 25 más anchas que el primero. Pero es entre las fibras electrohiladas donde se encuentran las células, es decir, entre los espacios vacíos dentro del andamio. Además, según los gráficos 3.15 y 3.38, las fibras no se tejen en capas ordenadas, una tras otra, sino que adquieren relieve debido a la forma de colectarlas por el método de electrohilado.

En la figura 3.42 se muestra el cultivo sobre los andamios de fibras desordenadas de PCL/gelatina donde se puede observar adherencia celular. Esta figura indica el marcaje de los núcleos celulares en color azul (A), el marcaje de filamentos de actina en color verde (B), y la unión de las imágenes anteriores para observar la morfología celular completa y su organización sobre los andamios (C). En estos andamios las células organizan su citoesqueleto de actina de forma aleatoria con formas circulares y poligonales, es decir, se distribuyen isotrópicamente; y se colocan entre una y varias fibras poliméricas sin orden aparente.

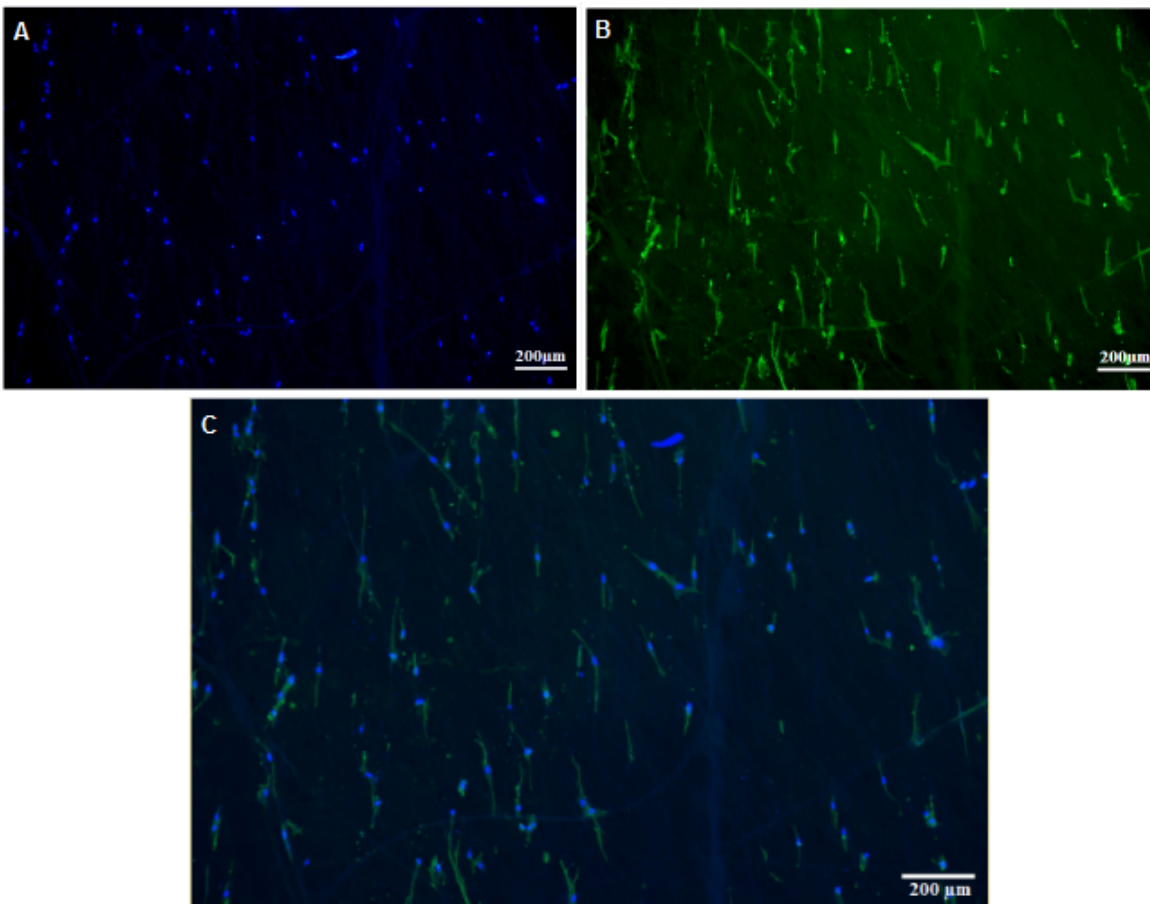


Figura 3.42: A) marcaje de núcleos (Hoechst), B) marcaje de filamentos de actina (Alexa 488 Phall), c) combinación de imágenes A y B, en fibroblastos humanos extraídos de piel BJ sembrados en andamios electrohilado de PCL/gelatina de fibras de orientación azarosa.

En la figura 3.43 se muestra el cultivo sobre los andamios de fibras alineadas donde se observa adherencia celular. En la figura se indica el marcaje de los núcleos celulares en color azul (A), el marcaje de filamentos de actina en color verde (B), y la unión de las imágenes anteriores para observar la morfología celular completa y su organización sobre los andamios (C). Sobre estos andamios, los fibroblastos siguen una organización guiada por las nanofibras poliméricas, donde las células muestran una morfología alargada, alineándose en la dirección de las fibras.

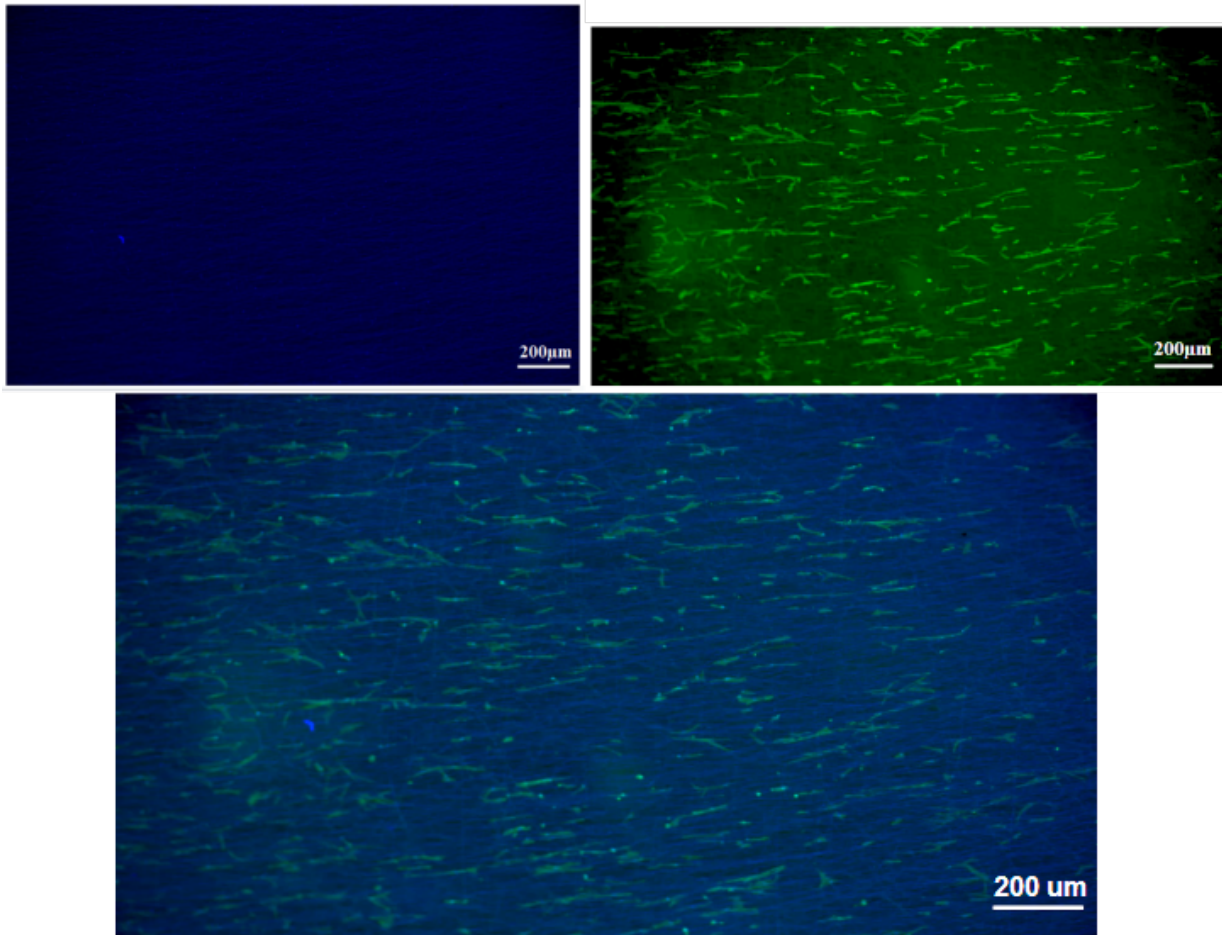


Figura 3.43: A) marcaje de núcleos (Hoechst), B) marcaje de filamentos de actina (Alexa 488 Phall), c) combinación de imágenes A y B, en fibroblastos humanos extraídos de piel BJ sembrados en andamios electrohilado de PCL/gelatina de fibras alineadas paralelamente.

En los andamios de fibras alineadas paralelamente las células muestran una forma alargada en respuesta a la estructura física del andamio, donde las fibras se encuentran dispuestas paralelamente entre ellas, por lo que los poros tienen una geometría longitudinal, ver figura 3.44. Mientras que en los andamios de fibras aleatorias, ver figura 3.45, las células mantienen una forma poligonal, debido al enmañaramiento físico de las fibras que les confiere dicha geometría. Con esto podemos concluir que las células se alteran morfológicamente en función de la topografía del andamio y que las propiedades biofísicas de los andamios afectan el comportamiento celular.

Estos resultados muestran que los fibroblastos se extienden y llenan los poros de los andamios, aún si éstos son grandes. Por lo que en los andamios de fibras de orientación azarosa, las células se esparcen sin orden y se observa que su citoesqueleto hace contacto con varias fibras poliméricas. Mientras que en los andamios de fibras alineadas, las células se adaptan a la geometría de éste y

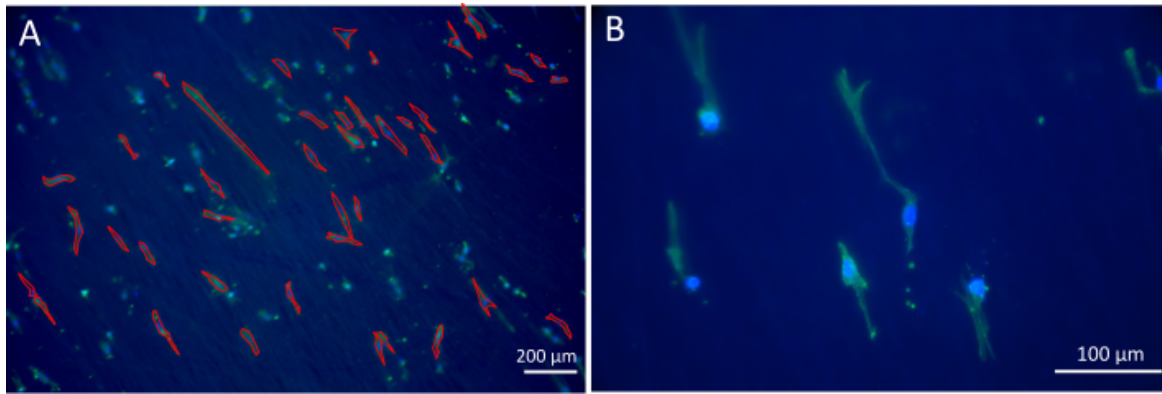


Figura 3.44: Cultivo celular en andamios de fibras alineadas

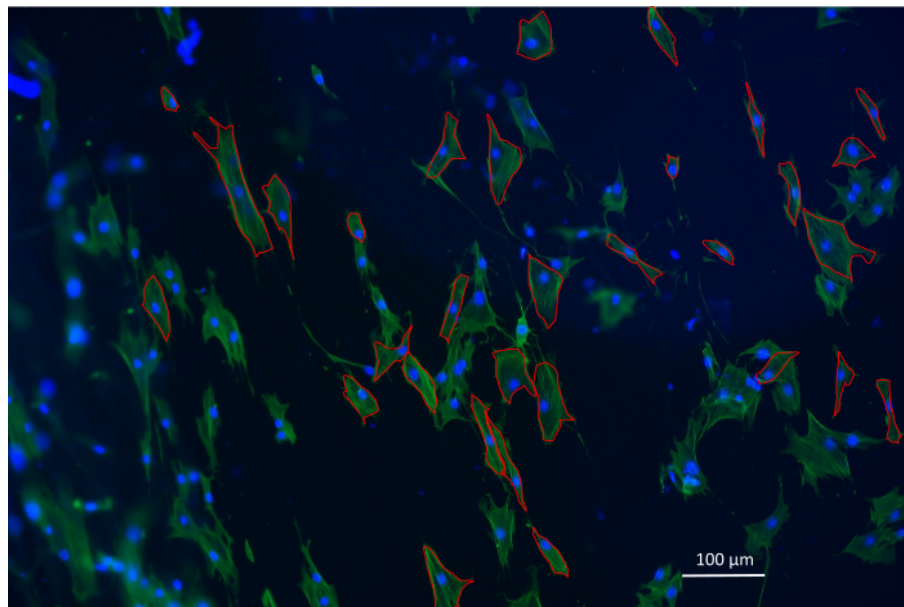


Figura 3.45: Cultivo celular en andamios de fibras aleatorias

distribuyen su citoesqueleto de forma ordenada en la dirección de las fibras. Es decir, se observa que el citoesqueleto determina la forma de una célula y se puede suponer que esto se relaciona con el comportamiento celular. Esto porque las fuerzas contráctiles en las células son generadas por interacciones cruzadas de filamentos de actina y miosina [71]. Se espera que esto contribuya a la migración colectiva de las células, ya que se sabe que esta migración es de vital importancia en la formación de tejidos, desarrollo de órganos, respuesta inmune y cicatrización de heridas. Donde las estructuras similares a las de la ECM proporcionan orientación direccional ya que existe el contacto célula-superficie [20].

3.4. Conclusiones

Los resultados de la presente investigación muestran que con las correctas hipótesis, se cumplieron todos los objetivos planteados, y que los biomateriales seleccionados, gelatina y PCL, permitieron fabricar andamios electrohilados de fibras orientadas al azar y alineadas paralelamente, en los que las células mostraron adherencia.

La técnica de electrohilado aunque es sencilla, involucra numerosos parámetros que complican su estandarización en la fabricación de los andamios, además el proceso convencional sólo permite fabricar andamios de fibras desordenadas. Sin embargo, el uso de electrodos permite modificarlo para controlar el arreglo de las fibras y lograr un patrón específico, es decir, se demostró que aunque el electrohilado es un proceso multivariable, es posible lograr una estandarización y controlar el patrón de las fibras electrohiladas. Más aún, la fabricación de los electrodos que se presenta es de un considerable menor costo (comparado con el uso del colector rotatorio), fácil, más eficiente, reproducible y controlable. El principio de aplicación de electrodos en el colector permitiría crear distintos y diversos patrones para depositar las nanofibras poliméricas de forma controlada y emplearlos en ingeniería de tejidos, logrando geometrías que el electrohilado convencional no permite.

Los resultados obtenidos muestran que los andamios de PCL/gelatina tienen un menor grado de hidrofobicidad que los andamios de PCL, lo que resulta en una mejor adherencia celular. Lo que muestra la enorme importancia del uso de la gelatina en los andamios, ya que mejora las propiedades hidrofílicas del material. EL ángulo de contacto fue de $121.2^\circ \pm 1.809$ para andamios de PCL de fibras al azar, $114.05^\circ \pm 1.806$ para andamios de PCL/gelatina de fibras al azar y $18.75^\circ \pm 1.92$ para PCL/gelatina de fibras alineadas.

Los análisis de FTIR, DSC y TGA, indican que el uso de la gelatina no cambia las propiedades de los andamios, ya que no modifica ni química ni estructuralmente, así que los andamios electrohilados conservan las características de los biomateriales pero mejoran las propiedades del andamio para el cultivo celular.

Según los resultados, se observa que las propiedades mecánicas de los andamios muestran dependencia del arreglo estructural de las fibras.

Los andamios de fibras desordenadas muestran un módulo elástico de $E = 674.61 \text{ kPa} \pm 94.55$, mientras que los de fibras alineadas tienen $E = 28.05 \text{ kPa} \pm 4.29$. La razón de esta diferencia es la anisotropía de las fibras, ya que las primeras se encuentran desordenadas y

enmarañadas, lo que le confiere rigidez al material, mientras que las segundas se disponen ordenadamente en una dirección.

Los resultados cualitativos del cultivo celular muestran que el arreglo geométrico de las nanofibras poliméricas influye en el comportamiento celular, ya que las células adoptan la forma que les confiere el patrón de las fibras, es decir, la orientación de las nanofibras inducen la alineación celular. Además se observa que el arreglo del citoesqueleto de los fibroblastos adquiere la forma del poro del andamio donde se encuentra. Para obtener resultados cuantitativos es necesario realizar más pruebas de cultivo celular y cuantificar el cambio en el número de células con el tiempo y observar su comportamiento en los andamios.

Así, las células organizaron su citoesqueleto de actina en la dirección de de las fibras alineadas, razón por la que muestran una forma alargada. Sin embargo, en las fibras desordenadas, las células se distribuyen isotrópicamente, por lo que adquieren una morfología redondeada o poligonal con orientación aleatoria, con lo que se confirman las hipótesis planteadas.

Bibliografía

- [1] Ibarra Guillermo Luis, Segura García Víctor, Chávez Arias Daniel, Borunda Falcón Oscar, Chávez Heres Tatiana, Ridaura Valencia Carlos, Macías Hernández Salvador; Las enfermedades y traumatismos del sistema musculoesquelético. Un análisis del Instituto Nacional de Rehabilitación de México, como base para su clasificación y prevención; 2013
- [2] Balderas López Maribel, Zamora Macorra Mireya, Martínez Alcántara Susana; (2019) Trastornos musculoesqueléticos en trabajadores de la manufactura de neumáticos, análisis del proceso de trabajo y riesgo de la actividad; Acta Universitaria, Multidisciplinary Scientific Journal; volumen 29; <https://doi.org/10.15174/au.2019.1913>.
- [3] Ross, M. H. y W. Pwalina, (2013), Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular, Capítulo 11 Tejido Muscular, Ed. Panamericana, 6^a ed.
- [4] Ulrich Meyer, Thomas Meyer, Jörg Handschel, Hans Peter Wiesmann, (2009), Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Springer Science Business Media, 1049 páginas.
- [5] Alexander L Yarin, Behnam Pourdeyhimi, Seeram Ramakrishna; (2014), Fundamentals and applications of micro and nanofibers; Cambridge, United Kingdom : University Printing House ; New York : Cambridge University Press
- [6] Guyton, A.C. Hall, J.E. (1996). Tratado de Fisiología médica. 13^a Edición. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid
- [7] Megane Beldjilali-Labro, Alejandro Garcia Garcia, Firas Farhat, (2018) Biomaterials in Tendon and Skeletal Muscle Tissue Engineering: Current Trends and Challenges, Materials, 11, 1116; doi:10.3390/ma11071116.
- [8] Sperling L.H., (2004), Introduction to Physical Polymer Science, 2nd. Edition, WileyInterscience, N.Y.

- [9] Bose, S., Bandyopadhyay, A. (2013) Introduction to Biomaterials. Characterization of Biomaterials, 1–9pp. doi:10.1016/b978-0-12-415800-9.00001-2
- [10] Vincenzo Guarino, Gennaro Gentile, Luigi Sorrentino Luigi Ambrosio; Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications; Encyclopedia of Polymer Science and Technology; DOI: 10.1002/0471440264.pst658
- [11] Wypych, G. (2016), Handbook of Polymers, ChemTec Publishing: Ontario, Canada. 712 pp.
- [12] Abedalwafa M, Wang F, Wang L, Li C, (2013), Biodegradable Poly-Epsilon-Caprolactone (PCL) for Tissue Engineering Applications: a Review; Rev Adv Mater Sc.
- [13] Gorgieva, S., Kokol, V. (2011). Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. Biomaterials Applications for Nanomedicine. doi:10.5772/24118
- [14] Silva, R. S. G., Bandeira, S. F., Pinto, L. A. A. (2014). Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). LWT - Food Science and Technology, 57(2), 580–585. doi:10.1016/j.lwt.2014.02.026
- [15] Lu, W. P., Guo, Y. (2018). Electrospinning of Collagen and Its Derivatives for Biomedical Applications. Novel Aspects of Nanofibers. doi:10.5772/intechopen.73581
- [16] Luis Jesús Villarreal-Gómez, José Manuel Cornejo-Bravo, Ricardo Vera-Graziano Daniel Grande (2016), Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: a critically selected survey, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 27:2, 157-176, DOI: 10.1080/09205063.2015.1116885.
- [17] Alexander L Yarin, Behnam Pourdeyhimi, Seeram Ramakrishna; (2014), Fundamentals and applications of micro and nanofibers; Cambridge, United Kingdom : University Printing House ; New York : Cambridge University Press
- [18] Arkadii Arinstein (2017); Electrospun Polymer Nanofibers, A physicist 's point of view; Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. 197 pp.
- [19] Alghoraibi, I., Alomari, S. (2018). Different Methods for Nanofiber Design and Fabrication. Handbook of Nanofibers, 1–46. doi:10.1007/978-3-319-42789-8₁ – 2.

- [20] Rogers, C. M., Morris, G. E., Gould, T. W. A., Bail, R., Toumpaniari, S., Harrington, H., ... Rose, F. R. A. J. (2014). A novel technique for the production of electrospun scaffolds with tailored three-dimensional micro-patterns employing additive manufacturing. *Biofabrication*, 6(3), 035003. doi:10.1088/1758-5082/6/3/035003.
- [21] Yuan, H., Zhou, Q., Zhang, Y. (2017). Improving fiber alignment during electrospinning. *Electrospun Nanofibers*, 125–147. doi:10.1016/b978-0-08-100907-9.00006-4.
- [22] R. West. Anthony, (2014), *Solid state chemistry and its applications*, New Delhi India, Wiley.
- [23] Andrew, Burrows, et al, (2016), *Chemistry. Introducing inorganic, organic and physical chemistry*, Oxford.
- [24] Hesse, Manfred, Meier, Herbert, et al, (2005), *Métodos espectroscópicos en química orgánica*, Sintesis.
- [25] Skoog D, Holler F, Nieman T, (2002), *Principios de análisis instrumental*, Mc Graw Hill, Madrid.
- [26] Omidi, M., Fatehinya, A., Farahani, M., Akbari, Z., Shahmoradi, S., Yazdian, F., ... Vashae, D. (2017). Characterization of biomaterials. *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*, 97–115. doi:10.1016/b978-0-08-100961-1.00007-4.
- [27] Q. M. Craig Dunca, Reading Mike, (2007), *Thermal analysis of pharmaceuticals*, USA, CRC Press.
- [28] Sampath Kumar, T. S. (2013). *Physical and Chemical Characterization of Biomaterials. Characterization of Biomaterials*, 11–47. doi:10.1016/b978-0-12-415800-9.00002-4.
- [29] Herrera D. Sara J, (2017), *Elaboración y caracterización de microelectrodos para medir glucosa*, Licenciatura en Física, UNAM.
- [30] Chakraborty Suman. (2010). *Microfluidics and Microfabrication*. Springer.
- [31] Madou Marc J. (2011). *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*. Vol1, Vol2, Vol3: CRC Press.
- [32] Rieutord, Michel. (2015). *Fluid Dynamics An Introduction*. Springer.
- [33] Lambert Pierre . (2014). *Surface Tension in Microsystems*. Microtechnology and MEMS. Springer.

- [34] Roeder, R. K. (2013). Mechanical Characterization of Biomaterials. *Characterization of Biomaterials*, 49–104. doi:10.1016/b978-0-12-415800-9.00003-6.
- [35] Dieter G.E., (1995), *Mechanical Metallurgy*, 4rd Edition, McGraw-Hill.
- [36] Will, J., Detsch, R., Boccaccini, A. R. (2013). Structural and Biological Characterization of Scaffolds. *Characterization of Biomaterials*, 299–310. doi:10.1016/b978-0-12-415800-9.00008-5.
- [37] Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M. D. (2014). Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(10), pdb.top071795–pdb.top071795. doi:10.1101/pdb.top071795.
- [38] Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence Staining. *Current Protocols in Cell Biology*, 4.3.1–4.3.7. doi:10.1002/0471143030.cb0403s69.
- [39] Moffat, K. L., Kwei, A. S.-P., Spalazzi, J. P., Doty, S. B., Levine, W. N., Lu, H. H. (2009). Novel Nanofiber-Based Scaffold for Rotator Cuff Repair and Augmentation. *Tissue Engineering Part A*, 15(1), 115–126. doi:10.1089/ten.tea.2008.0014
- [40] Yin, Z., Chen, X., Chen, J. L., Shen, W. L., Hieu Nguyen, T. M., Gao, L., Ouyang, H. W. (2010). The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials*, 31(8), 2163–2175. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.083
- [41] Kishore, V., Bullock, W., Sun, X., Van Dyke, W. S., Akkus, O. (2012). Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads. *Biomaterials*, 33(7), 2137–2144. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.066
- [42] Surrao, D. C., Fan, J. C. Y., Waldman, S. D., Amsden, B. G. (2012). A crimp-like microarchitecture improves tissue production in fibrous ligament scaffolds in response to mechanical stimuli. *Acta Biomaterialia*, 8(10), 3704–3713. doi:10.1016/j.actbio.2012.06.016.
- [43] Orr, S. B., Chainani, A., Hippensteel, K. J., Kishan, A., Gilchrist, C., Garrigues, N. W., ... Little, D. (2015). Aligned multilayered electrospun scaffolds for rotator cuff tendon tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 24, 117–126. doi:10.1016/j.actbio.2015.06.010.
- [44] Ulker, C., Gokalp, N., Guvenilir, Y. (2016). Enzymatic synthesis and characterization of polycaprolactone by using immobilized lipase onto a surface-modified renewable carrier. *Polish Journal of Chemical Technology*, 18(3), 134–140. doi:10.1515/pjct-2016-0060.

- [45] Gottlieb, H.E., Kotlyar, V. Nudelman, A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *Journal of Organic Chemistry* 62, 7512-7515. DOI: S0022-3263(97)01176-6.
- [46] Ranjit K. Roy, (2001), *Design of Experiments Using The Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process Improvement*, John Wiley Sons.
- [47] Guex, A.G.; Birrer, D.L.; Fortunato, G.; Tevaearai, H.T.; (2013), Giraud, M.-N. Anisotropically oriented electrospun matrices with an imprinted periodic micropattern: A new scaffold for engineered muscle constructs. *Biomed. Mater.* 8, 021001
- [48] Abarzúa-Illanes, P.N.; Padilla, C.; Ramos, A.; Isaacs, M.; Ramos-Grez, J.; (2017), Olgúin, H.C.; Valenzuela, L.M. Improving myoblast differentiation on electrospun poly(-caprolactone) scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 105, 2241–2251.
- [49] Jun, I.; Jeong, S.; Shin, H.; (2009) The stimulation of myoblast differentiation by electrically conductive sub-micron fibers. *Biomaterials*, 30, 2038–2047.
- [50] Wang, L.; Wu, Y.; Guo, B.; Ma, P.X.; (2015), Nanofiber Yarn/Hydrogel Core-Shell Scaffolds Mimicking Native Skeletal Muscle Tissue for Guiding 3D Myoblast Alignment, Elongation, and Differentiation. *ACS Nano*, 9, 9167–9179.
- [51] Cha, S.H.; Lee, H.J.; Koh, W.-G.; (2017), Study of myoblast differentiation using multi-dimensional scaffolds consisting of nano and micropatterns. *Biomater. Res.*, 21, 1.
- [52] McKeon-Fischer, K.D.; Flagg, D.H.; Freeman, J.W.; (2011), Poly(acrylic acid)/poly(vinyl alcohol) compositions coaxially electrospun with poly(-caprolactone) and multi-walled carbon nanotubes to create nanoactuating scaffolds. *Polymer*, 52, 4736–4743.
- [53] Li, W.-J.; Mauck, R.L.; Cooper, J.A.; Yuan, X.; Tuan, R.S.; (2007), Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomech.*, 40, 1686–1693.
- [54] Bosworth, L.A.; Rathbone, S.R.; Bradley, R.S.; Cartmell, S.H.; (2014), Dynamic loading of electrospun yarns guides mesenchymal stem cells towards a tendon lineage. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 39, 175–183.

- [55] Choi, J.S.; Lee, S.J.; Christ, G.J.; Atala, A.; Yoo, J.J.; (2008), The influence of electrospun aligned poly(caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials*, 29, 2899–2906.
- [56] Duque Sánchez L, Rodriguez L, López M, (2013), Electrospinning: la era de las nanofibras, *Revista Iberoamericana de polímeros*.
- [57] Mina J, Otero S, Bolaños C, Toro E, Preparación y caracterización fisico-química y térmica de mezclas binarias de resina mopa-mopa (*Elaegia Pastonoensis* Mora) y policaprolactona, *Rev. LatinAm.Metal.Mat*.
- [58] Zhou, Y., Hu, Z., Du, D., Tan, G. Z. (2018). The effects of collector geometry on the internal structure of the 3D nanofiber scaffold fabricated by divergent electrospinning. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*. doi:10.1007/s00170-018-2899-4
- [59] Consulta de internet <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-prepare-your-specimen>
- [60] Mouw, J. K., Ou, G., Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 771–785. doi:10.1038/nrm3902
- [61] Bittiger, H., Marchessault, R. H., Niegisch, W. D. (1970). Crystal structure of poly--caprolactone. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 26(12), 1923–1927. doi:10.1107/s0567740870005198
- [62] Lim, K. Y., Kim, B. C., Yoon, K. J. (2002). The Effect of Molecular Weight of Polycaprolactone on the Ester Interchange Reactions during Melt Blending with Poly(ethylene terephthalate). *Polymer Journal*, 34(5), 313–319. doi:10.1295/polymj.34.313
- [63] Gupta, B. S., Moghe, A. K. (2013). Nanofiber structures for medical biotextiles. *Biotextiles as Medical Implants*, 48–90. doi:10.1533/9780857095602.1.48
- [64] Rose, J., Pacelli, S., Haj, A., Dua, H., Hopkinson, A., White, L., Rose, F. (2014). Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering. *Materials*, 7(4), 3106–3135. doi:10.3390/ma7043106
- [65] Gautam, S., Dinda, A. K., Mishra, N. C. (2013). Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by

- electrospinning method. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1228–1235. doi:10.1016/j.msec.2012.12.015
- [66] Dulnik, J., Kołbuk, D., Denis, P., Sajkiewicz, P. (2018). The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres. *European Polymer Journal*, 104, 147–156. doi:10.1016/j.eurpolymj.2018.05.010
- [67] Gómez Pachón, Edwin Yesid, (2013), Estudio teórico-experimental de las propiedades elásticas de nanofibras poliméricas, Doctorado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, UNAM.
- [68] Carletti, E., Motta, A., Migliaresi, C. (2010). Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. *3D Cell Culture*, 17–39. doi:10.1007/978-1-60761-984-0₂
- [69] Nezarati, R. M., Eifert, M. B., Cosgriff-Hernandez, E. (2013). Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(10), 810–819. doi:10.1089/ten.tec.2012.0671
- [70] Breuls, R. G. M., Jiya, T. U., Smit, T. H. (2008). Scaffold Stiffness Influences Cell Behavior: Opportunities for Skeletal Tissue Engineering. *The Open Orthopaedics Journal*, 2(1), 103–109. doi:10.2174/1874325000802010103
- [71] Discher, D. E. (2005). Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science*, 310(5751), 1139–1143. doi:10.1126/science.1116995
- [72] Cameron, R. E., Kamvari-Moghaddam, A. (2012). Synthetic bioresorbable polymers. *Durability and Reliability of Medical Polymers*, 96–118. doi:10.1533/9780857096517.1.96
- [73] Bahareh Azimi et al. (2014). Poly (epsilon-caprolactone) Fiber: An Overview, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, Volume 9.
- [74] Pelipenko, J., Kristl, J., Janković, B., Baumgartner, S., Kocbek, P. (2013). The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(1), 125–134. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.078
- [75] Yang, G.-Z., Li, H.-P., Yang, J.-H., Wan, J., Yu, D.-G. (2017). Influence of Working Temperature on The Formation of Electrospun Polymer Nanofibers. *Nanoscale Research Letters*, 12(1). doi:10.1186/s11671-016-1824-8

- [76] Ren, K., Wang, Y., Sun, T., Yue, W., Zhang, H. (2017). Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 324–332. doi:10.1016/j.msec.2017.04.084
- [77] Ramalingam, R., Dhand, C., Leung, C., Ezhilarasu, H., Prasannan, P., Ong, S., ... Arunachalam, K. (2019). Poly--Caprolactone/Gelatin Hybrid Electrospun Composite Nanofibrous Mats Containing Ultrasound Assisted Herbal Extract: Antimicrobial and Cell Proliferation Study. *Nanomaterials*, 9(3), 462. doi:10.3390/nano9030462
- [78] Guo, Z., Xu, J., Ding, S., Li, H., Zhou, C., Li, L. (2015). In vitro evaluation of random and aligned polycaprolactone/gelatin fibers via electrospinning for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 26(15), 989–1001. doi:10.1080/09205063.2015.1065598
- [79] Sheng, D., Li, J., Ai, C., Ying, T., Liu, X., Cai, J., ... Chen, S. (2019). Electrospun PCL/Gel aligned scaffolds enhance the biomechanical strength in tendon repair. *Journal of Materials Chemistry B*. doi:10.1039/c9tb00837c
- [80] Fee, T., Surianarayanan, S., Downs, C., Zhou, Y., Berry, J. (2016). Nanofiber Alignment Regulates NIH3T3 Cell Orientation and Cytoskeletal Gene Expression on Electrospun PCL+Gelatin Nanofibers. *PLOS ONE*, 11(5), e0154806. doi:10.1371/journal.pone.0154806
- [81] Ferrari, Cirisano, Morán. (2019). Mammalian Cell Behavior on Hydrophobic Substrates: Influence of Surface Properties. *Colloids and Interfaces*, 3(2), 48. doi:10.3390/colloids3020048
- [82] Kontomaris, S.-V. (2018). The Hertz Model in AFM Nanoindentation Experiments: Applications in Biological Samples and Biomaterials. *Micro and Nanosystems*, 10(1), 11–22. doi:10.2174/1876402910666180426114700
- [83] Qian, L., Zhao, H. (2018). Nanoindentation of Soft Biological Materials. *Micromachines*, 9(12), 654. doi:10.3390/mi9120654
- [84] Paul Ducheyne, Kevin Healy, et al; (2015), *Comprehensive Biomaterials*, Vol 1, Elsevier.
- [85] McGrath, J. L. (2007). Cell Spreading: The Power to Simplify. *Current Biology*, 17(10), R357–R358. doi:10.1016/j.cub.2007.03.057

- [86] Miranda Buendia E., (2017), Andamios de poli(ácido láctico)/gelatina electrohilados en colector rotatorio no plano, para el crecimiento de células madre mesenquimales obtenidas de orina, Tesis de maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales.
- [87] Silva S, Bandeira F, Sidney A, Pinto A, (2014), Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia, LWT-Food Science and Technology.
- [88] Kajornsak Chuaynukul, Thummanoon Prodpran, Soottawat Benjakul, (2014), Preparation, thermal properties and characteristics of gelatin molding compound resin, India: RJCES, Vol 2.
- [89] Indraneil Mukherjee, MaryAnn Rosolen, (2013), Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry volume 114.
- [90] Wang, C., Chowdhury, S., Driscoll, M., Parent, C. A., Gupta, S. K., Losert, W. (2014). The interplay of cell-cell and cell-substrate adhesion in collective cell