



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE UN POLÍMERO CON BASE EN
QUITOSANO PARA EL DESARROLLO DE UN SUSTITUTO BIOLÓGICO
DÉRMICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NADIA ADRIANA VÁZQUEZ TORRES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2014.



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de marzo de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **VÁZQUEZ TORRES NADIA ADRIANA** con número de cuenta **407047468** con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE UN POLÍMERO CON BASE EN QUITOSANO PARA EL DESARROLLO DE UN SUSTITUTO BIOLÓGICO DÉRMICO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ**:

Presidente: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
Vocal: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Secretario: DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO
Suplente: DR. DAVID GARCADIIEGO CÁZARES
Suplente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de mayo de 2014



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la oportunidad que se me brindó al poder realizar mis estudios dentro de su programa y seguir preparándome y forjándome como lo he venido haciendo desde la licenciatura en esta gran universidad. También financiamiento PAEP con el cual me fue posible la asistencia a congresos para retroalimentarme y difundir el trabajo que se realizó en otros foros.

A CONACYT, por la beca que me otorgó durante estos cuatro semestres y la cual represento una ayuda importante durante este tiempo.

Al proyecto CONACYT Sectoriales SALUD 2011-01-161687.

Al ICyTDF, No. De Proyecto PICS0 12-152

A los miembros del Comité Tutorial:

A la Dra. Velasquillo, quien me ha incitado a crecer profesionalmente y quien me ha brindado los medios para poder realizar este trabajo permitiéndome ser parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Castell que desde que lo conozco me ha dado su apoyo incondicional y de quien he aprendido no sólo conocimientos sino grandes lecciones de vida.

A la Dra. Rivas, por su exigencia, sugerencias, asesorías durante estos años, pero sobre todo, por sus revisiones en cada tutorial.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, que con él, todo y sin él, nada...

A mis padres quienes bajo cualquier circunstancia han estado conmigo, siempre apoyándome y dándome lo mejor de ellos. Agradezco todos sus sacrificios y preocupaciones, sus enseñanzas y toda la fuerza que me han dado para seguir aquí, que aunque lejos, en la distancia ustedes han sido mi principal motivación para hoy poder brindarles un logro más.

A Chío, mi hermano, por sus consejos, su cariño y su ejemplo. A mis sobrinitos Ludri y Sofi, que aunque resentían el tiempo ausente de juego con ellos, me trataban de dar espacio para hacer mis tareas. A Edith que me prestó sus libros durante la Maestría.

A David, que vivió los momentos más estresantes de mi vida académica y sin embargo siempre me respondió con paciencia y amor dándome ánimo para seguir adelante.

A los miembros de mi Jurado: Dra. Piña, Dra. Fortoul, Dra. Rivas, Dr. Garcidiego y Dr. Castell, quienes se dieron el tiempo de leer este trabajo, enriquecerlo y evaluarlo.

A la Dra. Keiko Shirai por apoyarme con los copolímeros de Quitosano y haberme abierto las puertas del laboratorio que dirige en la UAM Iztapalapa. Al M. en C. Andrés Espadín por su ayuda en la síntesis y caracterización de las películas, así como la disponibilidad para resolver todas mis interrogantes.

Al Dr. Antonio Medina del INP, por todas las facilidades para la donación de los prepucios. A su asistente Claudia Ramírez, quien hizo más rápida la entrega de las biopsias.

A la Dra. Ana Rodríguez Hernández, que más que una profesora durante la maestría, fue para mí una importante asesora, guía y amiga.

A mis compañeros de laboratorio, a M. en C. Lenin Tamay que se pasó las horas en el Confocal, a la M. en C. Lilia Solis que reviso mil muestras en el MEB. Al Dr. Roberto Sánchez y el M. en C. Yaaziel Melgarejo que con su experiencia siempre tuvieron una respuesta o un consejo en las técnicas que estuve trabajando. Al Dr. David Garciadiego quien me asesoró en las inmunofluorescencias, así como la a la Biol. Angélica Retana quien me instruyó en esta técnica. A la Ing. Karina Martínez que cada mañana me surtía mis listas de materiales y reactivos. Al Biól. Valentín Martínez por todos sus consejos y apoyo en mi estancia en el INR. A QFB Karla Porras por la ayuda en la edición y revisión de los resúmenes y a la Lic. Eréndira Mejía por todas las facilidades dentro del Laboratorio de Biotecnología. A la Históloga Bertha Vargas por la asesoría en el montaje, corte y tinción de las biopsias, al igual que la Biól. Julieta García por el apoyo en las tinciones histológicas. A la Biól. Carmina Ortega por su disposición para el abastecimiento de N_2 , su apoyo y consejos. A la Dra Phaedra Silva por sus revisiones.

A mis tíos, prim@s, seres queridos, amig@s (Karla, Guadalupe, Paulina, Minerva, Abril, Anabel, Fátima, Susette, Edgar) todos aquellos, que con un aprecio franco tuvieron la atención de preguntar cómo iba en la Maestría y estuvieron al pendiente de mí con una palabra de aliento, un abrazo sincero o una sonrisa que motivará a seguir poniendo empeño en mi formación.

“No hay deber más urgente que el de saber ser agradecido” (James Allen)

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado para mis padres y hermano. A la Sra. Teresa Torres Vázquez y el Sr. Lucio Vázquez Quintana, que me recibieron cada viernes con gran alegría y cada domingo me despidieron con gran fortaleza durante 7 años. Gracias por darme las armas para ser alguien en la vida y brindarme con su apoyo, el legado más valioso: mi Educación.

Padres no puedo más que ofrecerles el fruto de otra etapa académica más, como lo es la maestría y recuerden que :

“EL SABER DE SUS HIJOS HARÁ SU GRANDEZA”

A mi hermano Lucio Vázquez que ha sido mi ejemplo de guerrero, pese a las adversidades que la vida conlleva siempre ha salido adelante, es un hombre sabio que tiene todo mi respeto y admiración. Para ti, el mejor manito, que en la medida que te ha sido posible, has estado tras de mí apoyándome.

“ Trabaja no para un aplauso,

sino para una causa

Vive tu vida para expresar,

no para impresionar

No te esfuerces por hacer notar tu presencia,

Sino para se note tu ausencia”

(Anónimo).

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
PIEL	5
Funciones de la piel	6
Epidermis	6
Dermis.....	8
Lesiones de la piel	14
INGENIERÍA DE TEJIDOS	16
Sustitutos cutáneos desarrollados mediante ingeniería de tejidos.....	17
Andamios o “scaffolds”	18
QUITOSANO (Qui)	20
Obtención de quitina y quitosano.....	21
Características y propiedades del quitosano.....	22
El quitosano como biomaterial en la Ingeniería de tejidos de piel.....	23
ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA).....	25
Isómeros.....	25
Características y propiedades	25
Aplicaciones Biomédicas	26
ANTECEDENTES	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
General:.....	29
Específicos:.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Obtención y manejo de las biopsias	30

<i>Películas de Quitosano- PLA</i>	31
<i>Pruebas biológicas</i>	33
RESULTADOS.....	36
<i>Aislamiento de fibroblastos por digestión con colagenasa</i>	36
<i>Expansión de fibroblastos para su sembrado en los copolímeros de Qui-PLA</i>	37
<i>Cultivo de fibroblastos en el copolímero de Qui-PLA</i>	38
<i>La formación de agregados celulares se presentó desde el primer día de cultivo independientemente del tipo de siembra</i>	40
<i>Viabilidad celular</i>	42
<i>Adhesión celular</i>	57
<i>Proliferación celular</i>	60
<i>Síntesis de proteínas</i>	63
<i>Niveles de expresión celular</i>	65
<i>Cultivo de fibroblastos humanos sobre películas de Qui-PLA con base en quitosano comercial por obtención netamente química</i>	66
DISCUSIÓN.....	68
CONCLUSIONES.....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

1. Estratos y componentes celulares de la piel.
2. Estructura química de quitina y quitosano
3. Obtención de quitina y quitosano
4. Aplicaciones del quitosano
5. Estructura química del Ácido Poliláctico
6. Aplicaciones del Ácido Poliláctico
7. Separación dermoepidérmica con dispasa
8. Morfología fusiforme típica de fibroblastos en cultivo.
9. Modificación de tamaño y forma de películas de Qui-PLA.
10. Cultivo de fibroblastos sobre copolímeros de Qui-PLA.
11. Viabilidad de fibroblastos a 5 días de cultivo en copolímeros Qui-APL lote 1, posterior a lavados con medio neutro y PBS.
12. Viabilidad de fibroblastos a 5 días de cultivo en copolímeros Qui-APL lote 1, posterior su neutralización con lavados alcalinos.
13. Viabilidad de fibroblastos a 5 días de cultivo en copolímeros Qui-APL lote 2, purificados con acetona.
14. Viabilidad y análisis de MEB de fibroblastos a 5 días de cultivo sobre los copolímeros del lote 2, purificados y lijados.
15. Viabilidad de fibroblastos a 5 días de cultivo en copolímeros sublote C y D lijados pero no purificados.
16. Viabilidad de fibroblastos a 5, 10 y 15 días de cultivo en copolímero C del lote 3, purificados y lijados.
17. Viabilidad a los 2 días de cultivo para fibroblastos provenientes de 5 pacientes sembrados sobre copolímero C.
18. Viabilidad a los 4 días de cultivo para fibroblastos provenientes de 5 pacientes sembrados sobre copolímero C.
19. Viabilidad a los 6 días de cultivo para fibroblastos provenientes de 5 pacientes sembrados sobre copolímero C.
20. Viabilidad a los 8 días de cultivo para fibroblastos provenientes de 5 pacientes sembrados sobre copolímero C.
21. Viabilidad de fibroblastos de los pacientes A-E sobre placas de cultivo a los 2 días de cultivo.
22. Viabilidad de fibroblastos a los 30 días de cultivo en copolímero C.
23. Viabilidad de fibroblastos a los 2, 4, 6 y 8 días de cultivo en copolímero C del lote 4 sin lijar.
24. Adhesión celular a 5 días de cultivo en copolímeros purificados del lote 2.
25. Adhesión celular sublotes C y D, lote 1

26. Adhesión celular a 5, 10 y 15 días de cultivo copolímero C del lote 3.
27. Controles negativos de adhesión, a los 2 y 8 días de cultivo.
28. Adhesión celular a los 2 y 8 días de cultivo sobre copolímero C. Inmunofluorescencia contra FAK.
29. Adhesión celular a días 2, 4, 6 y 8 en el copolímero C lote 4.
30. Proliferación de fibroblastos a los 5 días de cultivo en el copolímero C lote 3.
31. Proliferación a 5 días de cultivo en copolímero C lote 4.
32. Proliferación a 5 días de cultivo de fibroblastos sembrados en placa mutipozo.
33. Presencia de colágena y elastina en cortes de piel.
34. Síntesis de procolágena y tropoelastina en fibroblastos de 13 días de cultivo en copolímero C lote 3.
35. Síntesis de procolágena y tropoelastina en fibroblastos agregados a 2 días de cultivo en copolímero C.
36. Síntesis de procolágena y tropoelastina en fibroblastos a 13 días de cultivo en copolímero C lote 4.
37. Niveles de expresión para los genes de pro colágena, elastina y fibrilina a los 8 días de cultivo de fibroblastos sobre placa y sobre copolímero C.
38. Viabilidad de fibroblastos a los 2 (A), 4 (B), 6(C) Y 15 días (D) sembrados en el copolímero C Qui- PLA elaborado con quitosano químico comercial.

LISTA DE TABLAS

1. Principales funciones de piel
2. Clasificación de sustitutos dérmicos
3. Andamios con base en quitosano aplicados en la Ingeniería de Tejidos.
4. Lotes de copolímeros de Qui-PLA
5. Condiciones de lavado para neutralizar los copolímeros de Qui-PLA
6. Tipos de siembra
7. Rendimiento celular y porcentajes de viabilidad de los fibroblastos aislados.
8. Características físicas y químicas del primer lote de Copolímeros Qui-PLA, sublotos A, B, C y D.
9. Características físicas y químicas del segundo lote de Copolímeros de Qui-PLA sublotos A, B, C, D.

RESUMEN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y desempeña funciones de protección, regulación de temperatura, recepción de sensaciones, excreción entre otras. Sin embargo, cuando la piel llega a lesionarse, su funcionalidad se ve comprometida y de acuerdo a la profundidad y extensión de la herida puede ponerse en riesgo hasta la vida. Las lesiones más frecuentes de la piel, son causadas por quemaduras, las cuales requieren de un tratamiento que no siempre está al alcance de población afectada. La Ingeniería de Tejidos combina andamios y células que pueden favorecer la regeneración tisular de estas lesiones. Por lo que es fundamental el diseño de andamios que cumplan con las características necesarias para alcanzar dicho fin. El Quitosano (Qui) y el Ácido Poliláctico (PLA) son materiales biocompatibles y biodegradables, ambos con aplicaciones biomédicas.

Los andamios de quitosano reportados son sintetizados a partir de su obtención netamente química, mientras que en este estudio se propone emplear películas de quitosano obtenido por un método biológico-químico. El objetivo de este trabajo es determinar la biocompatibilidad de un copolímero (Quitosano-PLA) para el desarrollo de un sustituto biológico dérmico y su potencial uso en el tratamiento de quemaduras.

Los fibroblastos se obtuvieron de prepucios provenientes del INP con consentimiento informado. Los andamios fueron sintetizados por la UAM y se probaron 5 lotes. Se estandarizó el cultivo de los fibroblastos. Los fibroblastos se sembraron sobre las películas de Qui-PLA y se cultivaron con DMEM/F12 suplementado a 37 °C y 5% de CO₂ a diferentes tiempos. La viabilidad fue probada por ensayos de Calceína y Homodímero de etidio, mientras que la proliferación celular se evaluó mediante inmunofluorescencia contra Ki67. La adhesión celular con Microscopia de Barrido e inmunofluorescencia contra FAK. Para evidenciar la síntesis de tropoelastina y colágena en los fibroblastos, se realizaron inmunofluorescencias contra estas proteínas. Los niveles de expresión de tropoelastina, procolágena I y fibrilina se evaluaron a través PCR-tiempo real.

Se aislaron en promedio 1.96×10^6 fibroblastos por cm², con un promedio de viabilidad celular del 91%. La viabilidad de los fibroblastos sembrados sobre los primeros lotes de las películas de quitosano mantenidos *in vitro* por 5 días, fue de 35% con una morfología redonda. Por lo que se procedió a estandarizar el lavado de estos materiales con el objetivo de neutralizar su acidez. Para ello se purificaron las películas con acetona para eliminar el exceso de PLA y se realizaron lavados alcalinos para neutralizar el pH. Se encontró que la viabilidad de los fibroblastos sembrados en las películas de quitosano aumentó a 80%, sin embargo, la morfología se observó redonda.

Con el fin de promover la adhesión celular a las películas se procedió a lijarlas, encontrándose una morfología extendida típica de los fibroblastos después de los 5 días de cultivo. El mayor porcentaje de viabilidad que fue mayor al 85% a 5 días de cultivo, morfología alargada típica de los fibroblastos y confluencia después de 15 días, fue

observado en el copolímero C, estando éste purificado con acetona, lavado con medio alcalino y lijado.

También se obtuvo dicha morfología típica en otro lote de copolímero C sin lijar y además con una confluencia del 90% a los 8 días de cultivo. Una vez establecido que las células se mantenían viables y alargadas se procedió a evaluar la síntesis de proteínas de matriz. Lo que se observó fue que, los fibroblastos sembrados en el copolímero C proliferaron (Ki67, positivos) y sintetizaron Tropoelastina y Procolágena I. Por otro lado los análisis de MEB e inmunofluorescencia contra FAK evidenciaron la adhesión de los fibroblastos al copolímero. Adicionalmente mediante PCR tiempo real se evaluó la expresión a nivel de mensajero para Tropoelastina y procolágena I y fibrilina encontrándose que no hubo diferencia significativa entre los fibroblastos sembrados en los copolímeros C y los sembrados en placa. Las películas a base de quitosano biológico-químico mostraron mayor viabilidad con respecto a las elaboradas con quitosano comercial obtenido químicamente.

La acidez de las películas se debió al porcentaje de incorporación de PLA, el copolímero C fue el que menor PLA presentó y por lo tanto mayor viabilidad y adhesión. La biocompatibilidad de los copolímeros estuvo relacionada con la hidrofobicidad, carga y topografía de las superficies de los copolímeros. La neutralización de las películas así como su lijado mejoraron la biocompatibilidad del biomaterial. La obtención del quitosano, su peso molecular y el grado de desacetilación también influyeron en la viabilidad de los fibroblastos sembrados sobre las películas.

De acuerdo a lo obtenido, los fibroblastos aislados de prepucio y cultivados en el copolímero de Qui-PLA fueron viables, proliferaron, se adhirieron al biomaterial y sintetizaron proteínas de matriz, por lo que se demuestra que este material es biocompatible y tiene gran potencial para usarse como sustituto biológico dérmico.

ABSTRACT

Skin is the body's largest organ and performs protection functions, temperature regulation, excretion, among others. However, some injuries can affect severely the integrity of the skin and according of extent and depth endanger life. The most common injuries are burns that require a special and available treatment for affected population. Tissue Engineering is an alternative that aim the tissue regeneration in skin lesions when combines scaffolds and cells. The scaffolds design is essential to fulfill the necessary features to produce it, as well the selection of promising materials, such as Chitosan (CTS) and Polylactic Acid (PLA), both biocompatible and biodegradable and with biomedical applications.

Chitosan based scaffolds are obtained by chemical extractions while in our research we proposed biological-chemical extraction. Our goal was to determine biocompatibility of a scaffold based on CTS-PLA, seeded with human fibroblasts for the development of a biological dermal substitute and its potential use in burns treatment.

Human foreskin fibroblasts were obtained from children with informed consent at Pediatric National Institute. Chitosan was obtained from lactic acid bacteria fermentation of shrimp wastes and direct grafting of lactic acid onto the chitosan by UAM, Iztapalapa. Cells were seeded on CTS-PLA films and cultured under standard conditions. Cell viability was evaluated using calcein and ethidium probe. Cell proliferation and functionality was evaluated by immunofluorescent staining of Ki67 and elastin/collagen I, respectively. The samples were observed with a Confocal Microscope. Collagen and elastin levels expression were evaluated by real time PCR and cell attachment was analyzed with a Scanning Electron Microscopy (SEM) and immunofluorescent staining of FAK.

The average isolation was 1.96×10^6 fibroblasts by cm^2 with an average viability of 91%. Fibroblasts viability onto first batches of films (A-D) was 35% and they showed round morphology. Films were washed with alkaline medium for increasing its pH and purified with acetone for eliminate PLA excess. When films were neutralized, fibroblast viability increased to 80%, however, the fibroblasts were round shape.

In order to promote cell adhesion to films, these were ground, this allowed fibroblast lead typical morphology after 5 days of culture. The highest viability was 85% at 5 days of culture. In C copolymer was obtained typical morphology of fibroblasts and total confluence after 15 culture days, when it was purified, washed with alkali solution and ground.

Other batch of C film, allowed that, without grinding, the confluence was 90% at 8 culture days and their morphology was elongated. Fibroblast seeded onto copolymer C showed proliferation and synthesis of procollagen and tropoelastin. SEM analysis demonstrated cell attachment to films and adhesion by FAK staining. By the way, expression levels of collagen I and elastin of fibroblast onto films and in vitro culture were not significant

differences. Film based on CTS biological-chemical showed higher viability than those elaborated with chemical commercial CTS.

Low pH of films were due to incorporation percent of PLA, so low PLA incorporation enhanced cell viability. Copolymers biocompatibility was related to surfaces hydrophobicity, electric charge and topography of material. Increase pH and grind of them, improved their biocompatibility. Chitosan extraction, its molecular weight and deacetylation degree influenced also fibroblast viability seeded onto copolymers.

According to the results, fibroblasts isolated of foreskin and seeded onto CTS-PLA film, they were viable, showed proliferation, synthesis of proteins and cell adhesion, so suggested that there copolymers are biocompatible and have a great potential for its use as dermal substitute,

INTRODUCCIÓN

PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano que representa el 16% del peso corporal (Gartner *et al*, 2002), se encuentra integrada por células, tejidos y proteínas de la matriz extracelular que controlan una variedad de funciones. La piel se constituye básicamente de tres capas: la más externa, la epidermis; una capa de tejido conjuntivo, la dermis; y finalmente la más interna, la hipodermis, constituida por tejido adiposo (Fig. 1).

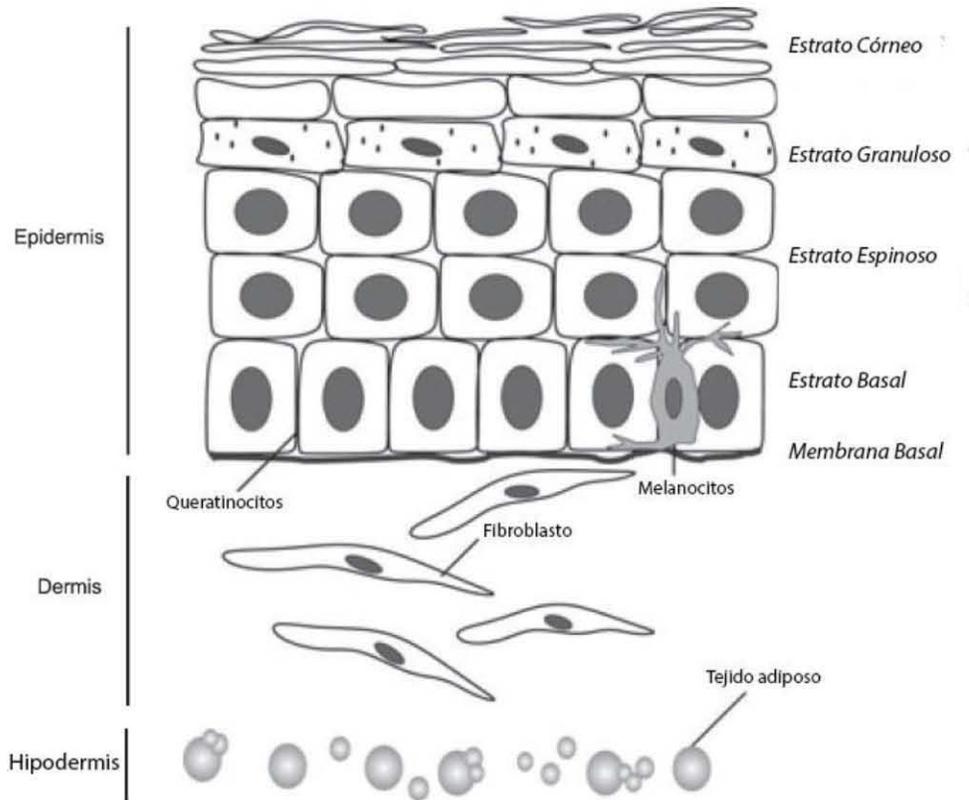


Figura 1. Esquema de los estratos que conforman la piel, así como sus componentes celulares. (Modificado de Brohem *et al*, 2010).

La piel puede clasificarse en piel gruesa y piel delgada. El primer tipo de piel recubre palmas y plantas. Su epidermis se caracteriza por la presencia bien definida de los cinco estratos que la constituyen (basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo). La piel gruesa carece de folículos pilosos y glándulas sebáceas, pero posee abundantes glándulas sudoríparas ecrinas. La piel delgada, por su parte, recubre el resto del cuerpo. Su epidermis, a diferencia de la piel gruesa, tiene un estrato córneo delgado, carece de estrato lúcido y su estrato granuloso es poco aparente (Gartner *et al*, 2002). La piel delgada tiene folículos pilosos, músculos erectores del pelo, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas (Welsch *et al*, 2008).

Funciones de la piel

La piel realiza una gran variedad de funciones, entre ellas, proteger del medio ambiente y al mismo tiempo permitir la interacción de ésta con su medio exterior, así, es más que sólo una barrera impenetrable contra posibles agresiones externas (Chu *et al*, 2005). Además de ser una barrera física de impermeabilidad y proporcionar un recubrimiento para la totalidad de la superficie, también participa en el mantenimiento de la homeostasis, protección contra lesiones, invasión bacteriana y desecación; regulación de temperatura corporal; recepción de sensaciones continuas del ambiente (tacto, temperatura y dolor); excreción y secreción por glándulas sudoríparas; y absorción de la radiación ultravioleta (UV) del sol para la síntesis de vitamina D (Lloyd y Patel, 2008). Las principales funciones y los procesos en que está involucrada, se enlistan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Principales funciones de la piel

Función	Proceso
Barrera	Control de las pérdidas de agua, electrolitos, etc. Protección frente a agentes físicos, químicos y biológicos.
Percepción	Calor, frío, dolor, presión.
Regulación de la temperatura	Aislamiento, variación del flujo sanguíneo, sudoración
Secreción, excreción	Función glandular Pérdida percutánea de líquidos
Síntesis	Vitamina D, queratina y melanina
Inmunológica	Vigilancia Y respuesta

Epidermis

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado en constante renovación que se cornifica. Embriológicamente proviene del ectodermo, capa germinal de la cual también se originan estructuras epiteliales, como pelo, uñas y glándulas (Gilbert, 2005). Esta capa de la piel está compuesta de cuatro poblaciones de células:

- Queratinocitos (85%)
- Melanocitos (5%)
- Células de Langerhans (2-4%)
- Células de Merkel (3-5%)

Capas de la epidermis

Debido a que los queratinocitos siguen un proceso cíclico, de proliferación, diferenciación, muerte y desprendimiento, es posible distinguir varios estratos en la epidermis

Estrato basal

Es la capa más profunda de la epidermis, subyacente a este estrato se encuentra una membrana basal que delimita la epidermis de la dermis. El estrato basal está conformado por una organizada capa de células cuboidales a cilíndricas con un citoplasma basófilo y un

núcleo grande. Las células están unidas unas con otras a través de desmosomas y se enlazan a la membrana basal por hemidesmosomas. Los filamentos de queratina de las células basales se organizan en haces pequeños alrededor del núcleo y se conectan con los desmosomas y los hemidesmosomas. Los melanocitos se encuentran en esta capa basal (Navarrete, 2003).

Las células del estrato basal son las encargadas de la renovación celular de la epidermis. Cuando se forman nuevas células por mitosis, la capa previa de células empuja a las siguientes hacia la superficie con lo cual se agregan al estrato espinoso. Aunque el estrato basal es el sitio primario de las células epidérmicas con actividad mitótica, no todas las células basales presentan el mismo potencial proliferativo.

Estrato espinoso

Representa la capa más gruesa de la epidermis, la cual está compuesta por células poliédricas a aplanadas. Se le conoce como estrato espinoso, por la apariencia de espinas en la membrana plasmática en los cortes histológicos, que no son más que numerosos desmosomas, que permiten la adhesión de las células epidérmicas y la resistencia a los factores mecánicos. Las células espinosas suprabasales tienen forma poliédrica y núcleos esféricos. Las células más superficiales de la capa espinosa son más grandes y más aplanadas. Los queratinocitos localizados en el estrato espinoso cerca del estrato basal, también pueden tener actividad mitótica (Gartner et al, 2002).

Estrato granuloso

Consiste de tres a cinco capas de queratinocitos aplanados y es la capa más superficial de la epidermis en la que las células aún tienen núcleo. El citoplasma de estos queratinocitos contiene gránulos de queratohialina grandes, de forma irregular, gruesos y basófilos. Las células del estrato granuloso también contienen gránulos o cuerpos laminares que contienen lípidos diversos, como: esteroides de colesterol y ceramidas (Gartner et al, 2002). Estos cuerpos laminares se originan en el estrato espinoso, pero persisten hasta el estrato granuloso. El contenido de estos gránulos se libera mediante exocitosis al espacio extracelular y forman láminas de sustancia rica en lípidos que actúan como barrera impermeable. Esta capa impermeable impide que el líquido tisular y el agua del medio externo pasen a través del estrecho espacio intercelular. La importancia de estos lípidos se manifiesta en condiciones en las que la epidermis se ha destruido como en las quemaduras extensas, donde los pacientes tienen una gran pérdida de líquido tisular que conduce a una grave deshidratación.

Estrato lúcido

Es la capa delgada homogénea superficial al estrato granuloso. Esta capa de apariencia eosinófila sólo se reconoce en la piel gruesa y es una zona de transición entre las capas más profundas de células vivas y las células cornificadas superficiales muertas. Aunque las células aplanadas del estrato lúcido carecen de organelos y núcleo, contienen filamentos de queratina agrupados en forma densa, orientados en haces paralelos a la superficie de la piel junto con la proteína eleidina. La cara citoplasmática de la membrana plasmática de estas células tiene un aspecto engrosado producido por la adhesión de una serie de

proteínas como la involucrina, la transglutaminasa y la proteína rica en glicina que permiten la estabilidad de la membrana plasmática para que no se rompa justo cuando los procesos metabólicos de los queratinocitos han dejado de funcionar en una célula cuyo núcleo ha desaparecido (Chu *et al*, 2005).

Estrato córneo

La capa más superficial de la epidermis, es el estrato córneo, se compone de numerosas capas de células cornificadas, aplanadas y muertas. Estas células carecen de núcleos y organelos y están llenas de filamentos de queratina. En el estrato córneo las células pierden del 50 al 80% del agua. Las células en este estrato continúan unidas por desmosomas y se descaman en grupos o columnas.

El estrato córneo forma una barrera muy eficaz que protege al organismo de diferentes agentes lesivos presentes en el medio externo, por otro lado, ayuda al mantenimiento de la homeostasis del medio interno.

Dermis

La dermis es el tejido conjuntivo de la piel que se sitúa justo debajo de la epidermis y deriva del mesodermo. Esta capa está compuesta por colágena, glicosaminoglucanos y elastina entre otras proteínas de la matriz extracelular. El principal componente celular de la dermis, son los fibroblastos, aunque también se identifican células del sistema inmune, como: mastocitos, linfocitos y granulocitos que ingresan en la dermis en respuesta a diferentes estímulos. En esta misma capa de la piel se localizan vasos y nervios, además de los apéndices o anexos cutáneos (folículos pilosos, glándulas sudoríparas y sebáceas) derivados de la epidermis (Schulz *et al*, 2000). La dermis es el componente más grande de la piel y le confiere su flexibilidad, elasticidad y fuerza tensil. Protege al cuerpo de lesiones mecánicas, atrae líquido tisular, contribuye a la regulación térmica e incluye receptores de estímulos sensoriales (Welsch *et al*, 2008).

Capas de la dermis

La dermis está constituida, de afuera hacia adentro, por dos regiones: la papilar y la reticular, que pueden diferenciarse por la organización del tejido conjuntivo y la densidad celular. El límite entre la dermis papilar y la dermis reticular está definido por un plexo horizontal de vasos. Por otro lado, el límite profundo entre la dermis y la hipodermis es proporcionado por la transición de tejido conjuntivo a tejido adiposo.

Capa papilar de la dermis

La capa papilar es el estrato superficial de la dermis y está compuesto por tejido conjuntivo laxo cuyas fibras de colágena tipo I y III (fibras reticulares) y fibras elásticas están dispuestas en redes laxas. Se extiende desde la membrana basal donde descansa la epidermis hasta la dermis reticular. La dermis papilar contiene fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas y cebadas, en general presenta mayor cantidad de células con respecto a la reticular.

La capa papilar también posee numerosas asas capilares, que se extienden al límite de la epidermis y dermis. Estos capilares regulan la temperatura corporal y nutren a las células de la epidermis ya que ésta es avascular.

Capa reticular de la dermis

No existe un límite definido entre la capa papilar y la capa reticular de la dermis porque ambas capas se continúan una con la otra. De manera característica la capa reticular se compone de tejido conjuntivo denso, irregular, que muestra fibras de colágena tipo I gruesas, que están agrupadas densamente en haces grandes que se encuentran orientados en distintas direcciones. Con las fibras de colágena se entremezclan redes de fibras elásticas gruesas que aparecen con especial abundancia cerca de las glándulas sebáceas y sudoríparas. Los intersticios de la capa reticular están llenos de proteoglucanos, con abundancia de sulfato dermatán. Las células son más escasas en esta capa que en la papilar, pero pueden llegar a encontrarse fibroblastos, células cebadas, linfocitos, macrófagos y con frecuencia, células adiposas en las zonas más profundas de la capa reticular en los límites de la hipodermis.

Las glándulas sudoríparas y sebáceas así como los folículos pilosos derivados de la epidermis invaden la dermis durante la embriogénesis y ahí se localizan de manera permanente. También hay grupos de células musculares lisas en las regiones más profundas de la capa reticular en sitios particulares, como la piel del pene y el escroto, y la areola alrededor de los pezones. Las contracciones de estos grupos musculares arrugan la piel de estas regiones. Otras fibras de músculo liso, denominadas músculos erectores del pelo, se insertan en los folículos pilosos. Por otro lado, los músculos estriados de la cara permiten la expresión facial, la región anterior cuello y el cuero cabelludo se origina en la dermis reticular y se continúan hasta la papilar donde se insertan (Ross, 2010).

Hipodermis

Es la región subcutánea rica en el tejido adiposo localizada por debajo de la dermis. Los adipocitos derivados del mesénquima son las células más abundantes de la hipodermis. Están organizados en lóbulos limitados por tabiques de tejido conjuntivo fibroso. Los nervios, los vasos sanguíneos y linfáticos están localizados entre los tabiques y otorgan una rica inervación e irrigación a la región. Aunque la hipodermis este en estrecha continuidad con la dermis y sean regiones distintas anatómicamente, están bien integradas estructural y funcionalmente por redes nerviosas y vasculares. Los folículos pilosos en crecimiento activo penetran en la grasa subcutánea y las glándulas sudoríparas apocrinas y ecrinas suelen estar confinadas en esta capa profunda de la piel.

El tejido hipodérmico actúa como aislante del cuerpo, sirve como reservorio energético, actúa como amortiguador de la piel y permite su movilidad sobre las estructuras adyacentes (Chu *et al*, 2005).

FIBROBLASTOS: COMPONENTE CELULAR BÁSICO EN LA DERMIS

Los fibroblastos son células derivadas del mesénquima (Makpol *et al*, 2011) y el principal tipo celular que caracteriza a los tejidos conjuntivos. Ultraestructuralmente tienen un Retículo Endoplásmico (RE) prominente y Aparato de Golgi característico de células con una alta actividad sintética. Su morfología es fusiforme, en forma de huso o alargada. Entre sus principales funciones destacan la síntesis, degradación y remodelación de la matriz extracelular (MEC), por ejemplo secretan procolágena, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y factores de crecimiento (Benavides, 2008) además de estimular la interacción entre la epidermis y la dermis (Lanza, 2000).

Es uno de los tipos celulares más importantes y abundantes en el proceso de reparación de tejidos debido a que está presente en las etapas tempranas de una lesión, jugando un papel central en la regulación de la homeostasis de la colágena ya que se encargan de controlar la síntesis y degradación de ésta y de otras proteínas de la matriz extracelular, induciendo la remodelación y recambio de estas proteínas ya que son capaces de producir enzimas como proteasas y colagenasas. Además, estas células también sintetizan una variedad de proteínas reguladoras de la reparación de tejidos en heridas, incluyendo: interleucinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos (Naughton, 2000).

Los fibroblastos empleados para Ingeniería de Tejidos pueden ser: *autólogos* cuando provienen del propio paciente, o *alógenicos* cuando son de un donador. Los primeros tienen la ventaja de no correr riesgo de rechazo o la transmisión de algún virus, además de que se ha reportado que cuando son usados en sustitutos dérmicos han mostrado una mejor reparación de la dermis y mínima formación de cicatriz comparado con aquellos donde se utilizaron fibroblastos alógenicos. Sin embargo, los fibroblastos autólogos pueden representar un retraso en la elaboración del sustituto ya que a partir de su aislamiento se necesitan expandir para obtener los suficientes. En contraste, los fibroblastos alógenicos pueden ser obtenidos y criopreservados para su uso en cualquier momento.

Las características de fibroblastos en cultivo pueden verse influenciadas por el número de pasajes en los cultivos, edad del donador y sitio anatómico de donde provengan las células (Wong *et al*, 2007).

La respuesta de los fibroblastos a su microambiente, incluye: diferenciación, migración, proliferación y adhesión.

Los fibroblastos pueden diferenciarse a miofibroblastos dependiendo de la combinación de factores de crecimiento, citocinas, componentes de Matriz Extracelular (MEC) y estrés mecánico. Los miofibroblastos son células de origen mesenquimal que comparten características de fibroblasto y de células de músculo liso. El principal marcador del fenotipo miofibroblástico es la proteína α -SMA (actina de músculo liso). El Factor de Crecimiento Transformante β 1 (TGF- β 1) es necesario para la diferenciación a miofibroblasto (Tomasek *et al*, 2002). Otro regulador implicado en el cambio de fenotipo fibroblástico a miofibroblástico es la trombina (Darby y Hewitson, 2007). Los fibroblastos expresan receptores para citosinas, como: Factor de Crecimiento Derivado de

Plaquetas (PDGF), TGF- β 1 y Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), los cuales participan en su activación durante una lesión (Noronha *et al*, 1995).

La migración depende de la interacción de los fibroblastos con la Matriz Extracelular y de las señalizaciones que se activan con ésta. En el caso de heridas, la presencia de factores quimioattractantes como el TGF- β y citocinas proinflamatorias, atrae tanto a fibroblastos como leucocitos al sitio afectado (Kovacs y DiPietro, 1994).

Por otro lado, la proliferación puede ser estimulada por el PDGF mientras que el TGF- β 1 puede actuar como un inhibidor o como promotor de la misma, dependiendo de su concentración, cuando ésta es alta inhibe la proliferación y cuando es baja la promueve (Darby y Hewitson, 2007).

La adhesión está mediada por vías de señalización activadas por la unión de componentes de MEC (glicosaminoglucanos, fibronectina, laminina, colágena y vitronectina), con mecanoreceptores transmembranales llamados integrinas (Schlie-Wolter *et al*, 2013). Es de notar que la interacción célula-MEC influye no sólo en el proceso de adhesión celular, sino también en la morfología, proliferación y comunicación intercelular.

Los fibroblastos expresan las integrinas: α 1 β 1 y α 2 β 1 (receptores con unión a colágena), α 3 β 1 (con unión a laminina), α 5 β 1 (con unión a fibronectina) y el receptor para ácido hialurónico (CD44) (Mineur *et al*, 2005). Algunas proteínas como fibronectina y vitronectina presentan una región con la secuencia Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) que las integrinas reconocen para llevar a cabo la adhesión (Hirata *et al*, 2010).

La adhesión celular se realiza por diferentes pasos: 1) las células redondas tienen contacto con el sustrato e interactúan mediante sus receptores de membrana con los ligandos que pueda expresar las diferentes proteínas de la MEC. 2) Las células presentan una morfología extendida "spreading" debida a un rearrreglo en la organización del citoesqueleto que es originado por la señalización a partir de la unión ligando del MEC con el receptor. 3) La adhesión celular que involucra la presencia de complejos de adhesión focal y adhesiones focales (Couchman *et al*. 1983). Cuando las integrinas se unen a la MEC, la actina se polimeriza y sus filamentos se organizan como fibras de estrés, promoviendo que más integrinas se agrupen y activando las vías señalización. En estos complejos de adhesión focal participan diferentes moléculas, componentes estructurales de citoesqueleto, como: vinculina, talina, actina o tensina que participan en la estabilización de la unión; cinasas de tirosina, como: la Cinasa de Adhesión Focal (FAK), Fyn o Src, y moléculas adaptadoras como: paxilina, Cdc42 o Shc (Schlie-Wolter *et al*. 2013).

En el contexto de Ingeniería de Tejidos, cuando las células entran en contacto con un biomaterial, identifican la química de su superficie a través de las integrinas con el fin de encontrar sitios disponibles donde adherirse. Las células no adheridas tienden a presentar una morfología redonda mientras que las que lo están, se observan bien extendidas y con muchas fibras de estrés estableciendo adhesiones focales. Con respecto a la

percepción de la topografía, se ha descrito que los fibroblastos proyectan filopodios para reconocer el relieve y la dimensionalidad de la topografía (Dalby et al, 2004).

COLÁGENA

La colágena es la proteína extracelular más abundante de la dermis, y forma alrededor del 80% de la matriz extracelular. Representa el 70% de peso en seco en piel y es una proteína insoluble que se sintetiza en los fibroblastos y miofibroblastos. Estas fibras proporcionan fuerza y elasticidad, y también están relacionadas en la migración celular, adhesión y quimiotaxis. En los individuos adultos, la mayor parte de la colágena en la dermis está formada por fibras de tipo I (87%) que se alinean en haces compactos relativamente grandes y colágena III (10%) que forman redes laxas. La colágena de tipo IV y VII se encuentra en la membrana basal (Lloyd and Patel, 2008).

Se han identificado 29 tipos de colágena y aunque los integrantes de esta familia de proteínas son diferentes, sin embargo todas las moléculas de colágena están formadas por un trímero que consta de tres cadenas alfa envueltas entre sí formando una triple hélice. Cada cadena alfa tiene aproximadamente 1,000 residuos de aminoácidos, en donde cada tercer aminoácido hay una glicina y la mayoría de los aminoácidos restantes está compuesta de prolina, lisina, hidroxiprolina e hidroxilisina (Karp, 2003).

La síntesis de la colágena se lleva a cabo en el Retículo Endoplásmico Rugoso (RER) en donde los polirribosomas sintetizan largas cadenas pro- α (moléculas precursoras de la colágena llamadas preprocolágena), con propéptidos globulares grandes en los extremos amino terminal y carboxilo terminal que simultáneamente pasan a las cisternas de RER. Dentro de éstas sufren modificaciones postraduccionales, como:

- 1) La escisión de la secuencia amino terminal
- 2) La hidroxilación de residuos de prolina y lisina cuando los polipéptidos aún no se encuentran en la conformación helicoidal.
- 3) La glucosilación a algunos residuos de hidroxilisina y la adición de sacáridos N-ligados a las dos posiciones terminales.
- 4) La formación de la estructura globular en el extremo carboxi terminal para la mantener alineada la triple hélice de las cadenas α .
- 5) La formación (con inicio en el extremo carboxi terminal) de la triple hélice.
- 6) La formación de enlaces hidrógeno y disulfuro intracatenarios e intercatenarios para estabilizar las interacciones de los polipéptidos.
- 7) La estabilización de la molécula helicoidal a través de la unión con la chaperona hsp4-7. Dicha unión también contribuye a que se aglomeren los trímeros dentro de la célula. La molécula resultante ahora es denominada procolágena.

Las moléculas de procolágena pasan al Aparato de Golgi y comienzan a asociarse en conjuntos pequeños, para que posteriormente en vesículas sean secretadas y transportadas a la superficie celular.

Una vez fuera de la célula, la enzima procolágena peptidasa asociada a la membrana, corta los extremos no heicoidales de la molécula y convierte a la procolágena en colágena madura. Finalmente las moléculas de colágena se alinean para formar fibrillas de colágena (Ross, 2010).

La matriz extracelular es sujeta a remodelación mediante enzimas que degradan a la colágena, como: Metaloproteinasas (MMP), en el caso de la colágenas I y III, es la MMP-1 la encargada de fragmentarlas, así como algunos otros componentes de la matriz extracelular de la dermis (Pardo y Selman, 2006). Sin embargo, las MMP's también están altamente reguladas por los Inhibidores de Tejidos de Metaloproteasas, TIMPs (Pardo y Selman, 2012). El balance entre la síntesis de colágena y su degradación es importante por su implicación en el envejecimiento (Darby & Hewitson, 2007).

ELASTINA

Es el componente fundamental de la matriz de la fibra elástica y también es una proteína insoluble sintetizada por los fibroblastos. Es codificada por uno de los genes más grandes ya que posee 28 kilobases pero menos del 10% de éstas contiene la secuencia que codifica esta proteína.

Las fibras elásticas representan del 1 al 3% del peso seco de la dermis, son finas, muy ramificadas, onduladas, entrelazadas en estado de relajación. Se extienden cuando existe alguna tracción y son precisamente ellas las que proporcionan la elasticidad a la piel. Las fibras elásticas maduras están conformadas por un núcleo central amorfo (propriadamente la elastina) rodeado por una envoltura de microfibrillas de fibrilina, aunque algunas de ellas también están dentro del componente amorfo (Uitto, 2005).

La elastina es procesada a partir de una molécula secretada y soluble precursora de la elastina llamada tropoelastina, que es rica en aminoácidos hidrófobos, como la valina y la alanina. Entre cuatro residuos lisilo de la molécula de tropoelastina se forman uniones cruzadas intermoleculares covalentes de desmosina que le otorgan una estabilidad y una insolubilidad a la molécula (Kozel *et al*, 2006).

La elastina cuenta con unos 750 residuos de aminoácidos de longitud, al igual que la colágena, es rica en prolina y glicina pero no está glucosilada y presenta un bajo contenido en hidroxiprolina y carece de hidroxilisina. Además de los aminoácidos mencionados, contiene desmosina e isodesmosina que son exclusivos de esta proteína.

Las moléculas de elastina son secretadas al espacio extracelular y se ensamblan formando fibras elásticas próximas a la membrana plasmática, generalmente en zonas invaginadas de la superficie celular. Después de la secreción, las moléculas de elastina forman números puentes cruzados, dando lugar a una extensa red de filamentos y láminas. Dichos puentes se forman entre residuos de lisina, mediante el mismo proceso por el cual se sintetizan las moléculas de colágena (Alberts, 2002).

Lesiones de la piel

En las secciones anteriores, se describió cómo está conformada la piel, sus estratos y principales células, en un tejido íntegro y sano. No obstante es importante entender que la piel puede sufrir lesiones que comprometen en diversos grados su integridad y traen como consecuencia desde una discapacidad hasta la muerte. Dentro de las principales lesiones de piel se encuentran:

- Quemaduras
- Úlceras crónicas (por presión, varicosas o por diabetes),
- Traumas
- Enfermedades dermatológicas

De las anteriores, nos enfocaremos en las quemaduras, dada su incidencia y debido a que este tipo de lesiones son atendidas precisamente en el Centro Nacional de Investigación y Atención al Quemado (CENIAQ) del que forma parte el laboratorio de Biotecnología donde se desarrolló este proyecto.

Quemaduras

Las quemaduras son lesiones en la piel producidas por diversos agentes físicos, químicos, eléctricos, químicos y biológicos que provocan alteraciones variables desde el simple enrojecimiento hasta la destrucción total del tejido afectado y los adyacentes. Las consecuencias de una quemadura en el paciente son desde mayor vulnerabilidad a infecciones, alteración en el control de la temperatura, pérdida de líquidos corporales e incluso la muerte.

Existen diferentes clasificaciones de quemaduras, de acuerdo a su etiología o bien a su profundidad. A continuación se describe la más aceptada mundialmente, propuesta por Dupuyren y Boyer (Ruíz, 1947).

Primer grado: Aquella donde sólo se lesiona la capa más superficial de la piel, es decir, la epidermis. No hay pérdida de la continuidad de la piel. Se puede presentar por exposición prolongada al sol, rayos ultravioleta A (UV A) o tipo B (UV B) o por la exposición corta de una flama.

Segundo grado: Se lesiona toda la epidermis y la dermis, se suelen conservar células viables residentes de los anexos cutáneos que pueden servir como un reservorio para la regeneración del epitelio. Este tipo de quemaduras, por su profundidad pueden dividirse a su vez en:

Segundo grado superficial o de espesor parcial superficial: Afectan la epidermis y la dermis papilar. Son producidas por escaldaduras (exposición a líquidos calientes) o por exposición a flamas. Se caracterizan por la presencias de ampollas.

Segundo grado profundo: Involucran la epidermis y la capa profunda de la dermis reticular. Hay destrucción de fibras nerviosas.

Tercer grado: Son las más severas, afectando todas las capas de la piel, pudiendo afectar también músculo y hueso. Son producidas por escaldadura con tiempo prolongado de exposición y a temperaturas elevadas o bien por llamas, electricidad o por agentes químicos.

En los casos de quemaduras de primer grado, la epidermis es capaz de reepitelizar debido a que algunos de los queratinocitos mantienen su capacidad proliferativa, de esta manera son capaces de migrar desde los bordes de la quemadura hacia la lesión. Estas células pueden provenir de remanentes del estrato basal o bien de los anexos cutáneos. En las quemaduras de segundo grado superficiales, a pesar de que la epidermis y dermis papilar estén afectadas, se puede considerar a los anexos cutáneos como una fuente de células, ya que éstos en su parte apical cuentan con una población celular capaz de proliferar y puede ayudar en el proceso de reepitelización. Por su parte, los fibroblastos vecinos a la zona quemada, pueden migrar a la lesión y producir componentes de matriz extracelular, como fibronectina y colágena (Escámez, 2004). El gran reto está en las quemaduras de segundo grado profundas y las de tercer grado, en donde tanto epidermis y dermis prácticamente están ausentes y los anexos cutáneos son destruidos (Schulz, 2000).

Epidemiología

En México, las quemaduras representan un grave problema de salud pública. La Secretaría de Salud reporta anualmente un promedio de 115 mil casos de accidentes por quemaduras, y casi 13 mil hospitalizaciones relacionadas con esta causa.

Las alternativas para el tratamiento de las quemaduras graves son diversas, siendo el objetivo principal, en las quemaduras de segundo grado profundo y tercero, el reemplazo de la piel quemada por piel sana lo más rápidamente posible e idealmente con los mejores resultados estéticos y funcionales (Gómez y Palao, 2002).

Dentro de las estadísticas que se llevan a cabo en el Instituto Nacional de Rehabilitación y de acuerdo a su Unidad de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria, en el CENIAQ desde que abrió sus puertas en el 2011 hasta septiembre de 2013, se han registrado:

- 352 pacientes quemados, de los cuales predominan los varones.
- La mayoría de ellos infantes, en el rango de los 0 a los 5 años.
- La etiología principal de la quemadura es por fuego y escaldadura.
- El tipo de quemadura más frecuente es la de segundo grado mixto y las quemaduras de segundo y tercer grado.
- Más del 80% de los pacientes afectados son de bajos recursos económicos.

Tratamiento

Entre los tratamientos más socorridos para las quemaduras pueden considerarse a los injertos de piel, que de acuerdo a su procedencia se clasifican en:

- a) Autólogos (autoinjerto): Cuando proviene del mismo paciente quemado.
- b) Singénicos (isoinjerto): Si su procedencia es de un individuo genéticamente idéntico, como sería el caso e gemelo homocigótico.
- c) Alogénicos (aloinjerto): Se refiere al injerto que no es un individuo genéticamente idéntico pero si comparte la misma especie. Por ejemplo piel cadavérica.
- d) Xenogénicos (xenoinjerto): Cuando proviene de una especie diferente a la del paciente, generalmente se utiliza piel de cerdo.

Desafortunadamente el uso de los injertos, presenta varias limitantes, como: rechazo inmunológico, infecciones virales, número limitado de donadores o sitios donantes en el caso del propio paciente cuando las quemaduras afectan grades extensiones corporales. También existe gran variedad de apósitos y cubiertas tanto celulares como acelulares teniendo como limitante que son costosas y no todas pueden emplearse para el tratamiento de quemaduras. De ahí que la Ingeniería de Tejidos sea una alternativa para proveer de un sustituto que funcione como cubierta para evitar la pérdida de electrolitos y las infecciones bacterianas y de manera general, pueda ayudar en el tratamiento de estas lesiones.

INGENIERÍA DE TEJIDOS

La Ingeniería de Tejidos es un área tecnológica emergente e interdisciplinaria, que involucra el uso de células para desarrollar sustitutos biológicos para ser implantados en el cuerpo y/o para promover la remodelación de tejido. El objetivo de la Ingeniería de Tejidos es reparar, reemplazar, mantener o aumentar la función de un tejido u órgano en particular (Jayakumar *et al*, 2010). Para lograrlo, no sólo se requieren células, como en el caso de la terapia celular, sino también de un andamio o una matriz extracelular artificial que las soporte, mantenga y promueva la reorganización celular (Metcalf *et al*, 2007).

Langer y Vacanti (1993) proponen además la necesidad de un tercer componente, y resulta en lo que se conoce como la triada de la Ingeniería de Tejidos:

- Células
- Andamio, “scaffold” o matriz de sostén
- Factores de crecimiento

En donde, el andamio brindará el ambiente adecuado para que las células sean capaces de adherirse y proliferar manteniendo la estructura celular. Mientras que la función de los factores de crecimiento es inducir a las células a diferenciarse y así recrear la morfogénesis del tejido dañado promoviendo la regeneración.

En conjunto, los tres elementos son esenciales, sin embargo para algunos, el factor crucial para el desarrollo de sustitutos biológicos, es el andamio a utilizar (Ma *et al*, 2003).

Sustitutos cutáneos desarrollados mediante ingeniería de tejidos

El reto más grande que tiene la Ingeniería de Tejidos es precisamente combinar un andamio de los materiales adecuados con las células, para producir un equivalente cutáneo que sea funcional y permita la integración en el hospedero. Generalmente, los modelos de piel se desarrollan cultivando células *in vitro* y posteriormente sembrándolas en un andamio el cual se coloca *in vivo* en el sitio de la lesión (Metcalfe *et al*, 2007). Los sustitutos de piel elaborados mediante Ingeniería de tejidos han sido usados como apósitos o injertos en el tratamiento de pacientes con quemaduras o con lesiones de piel congénitas (Brohem, 2010).

Los sustitutos cutáneos han recibido diferentes términos en la literatura, sin embargo Kim y cols. (2006) mencionan que también se pueden referir a ellos como: equivalentes cutáneos, piel elaborada por Ingeniería de Tejidos, constructos cutáneos, sustitutos biológicos de piel, bioconstructos de piel, reemplazos de piel, modelos de piel o tejido alternativo mediante Ingeniería Tisular.

Cualquier sustituto cutáneo debe cumplir con tres requisitos: ser seguros para el paciente, clínicamente efectivos y de fácil manipulación para su aplicación. En general, los biomateriales utilizados para desarrollar sustitutos no deben ser tóxicos, inmunogénicos o que causen una inflamación excesiva y no riesgosos para la transmisión de enfermedades. Por otro lado, el biomaterial deberá ser biodegradable, con características físicas y mecánicas semejantes a la piel, prevenir pérdida de fluidos y temperatura, y cubrir la herida para evitar infecciones. Debemos considerar que sea de bajo costo y disponible para la población de bajos recursos económicos que en general es la más susceptible a sufrir estas lesiones (Shevchenko *et al*, 2010 y Metcalfe *et al*, 2007).

La situación actual, es que no hay a un sustituto que cumpla con todos los requerimientos antes mencionados.

No obstante hay diversos grupos de investigación en el mundo que trabajan al respecto. La tabla 2 muestra algunas formas en las que se puede clasificar a los sustitutos cutáneos.

Tabla 2. Clasificación de sustitutos cutáneos

Criterio	Clasificación de sustitutos cutáneos
Anatómico	Epidérmicos
	Dérmicos
	Epidérmico-dérmico
Duración	Temporal
	Semipermanente
	Permanente
Tipo de biomaterial	Biológicos (autólogo, alogénico o xenogénico)
	Sintético (biodegradable o no biodegradable)
Componente biológico	Celular
	Acelular

Andamios o “scaffolds”

La Ingeniería de tejidos abarca también el diseño y la fabricación de andamios de acuerdo al propósito funcional que se quiera alcanzar, teniendo como objetivo definir estructuras que mimeticen el ambiente *in vivo* en el cual las células existen naturalmente y estimularlas a formar tejido. En particular, un andamiaje necesita proporcionar una estructura que facilite la unión celular y la regeneración tisular; al mismo tiempo preservar la expresión o diferenciación de los fenotipos celulares. La composición química de los polímeros puede influir en la unión celular y en la biocompatibilidad.

Estas estructuras llamadas andamio, en el sentido amplio y bajo este contexto, también se les ha referido como: sustratos, andamiajes, armazones, soportes o matrices, cuya función es servir de plataforma de anclaje para la adhesión de las células utilizadas y retenerlas; transportar, almacenar y liberar factores activos; estimular las respuestas celulares específicas y, en ciertas circunstancias, contribuir a la integridad estructural y mecánica de la región tratada (Vallet y Munuera, 2000).

Los materiales que más se emplean para la fabricación de andamios en aplicaciones de Ingeniería de Tejidos son los polímeros, los cuales pueden ser:

- a) Naturales, incluyendo polisacáridos (almidón, alginatos, quitina/quitosano, derivados del ácido hialurónico, glicaminoglicanos, hidroxiapatita) o proteínas (soya, colágena, geles de fibrina, fibronectina y seda).
- b) Sintéticos, como el ácido poliláctico (APL), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), polihidroxi butirato (PHB), politetrafluoretileno, polietileno, tereftalato entre otros.

Ambos grupos tienen ventajas y limitaciones. Para el primer caso, los polímeros naturales tienen gran reconocimiento con las células y favorecen su adhesión y funcionalidad. Sin embargo presentan pobres propiedades mecánicas. Los polímeros sintéticos, por su parte, tienen buenas características mecánicas, y su índice de degradación puede ser modificado de manera sencilla, pero tienen la desventaja de

tener superficies hidrofóbicas y presentar bajo reconocimiento celular (Armentano *et al*, 2010).

Algunas de las principales características que un candidato a ser andamio debe cumplir, son:

1. **Biocompatibilidad.** Este término se refiere a la evaluación de las propiedades de los materiales, las cuales no causen un efecto adverso cuando éstos estén en contacto con células, tejidos y el propio organismo. El andamio debe proveer un soporte en donde la interacción andamio- células promueva la adhesión celular, la proliferación, la viabilidad, y la producción de matriz tanto en el cultivo *in vitro* como tras su implante *in vivo* (Armentano *et al*, 2010). La biocompatibilidad depende de varias propiedades físico-químicas de los materiales, por ejemplo: carga de la superficie, mojabilidad, energía libre de superficie, topografía, rugosidad y la presencia de ciertos grupos químicos en la superficie (Tanaka, 2011).
2. **Biodegradabilidad** en una tasa adecuada que permita la formación del nuevo tejido antes de que se degrade por completo.
3. **No tóxico.** El contacto con el andamio y/o sus productos de degradación no deberá comprometer a las células sembradas en éste.
4. **No inmunogénico.** Que no provoque una respuesta inflamatoria una vez implantados en el hospedero.
5. **Propiedades mecánicas** similares a las del tejido que se pretende reemplazar o promover su reparación.
6. **Arquitectura adecuada** para el transporte de células, metabolitos, nutrientes y factores de crecimiento. Los andamios pueden diseñarse en diferentes presentaciones, de acuerdo a la aplicación que se busque, pueden ser: hidrogeles, películas, esponjas, membranas, fibras, nanopartículas, entre otras. (Dai *et al*. 2011).

Por lo anterior, las propiedades que deben cubrir estas matrices son múltiples y en la mayoría de los casos, resulta difícil encontrar un soporte que reúna todas, de ahí que no sea labor fácil encontrar el andamio adecuado que cuente con las características necesarias para que las células puedan desarrollarse plenamente y simular una determinada estructura o tejido.

Tratando que el andamio cubra con el mayor número de características posibles, se han propuesto varias estrategias:

- 1) Modificar la superficie del material alterando a su vez, las propiedades de superficie siendo éstas, factores clave que influyen desde el primer contacto que existe entre las células y el sustrato donde se siembran. Las propiedades químicas y topográficas de la superficie del material pueden repercutir en el estado de las

células, controlando su forma, funciones y movilidad. De este modo, modificaciones químicas en la superficie del biomaterial pueden aumentar la biocompatibilidad del mismo (Armentano *et al.* 2010). Algunas de las principales modificaciones químicas utilizadas son: la inmovilización en plasma de proteínas como gelatina, colágena, laminina y fibronectina en la superficie para aumentar la adhesión celular y la proliferación (Baek *et al.*, 2008).

- 2) Combinar materiales de origen natural con biopolímeros sintéticos ya que generalmente los materiales naturales presentan bajas propiedades mecánicas, difícil manipulación, altos índices de degradación pero un buen reconocimiento por parte de las células mientras que los sintéticos tiene mejores propiedades mecánicas, su fabricación es más versátil y su índice de degradación es más lento lo que permite que el neot Tejido se pueda formar antes de que se degrade por completo el andamio, no obstante tienen bajo reconocimiento celular. Por lo anterior, la combinación de dos o más polímeros diferentes es necesaria para producir mejores andamios ampliando sus características y equilibrándolas ventajas y desventajas que puedan tener cada uno de manera individual (Zhong *et al.*, 2010).

Entre los polímeros naturales que se han utilizado para el desarrollo de sustitutos biológicos para piel encontramos a los quitosanos.

QUITOSANO (Qui)

El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de glucosamina y N-acetil glucosamina unidos por enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$. Este polímero natural es obtenido por la desacetilación de la quitina (Fig. 2), de esta manera cuando el número de grupos N-acetil glucosamina es mayor a 50%, el biopolímero se considera quitina y cuando el número de unidades de glucosamina es mayor entonces hablamos de quitosano (Khor, 2003). La fuente más importante de quitosano es la quitina, aunque puede encontrarse también en cantidades significantes en algunos hongos, como: *Mucor rouxi* (30%) y *Choanephora cucurbitarum* (28%), la limitante es que están asociados a otros polisacáridos (Peniche, *et al.*, 2008).

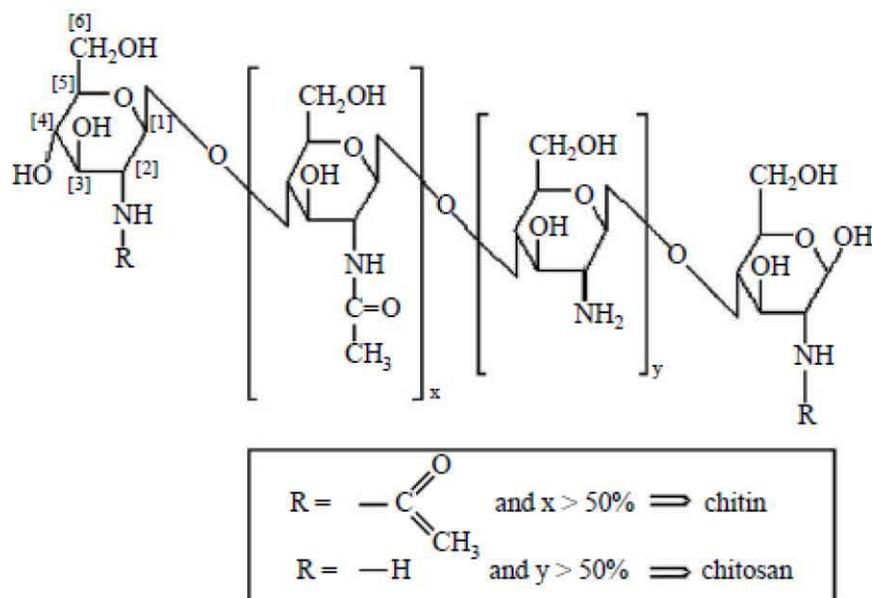


Figura 2. Estructura química de la quitina y el proceso de desacetilación para la obtención de quitosano.

La quitina es el componente orgánico más abundante del esqueleto de muchas clases de invertebrados, tales como: artrópodos, moluscos y anélidos. En animales, la quitina está asociada con otros constituyentes, como: lípidos, carbonato de calcio, proteínas y pigmentos. Se ha estimado que la quitina de todos los crustáceos en el mar es cerca de 1560 millones de toneladas. La quitina también es encontrada como el mayor componente de la pared celular de los hongos y las algas. La quitina de los hongos presenta algunas ventajas sobre la quitina animal, como tener una mayor uniformidad en la composición y la ausencia de sales inorgánicas en su matriz. Sin embargo, la quitina de hongos está asociada con otros polisacáridos, tales como la celulosa y manosa las cuales dificultan su aislamiento.

La mayor fuente de quitina a nivel industrial son los crustáceos ya que se encuentran disponibles como desechos de la industria marisquera (Kurita, 2006). El exoesqueleto contiene 15-40% de quitina, 20-40% de proteínas y 20-50% de carbonato de calcio, entre otros componentes como: pigmentos, lípidos y otras sales (Brück, 2010).

Obtención de quitina y quitosano

La obtención de la quitina (Fig. 3) a partir de exoesqueleto de crustáceos generalmente se realiza mediante un procesamiento químico que consiste en tres pasos:

- 1.- Desmineralización
- 2.- Desproteínización
- 3.- Eliminación de lípidos y pigmentos

Estos procesos emplean ácidos inorgánicos para el primer paso y fuertes bases para el segundo, mientras que para el tercero se emplean solventes como la acetona. Por lo que al final, los subproductos de estas reacciones son sustancias corrosivas y contaminantes.

Otras desventajas de este método es que reduce la polimerización y la calidad de la quitina además de producir su degradación (Jo, 2010).

Recientemente se ha propuesto, un método alternativo, el biológico, que recurre a la fermentación láctica ya sea por bacterias, hongos, protozoos y tejidos animales. El uso de la fermentación para la obtención de quitina, es un método más amigable con el ambiente, evita la despolimerización y se obtiene un biopolímero con alta estructura cristalina aumentando así sus aplicaciones biomédicas (Pacheco et al, 2010). La eficiencia de la fermentación depende de factores tales como: niveles de inóculo, contenido de exoesqueleto en el medio, así como su tamaño, presencia de azúcares, pH y duración de la fermentación. Se ha reportado que incrementando la concentración del inóculo bacteriano, se mejora la desmineralización (Shirai et al, 2001).

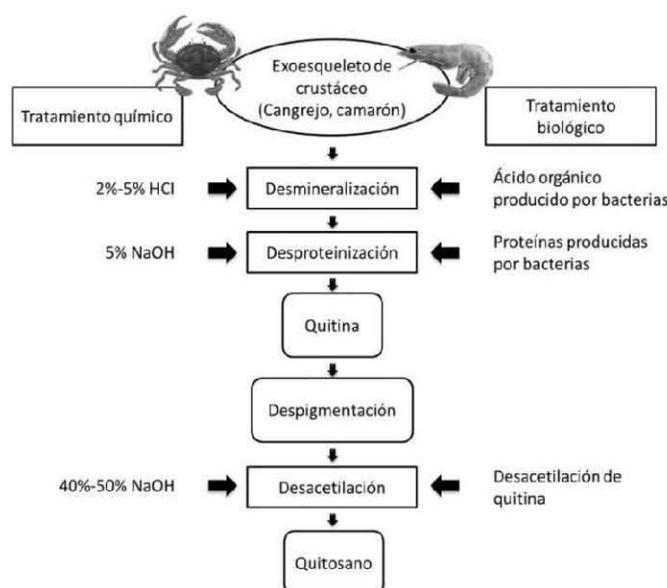


Figura 3. Comparación de obtención de la quitina y quitosano mediante proceso químico y biológico (Modificado de Jo, 2010)

Finalmente la obtención de quitosano a partir de la quitina se lleva a cabo generalmente por un método químico donde soluciones alcalinas al 40-50% a 100-160 °C durante varias horas desacetilan la quitina transformándola en quitosano (Zhang 2006, Honarkar, 2009). Las condiciones de desacetilación, como: la temperatura, la concentración de la base, el tiempo de reacción y las propiedades de las materias primas, es decir la calidad de la quitina, afectan las características del quitosano obtenido (Hwang et al, 2002).

Características y propiedades del quitosano

El quitosano es un polímero con una alta variabilidad en sus propiedades físico-químicas debido a su origen natural. (Aranaz, 2010). Dependiendo de la materia prima y de su procesamiento el peso molecular está en un rango de 300-1000 kDa y un grado de

desacetilación de 30-95%. Su peso molecular es de 150-200 kDa, es un polímero cuya densidad de carga depende del grado de acetilación y del pH. Presenta una estructura cristalina, es hidrofílico y no elástico. En su forma cristalina, el quitosano es insoluble en solución acuosa con pH mayor a 7, sin embargo, se solubiliza en soluciones ácidas.

La calidad del quitosano varía de acuerdo al grado de desacetilación, peso molecular, pureza, proceso de obtención, color, claridad, consistencia y uniformidad (Knezevic-Jugovic, 2010).

Sus propiedades químicas son: es una poliamina, cuenta con grupos aminos (NH_2) reactivos, grupos hidroxilos (OH) reactivos libres y es un quelante de metales (Dutta *et al*, 2004).

Entre sus propiedades biológicas se encuentran: biocompatible, biodegradable, no tóxico, citocompatible, hemostático, hipocolesterolémico e hipolipidémico, antimicrobiano y mucoadhesivo. Se ha reportado también que tiene acción antiinflamatoria, estimula la angiogénesis, promueve la formación de tejido de granulación y la activación de macrófagos (Aranaz, 2010).

El quitosano como biomaterial en la Ingeniería de tejidos de piel

La Ingeniería de tejidos ha recurrido a este polímero para la elaboración de andamios por varias razones:

- 1) La versatilidad que cuenta para poder formar estructuras porosas, películas, "composites", hidrogeles, fibras, etc. Se ha usado ampliamente fabricándolo en películas por naturaleza hidrofílica (Honarkar, 2009).
- 2) La naturaleza catiónica que permite la interacción con los grupos aniónicos de los glicosaminoglicanos y proteoglicanos que se encuentran en el cuerpo. Por otro lado, al presentar ese tipo de carga, hay cierta afinidad celular hacia este biomaterial (Prashanth y Tharanathan, 2007).
- 3) La degradación *in vivo* por hidrólisis enzimática así como la inocuidad de sus productos.
- 4) La actividad antibacteriana que reduce la infección en lesiones de la piel.
- 5) No hay rechazo por parte del cuerpo, además de estimular la angiogénesis y la formación normal del tejido de granulación (Peniche, 2008).
- 6) Este polímero *in vivo* estimula la proliferación de fibroblastos y regula la migración de neutrófilos y macrófagos para la reparación de heridas (Khor y Yong, 2003).
- 7) Actividad hemostática (Aranaz, 2010).

Aplicaciones

El quitosano por presentar todas esas propiedades antes mencionadas y ser un material disponible en la Naturaleza, de fácil acceso y manufactura, ya que puede fabricarse en diferentes presentaciones, cuenta con aplicaciones en diferentes áreas. La siguiente figura, enlista la diversidad de sus aplicaciones

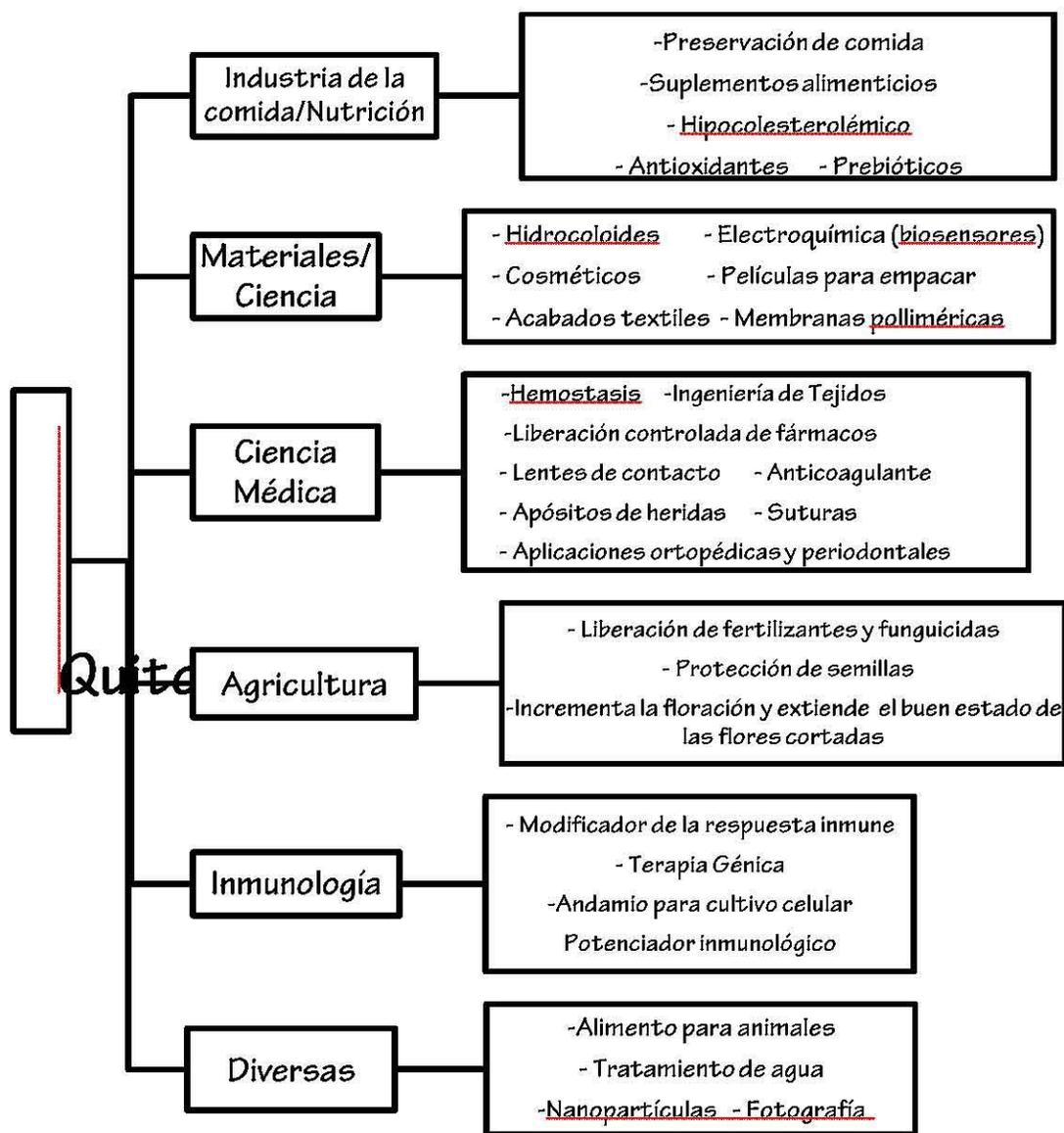


Figura 4. Aplicaciones potenciales del quitosano (Modificado de Prasshanth y Tharanathan 2007).

Debido al alto índice de degradación de los polímeros naturales se hace necesaria su combinación con diversos polímeros sintéticos.

ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA)

El ácido poliláctico es un poliéster alifático cuyo precursor es el ácido láctico (Fig. 5). Es uno de los pocos polímeros que puede ser modificado fácilmente en cuanto a su estructura estereoquímica, por polimerización. Es uno de los polímeros biodegradables sintéticos de mayor uso, así como de los más ampliamente investigados.

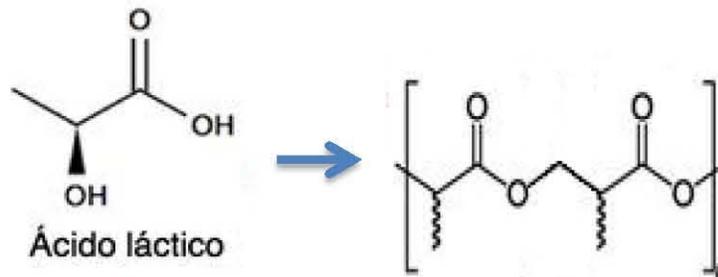


Figura 5. Estructura química del ácido láctico y del PLA tras la polimerización de su precursor.

Isómeros

Ya que el ácido láctico es una molécula quiral, existe en 2 formas estereoisómeras que dan lugar a 4 polímeros diferentes: 2 polímeros estereorregulares, D-PLA y L-PLA y la forma racémica D,L-PLA. Una cuarta forma, la meso-PLA puede obtenerse a partir de la D,L-lactona pero se usa muy poco en la práctica. Los polímeros derivados de los monómeros ópticamente activos D y L, son materiales semicristalinos, mientras que el ópticamente inactivo D,L-PLA es siempre amorfo. Generalmente, se usa más frecuentemente L-PLA que D-PLA debido a que su hidrólisis da lugar a ácido láctico L(+), que es el estereoisómero natural del ácido láctico. Las diferencias en cristalinidad de D,L-PLA y L-PLA tienen importantes implicaciones prácticas, ya que D,L-PLA es un polímero blando elegido habitualmente para aplicaciones de liberación de fármacos y el L-PLA que es semicristalino, es el compuesto preferido en aplicaciones donde se necesita altas propiedades mecánicas y resistencia, como en suturas y dispositivos ortopédicos (Vallet y Munuera, 2000).

Características y propiedades

El PLA es un polímero sintético, renovable, biocompatible, con una variedad amplia de procesamiento, hidrofóbico, presenta baja afinidad celular y su tasa de degradación es muy baja (Xiao *et al*, 2008). En cuanto a su solubilidad, se disuelve en cloroformo y otros disolvente clorados o fluorados, como el dioxano, dioxolano y el furano. La degradación del PLA se realiza por hidrólisis de los enlaces ésteres y no necesita de enzimas que catalicen esta reacción. La degradación de este poliéster puede efectuarse a altas temperaturas por arriba de los 200°C, por fermentación oxidativa, corte de la cadena principal y reacciones de transesterificación inter o intramoleculares (Garlotta *et al*, 2002). Este biomaterial presenta baja reacción tisular y una mínima toxicidad, ya que los productos de degradación (ácido láctico) son metabolitos que participan en el Ciclo de Krebs en los procesos metabólicos del organismo.

La síntesis del PLA puede darse por policondensación directa o polimerización por apertura de anillo del ácido láctico. El PLA es de los pocos polímeros sintéticos aprobados por la FDA comercialmente disponible para su producción a gran escala en un rango amplio de grados, su relativo bajo costo y sus propiedades lo hacen muy utilizado para infinidad de aplicaciones (Averuos, 2008).

Aplicaciones Biomédicas

El PLA ha sido estudiado ampliamente para uso en aplicaciones médicas por su biodegradabilidad y biocompatibilidad en el cuerpo (Fig. 6). Los principales ejemplos de productos biomédicos en donde se ha utilizado, son dispositivos de fijación de fracturas, como: tornillos y placas (Ding *et al*, 2004). Fibras de PLA son usadas para la fabricación de suturas reabsorbibles.

Las micro y nanopartículas son una importante categoría en los sistemas de liberación de fármacos usados en Medicina. Se han utilizado también en conductos y sistemas de liberación de fármacos para regeneración de hueso y nervio (Ding *et al*, 2004).

Finalmente, en la Ingeniería de Tejidos, las matrices de PLA han sido usadas como andamios porosos, encontrándoles un gran potencial en la reconstrucción de tejidos y órganos dañados (Averous, 2008).

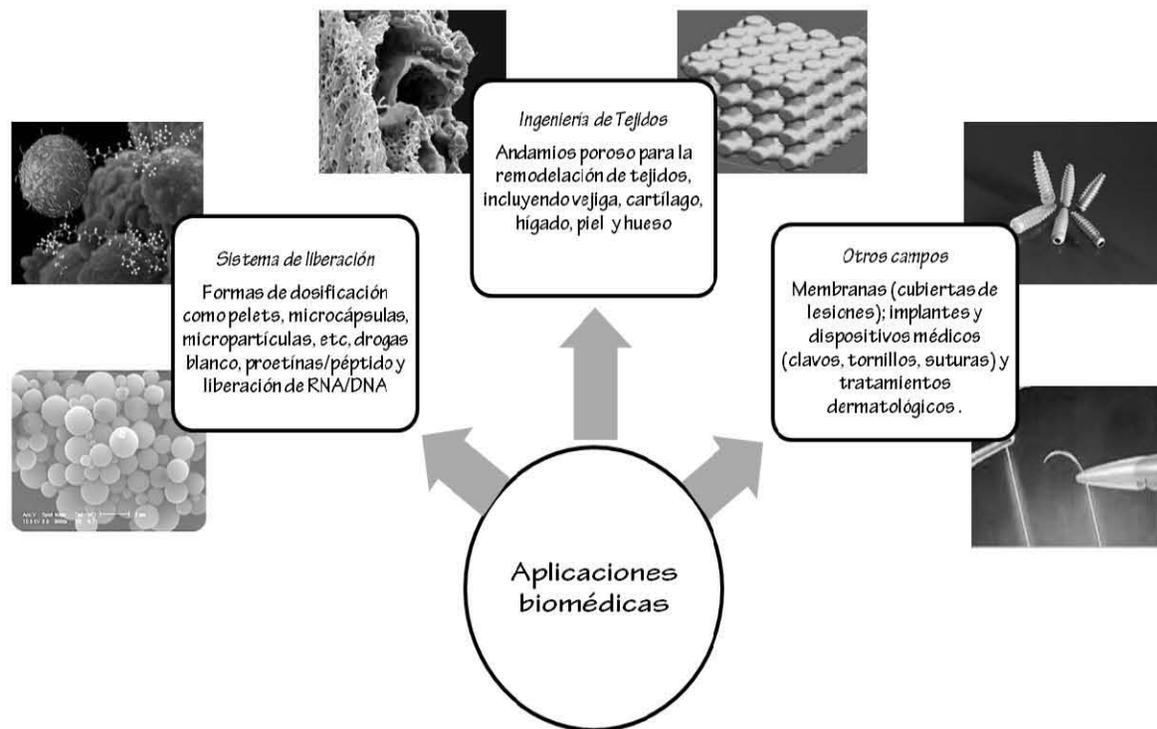


Figura 6. Aplicaciones del Ácido Poliláctico (Modificado de Xiao, 2008).

ANTECEDENTES

En cuanto a la utilización del quitosano para la fabricación de andamios en el área de Ingeniería de Tejidos se ha hecho bastante, ya sea únicamente con este polisacárido natural o bien en combinación con otros materiales. Y se han probado diversos tipos celulares buscando la reparación de diferentes tejidos o estructuras. En la siguiente tabla se resumen algunos de los trabajos ya reportados.

Tabla 3. Andamios con base en quitosano aplicados en la Ingeniería de Tejidos

Andamio	Arquitectura	Aplicación	Efecto	Referencia
Quitosano-ácido hialurónico	Fibras	Ligamento	Adhesión Proliferación Producción de MEC	Funakoshi <i>et al</i> , 2005
Quitosano-colágena	Porosa	Vasos sanguíneos	Adhesión Proliferación Producción de MEC	Zhu <i>et al</i> , 2009 Shi <i>et al</i> , 2008
Quitosano-colágena	Hidrogel	Tejido adiposo	Inducción de vascularización Formación de tejido adiposo	Wu <i>et al</i> , 2007
Quitosano gelatina	Tubos	Vasos sanguíneos	Proliferación Migración	Zhang <i>et al</i> , 2006
Quitosano - colágena	Porosa	Piel	Citocompatibilidad Infiltración Proliferación.	Ma <i>et al</i> , 2003
Quitosano-colágena y fibrina	Porosa	Piel	Viabilidad Reepitelización	Han <i>et al</i> , 2010
Quitosano	Porosa	Piel	Adhesión Viabilidad Infiltración	Mohd Hilmi <i>et al</i> , 2013
Quitosano-gelatina		Piel		Iyer <i>et al</i> , 2012
Quitosano-PLA	Películas	Piel	Citocompatibilidad	Yao <i>et al</i> , 2003
Quitosano -PLA	Películas	Fibroblastos y hepatocitos (líneas celulares)	Control de Morfología	Ding <i>et al</i> , 2004

Sin embargo, hay pocos trabajos que se enfocan específicamente en la combinación de Quitosano y Ácido Poliláctico evaluando más allá de la viabilidad y la morfología de las células sembradas en estos andamios. Además otro factor importante a considerar es que, todos los materiales que se han probado, provienen de un quitosano comercial, obtenido por un método netamente químico, por lo cual, no existe comparación con el copolímero que se propone en esta tesis, ya que, en ésta se utilizó un quitosano obtenido por un procedimiento biológico químico reportado ya por Pacheco y cols. 2010 que mantiene mejores propiedades biológicas. Por otro lado Sothornvit y col. 2000 reportaron que las películas elaboradas a base de quitosano son frágiles, poco flexibles y quebradizas, es por ello que se combinaron con PLA para que el copolímero en sí, mejore sus propiedades mecánicas.

Cabe mencionar, que la síntesis y caracterización del copolímero QUI-PLA en cuestión se realizó en un proyecto de tesis previo que ya ha sido publicado por Espadín et al, 2014. De esta forma, se sentaron las bases para poder proceder a la evaluación biológica de este copolímero en este trabajo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las lesiones por quemaduras de segundo y/o tercer grado requieren cuidados especializados en centros *ad hoc* con personal altamente calificado y con técnicas avanzadas como las de la Ingeniería de tejidos.

El tratamiento para quemaduras profundas incluye la aplicación de autoinjertos en la lesión, sin embargo, una de las limitantes frecuentes es la ausencia de zonas donadoras de piel sana del mismo paciente. Por otro lado, las cubiertas sintéticas actuales son caras y poco disponibles en nuestro país.

Actualmente existe gran cantidad de apósitos y sustitutos cutáneos empleados para el tratamiento de las lesiones de piel. Gran parte de ellos, han sido desarrollados fuera del país limitando su disponibilidad, y los pocos que se fabrican en México utilizan células alógenicas, además de que no todos son aplicables para las lesiones por quemaduras. Por otro lado, tienen un precio muy elevado y este costo se incrementa debido a que con frecuencia las quemaduras abarcan extensiones corporales considerables.

El panorama en México, es que las quemaduras son un problema de Salud Pública y que lamentablemente afectan al sector de la población más desprotegido económicamente hablando.

JUSTIFICACIÓN

Es necesario caracterizar y desarrollar materiales que puedan ser posibles candidatos a ser utilizados como sustitutos de piel que sean biocompatibles y proporcionen una eficacia en el tratamiento de pacientes con quemaduras profundas.

Existe una alta demanda no cubierta de sustitutos cutáneos en el Sector Salud en México. Únicamente en el CENIAQ más de 350 pacientes han sido atendidos y en su mayoría con escasos recursos económicos.

Es de notar que el caparazón de los camarones se desecha, sin embargo, puede ser utilizado como fuente accesible de quitosano para la fabricación de un andamio. La puesta en marcha de técnicas dentro del laboratorio para aislar fibroblastos autólogos y expandirlos para después sembrarlos en un andamio de quitosano y posteriormente colocarlos en pacientes con quemaduras profundas es una posible alternativa disponible y de bajo costo para el tratamiento de estos pacientes.

HIPÓTESIS

Las películas del copolímero Quitosano-Ácido Poliláctico (Qui-PLA) presentan regiones con alto contenido de Glucosamina y N-acetilglucosamina, las cuales se encuentran en una diversidad de tejidos animales y mediante estas moléculas las células interactúan con sus matrices extracelulares; en base a esto, los fibroblastos sembrados sobre copolímeros de Qui-PLA son capaces de reconocer la estructura similar a la de los glicosaminoglicanos permitiendo adherirse a ellos y mantener sus capacidades funcionales y morfológicas, así como su fenotipo diferenciado, haciendo de éstos un material biocompatible.

OBJETIVOS

General: Determinar la biocompatibilidad de un copolímero (Quitosano-PLA) para el desarrollo de un sustituto biológico dérmico para su uso en el tratamiento de quemaduras.

Específicos:

- Aislar y cultivar *in vitro* fibroblastos humanos.
- Cultivar *in vitro* fibroblastos humanos sobre el material.
- Analizar viabilidad celular y adhesión de fibroblastos sembrados en el copolímero.
- Analizar la proliferación celular de los fibroblastos en las películas de Qui-PLA.
- Evaluar la producción de procolágena I y tropoelastina de fibroblastos cultivados en el copolímero.
- Evaluar la expresión génica de colágena I, elastina y fibrilina en los fibroblastos sembrados en el biomaterial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y manejo de las biopsias

Las biopsias de piel provinieron de remanentes de circuncisiones de infantes realizadas en el Instituto Nacional de Pediatría. Fueron donadas con el asentimiento informado de los padres de familia.

Los criterios de inclusión fueron pacientes masculinos de 0 a 12 años, prepucios sanos sin ningún cuadro de infección ni alteración genética o patología asociada a piel. Criterios de exclusión: pacientes mayores de 12 años y con balanopostitis o alguna patología que afecte la piel. Criterio de eliminación: contaminación de la biopsia.

Las muestras biológicas se trasladaron en medio de cultivo DMEM con 5% de antibiótico en condiciones estériles desde el Instituto Nacional de Pediatría hasta llegar laboratorio en donde se procesaron. Se retiró el tejido subcutáneo a las muestras con la ayuda del bisturí y pinzas de punta fina, posteriormente fueron lavadas con PBS para retirar residuos de sangre o de tejido adiposo.

Aislamiento de fibroblastos

Las biopsias de piel se fragmentaron para poder realizar la separación dermoepidérmica que se efectuó con dispasa 2.4 unidades/ml (Gibco) durante 16 horas a 4°C y colagenasa 0.3% durante 3 horas a 37 °C en agitación para la obtención de fibroblastos.

Al final de la primera digestión con dispasa, se separó la epidermis, de la dermis con unas pinzas, La dermis se colocó en un tubo de 50ml con la solución de colagenasa en agitación a 37 °C. Después de la digestión de las dermis, se filtró la suspensión obtenida un colador celular de 70um y después se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. El "pellet" se resuspendió en medio DMEM y se determinó el rendimiento por cm² y la viabilidad celular a través de un conteo con azul de tripano.

Los fibroblastos obtenidos del aislamiento se congelaron en una solución de Suero Bovino Fetal (90%) y DMSO (10%) a -80 °C y se mantuvieron criopreservados de acuerdo a como se requirieron para su siembra.

Cultivo de fibroblastos in vitro

Se descongelaron los fibroblastos en cultivo primario para su expansión hasta el pase dos. Los cultivos celulares se mantuvieron en cultivo en Medio DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF) (Gibco) y 1% de antibiótico en una incubadora (Thermo Scientific) a 37° C y a 0.5% de CO₂. Se reemplazó el medio cada tercer día hasta llegar al 90% de confluencia. Los fibroblastos adherentes se obtuvieron de las cajas de cultivo utilizando Tripsina- EDTA 0.05% (Gibco).

Películas de Quitosano- PLA

Síntesis

Los biomateriales fueron provistos por el Departamento de Biopolímeros de la Universidad Autónoma Metropolitana plantel Iztapalapa. La quitina utilizada como materia prima se extrajo de restos de exoesqueleto del camarón *Litopenaeous vanameii* y se obtuvo el quitosano mediante un procesamiento biológico- químico, iniciando con una fermentación láctica empleando *Lactobacillus sp.* El quitosano obtenido tuvo un peso molecular de 900kDa y un grado de acetilación del 9.8% Mientras que el Ácido Láctico fue adquirido en JT Baker. Los catalizadores en las reacciones de síntesis fueron trietanolamina (TEA) y ácido sulfónico p-tolueno (p-TSA), ambos de Sigma Aldrich.

Se sintetizaron 4 tipos de copolímeros:

- Copolímero A: 160ml de quitosano, 40 ml de D- ácido láctico más catalizador p-TSA
- Copolímero B: 160ml de quitosano, 40 ml de L- láctico más catalizador p-TEA
- Copolímero C: 160ml de quitosano, 40 ml de D- ácido láctico y sin catalizador
- Copolímero D: 160ml de quitosano, 40 ml de D- ácido láctico, sin catalizador más sorbitol.

Las mezclas obtenidas fueron vertidas en cajas Petri y se dejaron secar para se formaran películas de aproximadamente 100 μm de grosor.

La tabla siguiente enlista los lotes que se usaron durante este proyecto.

Tabla 4. Lotes de copolímeros de Qui-PLA probados para analizar su biocompatibilidad

LOTE	SUBLOTE	Características generales
1	A,B,C,D	Quitosano químico-biológico No purificados acetona Sin lijar
2	A,B,C,D	Quitosano químico-biológico Purificados con acetona Lijados
3	C	Quitosano químico-biológico /Purificados con acetona / Lijados
4	C	Quitosano químico-biológico /Purificados con acetona
5	C	Quitosano químico (comercial) / Purificados con acetona

Purificación con acetona de las películas Qui-PLA

Las películas sintetizadas se purificaron en un "soxhlet" con acetona (Sigma) para retirar por completo el monómero de ácido láctico que no reaccionó. El tiempo de purificación se ensayó a las 12 y 18 horas. Este procedimiento se realizó por el Departamento de Biopolímeros, UAM.

Esterilización y desgaste superficial de las películas

Los copolímeros se cortaron en círculos y se esterilizaron con luz UV durante 10 minutos por cada cara del material en un "Cross Linker" (BLX-254 Vilber Lourmant,

Germany). Los lotes de copolímeros 2-5 se desgastaron superficialmente con una lija P800 por ambas caras haciendo movimientos circulares homogéneos sobre el material, hasta que la superficie tuvo una apariencia opaca.

Hidratación de películas previo al sembrado

Las películas se lavaron con diferentes soluciones, entre ellas: Solución Salina Balanceada de Fosfatos (PBS) (Gibco), Medio DMEM F12, medio alcalino al 0.1M de NaOH y agua desionizada estéril. El número de lavados así como su orden se determinaron con la experimentación. Las condiciones de lavado que se probaron en la siguiente tabla.

Tabla 5. Condiciones de lavados realizados para neutralizar la acidez de las copolímeros de Qui-PLA.

LAVADO	Descripción
A	7 lavados con Medio DMEM sin suplementar
B	10 lavados con PBS 1 lavado con Medio DMEM sin suplementar
C	10 con lavados PBS 3 lavados con Medio DMEM alcalino 1 lavado con Medio DMEM sin suplementar
D	10 con lavados con PBS 2 lavados con Agua estéril 3 lavados con Medio DMEM alcalino 2 lavados con Agua estéril 1 lavado con Medio DMEM sin suplementar

Sembrado en copolímeros Qui-PLA

Los copolímeros con los fibroblastos se cultivaron en placas de 96 pozos (Costar) recambiando el medio de cultivo diariamente. Se probaron diferentes variantes para el sembrado de las películas, como lo refiere la siguiente tabla. Se sembraron 50 000 fibroblastos /cm² en pase 3.

Tabla 6. Tipos de siembra que se probaron para cultivar los copolímeros Qui-PLA.

Criterio	Tipo o modalidad de siembra
Día de sembrado	Al día siguiente de ser lavadas
	En el mismo día de ser lavadas
Hidratación de las películas	Secas
	Semisecas (2 horas de secado)
	Húmedas
Sembrado de las células	Por regiones
	Resuspensión

Pruebas biológicas

Viabilidad celular

Se determinó la viabilidad de los fibroblastos sobre los copolímeros mediante el "Kit" LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells (Invitrogen) que consistió en una prueba con calceína y homodímero de etidio. Los copolímeros sembrados con las células se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se les adicionó una Solución de Hanks con la calceína (0.5µm/ml) y homodímero de etidio (1µm/ml) a los copolímeros sembrados, se incubó por 45 minutos y al final de este tiempo, se lavaron 2 veces con PBS y se montaron en un portaobjetos con PBS-Glicerol. Posteriormente se observaron con Microscopía de fluorescencia en un Confocal LSM 780 Carl Zeiss para la obtención las imágenes.

Para obtener el porcentaje de viabilidad y mortalidad se realizó un conteo celular. El análisis de la confluencia de células viables se realizó con el programa Image J® midiendo áreas ocupadas por las células viables y calculando la media y la error estándar de los ensayos por triplicado. El análisis estadístico para la comparación de porcentajes de confluencia en los tipos de siembra se realizó mediante la Prueba de Tukey en el programa GraphPad Prism 5.

Adhesión celular

Los copolímeros del lote 1-5 sembrados con fibroblastos se fijaron con Glutaraldehído al 2.5% (Sigma) por 30 minutos a los días 2, 4, 6 y 8 de cultivo. Se realizaron 2 lavados con PBS antes y después de adicionar el fijador. Finalmente los copolímeros se mantuvieron a 4°C en solución de fosfatos hasta su análisis con un Microscopio Electrónico ESEM XL 30 Phillips.

Para el lote 6, se realizaron inmunofluorescencia contra la Cinasa de Adhesión Focal (FAK). El procedimiento fue el ya mencionado antes, se usó como anticuerpo primario FAK (Abcam ab 38512) a una dilución 1:100 mientras que el anticuerpo secundario fue Alexa 594 (Invitrogen A-11001) dilución 1:300. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Sigma) (10mg/ml) con una dilución 1:1000 durante 10 minutos. Al final, se lavaron con PBS dos veces y se teñieron las fibras de actina del citoesqueleto con faloidina 0.025µl/ml (Alexa 547 Invitrogen) dejando incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Por último, se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos con PBS-Glicerol.

Proliferación celular

Se realizaron inmunofluorescencias para evaluar la proliferación. Los copolímeros sembrados se les retiró el medio de cultivo y fueron lavados con PBS durante 5 minutos. Se fijaron con PFA AL 2% durante 20 minutos y se lavaron con PBS. Después se realizó el mismo protocolo que se siguió para hacer las inmunofluorescencia de los criocortes descrito antes. El anticuerpo primario Ki67 (Biolegend) se utilizó a una dilución 1:100 y el anticuerpo secundario fluoresceinado Alexa 488 (Invitrogen A-21203) dilución 1:300. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Sigma) (10mg/ml) con una dilución 1:1000 durante

10 minutos. Al final, se lavaron con PBS 2 veces y se montaron en un portaobjetos con PBS-Glicerol.

La estimación del número de células proliferando se realizó con conteo mediante el programa Image J®. Los datos de los ensayos por triplicado fueron procesados en GraphPad Prism 5 para obtener su media y su error estándar.

Síntesis de proteínas de matriz

Se realizaron inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias contra Procolágena I, y tropoelastina.

Para el caso de las inmunohistoquímicas, las películas sembradas se lavaron con PBS después de retirarles el medio y se fijaron con PFA 2% durante 20 minutos a 4°C. Se retiró el fijador y se lavaron nuevamente antes de adicionar una solución de peróxido de hidrógeno al 0.3% durante 20 minutos. Se continuó lavando con PBS y después se bloqueó con PBS /Albúmina 1% por 20 minutos. Los anticuerpo primarios Procolágena I (Dilución 1:50) y Tropoelastina (Dilución 1:100) se dejaron incubando a 4°C toda la noche. Al siguiente día, se lavaron con PBS y se les adicionó el anticuerpo secundario antiratón y anticonejo respectivamente a una dilución 1:100 del "Kit ABC Vectastain" durante una hora. Se lavó con PBS y se incubó durante 30 minutos con el complejo A/B del "Kit" antes mencionado. Nuevamente se lavó con PBS y se agregó la diaminobenzidina (DAKO) a 0.02ul/ml durante unos minutos hasta que apreció señal café en el corte. Para detener esta reacción, se lavó con agua destilada y se tiñó con hematoxilina de Harris para evidenciar los núcleos, se realizaron posteriormente lavados con agua para eliminar el colorante y finalmente se montaron en portaobjetos con gelatina. Al día siguiente se capturaron las fotos en un Microscopio Zeiss Imager Z2.

Para las inmunofluorescencias, se fijaron con Paraformaldehido (PFA) al 2% durante 20 minutos y se siguió el mismo procedimiento que se ha estado realizando para esta técnica. Los anticuerpos primarios fueron: Procolágena I (Dilución 1:50) y Tropoelastina (Dilución 1:100), mientras que los anticuerpos secundarios fueron Alexa antiratón 488 y Alexa 594 anticonejo (Invitrogen A-21203 y A-11001) respectivamente en una dilución 1:300. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Sigma) (10mg/ml) con una dilución 1:1000 durante 10 minutos. Al final, se lavaron con PBS 2 veces y se montaron en un portaobjetos con PBS-Glicerol. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Confocal LSM 780 Carl Zeiss.

Tinción de Verhoeff

Los cortes se desparafinaron 10 minutos a 60°C y después se rehidrataron en xilol, alcoholes (100%-70%) y agua destilada. La primera tinción se realizó con el colorante de Verhoeff durante 15 minutos después lavó durante 20 minutos con agua. La siguiente tinción fue con Cloruro Férrico 2% para diferenciar las fibras elásticas de un color negro y posteriormente con Tiosulfato de sodio 5%. Se lavó con agua destilada por 5 minutos y se tiñó con Solución de Van Gieson para contrastar. Los cortes se deshidrataron y se montaron en resina.

Inmunofluorescencia contra Elastina y Colágena I

Los criocortes guardados a -20° C y se lavaron con agua destilada y PBS. Se bloquearon con una solución de PBS/Albúmina 1%, y se permeabilizó a con tritón 0.3% durante 20 minutos a 4° C. Posteriormente se le agrego el anticuerpo primario, Tropoelastina (Abcam ab 21600) a una dilución 1:100 y procolagena I (Sigma C2456) 1:50 y se dejó incubar durante toda la noche a 4 °C. Al siguiente día, se lavó con PBS durante 10 minutos y se agregó el anticuerpo secundario, Alexa anti mouse 488 y Alexa 594 anti conejo (Invitrogen A-21203 y A-11001 respectivamente) en una dilución 1:300 que se incubó durante 2 horas a 37 °C y en oscuridad. Se retiró el anticuerpo secundario y se lavó con PBS -Tritón al 0.3% durante 10 minutos y después con PBS. Finalmente se montaron con DAPI Vectastain para la tinción de núcleos y se guardaron a 4°C protegidos de la luz hasta su análisis en el Microscopía de fluorescencia en un Confocal LSM 780 Carl Zeiss

Análisis de expresión génica

Se extrajo RNA de los fibroblastos de cinco pacientes en dos condiciones: fibroblastos pase 2, cultivados en frascos de poliestireno y fibroblastos sembrados sobre copolímero en pase 3, ambos extrayéndose a los 8 días de cultivo. La extracción de RNA se realizó a través del "RNeasy Plus Mini Kit" (Quiagen). Al inicio, se retiró el medio en que se encontraban las células, se lavó con PBS y se agregó buffer de lisis; con ayuda de un separador celular, se recuperó el extracto celular y se trasladó a tubos "eppendorf" tratados con DPCE. Mediante los componentes del Kit mencionado, se aisló y purifico sólo el RNA. La cuantificación del ácido ribonucleico se determinó con el equipo "Nanodrop" (Thermo Scientific). Posteriormente se llevó a cabo la RetroTranscripción para obtener DNAc y efectuar la PCR-TR mediante "QuantiTect Reverse Transcription Kit" (Quiagen) en el "Thermal Cycle 2720" (Applied Biosystems). La PCR- Tiempo Real se realizó con "QuantiTect BYBR Green PCR Kit" (Quiagen) en el "Rotor Gene" (Quiagen). Los "primers" que se utilizaron pertenecen a la plataforma "QuantiTec Primer Assay" de Quiagen y correspondieron a Procolagena 1(QT00037793), Tropoelastina (QT00034594) y Fibrilina (QT00024507). Se usó actina (QT00095431) y GADPH (QT01192646) como genes constitutivos en la PCR.

Finalmente, los valores obtenidos de la expresión de los genes de interés fueron analizados con el programa REST® 2009 aplicando una prueba no paramétrica preestablecida por Quiagen.

RESULTADOS

Aislamiento de fibroblastos por digestión con colagenasa.

El aislamiento de los fibroblastos se realizó primero mediante la separación dermoepidérmica y posteriormente por digestión de la dermis. En la Figura 7 se observa la piel después de la incubación con dispasa (separación dermoepidérmica) con la cual fue posible separar epidermis de la dermis.

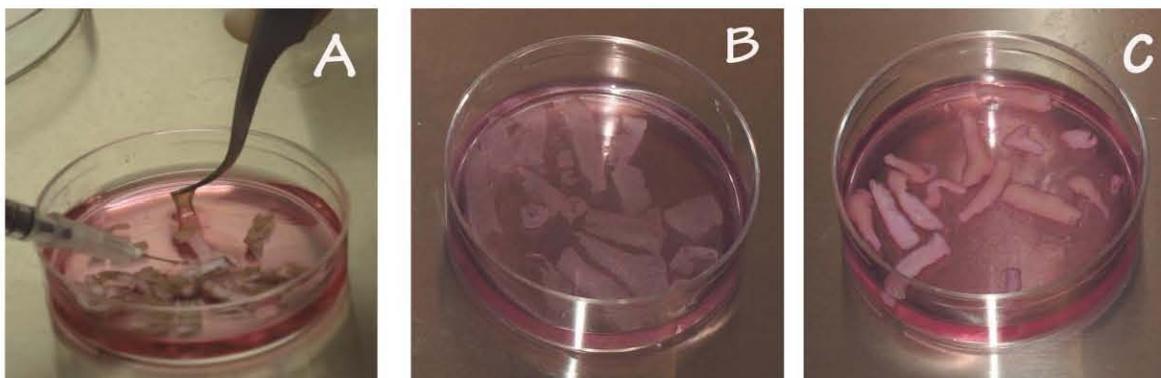


Figura 7. Separación dermoepidérmica tras su incubación con dispasa (2.4u/ml). La epidermis delgada y traslúcida (B) y las dermis de color blanco y más gruesa con respecto a la epidermis(C).

Las biopsias procesadas provenían de pacientes de diferentes edades (Tabla 7). Aunque las muestras presentaron diferente tamaño, en la tabla 7 se enlista el número de fibroblastos obtenidos por cm^2 , así como el porcentaje de viabilidad que se obtuvo tras la digestión con colagenasa. El promedio del rendimiento celular de todas las biopsias fue de 1.96×10^6 células / cm^2 con una desviación estándar de 7.5×10^5 mientras que el porcentaje de viabilidad promedio fue de 91%.

Tabla 7. Rendimiento celular y porcentaje de viabilidad de los fibroblastos aislados. Las biopsias seleccionadas para ser cultivadas sobre los copolímeros de Qui-PLA se denotan con letras (A-E).

No. biopsia	Edad del donante	% de viabilidad celular	Rendimiento celular (#células/ cm^2)
1	4	94	9.4×10^5
2(A)	4	93	1.048×10^6
3	8	96	2.8×10^6
4	8	95	1.4×10^6
5	12	90	1.7×10^6
6(B)	6	91	1.02×10^6
7	10	82	2.4×10^6
8(C)	6	91	2.6×10^6
9(D)	6	93	2.9×10^6
10	12	86	2.1×10^6
11(E)	7	90	2.3×10^6

Se seleccionaron 5 biopsias y se utilizaron sus fibroblastos para ser sembrados en las películas de Qui-PLA. Los criterios para la selección fueron el rendimiento celular, la edad y la viabilidad celular.

En relación a la edad, de manera arbitraria se eligieron los fibroblastos provenientes de los pacientes más jóvenes, en un intervalo de 4-7 años. El rendimiento celular fue un criterio secundario que también se valoró, por lo que a pesar que las biopsias 3, 8, 15 presentaron rendimientos mayores a los 2 millones de fibroblastos /cm² éstas no fueron seleccionadas por la edad de los pacientes que provenían y en alguno de los casos, también por la viabilidad celular que fue otro de los criterios que se tomó en cuenta. Se consideraron fibroblastos de pacientes de edades en un intervalo reducido para disminuir la variabilidad *per se* de las células, además de que las fibroblastos entre más jóvenes, mayor es su capacidad proliferativa.

Tomando en cuenta sólo las biopsias elegidas, la viabilidad celular fue de 91.6% y el rendimiento celular promedio de 2.01×10^6 células /cm².

Expansión de fibroblastos para su sembrado en los copolímeros de Qui-PLA.

Los fibroblastos recién aislados se congelaron de 4-7 meses a -80°C, fueron descongelados para mantenerse en condiciones estándares de cultivo hasta el segundo pase. Cuando estuvieron al 90% de confluencia se tripsinizaron para ser resembrados. En la Figura 8 se muestra un cultivo de fibroblastos *in vitro* en donde se observa la morfología de las células cuando se sembraron en frascos de cultivo durante el transcurso del proyecto. Se hace énfasis en la morfología evidenciando que en condiciones estándares este tipo celular presenta una morfología fusiforme, extendida o alargada que a pesar de que los fibroblastos fueron congelados, este proceso no afectó la morfología ni la viabilidad celular.

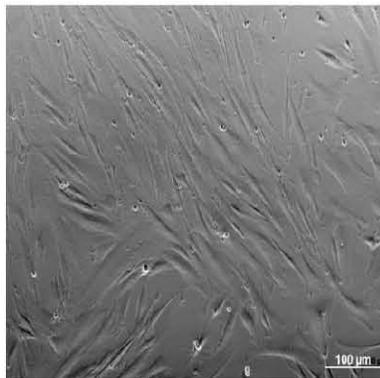


Figura 8. Morfología fusiforme típica de fibroblastos aislados de prepucio y mantenidos en frascos de cultivo. Los fibroblastos adoptaron esta morfología desde las 24 horas posteriores a su siembra.

Cultivo de fibroblastos en el copolímero de Qui-PLA

Los fibroblastos fueron cultivados en diferentes lotes y sembrados en el pase tres. El primer lote estuvo conformado de 4 sublotes (A, B, C y D). En la tabla 8 se enlistan las características observadas de cada uno de los sublotes correspondientes al primer lote.

Tabla 8. Características físicas y químicas del primer lote de Qui-PLA, sublotes A, B, C y D.

SUBLOTE		Características
A		Con catalizador 1 Reacción por policondensación Color oscuro Rugoso
B		Con catalizador 2 Reacción por apertura de anillo Color oscuro Rugoso
C		Sin catalizador Reacción por policondensación Color claro Liso
D		Sin catalizador pero con sorbitol Reacción por policondensación Color claro Liso

En la Tabla 8, se observa que en cuanto a sus características físicas, los copolímeros A y B eran de un tono más oscuro con superficies rugosas. En tanto que el polímero C y D tuvieron en común que ambos eran más claros, lisos, más delgados con respecto a A y B. En cuanto a su síntesis, al sublote A y B se les adicionaron un catalizador, mientras que C y D no. Éste último tiene sorbitol D que sirvió como un plastificante para la mejor formación de la película. Las reacciones de síntesis para A, C y D fueron la misma, por policondensación, y sólo el sublote D fue mediante una reacción de apertura de anillo.

La siembra en seco del primer lote, presentó algunas limitantes que dificultaron el cultivo de los fibroblastos sobre el material. Algunas de ellas fueron: el cambio de tamaño de las películas al ser lavadas y después secadas lo que no permitió cubrir el fondo del pozo donde se colocaron y cultivaron (Fig. 9C, C'); y por otra parte, la modificación en la forma del material (Fig. 9A, A'), ya que cuando las películas se secaban, dejaban de estar planas y se ondulaban propiciado que la gota que contenía las células se desbordara y cayeran gran parte de ellas por debajo de las películas.

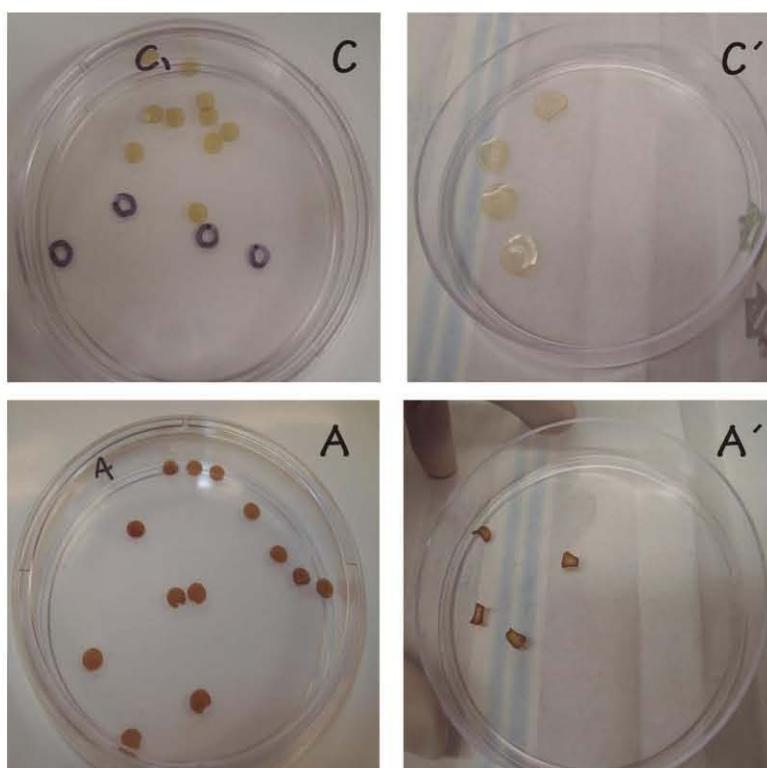


Figura 9. Modificaciones de las películas después de su lavado. En C, C' el aumento de tamaño y en A, A' la modificación de su forma plana a ondulada después de secarse.

Para el lote 2, los componentes y la reacción de síntesis de los sublotos A, B, C, y D se mantuvieron, los rasgos adicionales fueron: la purificación con acetona que se les aplicó después de la formación de las películas y un mayor tiempo de despigmentación para aclarar el color de los copolímeros. La siembra de los fibroblastos se realizó en húmedo y por regiones para evitar el que las células cayeran por debajo de la película. Las características de los nuevos sublotos son enlistadas en la Tabla 9.

Tabla 9. Características físicas y químicas de los Copolímeros de Qui-PLA sublotes A, B, C, D del segundo lote con la implementación de la purificación con acetona

SUBLOTE		Características
A		Con catalizador 1 Reacción por policondensación Color claro Liso Purificación con acetona 12 horas
B		Con catalizador 2 Reacción por apertura de anillo Color claro Liso Purificación con acetona 12 horas
C		Sin catalizador Reacción por policondensación Color claro Liso Purificación con acetona 12 horas
D		Sin catalizador pero con sorbitol Reacción por policondensación Color claro Liso Purificación con acetona 12 horas

A partir del lote 3, únicamente se evaluó el sublot C.

La formación de agregados celulares se presentó desde el primer día de cultivo independientemente del tipo de siembra.

El cultivo de los fibroblastos sobre las películas mostró un rasgo en común en los diferentes tipos de siembra que se estudiaron en este trabajo. Éste fue la presencia de agregados celulares desde el primer día de cultivo sobre los materiales.

Con el fin de determinar si la formación de los agregados estaba influenciada con la manera de sembrar los fibroblastos, se comparó sembrar en las películas secas colocando las células en una gota de medio e incubar durante 2 horas antes de agregar el medio total, sémicas y sembrarlas en húmedo por regiones sobre el copolímero, o cubriendo el material completamente con un volumen de medio en el cual las células estuvieron resuspendidas.

En los tres tipos de siembra, los fibroblastos se observaron individuales inmediatamente después de sembrados (Fig. 10 A, B,C)

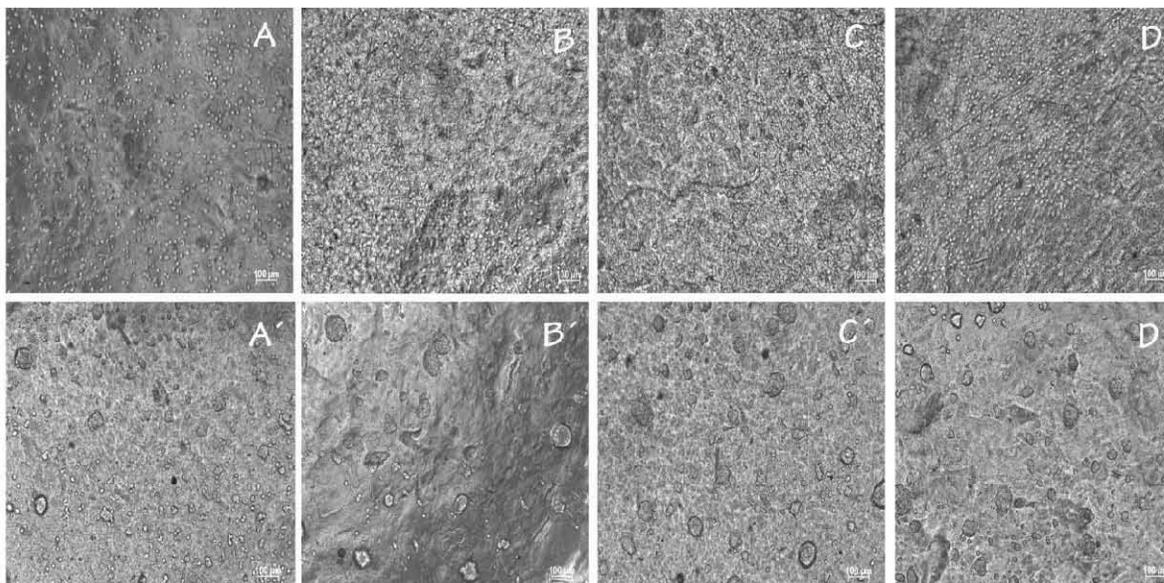


Figura 10. Siembra de fibroblastos en copolímeros Qui-PLA. En A, siembra seca, B siembra semiseca 2 horas, C húmedo por regiones y D húmedo resuspensión. En los paneles inferiores se observan las células después de un día de cultivo sobre la película. En todos los casos se formaron agregados celulares. (Barra 100µm)

No obstante, independientemente de si el copolímero fue sembrado en seco o en húmedo, o si las células se sembraron en regiones o en resuspensión, se observó la presencia de esos cúmulos al siguiente día de su siembra sobre el andamio (Fig.10,A'-C'), lo que sugiere que posiblemente la razón por la cual los fibroblastos pierden su individualidad y se organizaron en esos agregados podrían estar relacionados con la interacción que tienen los fibroblastos con el copolímero de Qui-PLA y no con una ineficiente tripsinización de los fibroblastos o con el método de sembrado.

Una vez que se logró cultivar fibroblastos humanos sobre las películas, se evaluó si estando en la condición de agregados, o de manera individual, las células se mantenían vivas o no, por lo que se procedió a evaluar si viabilidad.

Viabilidad celular

La acidez del lote 1 de copolímeros de Qui-PLA afectó la viabilidad de los fibroblastos.

El primer lote de copolímeros tuvieron un pH ácido, y debido a que este pH no es compatible con ningún cultivo celular, se procedió a determinar qué condición de lavado era el más adecuado para neutralizar y promover la biocompatibilidad de los lotes con los fibroblastos de prepucio (Tabla 5). La condición de lavado A fue ensayada con medio DMEM y se observó que para los 4 sublotes de copolímeros el medio viraba a un tono amarillo inmediatamente, lo que indicaba la acidez de las películas.

Se implementó, la condición de lavados B utilizando PBS y medio DMEM neutro, sin embargo no se logró abatir la acidez y esto se vio reflejado en las pruebas de viabilidad como lo muestra la Figura 11, en donde los copolímeros A y B se encontraron los más altos porcentajes de células muertas, en el copolímero D el porcentaje de vivas y muertas es similar mientras que fue en el copolímero C donde mayor porcentaje de viabilidad se presentó con respecto a los otros tres, sin embargo con un 40% de mortalidad. Los fibroblastos se apreciaron en los 4 sublotes con una morfología redonda.

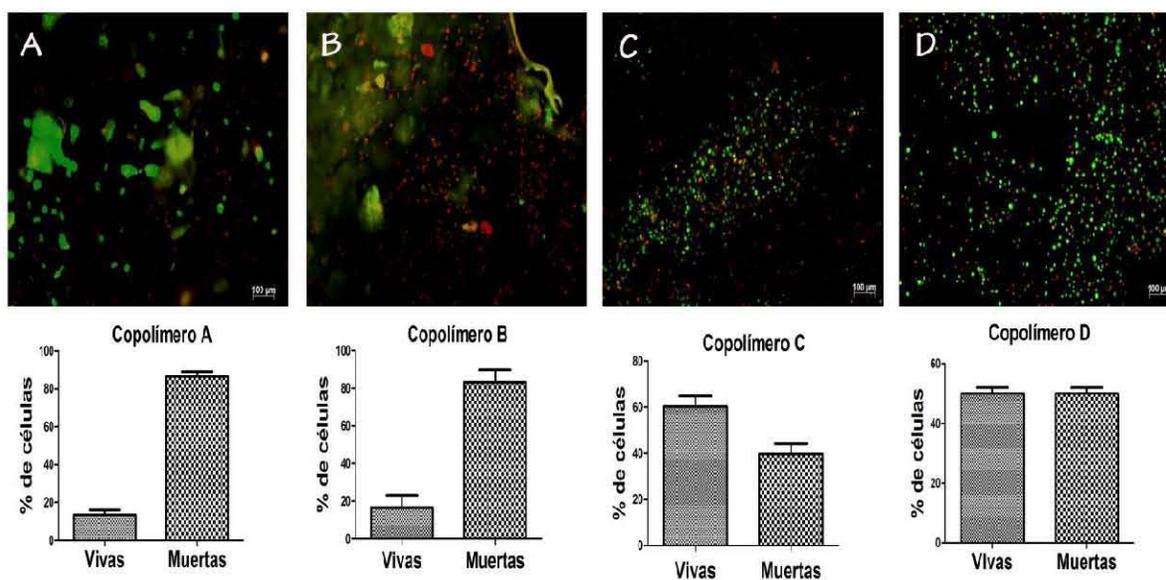


Figura 11. Viabilidad de fibroblastos al 5° día de cultivo en Copolímeros Quitosano-PLA lote 1, sublotes A, B, C, D, posterior a los lavados con medio neutro y PBS. En verde las células vivas y en rojo las muertas. Las gráficas corresponden al porcentaje de viabilidad y mortalidad en cada lote.

Debido a que el porcentaje de viabilidad en la mayoría de los lotes de copolímeros estuvo por debajo del 60%, se implementó la condición de lavado C con medio alcalino, como alternativa para neutralizar la acidez de las películas.

Los lavados con medio alcalino aumentaron la viabilidad celular del lote 1

Con la implementación de los lavados alcalinos, la viabilidad aumentó. Sin embargo la morfología de los fibroblastos fue redonda aún en células viables (Fig.12). Las gráficas (Fig.12) muestran que en los sublotes A y B, la viabilidad se encuentra oscilando entre el

30 y 35%, y sólo el lote C y D rebasa el 50% de viabilidad, nuevamente el copolímero C muestra el mayor porcentaje de células vivas con un 78%.

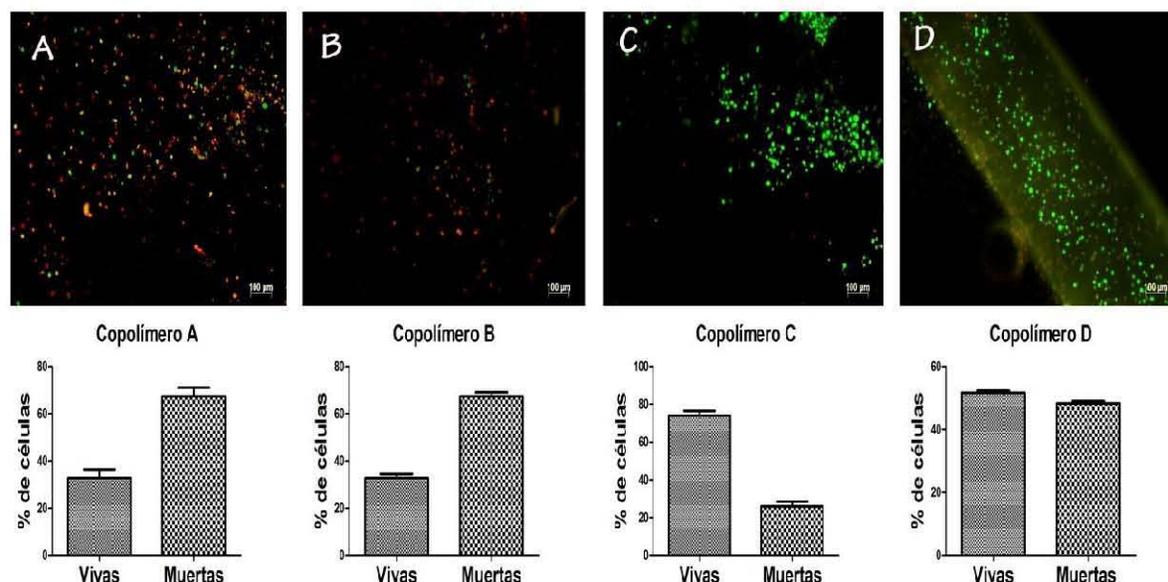


Figura 12. Viabilidad de fibroblastos en el 5° día de cultivo sobre copolímeros Qui-PLA, lotes A, B, C, D después de la neutralización con los lavados alcalinos. Los lotes A, B muestran un porcentaje de viabilidad menor 50%, el D de 50%, mientras que sólo el lote C mostró el mayor porcentaje de células vivas. En los cuatro lotes, los fibroblastos no mostraron una morfología extendida.

Para aumentar el porcentaje de viabilidad de las películas, se sintetizó un segundo lote purificándolo con acetona

Purificación con acetona neutralizó la acidez de las películas del lote 2 y aumentó la viabilidad celular hasta un 80%

La viabilidad celular se incrementó cuando los copolímeros tuvieron un pH fisiológico. Las gráficas muestran como los lotes A, C y D alcanzaron el 80% de viabilidad y el B estuvo cerca de esta cifra. Sin embargo a pesar de que los fibroblastos fueron viables, su morfología seguía siendo redonda. El quitosano presentó autofluorescencia que fue evidente al momento de capturar las imágenes (Fig. 13).

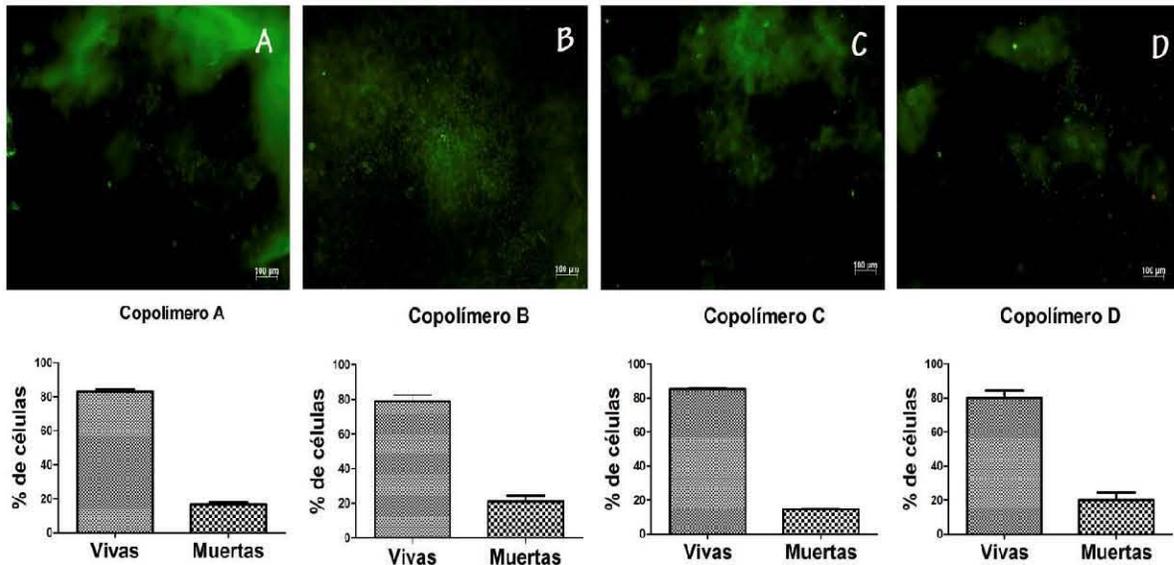


Figura 13. Viabilidad de fibroblastos sembrados en copolímeros de Qui-PLA en sublotes A, B, C, D purificados con acetona. El copolímero C mostró el mayor % de viabilidad con un 85%. La morfología de los fibroblastos no fue la habitual de los fibroblastos.

La viabilidad celular se logró incrementar en los 4 sublotes probados, sin embargo en ninguno de ellos se pudo observar que los fibroblastos adoptaran una morfología extendida, como típicamente ellos la presentan. Por tal razón, se lijaron las superficies de las películas para conocer si esto teniendo algún efecto en la morfología de los fibroblastos viables.

El desgaste de la superficie de las películas del lote 2 mejoró la morfología de los fibroblastos viables sólo en los sublotes C y D.

Se lijó la superficie de los copolímeros A, B, C y D y se aplicó la condición de lavado D. Las pruebas de viabilidad mostraron que de los 4 sublotes de copolímeros, en el copolímero C y D se observaron fibroblastos alargados, y con una viabilidad mayor al 80% (Fig. 14). En el resto de los sublotes, aunque vivas, las células se observaron redondas y con una confluencia del 5%, menor con respecto a los copolímeros C y D.

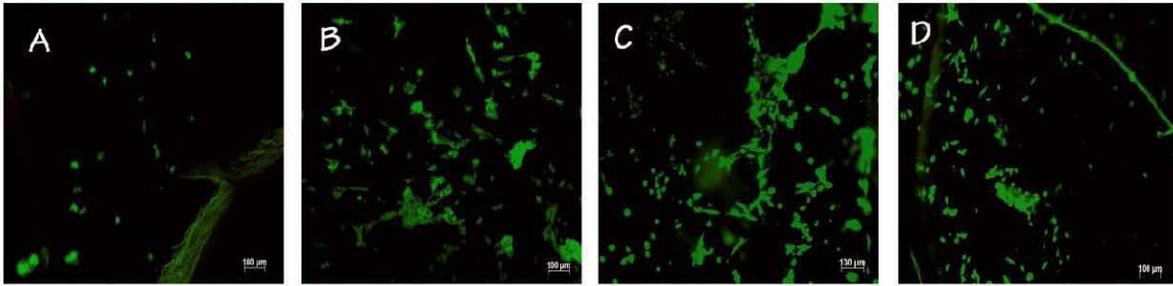


Figura 14. Viabilidad (A-D) de fibroblastos al 5^o día de cultivo sobre los copolímeros de Qui-PLA, sublotes A, B, C, D en donde se implementó la purificación con acetona y el lijado de la superficie. Sólo en los copolímeros C y D se observó la morfología típica de los fibroblastos.

De acuerdo a los resultados de los 4 sublotes del lote 2, en donde fueron purificados con acetona y lijados, los copolímeros C y D sobresalieron por tener los porcentajes más altos de viabilidad y la morfología extendida con respecto a los copolímeros A y B, se continuó trabajando con los copolímeros C y D que fueron los que mostraron una confluencia mayor sobre las películas y una morfología extendida de las células.

La viabilidad de los fibroblastos se evaluó a 12 días de cultivo únicamente en los sublotes C y D que habían sido los de los mejores resultados. Se observó que ambos mantuvieron un porcentaje de viabilidad superior al 90%, sin embargo solo el copolímero C mostró a los fibroblastos extendidos y ya cubriendo gran extensión de su superficie con una confluencia del 78% (Fig.15C).

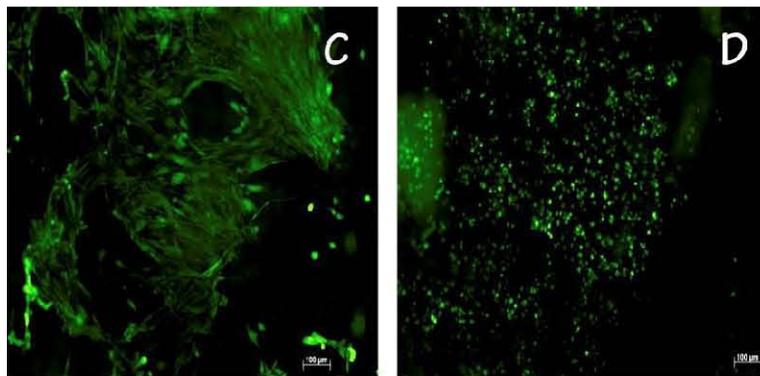


Figura 15. Viabilidad de fibroblastos a los 12 días de cultivo en copolímeros C y D purificados con acetona y lijados. Nótese que únicamente en C se conservó la morfología extendida.

Basándose en que a los 12 días de cultivo, en el copolímero D las células no se observaron con una morfología extendida y retomando los resultados de viabilidad obtenidos desde el lote 1, en donde C siempre fue el sublote con el mayor porcentaje de células vivas, se concluyó seguir trabajando únicamente con el lote C. De esta manera se evaluó la viabilidad del copolímero C a otros tiempos.

El copolímero C mostró una viabilidad cercana al 100% a los 15 días de cultivo

El lote 3 de copolímero C que se trabajó para continuar los objetivos de este proyecto, fue purificado con acetona durante 12 horas, fue lijado, hidratado con la condición D de lavado ya descrita y sembrado en húmedo el mismo día en que se efectuaron los lavados.

El sembrar en húmedo aumentó la probabilidad de que las células se mantuvieran sobre el copolímero ya que las películas no se plegaron ni ondularon estando húmedas. Por otro lado, la implementación de los lavados con agua desionizada y estéril después de los lavados con PBS y medio alcalino, logró lavar los restos de dichas soluciones que pudieran afectar a los fibroblastos.

La combinación de purificar con acetona y aplicar la modalidad de lavado D, propició que se obtuvieran unos mejores resultados tanto de viabilidad, de morfología, así como de confluencia celular sobre el material. A continuación se muestran las imágenes de las pruebas de viabilidad evaluadas a 3 diferente tiempos, 5, 10 y 15 días de cultivo en placas de 48 pozos (Fig. 16).

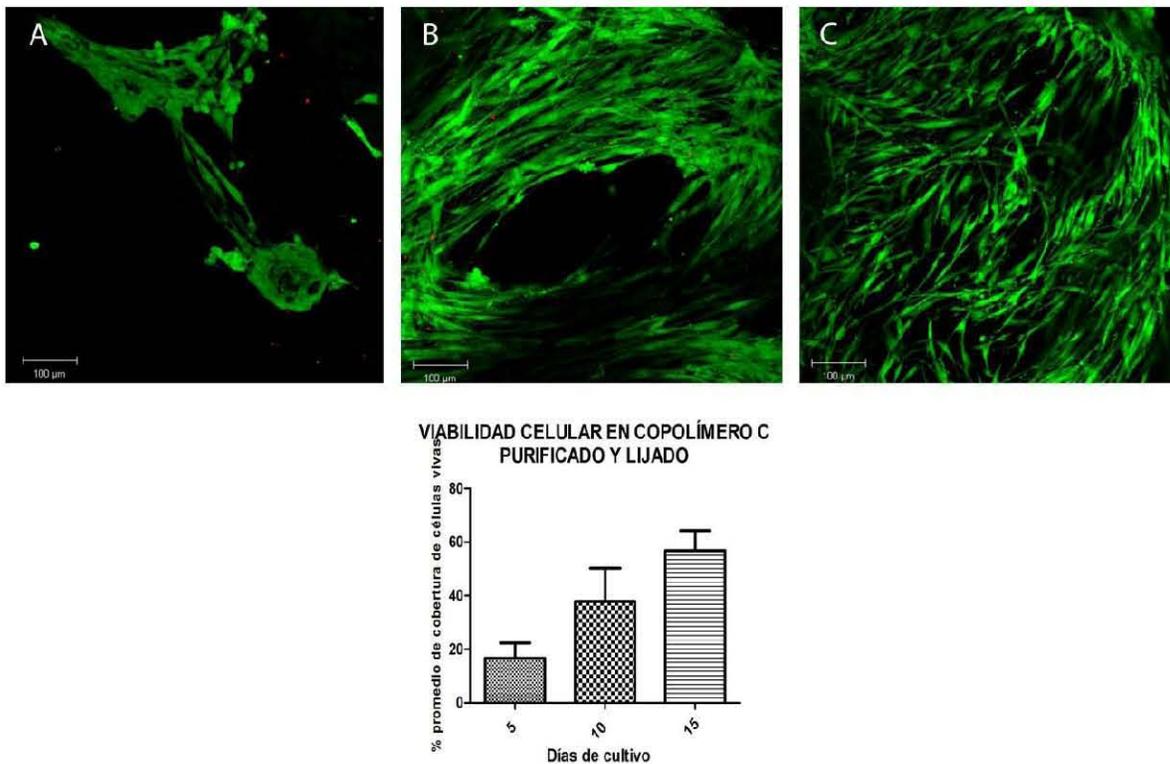


Figura 16. Viabilidad de fibroblastos sobre el copolímero C purificado con acetona y lijado A) 5 días, B) 10 días y C) 15 días de cultivo. En verde las células vivas, con una morfología extendida que gradualmente van cubriendo la superficie del material.

Los resultados de viabilidad fueron mayores al 90% y se observaron agregados o cúmulos celulares en donde los fibroblastos se mantuvieron redondos. Debido a esto, no fue posible hacer un conteo, así que se calculó el porcentaje de la confluencia sobre el copolímero.

Se observó que a los 5 días de cultivo, hubo presencia de algunos agregados celulares y posteriormente a los 10 y 15 días se observaron a los fibroblastos individuales y extendidos. Debido al arreglo agregado que presentaron, no fue posible cuantificarlos pero se calculó el porcentaje de confluencia promedio que mantuvieron en cada uno de los días evaluados. De esta manera se obtuvo que a los 5 días de cultivo, los fibroblastos cubrieron el 16% de la superficie, a los 10 días el 37% y a los 15 días un 56% de la superficie del copolímero. Los fibroblastos mostraron un porcentaje de viabilidad de 97% y con una tendencia a lo largo de los días a alcanzar una confluencia.

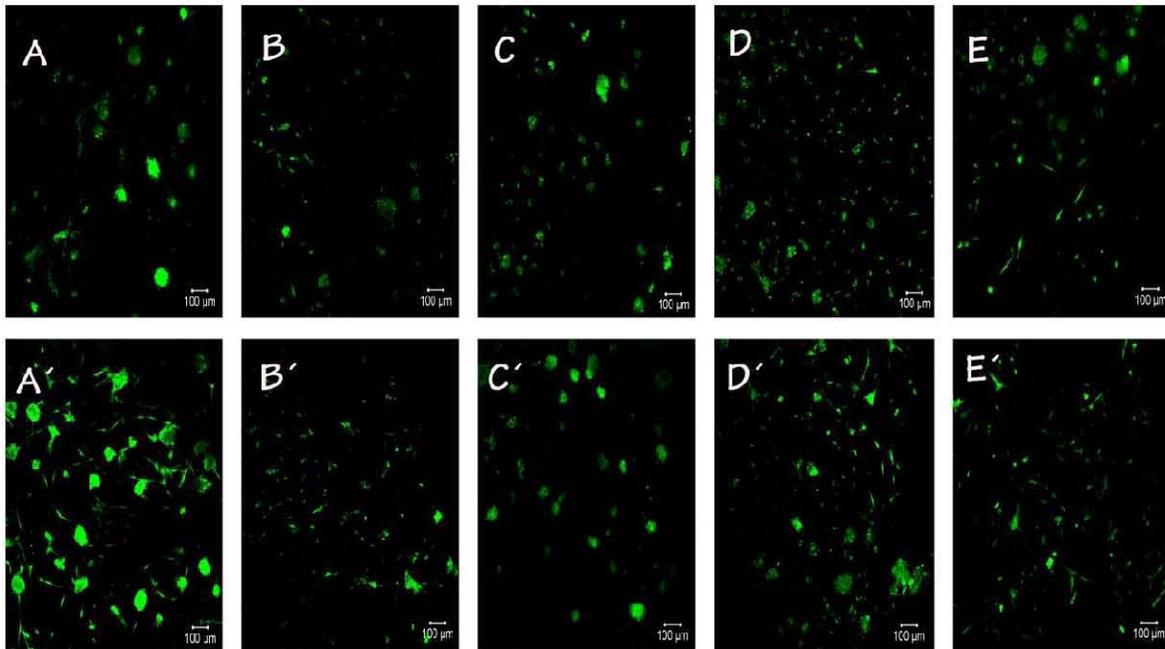
Para determinar si el modo de siembra o procedencia de las células estaban influyendo en la viabilidad y confluencia, se compararon dos tipos de siembra: la semiseca y la húmeda.

La modalidad de siembra en húmedo en resuspensión fue la que mayor confluencia de células viables mostró con respecto a la semiseca de 2 horas.

Se realizaron pruebas de viabilidad con los fibroblastos provenientes de 5 pacientes a los 2, 4, 6 y 8 días. El porcentaje promedio de viabilidad para el día 2 en ambas modalidades de siembra fue del 96%, aunque las células se observaron formando en su mayoría aglomerados (Fig.17).

A los 2 días de cultivo, las pruebas de viabilidad revelaron que en el caso de siembra en semiseco, la confluencia promedio para todos los pacientes fue de 4% observándose a los fibroblastos en agregados aislados en donde las células del paciente B y E se pudieron apreciar extendidas (Fig. 17B, E).

Para el caso de la siembra en húmedo y resuspensión, los fibroblastos se observaron también en agregados pero en mayor cantidad, lo cual se vio reflejado en la confluencia promedio para los 5 pacientes, siendo ésta de 8%, duplicando el valor obtenido en la otra modalidad de siembra. En la siembra en húmedo también se observaron fibroblastos extendidos del paciente A y D (Fig.17 A', D'). Cuando se compraron por paciente, los tipos de siembra, se encontró que de acuerdo al análisis estadístico, sólo en el paciente D existió una diferencia significativa en la confluencia mostrada, sugiriendo que la siembra en húmedo promovía una mayor confluencia.



VIABILIDAD
SIEMBRA SEMISECA VS HÚMEDA
(2 días)

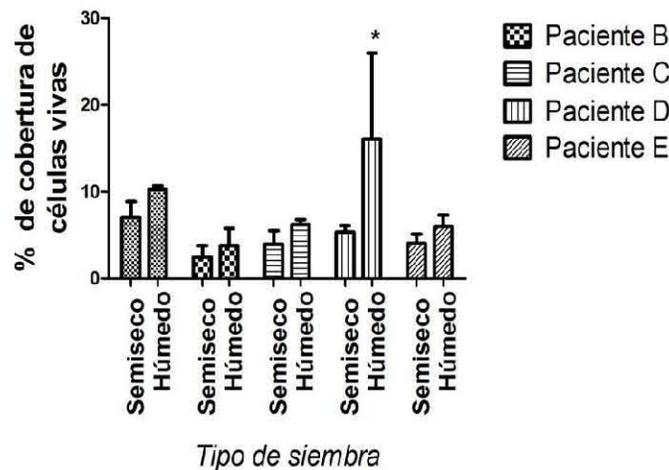


Figura 17. Viabilidad a los 2 días de cultivo para fibroblastos provenientes de 5 pacientes (A, B, C, D, E) sembrados sobre copolímero C cara lisa lijada. Paneles superiores probando la siembra 2 horas de secado y en los inferiores, siembra en húmedo y resuspensión. Prueba de Tukey mostró diferencias significativas en el paciente D al comparar los tipos de siembra ($p=0.0036$, $p>0.05$).

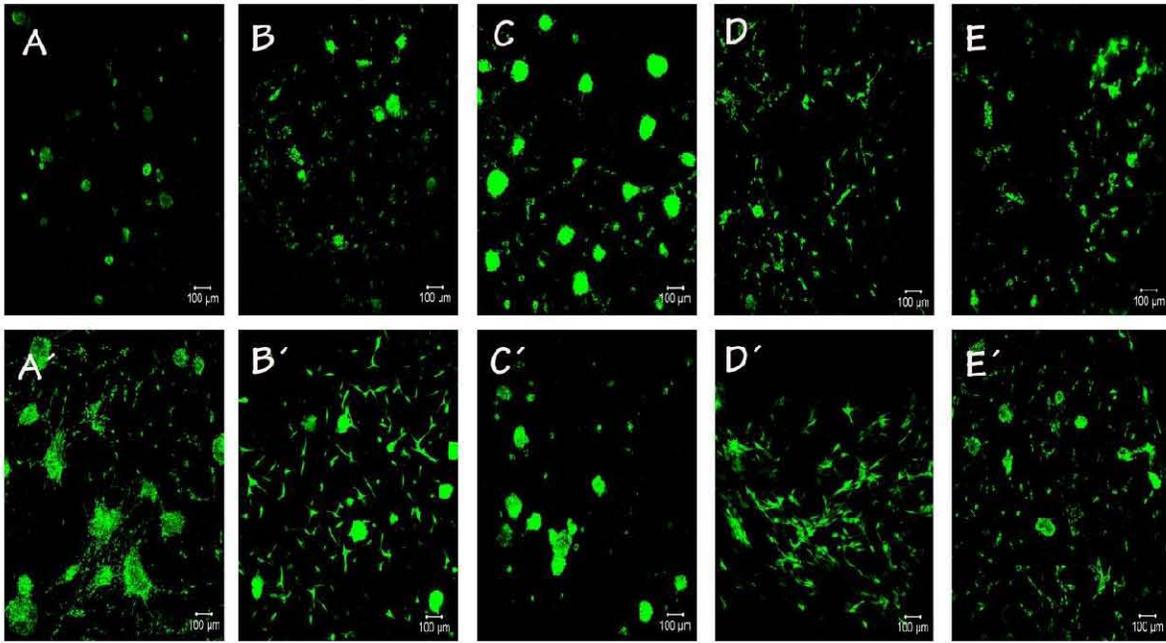
En la Figura 18 se muestran los resultados de viabilidad a los 4 días de cultivo, donde el porcentaje promedio fue de 95% sin embargo, contrastando los tipos de siembra, nuevamente se observó mayor número de células fusiformes en la siembra del copolímero en húmedo y resuspensión. Los aglomerados celulares persistieron en ambos tipos de siembra, semiseca y húmeda.

En la modalidad semiseca, la confluencia promedio de los 5 pacientes fue del 6%, observándose en el paciente B el valor más alto de esta modalidad. Para la siembra en

húmedo, la confluencia promedio fue de 17% en donde los fibroblastos del paciente D tuvieron el más alto valor de confluencia dentro de esta modalidad y de la semiseca.

Se encontró que los fibroblastos provenientes del paciente B que se habían mantenidos extendidos a los 2 días de cultivo siembra en seco, a los 4 días no conservaban esa morfología y que eran las células del pacientes D quienes la presentaban junto con las del paciente E que en ambas evaluaciones los fibroblastos se mantuvieron extendidos. Para la siembra en húmedo, las células del paciente A que a los 2 días habían mostrado fibroblastos extendidos, a los 4 días ya no mostraron esa morfología y sólo las del paciente D se mantuvieron así tanto a los 2 como a los 4 días. Las células del paciente C si continuaron tanto en el día 2 y 4 con una morfología redonda y para los dos tipos de siembra.

De manera global, a los 4 días y de acuerdo a los resultados de viabilidad y confluencia y morfología se tuvieron las cifras más altas en la siembra en húmedo y en resuspensión. Nuevamente, el único valor significativo entre pacientes contrastando los tipos de siembra, se obtuvo en los fibroblastos del paciente D, en donde la confluencia fue significativamente mayor en la siembra en húmedo con respecto a la semiseca.



VIABILIDAD
SIEMBRA SEMISECA VS HÚMEDA
(4 días)

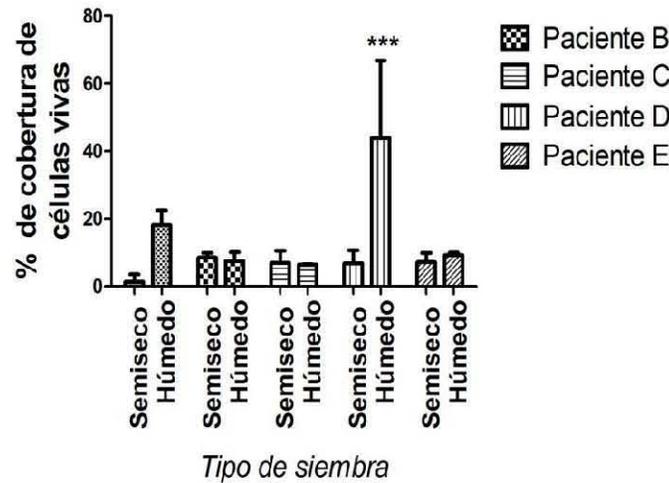
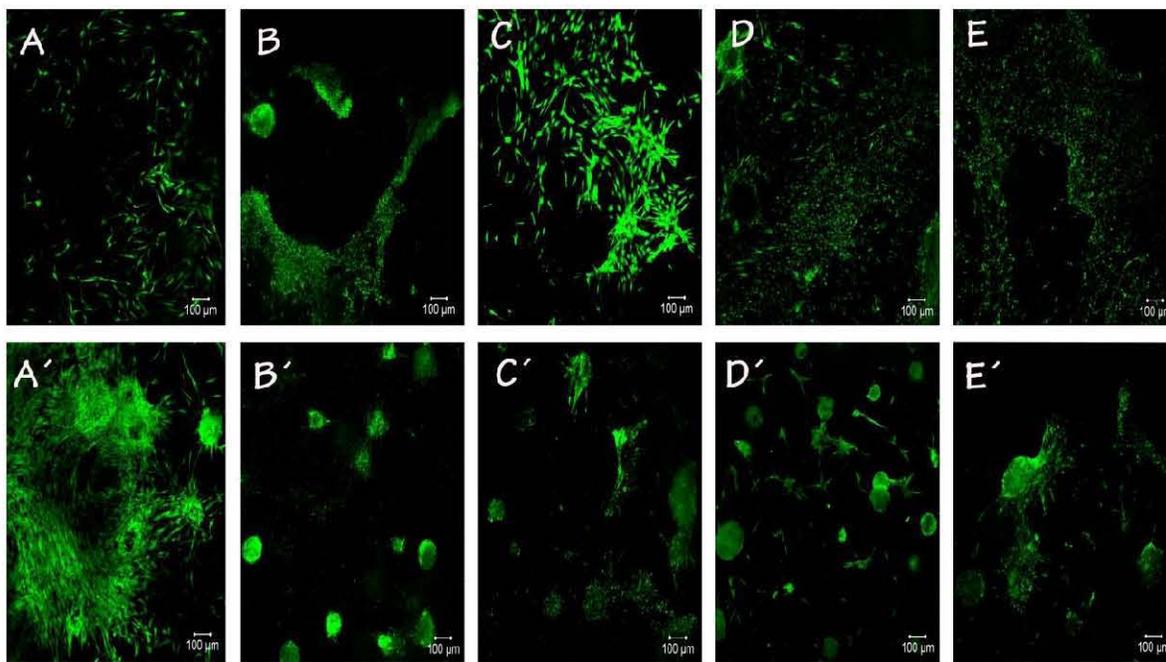


Figura 18. Viabilidad de celular a los 4 días de cultivo para fibroblastos provenientes de 5 pacientes (A, B, C, D, E) sembrados sobre copolímero Qui-PLA. Paneles superiores probando la siembra 2 horas de secado y en los inferiores, siembra en húmedo y resuspensión. Prueba de Tukey mostró diferencias significativas en el paciente D al comparar los tipos de siembra ($p=0.001$, $p>0.05$).

La viabilidad en el día 6 fue en promedio de 97% para ambas modalidades de siembra. Considerándose la morfología de los fibroblastos, se tuvo en las células del paciente C que a los 2 y 4 días de cultivo había sido redonda, a los 6 días en la modalidad de semiseco se observaron 100% extendidos. La siembra en húmedo que en el día 2 y 4 había presentado fibroblastos alargados, a los 6 días se encontró gran cantidad de agregados celulares y escasas células extendidas en 4 de los 5 pacientes. Los fibroblastos del paciente A sí lograron mantenerse extendidos (Fig. 19 A).

En cuanto a la confluencia, la siembra en semiseco tuvo un porcentaje promedio para todos los pacientes de 46% en donde 4 de los 5 pacientes presentaron una confluencia entre 48-53%. En contraste, la modalidad de siembra en húmedo tuvo la mitad de la confluencia promedio obtenida en la siembra semiseco, con 23%. A pesar de esto, fueron los fibroblastos del paciente A en siembra húmeda quienes presentaron el más alto porcentaje de confluencia para ambos tipos de siembra, con el 55%. De acuerdo al análisis estadístico, no hubo diferencia significativa entre las confluencias de cada uno de los pacientes al comprar los dos tipos de siembra.



VIABILIDAD
SIEMBRA SEMISECA VS HÚMEDA
(6 días)

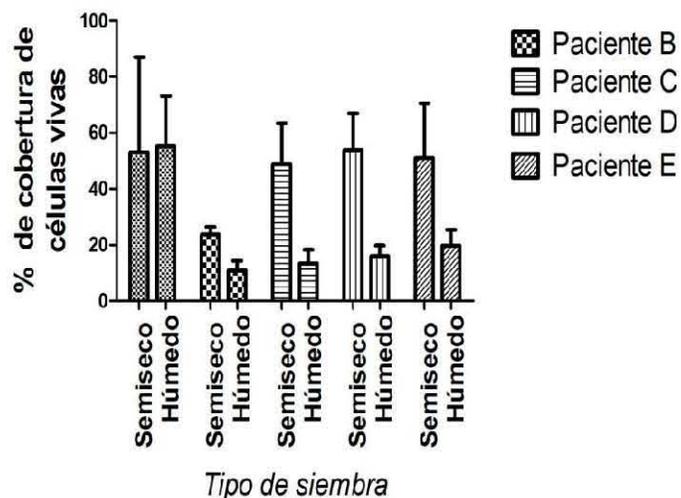
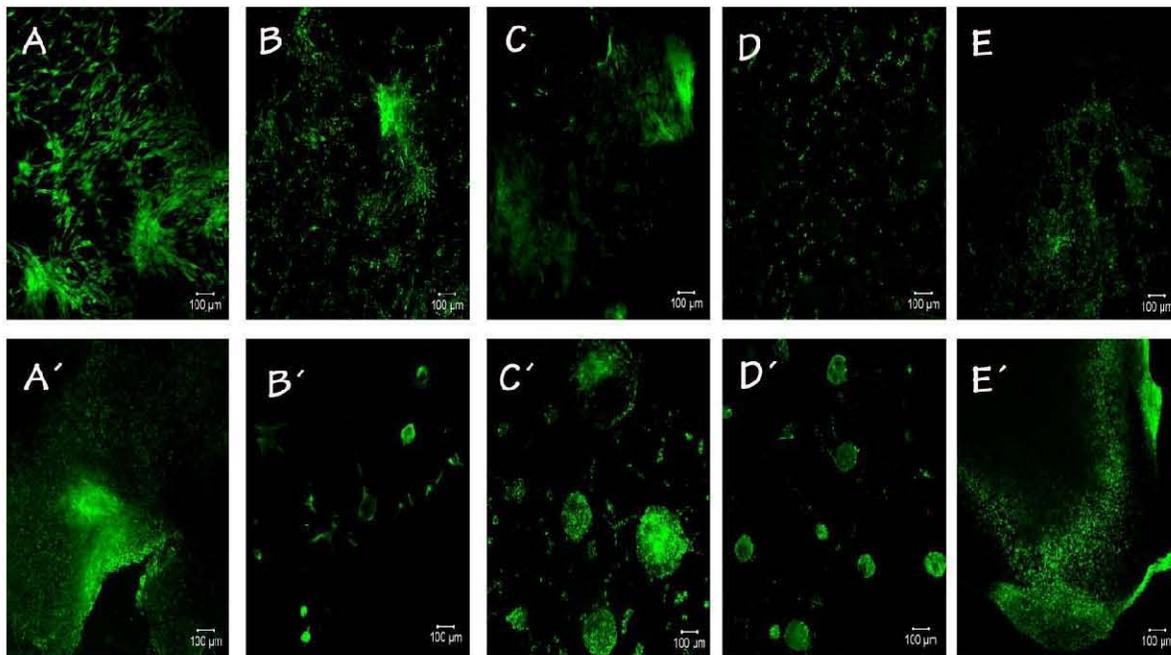


Figura 19. Viabilidad de celular a los 6 días de cultivo para fibroblastos provenientes de 5 pacientes (A, B, C, D, E) sembrados sobre copolímero Qui-PLA. Paneles superiores probando la siembra 2 horas de secado y en los inferiores, siembra en húmedo y resuspensión. Se encontró las confluencias más altas en la siembra en semiseco 2 horas. No se encontraron diferencias significativas en las confluencias de acuerdo a la Prueba de Tukey ($p=0.0018$, $p>0.05$).

Finalmente, el porcentaje de viabilidad promedio para ambas modalidades al día 6 de siguió siendo de 97%. La siembra en semiseco no mostró aglomerados celulares en ninguna de las células de los 5 pacientes. Los fibroblastos de los pacientes A, B, y E (Fig.20 A, B, y E) obtuvieron confluencias entre los 45%-23% con células extendidas en su totalidad, mientras que en los pacientes C y D presentaron el 8%. La confluencia promedio para la siembra sémica fue de 24%

Por otro lado, en la siembra húmeda y resuspensión, los mejores resultados se pudieron observar en los fibroblastos del paciente A y E (Fig. 20A',E') en donde la confluencia de células viables, rebaso el 60% mientras el resto de los pacientes, se encontraron agregados celulares y pocos fibroblastos fusiformes, así como confluencia bajas entre los 3-16%. La confluencia promedio en la siembra en húmedo fue de 29%. Estadísticamente, no se presentaron diferencias significativas entre las confluencias obtenidas en cada paciente para cada modalidad de siembra.



VIABILIDAD CELULAR
SIEMBRA SEMISECA VS HÚMEDA
(8 días)

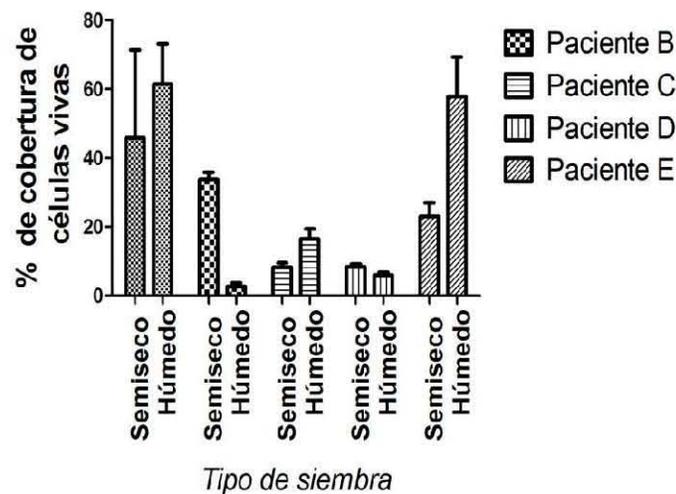


Figura 20. Pruebas de viabilidad de celular a los 8 días de cultivo para fibroblastos provenientes de 5 pacientes (A, B, C, D, E) sembrados sobre copolímero Qui-PLA. Paneles superiores probando la siembra 2 horas de secado y en los inferiores, siembra en húmedo y resuspensión.. No se encontraron diferencias significativas en las confluencias de acuerdo a la Prueba de Tukey ($p=0.0011$, $p>0.05$).

Con base a los resultados obtenidos de las evaluaciones a los diferentes días de cultivo, las pruebas de viabilidad indican que en ambos tipos de siembra, la viabilidad promedio se mantuvo igual o mayor a 95%. La morfología de los fibroblastos fue el parámetro que mayor variabilidad presentó sin poder generalizar si las células se observaron extendidas en alguno de los tipos de siembra o si fue las células de algún paciente mostraron una morfología extendida sobre las del resto y en todas las evaluaciones. Lo que se puede concluir es que en los días 2, 4 y 8, la confluencia fue mayor en la siembra en húmedo, mientras que para el día 6 fue lo contrario y la siembra semiseca presentó mayor confluencia. Estadísticamente, existió una mayor confluencia en la siembra en húmedo al menos para el paciente D a los 4 días. Considerando lo anterior, fue como se determinó elegir la siembra en húmedo para seguir ensayando los siguientes lotes de copolímero C.

También se observó que los porcentajes de confluencia fueron aumentando conforme mayor era el número de días de cultivo, exceptuando lo que se encontró para el día 8 donde en la siembra en semiseco, la confluencia disminuyó con respecto al día 6, de 46% a 24%

Dada la variabilidad que se presentó en las evaluaciones anteriores en cuanto a la morfología de los fibroblastos de los 5 pacientes, para determinar si la procedencia de ellos presentaba alguna tendencia por formar agregados celulares, se cultivaron las células de todos los pacientes en frascos de cultivo para evaluar su viabilidad y morfología.

Viabilidad celular de fibroblastos cultivados en placa multipozo

Para evidenciar la morfología, la viabilidad y la confluencia que presentaron los fibroblastos de los diferentes pacientes cultivados sobre placa multipozo, se realizó una prueba de viabilidad a los 2 días de cultivo, como se observa en la Figura 21 en ningún de los casos se presentaron cúmulos celulares.

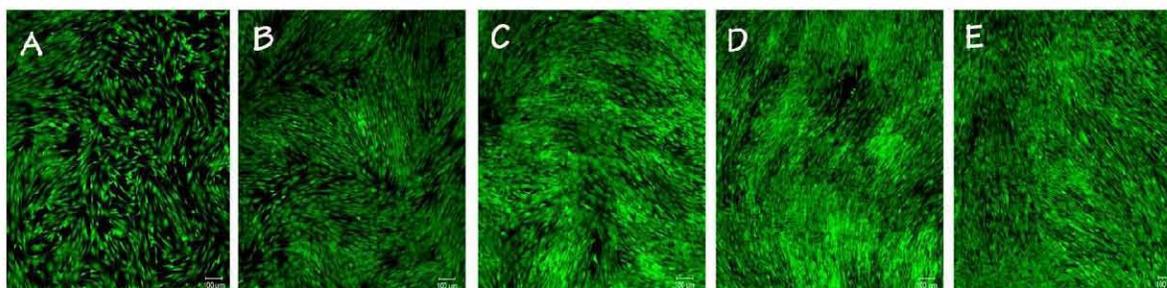


Figura 21. Viabilidad de fibroblastos de los pacientes A-E sobre placas de cultivo a los 2 días de cultivo. Independientemente de la procedencia de los fibroblastos, en todos los casos, éstos se observan extendidos y con una confluencia cercana al 100%

El porcentaje de viabilidad para los controles positivos de los fibroblastos de los 5 pacientes, fue del 99%, en donde desde el primer día de cultivo se observó a las células extendidas cubriendo a los 2 días de cultivo el pozo donde fueron sembrados. Al observarse en los cinco pacientes una morfología alargada en los cultivos de los fibroblastos en placa de poliestileno, se propone que es la interacción de las células con el polímero lo que repercute en los cambios morfológicos.

Debido a la tendencia que existió de aumentar la confluencia conforme más días de cultivo se mantuvieron los fibroblastos sembrados en los copolímeros, se dejó cultivar 30 días para observar el efecto en la confluencia celular y evaluar si los fibroblastos se mantenían vivos hasta entonces.

Los copolímeros mostraron una viabilidad y confluencia cercanas al 100% a los 30 días de cultivo.

Las pruebas de viabilidad realizadas al mes de cultivo, revelaron que el copolímero estaba totalmente confluyente, es decir, que la confluencia de células vivas era de un 100% e inclusive se observó que se encuentran distintas capas ya que cuando se trató de enfocar con el Microscopio fue posible observar que las células se encontraban en distintos planos. Además de que el porcentaje de células vivas fue de 98%, se apreció la morfología extendida característica de este tipo celular a diferentes aumentos sin la presencia de esos agregados celulares (Fig. 22).

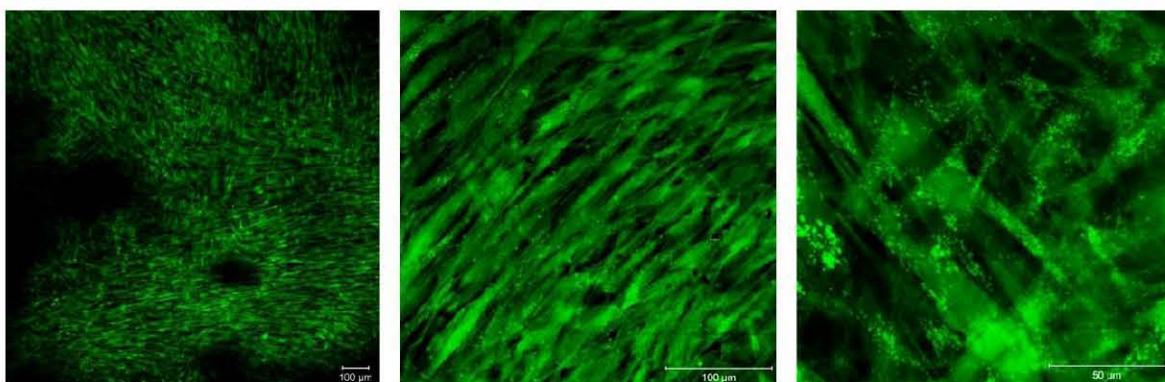


Figura 22. Viabilidad de fibroblastos a 30 días de cultivo en copolímero C. A tiempos tardíos, no se observaron cúmulos celulares y se llegó a la confluencia.

En los copolímeros cultivados por más de 30 días, puede sugerirse que los fibroblastos que forman los agregados observados hasta los 6 días de cultivo fueron capaces de abandonar las agrupaciones en días posteriores. El hecho de que a un mes de cultivo ya no se observaran aglomerados puede estar relacionado con que los mismos fibroblastos produzcan matriz y esto ayude a que éstos abandonen sus cúmulos y poco a poco al ir recubriendo la película con esa matriz para que vayan cubriendo toda la superficie del material o que también contribuyan a la erosión que el material sufrió haciendo una superficie más amigable para ellas. Las películas sufrieron una mayor erosión cuando tenían células que cuando sólo se mantenían con medio de cultivo.

Debido a que la confluencia total de fibroblastos viables fue obtenida hasta después de un mes de cultivo, nos fue importante obtener dicho resultado en menor tiempo y prescindiendo del paso metodológico de lijar las superficies, por lo que se sintetizó un nuevo lote de copolímeros C con una superficie lisa.

Películas del copolímero C sin lijar presentaron una viabilidad del 98% y una confluencia del 91% en menor tiempo que las lijadas.

La viabilidad promedio evaluada del día 2 al 15 fue de 98%. Además de eliminar el lijado de las películas, se probó la incubación de éstas con medio con Suero Bovino fetal una hora antes de que las películas fueran sembradas. La Figura 23 muestra las células viables a los diferentes días de cultivo, en donde ya no se observó la formación de esos agregados que se habían presentado en los anteriormente y los fibroblastos mostraron una morfología alargada desde el día 2 de cultivo. La confluencia celular (Fig. 23) a los 2 días fue del 24%, para el día 4 de 29%, día 6 de 45%, día 8 de 55% y a los 15 días de cultivo estuvo cerca de lograr la confluencia total, con un 91%.

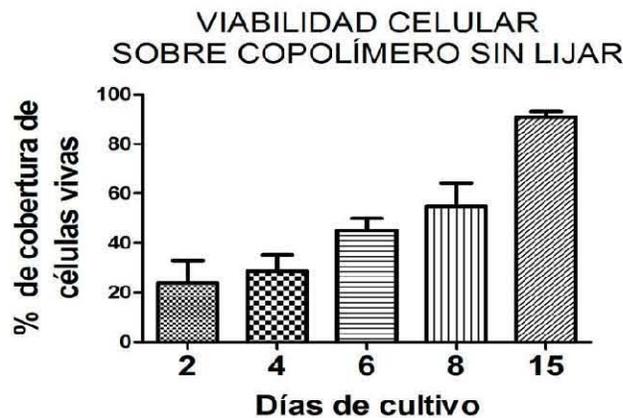
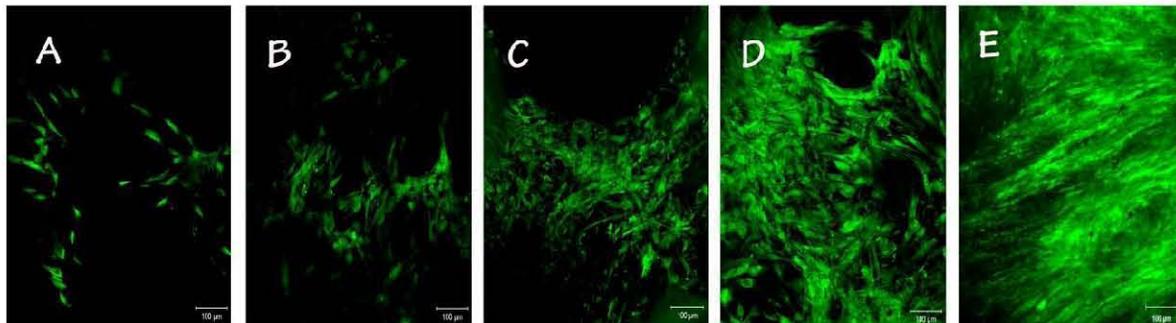


Figura 23. Viabilidad de fibroblastos a los 2 (A), 4 (B), 6 (C) y 8 (D) días de cultivo en un copolímero de Qui-PLA liso y sin lijar, lote 4 en donde ya no se formaron cúmulos celulares y la morfología de los fibroblastos fue extendida desde el día 2 hasta el día 8 con una confluencia superior al 50% a los 8 días.

En general considerando todos lotes y días evaluados, fueron en estos copolímeros y bajo estas condiciones donde se observaron los más altos porcentajes de confluencias alcanzados en menos días de cultivo además con una viabilidad casi del 100%.

Después de que la viabilidad de los fibroblastos fue evaluada, se procedió a analizar si los fibroblastos se encontraban adheridos al biomaterial

Adhesión celular

Dado la acidez y a la modificación que sufrían las películas dejándolas secar y que sembrándolas así, no propiciaban que la mayoría de las células quedaran sobre los copolímeros del primer lote, los análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se realizaron a partir del lote 2 con los lavados alcalinos en donde la siembra ya fue en húmedo y las células en su mayoría se mantenían sobre las películas.

Para el lote 2 donde las películas fueron purificadas y lavadas con medio alcalino, las micrografías mostraron que los fibroblastos están redondos lo cual no era indicativo de que estuvieron adheridos al copolímero. En la Figura 24 puede observarse además los copolímeros sin células como un control negativo de este ensayo y la ausencia de estrías ya que aún no se implementaba el lijado de las películas.

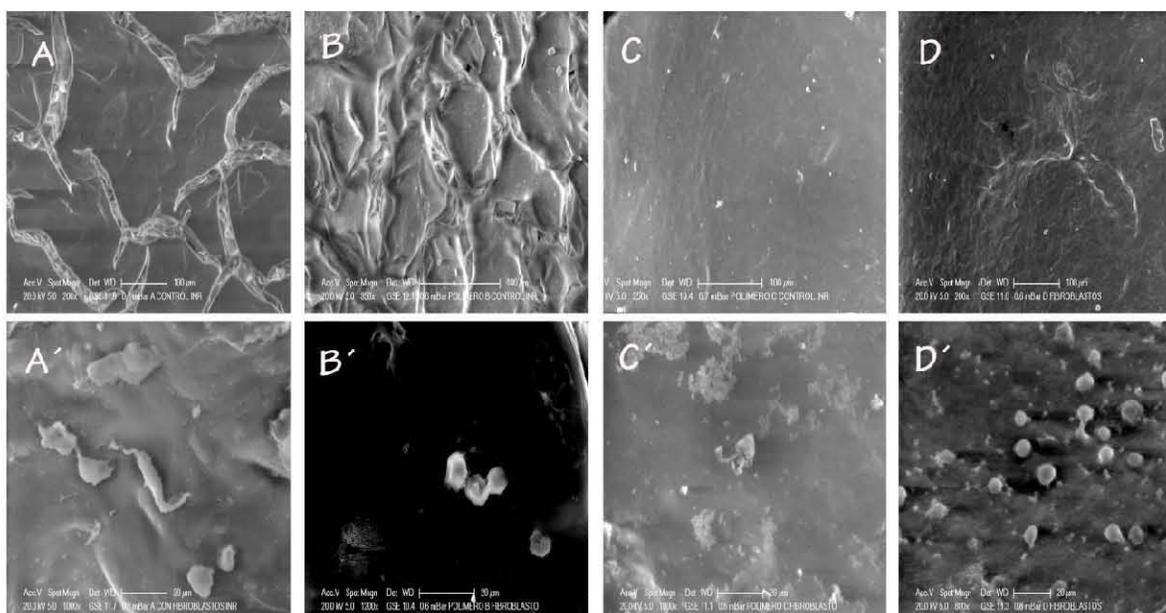


Figura 24. Análisis de MEB al 5° día de cultivo en copolímeros C y D lijados, pero no purificados con acetona. En ninguno de los casos, los fibroblastos presentaron una morfología extendida, enfatizando que es necesario que los copolímeros sean purificados y lijados

Después de que se implementó lijar las superficies de los copolímeros del lote 2, se encontró que sólo el sublte C y D mostraban fibroblastos extendidos. Para conocer si esto sucedía por la combinación de la purificación y el lijado o sólo por uno de esos dos factores, se montaron ensayos en donde se lijaron los copolímeros C y D sin haber sido purificados con acetona (Lote 1). Con análisis de MEB, fue posible apreciar que en ambos copolímeros los fibroblastos estaban redondos (Fig. 25C y D).

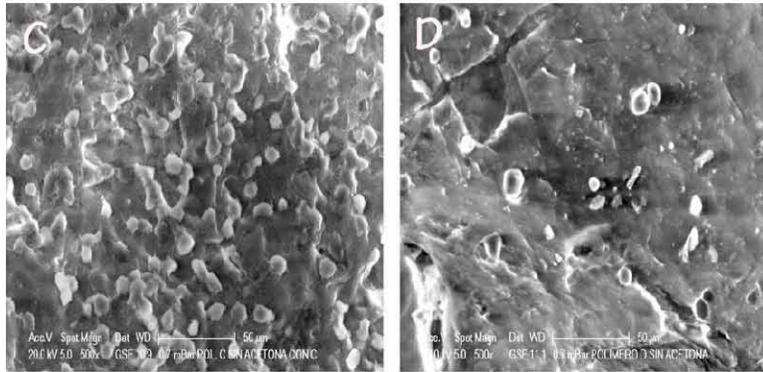


Figura 25. Adhesión celular al 5° día de cultivo en copolímeros C y D lijados, pero no purificados con acetona (Lote 1). En ninguno de los casos, los fibroblastos presentaron una morfología extendida, enfatizando que es necesario que los copolímeros sean purificados y lijados.

De este modo, se llegó a la conclusión de que ambos factores eran necesarios para que los fibroblastos se extendieran y se mantuvieran adheridos a los copolímeros.

El copolímero C, que fue el que finalmente se eligió para seguir probando su biocompatibilidad, mostró a pesar de la presencia de agregados celulares, en la base existían fibroblastos que mantenían adheridas a estas formaciones.

A los 5 días se apreciaron fibroblastos redondos que aún no se terminaban de extender, sin embargo los que se encontraron ahí en la superficie del polímero, emitieron prolongaciones que los mantuvieron sobre el andamio. Para el día 10 y 15 se encontraron fibroblastos extendidos cubriendo el andamio, con morfología habitual a la que ellos presentan en cultivo (Fig. 26).

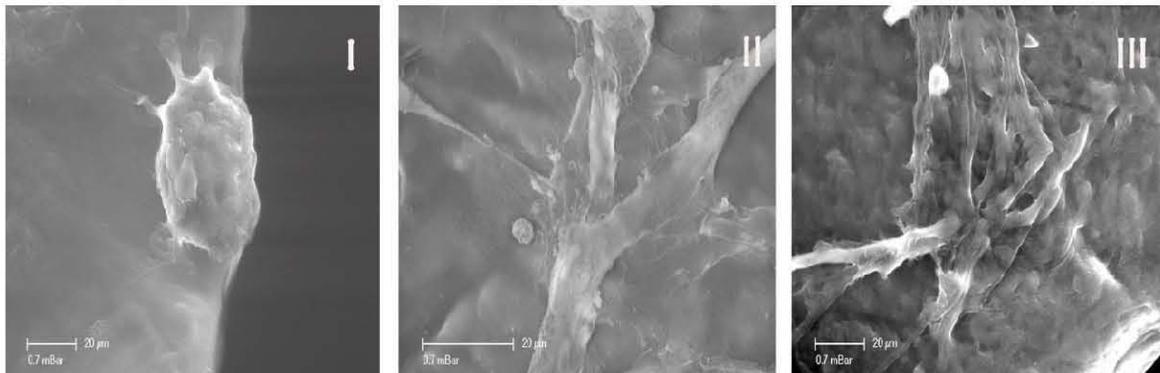


Figura 26. Adhesión celular al copolímero C, lote 3, a los 5 (I), 10 (II) y 15 días de cultivo (III). Nótese la morfología que al inicio los fibroblastos forman aglomerados y que después presentan una morfología típica de fibroblastos.

Con los análisis de MEB pudo observarse las películas sembradas después de 10 días las estrías hechas con el lijado no se logran distinguir en las películas por lo que se puede sugerir dos cosas: que las películas se van erosionando por el componente biológico y/o las células sintetizaron matriz extracelular que se depositó en la superficie del copolímero.

Mientras que en aquellas películas lijadas y sin células, las estrías son evidentes (Fig. 27).

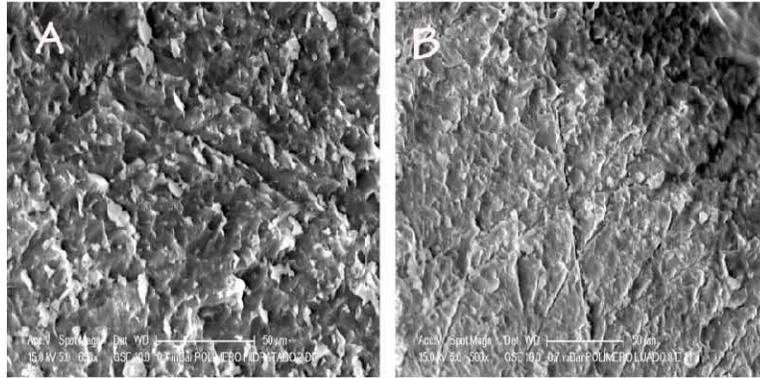


Figura 27. Controles negativos sin fibroblastos, en A evaluados a los 2 días y en B a los 8 días. Nótese que en el caso A los bordes de las estrías están más pronunciados que en B.

Cabe resaltar cómo las estrías a los 2 días se observaron más pronunciadas y con el paso del tiempo se fueron erosionando (Fig. 27B).

La adhesión celular fue evidenciada través de la presencia de FAK fosforilada a días tempranos en donde se observaron agregados celulares, así como días después en donde los fibroblastos se encontraban ya extendidos. En ambos casos fueron positivos para FAK (Fig. 28 A, A').

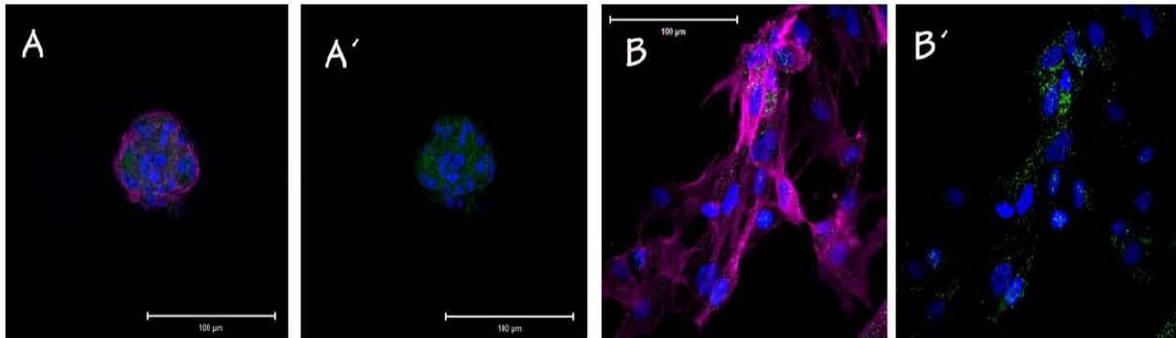


Figura 28. Adhesión en fibroblastos cultivados sobre copolímero C sin lijar a los 2 (A, A') y 8 (B, B') días de cultivo. Inmunofluorescencia contra FAK en verde, faloidina en magenta y azul para núcleos.

En el día 8, los fibroblastos fue posible ver células alargadas (Fig. 28 B, B') que fueron positivas para FAK donde su citoesqueleto tuvo arreglo extendido y pudo apreciarse algunas fibras de estrés.

En cuanto a la adhesión en copolímero que no se lijó, se pudo observar como las células desde el 2, los fibroblastos presentan prolongaciones que los mantienen unidos a la película. Nótese cómo en los días 2 y 4 de cultivo (Fig.29 A, B), las células se vieron extendidas y la superficie donde se observaron fue lisa ausente de estrías por la eliminación del lijado en este lote. Para el día 6 y 8 ya no fue posible ver la base del

materiales, porque todo se mostró cubierto por células alargadas como típicamente se encuentran en cultivo sobre placa (Fig. 29 C,D).

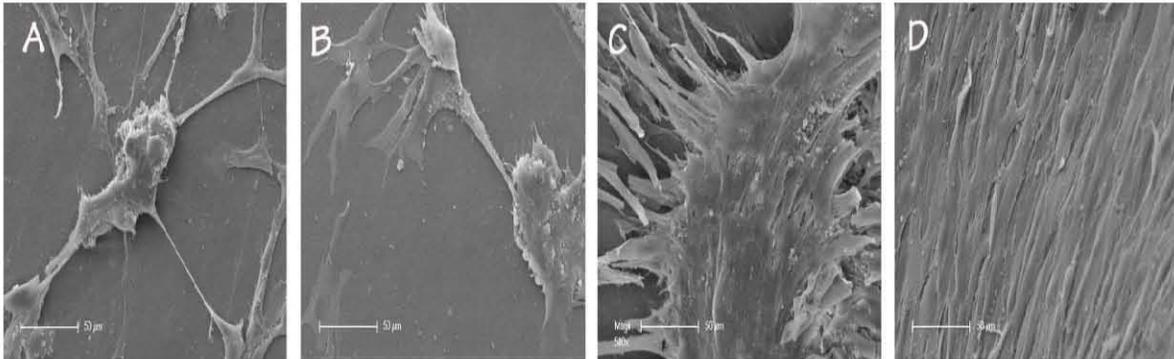
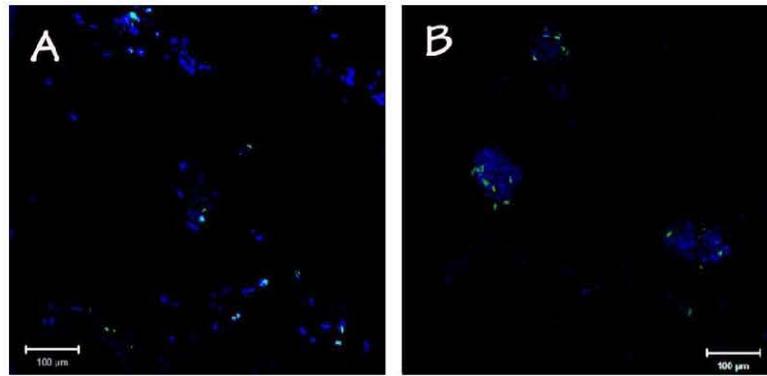


Figura 29. Análisis SEM para los mismos días 2 (A), 4 (B), 6 (C) y 8(D). Apariencia del polímero de lote 6, caras lisas.

En cuanto a la adhesión, estas fueron las condiciones en las que se encontró una mejor adhesión desde el día 2 de cultivo y sin el desgaste de la superficie.

Proliferación celular

La proliferación fue evaluada en el sub lote donde se encontró la más alta viabilidad y mejor adhesión a las películas, el copolímero C. En la figura 30 se observa una imagen representativa de los fibroblastos sobre el copolímero C lote 3 aparecen con una marca verde dentro del núcleo, correspondiente a Ki67 con la que se evidenció su proliferación



PROLIFERACIÓN
SOBRE COPOLÍMERO C LIJADO
(5 días)

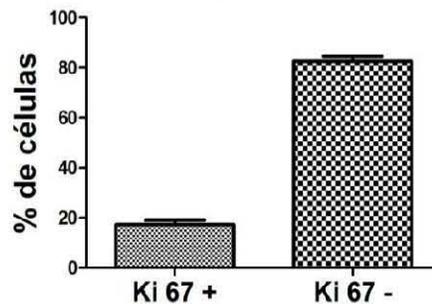
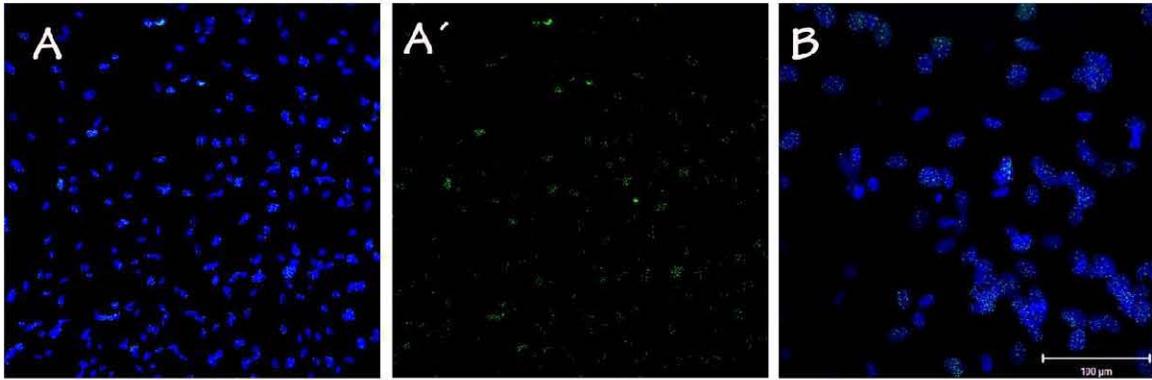


Figura 30. Proliferación de fibroblastos en el copolímero C lijado sembrado con a los 5 días de cultivo. Inmunofluorescencia contra Ki67, en azul, los núcleos teñidos con DAPI y en verde aquellas células positivas para Ki67.

En los casos, donde los fibroblastos se encontraban individuales y aislados (Fig. 30A) así como formando agregados (Fig. 30B), también se encontró la positividad de los fibroblastos para Ki67. En la gráfica también se puede observar que el porcentaje de células proliferando (Ki 67+) es de 17.2% a los 5 días de cultivo.

En el lote 4, donde las películas no fueron lijadas, se encontró que los fibroblastos en estas condiciones también se encontraban proliferando, como puede observarse en la Figura 31. Fue mayor el número de núcleos visualizados en este lote, sin embargo, considerando el porcentaje de células proliferando, se obtuvo que éste fue de 21.2. De esta forma fue mayor al obtenido en el lote donde se lijaron los copolímeros.



PROLIFERACIÓN
SOBRE COPOLÍMERO C NO LIJADO
(5 días)

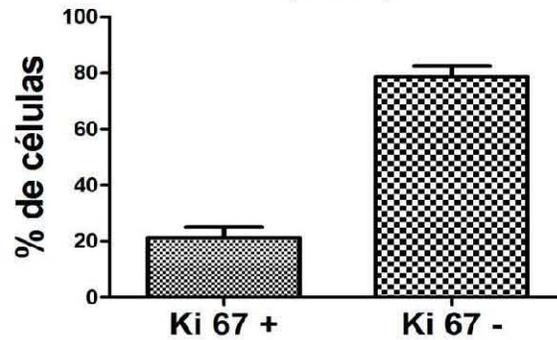


Figura 31. Proliferación de fibroblastos a 5 días de cultivo en copolímero C sin lijar, lote 4 . En (A) núcleos teñidos con DAPI (azul) y en verde la señal para Ki67; en (A´) señal de Ki67 y (B) núcleos con señal Ki67 a mayor aumento.

La proliferación para fibroblastos sembrados sobre placa multipozo fue similar al encontrado en el lote 4. De acuerdo a la Figura 32, las células proliferaron en un 21.35% . Contrastando este resultado y considerándolo un control positivo de proliferación a los 5 días de cultivo, se puede indicar en el copolímero C lote 4 los fibroblastos tiene una mayor proliferación.

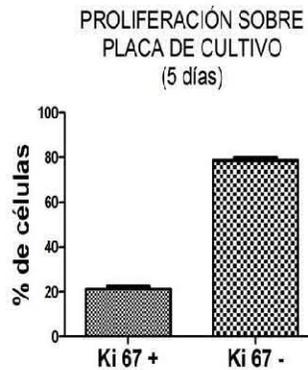
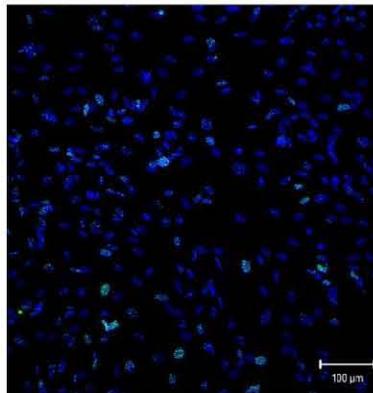


Figura 32. Proliferación de fibroblastos a 5 días de cultivo en placa multipozo. En azul aparecen los núcleos teñidos con DAPI y en verde la señal para Ki67.

Continuando con la evaluación de la biocompatibilidad, se procedió a evaluar si los fibroblastos viables, adheridos y proliferando también eran funcionales y capaces de sintetizar las proteínas típicas de Matriz.

Síntesis de proteínas

De acuerdo a la tinción e inmunofluorescencia realizadas a los cortes histológicos de la piel de prepucio se evidenció la presencia de colágena tipo I y elastina, (Fig. 33) teniendo así un control positivo como referencia al momento de evaluar su síntesis en los fibroblastos cultivados sobre los copolímeros de QUI-PLA.

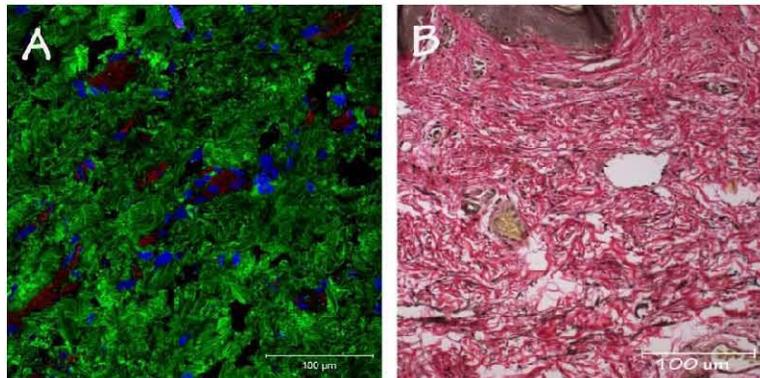


Figura 33. Presencia de proteínas estructurales en la dermis de biopsias de prepucio. Expresión de colágena I (verde) y elastina (rojo), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul); inmunofluorescencia. En B, Tinción de Verhoeff, en donde se aprecian las fibras de colágena en rojo y las fibras elásticas en negro.

En la doble inmunofluorescencia (Fig. 33A) se observa los dos tipos de fibras, las más aumentantes en verde son las correspondientes a colágena, mientras que en menor proporción se observan las de elastina. Con la tinción de Verhoeff se evidenció también la presencia de las fibras de colágena y elastina en los cortes realizados de los prepucios con los cuales se realizaron los cultivos celulares para evaluar la biocompatibilidad. Los resultados obtenidos son indicativos de biopsias sanas.

En el copolímero C, lote 3 se evaluó la síntesis de procolágena I y tropoelastina de los fibroblastos sembrados en éste, en la Figura 34 se observa que las células en su totalidad son positivas para procolágena I y tropoelastina.

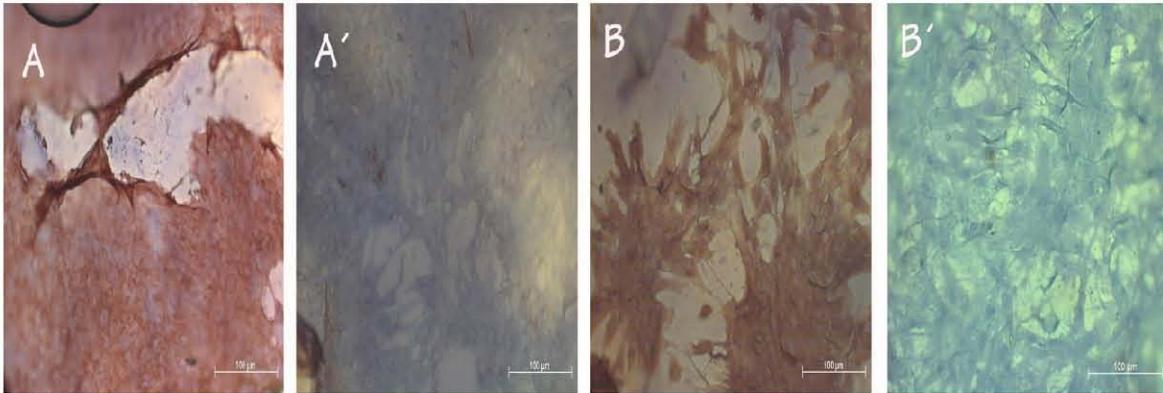


Figura 34. Síntesis de procolágena y tropoelastina en fibroblastos a los 13 días de cultivo sembrados sobre el copolímero Qui-PLA lote 3. Células positivas para procolágena I (A) y el control de la técnica (A'), células positivas para tropoelastina (B) y control de la técnica (B').

Los fibroblastos donde las células se encontraron en agregados, también resultaron ser positivos para estas dos proteínas (Fig. 35).

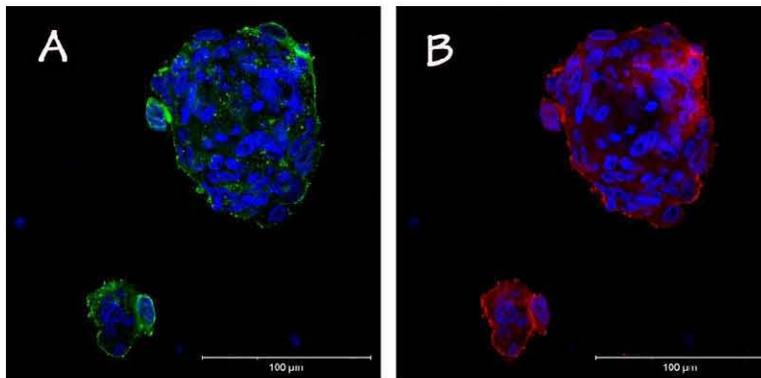


Figura 35. Síntesis de procolágena I y tropoelastina en fibroblastos formadores de agregados. Doble Inmunofluorescencia contra procolágena (A) y tropoelastina (B) a 2 días de cultivo en copolímero C lijado lote 3. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Los fibroblastos sembrados en el copolímero C donde se prescindió de lijarse, se observó una confluencia cercana al 100% en donde las células en su totalidad fueron evidenciadas que sintetizan procolágena I y tropoelastina (Fig. 36).

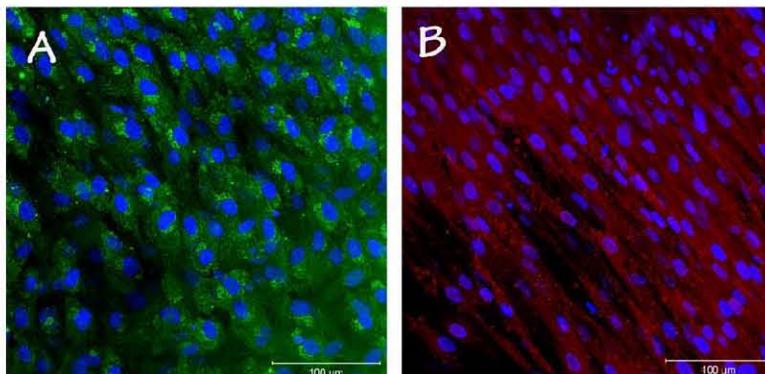


Figura 36. Síntesis de procolágena y tropoelastina en fibroblastos de 13 días de cultivo en copolímero C liso y sin lijar. Inmunofluorescencia contra procolágena y tropoelastina. En verde la señal para procolágena y rojo para tropoelastina. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Para demostrar el fenotipo celular antes y después del sembrado sobre los copolímeros, se analizó la expresión de los genes de procolágena, tropoelastina y fibrilina en los fibroblastos cultivados sobre los biomateriales.

Niveles de expresión celular

Los niveles de expresión de colágena I, elastina y fibrilina no se vieron afectados por el copolímero de Qui-PLA. Se evaluó el fenotipo de las células que se sembraron en el copolímero analizando la expresión génica de procolágena I, tropoelastina y fibrilina. Además, se comparó el nivel de su expresión génica en frascos de cultivo y sobre las películas de Qui-PLA.

Se aisló RNA de cultivos de fibroblastos de 5 pacientes en frasco de cultivo así como de fibroblastos sembrados sobre el copolímero Qui-PL ambos a los 8 días de cultivo. Se tuvo una pureza de RNA necesaria para poder realizar la PCR. Se utilizó la misma concentración de ácido ribonucleico proveniente de los cultivos de fibroblastos en frasco y de aquellos cultivados en los copolímeros (0.5µg) para poder retrotranscribirlo a DNA copia.

A continuación se muestra una gráfica representativa de la expresión génica de colágena I, elastina y fibrilina de fibroblastos (Fig.37).

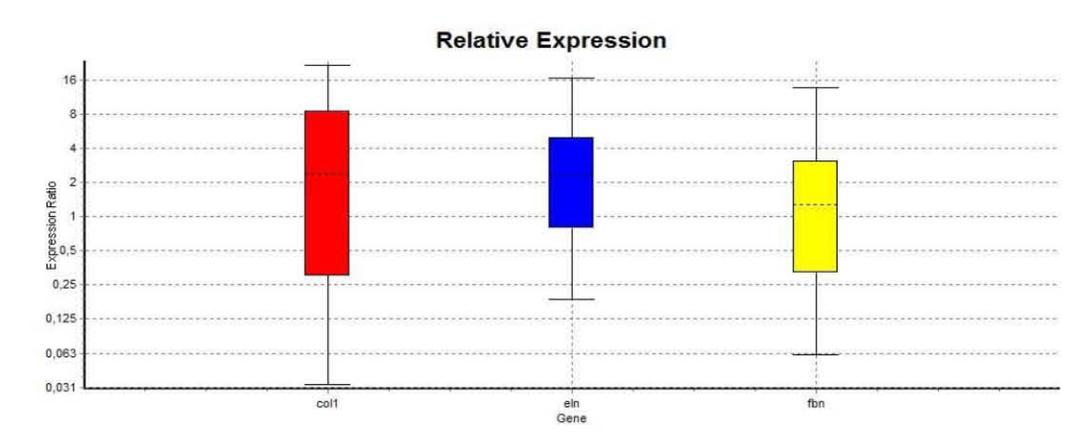


Figura. 37. Niveles de expresión para los genes de pro colágena (rojo), elastina (azul) y fibrilina (amarillo) a los 8 días de cultivo de fibroblastos *in vitro* del paciente D y sobre el copolímero de Qui-PLA en donde no hay diferencias significativas entre los niveles de expresión, pero hay ligero aumento principalmente para la expresión de colágena I cuando los fibroblastos están sobre el copolímero. (n=3, p>0.05)

De acuerdo a los datos obtenidos y analizados por Rest®, considerándose el valor de uno como el control en el que los fibroblastos se cultivaron en frascos, los resultados indican que aunque no se encontró una diferencia significativa entre los niveles de expresión para los genes ya mencionados, existe una tendencia a aumentar los niveles de expresión para

los fibroblastos sembrados sobre el copolímero, siendo ésta mayor para el gen de colágena I. De manera similar a lo obtenido con el paciente D, se observó lo mismo en las muestras del resto de los pacientes (A, B, C y E).

Por lo anterior, se sugiere que las células que se aislaron y se sembraron sobre el biomaterial, son fibroblastos y que este copolímero no afectó la expresión de los genes de colágena I, elastina y fibrilina manteniéndose el fenotipo celular.

Para evidenciar el que el quitosano obtenido por método biológico-químico, y empleado para la síntesis de todos los lotes probados, conservó mejor las propiedades biológicas sobre el obtenido por una metodología completamente química, también se evaluó la viabilidad de los fibroblastos sobre películas hechas en la misma proporción que el polímero C.

Cultivo de fibroblastos humanos sobre películas de Qui-PLA con base en quitosano comercial por obtención netamente química.

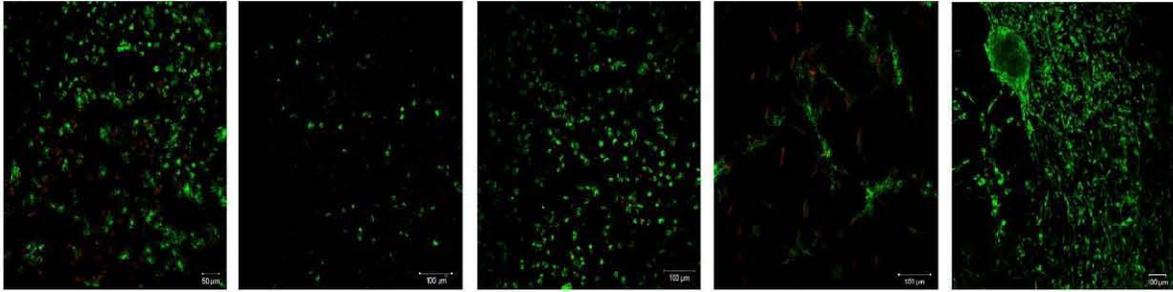
Los copolímeros del lote 5 fueron sintetizados con quitosano químico comercial, se obtuvieron películas que físicamente fueron más lustrosas, y totalmente lisas

Las pruebas de viabilidad revelaron que en el día 2 cultivo se observó el 30% de células muertas, y que conforme el tiempo pasó las células no adoptaban una morfología extendida. En el día 8 el porcentaje de viabilidad fue de 77% y su morfología seguía siendo redonda. Hasta el día 15 de cultivo, la confluencia no rebaso el 20% (Fig. 67). En los días 6, 8 y 15 de cultivo la confluencia disminuyó hasta en un 14% con respecto a la obtenida a los 2 y 4 días. Lo cual podría indicar que las células se van muriendo o se van perdiendo en cada recambio de medio que se hizo diariamente.

Para conocer cuál sería el resultado a mayor tiempo, se evaluó a 30 días como se realizó en el lote 3. La viabilidad de los fibroblastos sobre este material aumentó con respecto a los primeros días, fue de 93%. Al comparar los resultados de viabilidad y confluencia obtenidos en lote 3 a un mes de cultivo, y se encontró que a los mismo 30 días, el copolímero elaborado con quitosano comercial presentó una mayor tendencia a la formación de agregados celulares, la viabilidad y la confluencia fueron menores, siendo 93 y 49% (Fig.38).

Es de notar que, a pesar de un mes de cultivo, en el copolímero con quitosano comercial se observaron agregados celulares mientras que en el copolímero lote 3 en el mismo tiempo se observó completamente confluyente y el copolímero liso sin lijar (lote4) a los 15 días no presentaba agregados y su confluencia era de 91%.

Por otro lado, en el copolímero elaborado con base en quitosano obtenido por un método netamente químico, a un mes de cultivo apenas y se alcanza el 50% de confluencia celular



VIABILIDAD EN COPOLÍMERO
A BASE DE QUITOSANO QUÍMICO COMERCIAL

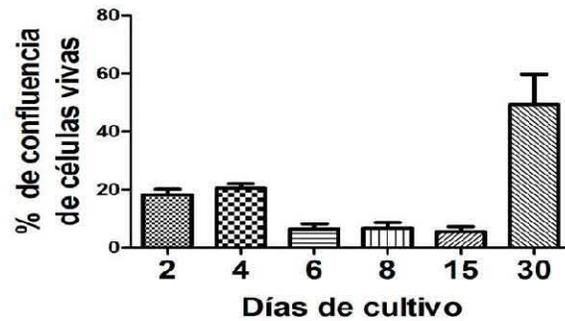


Figura 38. Viabilidad de fibroblastos a los 2 (A), 4 (B), 6 (C) y 15 días (D) en el copolímero C Qui-PLA elaborado con quitosano químico comercial.

Con base a los resultados, todo indica que los copolímeros elaborados a partir de quitosano químico comercial presentaron menor viabilidad, tardaron más días en alcanzar la confluencia, no mostraron una morfología extendida hasta después de 15 días y presentaron agregados celulares por lo que en comparación con los propuestos en este trabajo, los elaborados con un quitosano con un método biológico-químico mantuvieron mejores propiedades que se vieron reflejadas en mayores porcentajes de viabilidad, confluencia y morfología.

DISCUSIÓN

La biocompatibilidad de un andamio es determinante para poder cumplir con el objetivo que se plantea la Ingeniería de Tejidos. Los biomateriales elaborados a base de quitosano han mostrado tener biocompatibilidad y este polisacárido por sí sólo ha mostrado promover la morfología normal, adhesión, proliferación y la viabilidad de las células (Shin *et al*, 2006,).

El copolímero de Qui-PLA es un material nuevo del cual se ha reportado poco sobre su caracterización biológica, su originalidad radica en la obtención biológica-química del quitosano con el cual se elabora. Debido a esto, se probaron distintas películas y condiciones estandarizando y discerniendo cuál de todas era la que propiciaba mayor biocompatibilidad.

Inicialmente los cuatro sublotos (A-D) de películas presentaron un pH bajo con el cual no fue posible cultivar los fibroblastos debido a la alta acidez. Se trató de minimizar la acidez con diferentes condiciones de lavados, los lavados con medio alcalino y PBS, aumentaron en un 20% la viabilidad celular en todos los sublotos; sin embargo, no se logró obtener un pH neutro debido a que estas soluciones no lograron eliminar por completo los restos de ácido láctico no polimerizado durante la reacción de síntesis. Fue con la purificación con acetona que se logró remover los monómeros y oligómeros de ácido láctico presentes en las películas, aumentándose la viabilidad hasta un 80%. Trabajos similares como el de Yao *et al*, (2010) reportaron también la purificación de películas Qui-PLA pero usando cloroformo o metanol para resolver el problema de acidez.

A pesar de que todos los copolímeros A-D se componían de quitosano y PLA en la misma proporción, las reacciones de síntesis y catalizadores empleados para su obtención fueron diferentes, resultando en una incorporación diferencial de PLA en cada una de los sublotos. La acidez presentada en los materiales, estuvo altamente relacionada con el porcentaje de incorporación del PLA; los copolímeros A, B, C y D presentaron el 55%, 75%, 30% y 35% de incorporación de Ácido Láctico; respectivamente (Espadín y cols. (2014)). La viabilidad de los fibroblastos estuvo correlacionada con los porcentaje de incorporación de PLA; a mayor porcentaje de incorporación, menor viabilidad celular. De acuerdo a el porcentaje de incorporación y otros trabajos, los productos de degradación del PLA pueden producir la acidificación del microambiente (Li *et al*, 2003). Con todo lo anterior, se puede explicar las razones por la cuales, el copolímero C haya sido el sublote con el mayor porcentaje de viabilidad.

En cuanto a la adhesión que está asociada con las propiedades químicas y de superficie, como: el ángulo de contacto, la carga eléctrica y la topografía (Vitte *et al*, 2004), los sublotos A y B tuvieron un ángulo de contacto de 94°, el C de 73° y el D de 85° (Espadín *et al*, 2014) por lo que podemos indicar que los copolímeros C y D presentaron una superficie más hidrofílica que A y B. Lo que se sugiere que el quitosano favorece la hidrofiliidad de los materiales y que este polisacárido es más hidrofílico que el PLA. Li y cols. 2003 encontraron que en materiales de Qui-PLA, el ángulo de contacto disminuye conforme la proporción de quitosano aumenta. Nuestros resultados son similares a los evidenciados en ese estudio, ya que el copolímero C es el que presenta el menor ángulo de contacto y el que

contiene el mayor porcentaje de quitosano. A su vez, los copolímeros A y B tienen los ángulos de contacto más altos y los que contienen el menor porcentaje de quitosano. Trabajos como los de Xie *et al.*, (2010) y Depan *et al.* (2006) observaron el mismo comportamiento; mayor incorporación de PLA se obtiene un mayor ángulo de contacto debido a la formación de zonas hidrofóbicas.

La carga negativa de la superficie del material también pudo haber estado relacionada con la morfología redonda de los fibroblastos. Si el PLA que presenta este tipo de carga, se encontró expuesto en la superficie de las películas puede sugerirse que cuando los fibroblastos entraron en contacto con la superficie, experimentaron una repulsión.

La topografía, por su parte, se encontró que cuando las películas eran lijadas, los fibroblastos mostraban una morfología alargada, lo que nos puede indicar que las estrías producidas por el desgaste proporcionaban una superficie en donde las células se pudieran adherir, ya que se ha reportado que en superficies rugosas existe una mayor adhesión (Rodríguez *et al.*, 2008). Además, estos copolímeros de Qui-PLA presentaban cadenas laterales de PLA (Espadín *et al.*, 2014) por lo que al lijar se estarían exponiendo la cadena principal de quitosano que es el que presenta similitud con la estructura de los glicosaminoglicanos y le confiere la afinidad y reconocimiento celular. Sin embargo, la formación de agregados celulares a los primeros días de cultivo sobre las películas de Qui-PLA fue un factor que se presentó en los diferentes lotes evaluados, excepto para el lote 4. Con los resultados obtenidos, se descartó la posibilidad de que los agregados provinieran de una ineficiente tripsinización o que se debiera por la procedencia de los fibroblastos, ya que los mismos fibroblastos en placa de cultivo, desde el primer día después de su siembra, se observaron extendidos y no agregados.

Nuestros resultados mostraron la presencia de fibroblastos extendidos en la vecindad de los agregados celulares que con el paso de los días aumentaban su número mostrando una morfología fusiforme, sugiriendo que las células que formaban esos agregados iban abandonándolos para adoptar una morfología fusiforme y conseguir la confluencia sobre el material. De acuerdo a las micrografías de SEM, después de 5 días de cultivo, no era posible distinguir las estrías realizadas por la lija, por lo que se puede indicar que los fibroblastos antes de los primeros 5 días de cultivo, se agrupaban en cúmulos como una estrategia de defensa mientras sintetizaban matriz extracelular que les sirviera de sustrato y que poco a poco cubriera la superficie del copolímero permitiendo que llegaran a confluencia sobre las películas. Los agregados celulares fueron centros de reclutamiento para la síntesis de matriz y posteriormente centros de distribución de fibroblastos que parecían abandonarlos para observarse individuales y extendidos en la cercanía de estas agrupaciones.

La formación de estos agregados fue de suma importancia, ya que finalmente fue mediante estos cúmulos que los fibroblastos se mantuvieron sobre las películas hasta que las condiciones les favorecieran. De cualquier modo, como los resultados lo mostraron, los fibroblastos aun en agregados, seguían manteniéndose viables, adheridos al copolímero, proliferando, sintetizando proteínas de matriz y manteniendo su fenotipo.

Ya que no se ha demostrado cuál es el receptor implicado en la adhesión con el quitosano (Hynes *et al.*, 2000) es posible que no exista una adhesión celular directa al material, sino que, es la matriz de las propias células la que promueve su adhesión y que la erosión del copolímero con los días puede influir también en este evento. Los resultados de la evaluación de FAK, indican que la adhesión presentada pudo haberse llevado no sólo mediante puntos focales, sino por otros receptores expresados por los fibroblastos. Posiblemente también puedan adherirse por receptores a colágena y/o fibronectina.

La prefuncionalización del copolímero C con Suero Bovino Fetal que contiene proteínas y factores de crecimiento pudo haber modificado la superficie de las películas mejorando la adhesión y la proliferación (Armentano *et al.* 2010). De hecho fue en esta condición en donde se observó a los fibroblastos con morfología extendida desde los 2 días de cultivo, ya no se presentó la formación de agregados, el porcentaje de proliferación fue similar al obtenido en los cultivos en placa y el tiempo para alcanzar la confluencia fue de 15 días. Algunas de las ventajas que resultaron de la prefuncionalización, fueron: la eliminación del lijado, ya que al realizarlo manualmente, no era reproducible totalmente; la ausencia de formación de agregados celulares observándose sólo fibroblastos extendidos y la disminución en el tiempo para alcanzar la confluencia. Este último factor es esencial en la Ingeniería de Tejidos, ya que el reto a lograr es contar un sustituto biológico en el menor número de días posible, desde la toma de la biopsia, aislamiento celular hasta su implante. De ahí la importancia de obtener un alto rendimiento celular con alta viabilidad en la obtención de los fibroblastos para poder expandir y contar con un número suficiente y sembrarlos en los andamios.

Dentro de los trabajos registrados en la literatura en los que se han utilizado biomateriales con la combinación Qui-PLA, encontramos a:

Yao y cols. 2003 trabajaron con películas de quitosano y evaluaron la proliferación de fibroblastos dérmicos en copolímeros con diferentes proporciones de PLA. El ensayo de MTT indicó que la proliferación fue mayor en las películas con menor proporción de PLA debido a la hidrofobicidad de este compuesto. Estos resultados son similares a los que se obtuvieron en este estudio; altas proporciones de PLA repercuten en las pruebas biológicas.

Ding y cols. 2004 trabajaron con películas de PLA pretratadas con quitosano en su superficie para conocer su efecto en la morfología de dos líneas celulares así como en su proliferación. Observaron que las células se mantenían redondas pero que su proliferación no se veía afectada. Dicho hallazgo es similar al obtenido en los copolímeros evaluados, ya que aunque los fibroblastos se mantenían agregados, mostraron evidencia de que proliferaron sobre las películas de Qui-PLA

Por su parte, Fakhry y cols. 2004 compararon dos quitosanos comerciales con diferentes pesos moleculares y grados de acetilación, el primero con 1.4×10^6 g mol⁻¹ y 20% y el segundo con 2.7×10^5 g mol⁻¹ y 30% respectivamente. Evaluaron la adhesión celular y la morfología de una línea celular de fibroblastos 3T3 y osteoblastos a través de las fibras de

estrés de actina a 1 y 24 horas de ser sembradas. La adhesión fue más rápida para el quitosano con mayor peso molecular y mayor grado de desacetilación. Lo anterior, respalda el resultado que se obtuvo al comparar las películas elaboradas a base de quitosano químico-biológico y las de quitosano químico, en donde queda evidenciada influencia del peso molecular y el grado de acetilación del quitosano en la adhesión y morfología de los fibroblastos; un mayor peso molecular y un menor grado de acetilación promueven una morfología extendida y la adhesión celular.

Espadín y cols, 2014 reportó que el quitosano obtenido con la metodología propuesta tiene un peso molecular $9.59 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ y un grado de acetilación del 9.8% mientras que los materiales sintetizados a partir de quitosanos comerciales presentan un de peso molecular de $3.19\text{-}5.5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ y grado de acetilación del 15%. No existe ningún trabajo que estudie la viabilidad celular comparando quitosanos comerciales obtenidos completamente por el método químico contra los obtenidos por un método biológico-químico. Los resultados de las pruebas de viabilidad de este estudio mostraron que en los copolímeros de quitosano químico, los fibroblastos presentan una viabilidad del 70% y una confluencia del 49% a los 30 días de cultivo. Dichos porcentajes son menores a los obtenidos tanto en el copolímero lijado como en el no lijado y prefuncionalizado. En el primer caso, se obtuvo una viabilidad del 95% con una confluencia total para los mismos 30 días. Mientras que para los prefuncionalizados, la viabilidad fue de 98% y a los 15 días de cultivo se obtuvo una confluencia del 91%. Estos resultados evidencian que los copolímeros de Qui-PLA propuestos en este trabajo, además de su biocompatibilidad, cuenta con mejores propiedades biológicas superando a los elaborados con base en quitosano químico.

La perspectiva de este estudio va encaminada a continuar con los ensayos *in vivo* utilizando algún modelo de quemadura profunda en animales de experimentación inmunodeprimidos, monitoreando el tiempo de reepitelización, la histología de la piel en el área reparada, el destino de los fibroblastos humanos una vez implantados así como el tiempo de degradación del material *in vivo*. Y por otro lado sería interesante evaluar la biocompatibilidad de fabricar esta mismo copolímero ahora fabricándolos con una estructura 3D esponjosa.

CONCLUSIONES

El aislamiento de fibroblastos fue posible con la digestión de dispaasa para la separación dermoepidérmica y la digestión de la dermis con colagenasa para el aislamiento de fibroblastos, obteniendo un rendimiento celular promedio de 1.96×10^6 células /cm² con una viabilidad de 91%.

Posteriormente fue posible cultivar estos fibroblastos dérmicos humanos sobre el copolímero de Qui-PLA sembrando las películas hidratadas y teniendo las células en resuspensión.

La viabilidad celular se vio afectada por la acidez de los copolímeros, sin embargo la purificación con acetona logro elevar la viabilidad celular hasta un 90%. El copolímero que mostro una mayor viabilidad celular fue el copolímero C, síntesis sin catalizador y con un porcentaje de incorporación de PLA de 30%, que se eligió para realizar el resto de las evaluaciones biológicas.

A pesar de diferentes variables probadas del copolímero C en los lotes 4-6 se evidenció que los fibroblastos en cualquier condición proliferan, sintetizan procolágena I y elastina y además se adhieren mostrando una morfología extendida después de 6 días de cultivo.

Los niveles de expresión de colágena, elastina y fibrilina en fibroblastos cultivados sobre el copolímero C no se vieron afectados indicando el fenotipo celular se mantuvo.

Considerando la totalidad de lotes, se puede concluir que las propiedades óptimas para obtener los mejores resultados biológicos son: porcentaje de incorporación de PLA de 30%, superficie hidrofílica, topografía lisa y lijada, purificación con acetona de 12 horas, condición de lavados D y siembra en húmedo y resuspensión. Sin embargo para alcanzar dichos resultados, prescindiendo de lijar la superficie, en menor tiempo y con una adhesión desde los primeros días, esto se puede lograr prefuncionalizando la superficie de las películas incubando con medio suplementado con Suero Bovino Fetal los copolímeros antes de sembrarse.

Con respecto a las películas sintetizadas con quitosano biológico químico propuesto en este trabajo, los resultados sugieren que éste guarda mejores propiedades biológicas con respecto a los comerciales obtenidos por un método netamente químico y que esto a su vez está relacionado a que entre mayor peso molecular y grado de desacetilación presente el quitosano mayor viabilidad celular.

La combinación de quitosano biológico-químico con el Ácido Poliláctico para la síntesis de copolímeros presentó la biocompatibilidad necesaria para ser considerado una opción con potencial en el tratamiento de quemaduras profundas y que pudiera para ser evaluado posteriormente *in vivo* como un andamio que favorezca que lleguen a confluencia las células encargadas de la regeneración de la piel.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Biología Molecular de la célula*. 3ª edición. Barcelona: Ediciones Omega; 2002. p1048-1052.

Aranaz, I., Harris, R. & Heras A. (2010). Chitosan and amphiphilic derivatives. *Chemistry and applications. Current Organic Chemistry*. 4,308-330.

Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattiolo, S. & Kenny J.M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer degradation and stability*. 95, 2126-2146.

Avèrous L. (Polylactic Acid: synthesis, properties and applications. En: Naceur Belgacem M y Gandini A, Editores. *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Madrid: Elsevier; 2008. p 433-447.

Baek H., Park YH., Ki CS., Park JC & Rah DK. (2008) Enhanced chondrogenic responses of articular chondrocytes onto porous silk fibroin scaffolds treated with microwave-induced argon plasma. *Surface Coat Technology*. 202, 5794-97.

Benávides Joaquín. (2008) Reparación de heridas cutáneas. *Revista de Asociación Colombiana de Dermatología*. 16(1), 29-35

Brohem C, da Silva C, Tiago M, Soengas M, de Moraes S y Maria-Engler S. (2010) Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res*. 24; 35-50

Brück, W., Slater, J W. & Carney, B. Chitin and chitosan from marine organisms. En: Se-Know Kim Editores. *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications*. USA: CRC Press; 2010. P 12-19.

Couchman JR., Hook M., Rees D & Timpl R. (1983). Adhesion, growth and matrix production by fibroblasts on Laminin substrates. *The Journal of Cell Biology*. 96, 177-183.

Chu D V, Haake R A, Holbrook K. Estructura y desarrollo de la piel. En: Freedberg I M, Eisen A R, Wolff K, Austen K F, Goldsmith L A, Katz S I, Editores. *Fitzpatrick Dermatología en Medicina General*. Vol. 1. 7ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p. 64-88

Escámez, MJ., García, M., Larcher, F., Meana, A., Muñoz, E., Jorcano, JL & Del Río, M. (2004) An in vivo model of wound healing in genetically modified skin humanized mice. *The Journal of investigative Dermatology*. 123, 1182-1191.

Dai T., Tanaka M., Huang Y. & Hamblin M. (2011). Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 9(7), 857-879.

Dalby, M., Riehle, M., Sutherland D., Agheli, H. y Curtis A. (2004). Changes in fibroblasts morphology in response to nano-columns produced by colloidal lithography. *Biomaterials*. 25, 5415-5422.

Darby I. & Hewitson T. (2007) Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *International Review of Cytology*. 237, 144-179.

- Depan, D., Kumar, A., & Singh, R. (2006). Preparation and characterization of novel hybrid of chitosan-g-lactic acid and montmorillonite. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 372-382.
- Ding, Z., Chen, J., Gao, S., Chang, J., Zhang, J., Kang, E. (2004) Immobilization of chitosan onto poly-L-lactic acid films surface by plasma graft polymerization to control the morphology of fibroblast and liver cells. *Biomaterials* 25, 1059-1067
- Dutta, P., Dutta, J. y Tripathi, V.S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 63, 20-31.
- Espadín A.(2012). Preparación y caracterización de materiales a base de quitosano biológico-químico y derivados del ácido láctico. Tesis de Maestría. UAM Iztapalapa.
- Espadín A., Vázquez N., Tecante, A., Tamay L., Gimeno M., Velasquillo, C. & Shirai K. (2014). Fibroblast viability and inhibitory activity against *Pseudomonas aeruginosa* in Lactic acid grafted chitosan hydrogels. *Journal applied polymer science*. 131, 40252.
- Fakhry, A., Scheinder, G., Zaharias, R., & Senel S. (2004) Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblast. *Biomaterials*. 25, 2075-2079.
- Funakoshi, T., Majima, T., Iwasaki, N., Yamane, S., Masuko, T., Minami, A., Harada, K., Tamura, H., Tokura, S. & Nishimura S.(2005). Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering. *J. Biomedical Material Research*. 89, 829-840.
- Garlotta Donald (2002) A literature review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and Environment*. 2(9), 63-84
- Gartner L & Hiatt J. *Texto atlas de Histología*. 2a edición. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2002.p. 311-319
- Gilbert, S.F. *Biología del desarrollo*. 7ª edición. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2005, p28
- Gómez P. & Palao R. (2002) Tratamiento de las quemaduras en el siglo XXI desde la Cirugía. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*. 28 (1), 69-74.
- Han, C.M., Zhang, L.P., Sun, J.Z., Shi, H.F., Zhou, J., Gao, C.Y. (2010). Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* . 11, 524-530.
- Hirata, M., Kobayashi, M., Matsumoto C., Miyaura, C., Asakura, T. & Inada, M. (2010). Cell shape and matrix production of fibroblasts culture on fibroin organized silk scaffold with Type-II B turn structured (Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly) sequences. *Journal of Health Science*. 56(6), 738-744.
- Honarkar, H. & Barikani M. (2009) Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatsh Chemistry*. 140, 1403-1420.

Hwang, K., Jung, S., Less, G., Chinnan, M., & Park, Y. (2002). Controlling Molecular Weight and Degree of Deacetylation of Chitosan by Response Surface Methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1876-1882.

Hynes R. & Zhao Q. (2000) Evolution of cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*. 150, F89-F95.

Iyer, P., Walker, K. & Madhally, S. (2012). Increased matrix synthesis by fibroblasts with decreased proliferation on synthetic chitosan-gelatin porous structures. *Biotechnology and Bioengineering*. 109, 1314-1324.

Jayakumar R., Menon D., Nair SV. & Tamura H. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials: a short review. *Carbohydrate polymers*. 82(2), 227-232.

Jo, GH., Park, RD. & Jung WJ. Enzymatic production of chitin from crustacean shell waste. En: Se-Know Kim Editores. *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications*. USA: CRC Press; 2010. P 37-43

Karp G. *Biología Celular y Molecular*. 1ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 1998 p 421

Khor E. y Yong L. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 24, 2339-2349.

Kim, P. J., Dybowski, K. S. & Steinberg, J. S. (2006). Feature: a closer look at bioengineered alternative tissues. *Podiatry Today* 19, 38-55.

Knezevic-Jugovic, Z., Petronijevic, Z. & Smelcerovic A. Chitin and chitosan from microorganisms. En: Se-Know Kim Editores. *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications*. USA: CRC Press; 2010. P 31-35.

Kovacs, E. J., and DiPietro, L. A. (1994). Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB Journal*. 8, 854-861.

Kozer B, Rongish B, Czirik A, Zach J, Little C, Davis E, Knutsen R, Wagenseil J, Levy M, Mecham R. (2006) Elastic Fiber formation: A dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *Journal of Cellular Physiology*, 207, 87-96.

Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustacean (mini-review). *Mar. Biotechnol.*, 8, 203-226

Langer R & Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science*. 260:920-6.

Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. (2000) Wound repair: Basic Biology to Tissue Engineering. En *Principles of Tissue Engineering* 2ª edición. Academic Press. USA.

Li L., Ding, S. Y Zhou C. (2003) Preparation and degradation of PLA/Chitosan composite materials. *Journal of Applied Polymer Science*. 91, 274-277.

Lloyd D y Patel A. Estructura y funciones de la piel. En: Foster A y Foil C Manual de Dermatología en Pequeños Animales y Exóticos, 2ª edición. España: Ediciones S; 2008. P.1-11

Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X., & Han, C. (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24(26), 4833-4841.

Makpol S, Azura F, Anum Y, Zurinah W. (2011) Modulation of collagen synthesis and its gene expression in human skin fibroblasts by tocotrienol-rich fraction. *Archive Medical Science*. 5,879-895.

Metcalfe, A. & Ferguson M. (2007). Review. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the Royal Society Interface*. 4, 413-437.

Mohd Hilmi, AB., Halim, AS., Hassan, A., Lim, CK., Noorsal, K. & Zainol Ismail (2013) In vitro characterization of a chitosan skin regenerating template as a scaffold for cells cultivation. *Springer plus*. 2, 1-9

Navarrete Franco G. (2003) Histología de la piel. *Revista Facultad de Medicina* 4(46), 130-133.

Naughton G. (2000) Dermal Equivalents. En *Principles of Tissue Engennering* 2a edición. Academic Press. USA.

Noronha, I L., Niemir, Z., Stein, H., and Waldherr, R. (1995). Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant*. 10, 775-786.

Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Gimeno, M., Barzana, E., Trombotto, S., David, L., & Shirai, K. (2011). Structural Characterization of Chitin and Chitosan Obtained by Biological and Chemical Methods. *Biomacromolecules*, 12, 3285-3290.

Pardo, A. & Selman, M. (2006) Matrix metalloproteasas en aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proceedings of the American thoracic Society*. 3, 383-388.

Pardo, A. & Selma, M. (2012). Role of matrix metalloproteases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 5(Suppl. 1)

Prashanth H y Tharanathan R (2007) Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology* 18, 117-131.

Peniche C, Argüelles-Monal W y Goycoolea F. Chitin and Chitosan: Major sources properties and applications. En: Naceur Belgacem M y Gandini A, Editores. *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Madrid: Elsevier; 2008. p 517-534

Peschel G, Dahse H, Konrad A, Dieter G, Mueller P, Martin D, Roth M.(2007) Growth of keratinocytes on porous films of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(4-hydroxybutyrate) blended with hyaluronic acid and chitosan. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 1072-1081.

Ross Pawlina. *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 5ª edición. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2010, p.165-171.

Rodríguez A. & Juárez A. (2011) *Streptococcus sanguinis* adhesión on titanium rough surfaces: effect of shot-blasting particles. *Journal of Materials Science*. 22, 1913-1922.

Ruíz Mora Juan. (1947). Las quemaduras su tratamiento por injertos de piel. *Revista Facultad de Medicina, Bogotá Colombia*. XV (1). 671-687

Schlie-Wolter S., Ngezahayo A. & Chichkov B. (2013) The selective role of ECM on cell adhesion, morphology, proliferation and communication *in vitro*. *Experimental Cell Research*. 319, 1553-1561.

Schulz, JT., Tompkins RG. & Burke JF. (2000). Artificial skin. *Annu. Rev. Med.* 51, 231-244

Shevchenko, R., James SL. & James E. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the Royal Society Interface*. 7, 229-258

Shi, H.; Han, C.; Mao, Z.; Ma, L.; Gao, C. (2008). Enhanced angiogenesis in porous collagen-chitosan scaffolds loaded with angiogenin. *Tissue Eng.* 14, 1775-1785.

Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su Y. y Cheng T. (2006). Therapeutic potencial Chitosan and its derivatives in Regenerative Medicine. *Journal of Surgical Research*. 133, 185-1992.

Shirai, K., Guerrero, I. & Huerta, S. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 446-452.

Sothornvit, R., & Krochta, J. (2000). Oxygen permeability and mechanical properties of films from hydrolyzed whey protein. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3913-3916.

Tanaka M. (2011) Design of ovel 2D and 3D biointerfaces using self-organization to control cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1810, 251-258

Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349-363.

Uitto, J. & Chu ML. Fibras elásticas. En: Freedberg IM, Eisen A R, Wolff K, Austen K F, Goldsmith L A, Katz S I, Editores. *Fitzpatrick Dermatología en Medicina General* . Vol. 1. 7ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p. 201-210.

Vallet R. & Munuera. *Biomateriales aquí y ahora*. Madrid: Ediciones Dykynson. p 40-48

Vitte, J., Benoliel, M., Pierres, A. y Bongrand P. (2004) Is thee a predictable relationship between Surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface?. *European cells and Materials*. 7, 54-63.

Welsch, U., Sobotta J., *Histología*. 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2008.p. 549-562

Wong T, McGrath JA, Navsaria H. (2007) The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology*. 156, 1149-1155.

Wu, X.; Black, L.; Santacana-Laffitte, G.; Patrick, C.W., Jr.(2007). Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 81, 59-65.

Xiao, Y., Li, D., Chen, X., Lu, J., Fan, H., & Zhang, X. (2008). Preparation and Cytocompatibility of Chitosan-Modified Polylactide. *J.Appl. Polym. Sci.*, 110, 408-412.

Xie, D., Huang, H., Blackwood, K., & MacNeil, S. (2010). A novel route for the production of chitosan/poly(lactide-co-glycolide) graft copolymers for electrospinning. *Biomed. Mater.*, 5, 1-9.

Yao, F., Chen, W., Wang, Hao., Liu H., Yao K., Sun, P. & Lin Hai.(2003) A study on cytocompatible poly(chitosan-g-L-lactic acid). *Polymer*. 44, 6435-6441.

Zhang, L.; Ao, Q.; Wang, A.; Lu, G.; Kong, L.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. (2006). A sandwich tubular scaffold derived from chitosan for blood vessel tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 77, 277-284.

Zhong, SP., Zhang, YZ. & Lim, CT. (2010) Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2 510-525

Zhu, C.; Fan, D.; Duan, Z.; Xue, W.; Shang, L.; Chen, F.; Luo, Y.(2009) Initial investigation of novel human-like collagen/chitosan scaffold for vascular tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 89, 829-840.