



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“Optimización de los parámetros de electrohilado de gelatina porcina para la  
producción de un andamio vascular”**

**T É S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**Miguel Angel Jiménez Beltrán**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Paul Mondragón Terán**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Méx. Mayo, 2017





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

## **Sinodales**

**Dr. Paul Mondragón Terán**

**Dra. Martha Salcedo Álvarez**

**Dr. Juan Antonio Suarez Cuenca**

**M en C Josefina Vázquez Medrano**

**M en C Ángel Durán Díaz**

# Agradecimientos

En primer y más importante mención, al pueblo de México, ya que sin la ayuda y el sacrificio diario, de los millones de trabajadores en nuestro país, estudiar para muchos de nosotros, no sería posible. Por consiguiente, por ellos y para ellos, hacemos y haremos ciencia, sirviendo al pueblo de todo corazón.

A todos esos estudiantes, profesores y trabajadores democráticos de la Universidad Nacional, que durante años lucharon y trabajaron por una mejor y mayor educación, y que gracias a ellos la UNAM es hoy lo que es, a pesar de las grandes investidas por parte del Estado y sus representantes en Rectoría.

A mi madre, que sin su ardua labor, del día a día, me dio todo su apoyo, dándome las bases más importantes en los primeros años de vida. A mi padre, por iniciarme en el camino de la ciencia a lo largo de toda mi vida. Por ellos, soy el hombre que soy ahora.

A mi hermana, por enseñarme a ser mejor persona, y darle un sentido de mayor responsabilidad diaria, así como vivir y seguir viviendo muy buenos momentos. Y en un mismo plano, a mi primo Alberto, el cual lo considero como mi hermano.

Al Dr. Paul Mondragón Terán, por darme la gran oportunidad de trabajar a su lado y formar parte de su equipo de investigación, así como enseñarme y darme un enfoque diferente y mayormente aplicado de las ciencias, y a no olvidar nunca las bases de todo. Así mismo de él, aprendí mucho, no solo académicamente, sino también como persona.

A mis profesores de la carrera que considero fueron piedras angulares en mi formación: Dr. y amigo Elías Piedra Ibarra; M en C Josefina Vázquez Medrano quien me apoyó a lo largo de mi proyecto y, considero, es una gran maestra y la mejor persona que me pudo tocar para el inicio de la carrera; a la Dra. Martha Salcedo Álvarez, quien es una persona altamente preparada y siempre me dio buenos consejos; al M en C Ángel Durán Díaz, quien me enseñó en su momento las bases estadísticas necesarias y las cuales apliqué a lo largo de la carrera; al Dr. Juan Antonio Suarez Cuenca, quien, a pesar de tener poco tiempo de conocerlo, me brindó su apoyo; al M en C Rafael Emiliano Quintanar Zúñiga, quien me apoyó de una espectacular forma a lo largo del mi proyecto de tesis; al M en C Francisco Javier Martínez López, el cual es un gran profesor y me enseñó en un primer momento, lo compleja que es la vida y al Biol. Arnulfo Reyes Mata, por darme una visión integral de la biología y lo que es realmente la biología de campo.

A mis amigos y hermanos que me apoyaron a lo largo de la carrera y con los cuales pude vivir muchas experiencias: Estefanía de Allende Becerra, Rebeca Pérez Gil, Nadia Michel Rodríguez Nieto y Pedro Alfonso Díaz Escobar; así como a sus respectivas familias.

A mis amigos del laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos Alan Jesus Calderón, Daniel Santillán, Mario Marroquin, Mario Téllez, Issac Arellano, Miguel Ángel Juárez y Arturo Gaspar; ya que gracias a sus críticas constructivas y visiones distintas de los problemas pude tener una visión más amplia de los mismos que se nos presentaban día con día, pero siempre resolviéndolos positivamente.

A mis amigos y camaradas del MERI, por enseñarme tanto teórica como prácticamente, como la ciencia no está separada de la lucha diaria, así como darme una visión aún más materialista y crítica, la cual aún seguiré desarrollando y llevándola a las masas, de manera firme y desinteresada.

“Luchar, fracasar, volver a luchar, fracasar de nuevo, volver otra vez a la luchar, y así hasta la victoria: ésta es la lógica del pueblo, y él tampoco marchará jamás en contra de ella.”

“El idealismo y la metafísica son las cosas más fáciles del mundo porque permiten a la gente disparate a gusto, sin basarse en la realidad objetiva, ni someterse a la prueba de ésta.”

**Mao Tse- Tung**

“Los líderes vienen y van, pero el pueblo permanece. Sólo el pueblo es inmortal; todo lo demás es efímero”.

“Para edificar, hay que saber, hay que dominar la ciencia. Hay que estudiar apretando los dientes, sin que nos importe que los enemigos se burlen de nosotros, de nuestra ignorancia, de nuestro atraso “

**Joseph Stalin**

“Es preciso soñar, pero con la condición de creer en nuestros sueños. De examinar con atención la vida real, de confrontar nuestra observación con nuestros sueños, y de realizar escrupulosamente nuestra fantasía”

“El materialismo no es "en lo fundamental, una concepción científica de la historia", sino la única concepción científica de ella”

**Vladimir I. Lenin**

“La miseria religiosa es, por una parte, la expresión de la miseria real y, por otra, la protesta contra la miseria real. La religión es el suspiro de la criatura agobiada, el estado alma de un mundo desalmado, porque es el espíritu de los estados de alma carentes de espíritu. La religión es el opio del pueblo”

“La historia no es ni hace nada. Quien es y hace es el hombre”

**Karl Marx**

“Así como Darwin descubrió la ley del desarrollo de la naturaleza orgánica, Marx descubrió la ley del desarrollo de la historia humana: el hecho, tan sencillo, pero oculto bajo la maleza biológica, de que el hombre necesita, en primer lugar, comer, beber, tener un techo y vestirse antes de poder hacer política, ciencia, arte o religión”

“En la naturaleza nada ocurre en forma aislada. Cada fenómeno afecta a otro y es, a su vez, influenciado por éste; y es generalmente el olvido de este movimiento y de ésta interacción universal lo que impide a nuestros naturalistas percibir con claridad las cosas más simples”

**Friedrich Engels**

# Índice de contenido

1. Resumen .....	1
2. Introducción .....	2
<b>2.1 Sistema Cardiovascular o Circulatorio .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Enfermedades Cardiovasculares .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Ingeniería de Tejidos.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.1 Matriz Extracelular .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.2 Electrohilado.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3.2.1 Fundamentos Físicos .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2.1.1 Cargas eléctricas .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2.1.2 Carga por contacto .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2.1.3 Ley de Coulomb .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2.1.4 Campo eléctrico .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2.1.5 Líneas de campo .....</b>	<b>14</b>
3. Antecedentes .....	15
4. Justificación .....	18
5. Hipótesis .....	18
6. Objetivos.....	19
<b>6.1 Objetivo principal.....</b>	<b>19</b>
<b>6.2 Objetivos Particulares .....</b>	<b>19</b>
7. Materiales y Métodos .....	20
7.1 Electrohilado .....	20
<b>7.2 Evaluación Morfológica.....</b>	<b>21</b>
<b>7.3 Prueba de degradación .....</b>	<b>21</b>
<b>7.4 Prueba de adhesión celular.....</b>	<b>22</b>
<b>7.5 Inmunofenotipo .....</b>	<b>23</b>
<b>7.6 Análisis Estadístico.....</b>	<b>23</b>
8. Resultados .....	24
<b>8.1 Variación de voltaje y velocidad de flujo.....</b>	<b>24</b>
<b>8.2 Variación de distancia entre punta de jeringa y colector .....</b>	<b>30</b>
<b>8.3 Variación de velocidad de rotación del colector .....</b>	<b>33</b>

<b>8.4 Prueba de degradación</b> .....	36
<b>8.5 Prueba de adhesión celular</b> .....	37
<b>8.6 Inmunofenotipo</b> .....	40
<b>8.7 Morfología de constructos por MEB</b> .....	42
8. Discusión.....	45
10. Conclusión .....	50
9. Bibliografía.....	51

# 1. Resumen

En México las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte, por tanto se ha optado por el uso de substitutos vasculares para suplir la gran demanda de trasplantes de este tipo, siendo la ingeniería de tejidos el área que ha abordado esta problemática por el uso de materiales que mimeticen la matriz extracelular nativa, ya que disminuyen su rechazo, por parte del sistema inmunológico, dentro de las técnicas desarrolladas para este fin se encuentra el electrohilado. El presente trabajo tuvo como objetivo la optimización de los parámetros de electrohilado de gelatina porcina para la generación de un andamio vascular. Se evaluó la variación de 4 parámetros de proceso (voltaje, velocidad de flujo, distancia y rpm), obteniéndose las mejores condiciones a voltajes de 15 Kv, distancias superiores o iguales a 10 cm, flujo de 0.06 ml/h y velocidades de rotación mayores a 1000 rpm. De igual manera se evaluó la adhesión con células endoteliales y células troncales embrionarias, encontrando que las nano y microfibras generadas son capaces de servir como soporte para el cultivo y expansión de las células mencionadas. Además de presentar proliferación celular en dirección de las fibras para el caos de las células endoteliales. Se concluye que para la obtención de fibras para andamios vasculares es necesario flujos de infusión bajos, distancias lo menos próximas al colector, voltajes y velocidad de rotación del colector elevadas, así mismo, los andamios generados son compatibles para el cultivo y expansión de células endoteliales humanas y células troncales embrionarias.



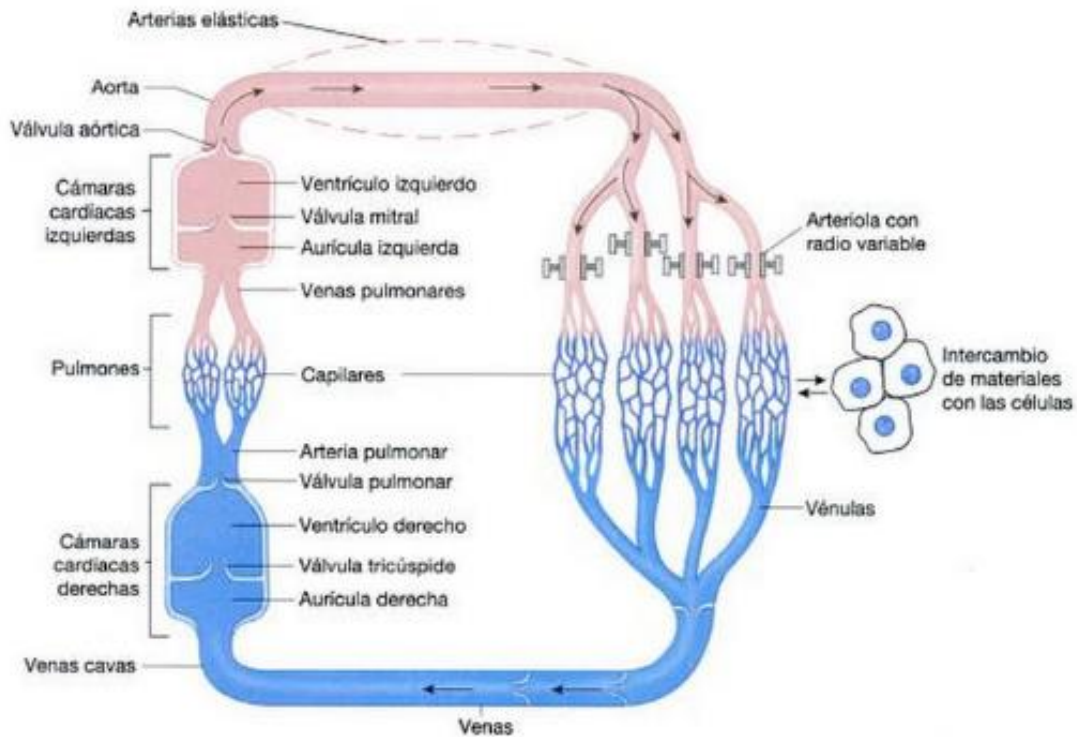
## 2. Introducción

### 2.1 Sistema Cardiovascular o Circulatorio

El sistema circulatorio (SC) tiene como objetivo perfundir y drenar los órganos del cuerpo y sus tejidos constituyentes, bombeando la sangre por el corazón hacia las distintas partes del cuerpo. La red de circulación sanguínea se compone de una serie de compartimientos, de acuerdo con el tamaño del vaso sanguíneo y la dinámica del flujo sanguíneo: 1) arterias (0.2- 25 mm); 2) arteriolas (0.01- 0.02); 3) capilares (0.006- 0.010); 4) vénulas (0.2- 5 mm); y 5) venas (0.2- 35 mm) (Thiriet, 2014) (Figuras. 1 y 2).

	Diámetro Medio	Espesor medio de la pared	Endotelio	Tejido Elastico	Musculo Liso	Tejido Fibroso	
Arteria	4 mm	1 mm					
Arteriola	30 μm	6 μm					
Capilar	8 μm	0.5 μm					
Vénula	20 μm	1 μm					
Vena	5 mm	0.5 mm					

**Figura 1.** Estructura de vasos sanguíneos. El diámetro y la composición de los vasos sanguíneos son variables. El endotelio y su tejido elástico subyacente constituyen la túnica íntima (Silverthorn, 2008).

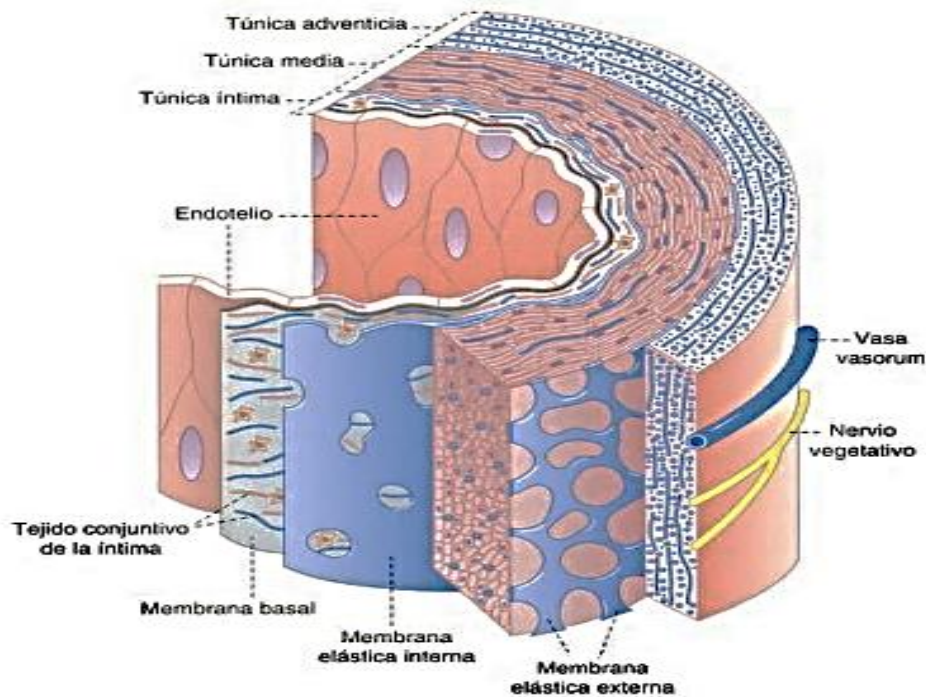


**Figura 2.** Modelo funcional del Aparato Cardiovascular. El corazón funciona como dos bombas dispuestas en serie. Las arterias sistémicas constituyen un reservorio de presión que mantiene el flujo sanguíneo durante la relajación del ventrículo. En las arteriolas, que se muestran como tornillos ajustables, representan su radio variable, se producen las modificaciones de resistencia. El intercambio entre la sangre y las células solo se produce en los capilares (Silverthorn, 2008).

El papel vital del Sistema Cardiovascular es mantener la homeostasis en el cuerpo, la cual depende del movimiento continuo y controlado de la sangre a través de los tejidos, ya que los nutrientes esenciales (oxígeno, dióxido de carbono, desechos celulares, etc.) pasan a través de esta hacia los fluidos que rodean a las células, además de estar implicados en la respuesta inmune.

La perfusión de tejido depende de: 1) Estado de irrigación de las arterias y venas; 2) flujo de entrada con sus parámetros específicos; 3) reología de la pared del vaso sanguíneo; y 4) control de la irrigación. Aunado a esto, los vasos sanguíneos son capaces de responder a los cambios locales en el estrés ejercido por la sangre que fluye en sus paredes. La base arterial se caracteriza por sus respuestas dependientes del flujo miogénicas y metabólicas para limitar la poscarga cardíaca y adaptar el flujo sanguíneo a la demanda de tejidos (Thiriet, 2014).

Los componentes estructurales más importantes de los vasos sanguíneos son: 1) la capa íntima o interna, formada por endotelio, tejido conjuntivo subendotelial y una membrana elástica interna; 2) Capa media, formada por células musculares lisas, de organización circular y fibras de tejido conjuntivo; y 3) la capa adventicia o externa, formada por fibrillas de colágeno longitudinales, fibras de elastina y fibroblastos (Welsch, 2008) (Figura 3).



**Figura 3.** Anatomía general de vaso sanguíneo. Compuesto por 3 capas: Túnica Intima, Media y Adventicia (Welsch, 2008).

Las células endoteliales, presentes en la Capa Íntima, con diámetros de hasta 50  $\mu\text{m}$  de largo y 10- 15  $\mu\text{m}$  de ancho, tienen una gran cantidad de vesículas de transición de paredes lisas; en su citoplasma hay cuerpos de Weibel- Palade (gránulos alargados con estructuras internas tubulares) que contienen el factor de Von Willebrand (glucoproteína plasmática multimérica heterogénea que se sintetiza en todos los endotelios. También expresan moléculas de adhesión celular (CAM), así mismo se unen con los ligandos (integrinas) a la superficie de leucocitos, linfocitos y matriz extracelular, presentes en la sangre (Eynard *et al.*, 2008).

Así mismo se ha utilizado marcadores específicos para poder identificar fenotípicamente a estas células, por medio del inmunoensayo de las moléculas presentes en la membrana celular,

como son CD 34 +, CD 14 +, CD 31 +, CD 36 +, CD 105 +, CD 106 +, CD 144 +, CD 146 +, Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial + (KDR), Factor von Willebrand + (FvW), BS-1 +, UEA- 1 +, LDL acetilado + y Tie- 2/Tek +( Macías *et al.*, 2010).

## **2.2 Enfermedades Cardiovasculares**

En el mundo las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) corresponden a la principal causa de muerte, ya que cada año mueren más personas por este padecimiento. Correspondiendo dos cuartas partes de este tipo de muertes a países con ingresos bajos o medios (> 75%), como es el caso de México (OMS, 2015).

Estas enfermedades corresponden al grupo de desórdenes asociados al corazón y vasos sanguíneos, entre los cuales se encuentran:

- La cardiopatía coronaria: enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco.
- Las enfermedades cerebrovasculares: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- Las arteriopatías periféricas: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.
- La cardiopatía reumática: lesiones del músculo cardíaco y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por bacterias denominadas estreptococos.
- Las cardiopatías congénitas: malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento.
- Las trombosis venosas profundas y embolias pulmonares: coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones (Guadalupe *et al.*, 2016)

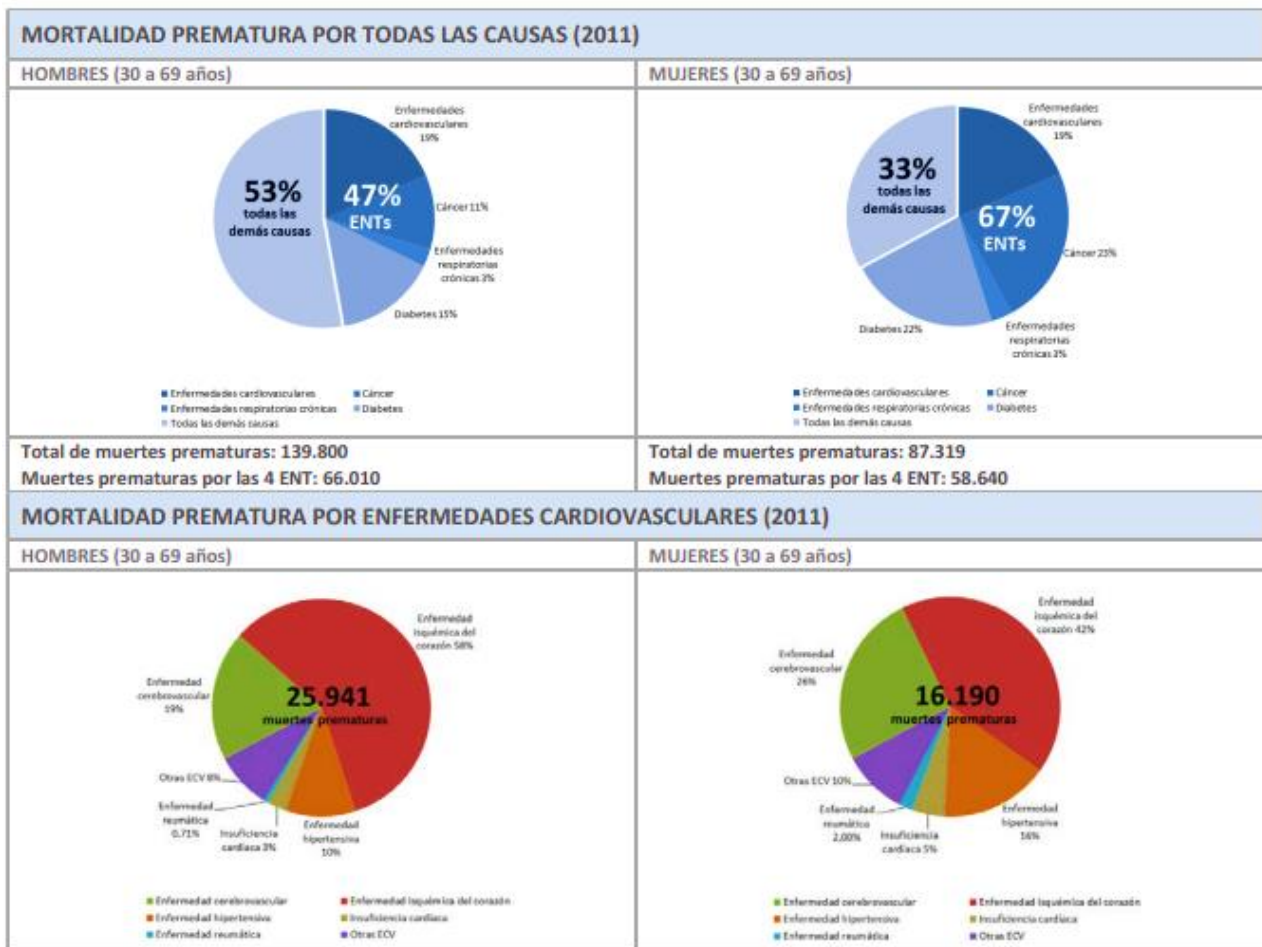
Los ataques al corazón, suelen ser fenómenos agudos que usualmente se deben a obstrucciones en los vasos sanguíneos que impiden que la sangre fluya hacia el corazón o el cerebro. Estas obstrucciones pueden ser por la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos debido a la presencia de una combinación de factores de riesgo, tales como el tabaquismo, dietas altas en grasas, obesidad, inactividad física, consumo nocivo de alcohol, hipertensión arterial, diabetes e hiperlipidemia (Sánchez *et al.*, 1999).

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Se calcula que tan solo en el 2012 murieron cerca de 17.5 millones de personas, lo cual representa el 31% de todas las muertes registradas en el mundo, de estas 7.4 millones se debieron a cardiopatía coronaria, y, 6.7 millones a cerebrovasculares (OMS, 2015).

Para el caso de México esto no cambia mucho ya que, al igual que a nivel mundial, corresponde una de las principales causas de muerte, se ha reportado que en el 2011, el 19 % de las muertes en el país se debieron a estas enfermedades, seguidas del cáncer (11- 23 %), Diabetes (15- 22 %) y enfermedades respiratorias crónicas (3%) (Figura 4).

Dentro de las principales causas de muerte para las ECV se encuentran las enfermedades isquémicas del corazón (58- 42 %), seguido de las enfermedades cerebrovasculares (26- 19%), Hipertensión (16- 10 %), insuficiencia cardiaca (10- 5 %), enfermedad reumática (5- 3%), entre otras (10- 8 %) (Figura. 4).

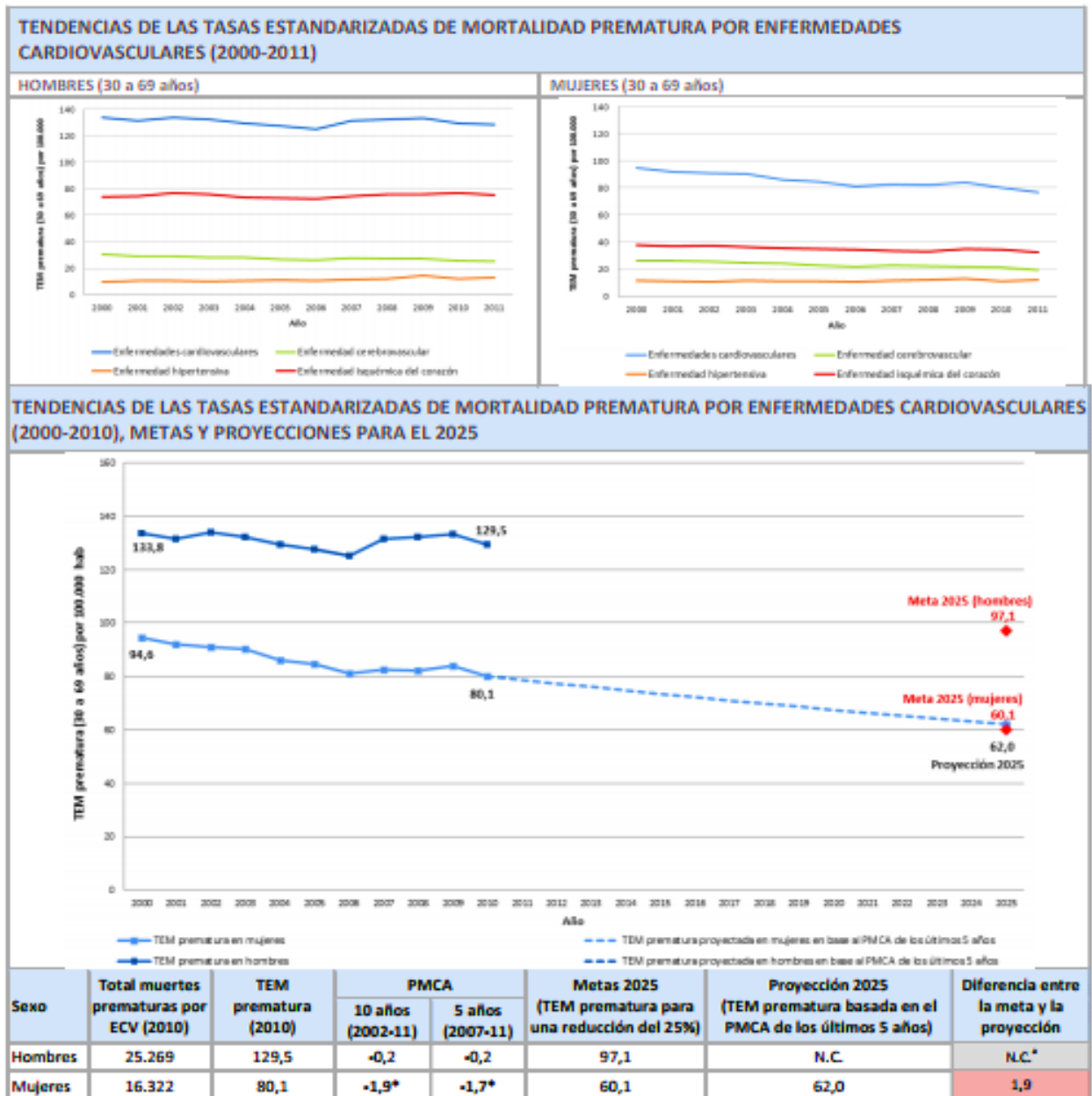


**Figura 4.** Mortalidad de Enfermedades Cardiovasculares en México. Fuente: OPS/OMS Sistema de información regional de mortalidad 2014 (ICD-10: Enfermedad cardiovascular (I00-I99), enfermedad cerebrovascular (I60-I69),

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

enfermedad hipertensiva (I10- I15), enfermedad isquémica del corazón (I20-I25), cáncer (C00-99), diabetes (E10-14) y enfermedad respiratoria crónica (J30-98)).

Se estima que para el 2020, la mortalidad por ECV se reduzca en un 97.1 personas por cada 100000 habitantes, para el caso de los hombres, y para las mujeres un 60.1 personas, es decir, un 25 % menos a los actuales, sin embargo dicho número aún es muy elevado (OMS y OPS, 2014) (Figura 5).



**Figura 5.** ECV: Enfermedades cardiovasculares; TEM prematura: Tasa estandarizada de mortalidad prematura (30 a 69 años) por 100.000 habitantes; PMCA: Porcentaje medio de cambio anual; \*: El PMCA es distinto de cero con significación estadística para un valor de  $p=0.05$ ; N.C.: No calculable. Fuente: OPS/OMS Sistema de

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

información regional de mortalidad 2014 (ICD-10: Enfermedad cardiovascular (I00-I99), enfermedad cerebrovascular (I60-I69), enfermedad hipertensiva (I10- I15), enfermedad isquémica del corazón (I20-I25), cáncer (C00-99), diabetes (E10-14) y enfermedad respiratoria crónica (J30-98)).

Debido a que un gran número de pacientes presentan enfermedades cardiovasculares, existe una elevada demanda clínica por obtención de vasos sanguíneos funcionales. Así mismo los aloinjertos y xenoinjertos han sido ampliamente utilizados para suplir esta necesidad, ofreciendo una permeabilidad a largo plazo, sin embargo su utilidad clínica está limitada por el potencial de la respuesta inmune, así como su disponibilidad. Los injertos sintéticos como el poli (tereftalato de etileno) (Dacron) y Politetrafluoruroetileno expandido (ePTFE), han sido ampliamente utilizados para las reconstrucciones vasculares periféricas, sin embargo estos injertos tienden a fallar cuando se aplican a vasos sanguíneos de diámetros reducidos ( $\leq 5$  mm), generando trombosis, estenosis o dilatación aneurismática; por lo que la generación de estos sustitutos, siguen siendo principales obstáculos (Figura 6), como en la arteria coronaria (Jin *et al.*, 2008; Pektok *et al.*, 2008.).



**Figura 6.** Injerto de ePTFE trombosado en un modelo de rata a 14 días del implante (Bunján *et al.*, 2004). La T denota el trombo presente en el injerto.

## 2.3 Ingeniería de Tejidos

Actualmente existen 18 mil personas registradas en el Consejo Nacional de Trasplantes que requieren un órgano; sin embargo solo 6.3% han dispuestos de este, el resto se encuentran en lista de espera. De acuerdo a la OMS, para suplir la demanda de órganos, el número de donantes debe ser de 20 por cada millón de habitantes, en nuestro país solo es de 9 por cada millón (Moreno y Rivera, 2015).

Debido a ello, esta problemática ha sido abordada con investigación en ingeniería de tejidos; que ha permitido el desarrollado de métodos eficaces para reemplazar órganos o tejidos dañados. Por lo tanto, la fabricación de andamios en tres dimensiones que mimeticen la matriz extracelular autóloga es uno de los principales desafíos de esta rama de la ciencia (Zhou *et al.*, 2010).

Entendemos como ingeniería de tejidos al campo que utiliza conocimientos de ingeniería, ciencias de los materiales y ciencias de la vida para generar componentes estructurales que pueden ser utilizados como substitutos biológicos que reemplazan, mantienen o mejoran la función de tejidos u órganos dañados.

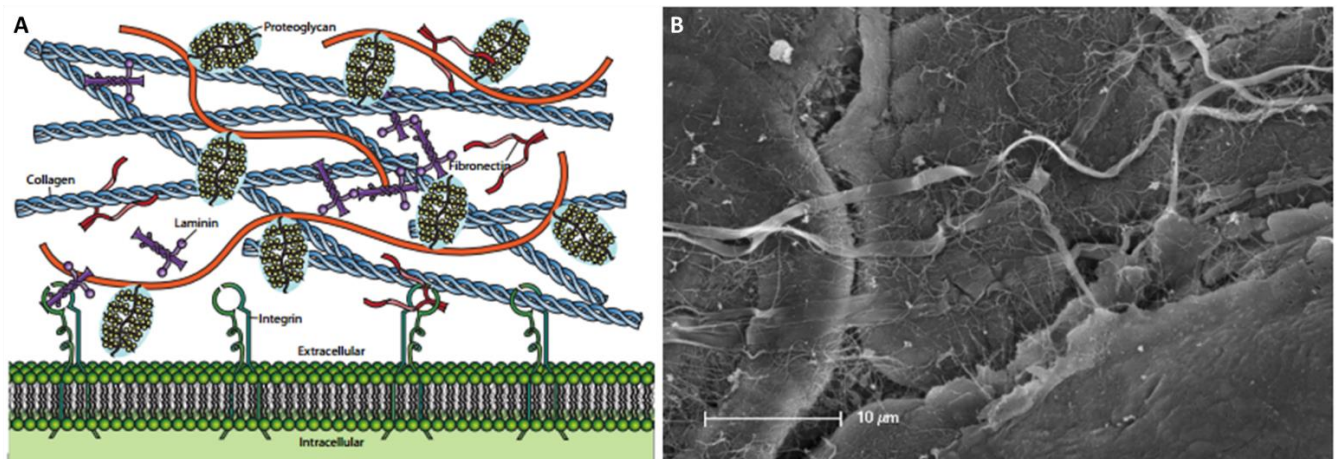
Históricamente los enfoques de la ingeniería de tejidos se han clasificado en tres: células aisladas, materiales inductivos de tejido (andamios) y matrices cargadas de células (constructos). La presencia de células aisladas es atractiva debido a su simplicidad y facilidad, pero la tasa de retención celular es muy baja, así mismo es insuficiente para defectos a gran escala. El uso de andamios es una opción más prometedora, sin embargo los constructos de materiales naturales, sintéticos o compuestos son la plataforma más completa y robusta que puede incluir los beneficios de los enfoques anteriores y aún más. (Sethuraman *et al.*, 2017).

### 2.3.1 Matriz Extracelular

El objetivo de las matrices en un andamio, es proporcionen un microambiente fisiológicamente relevante para las células sembradas dentro de ellas, con una eventual reabsorción de estas matrices a medida que son reemplazadas por la Matriz Extracelular (MEC). Entendemos a la MEC, como una red supramolecular secretadas por las células que constituyen el microambiente celular, compuesto por glicoproteínas, colágenos, glicosaminoglicanos y



proteoglicanos. La MEC proporciona el volumen, forma y fuerza de muchos tejidos *in vivo*. Mientras que *in vitro*, la mayoría de las células animales sólo pueden proliferar cuando se unen a las superficies a través de MEC, ya que también participa como sustrato para la migración celular. También está implicada en eventos de señalización celular por varios receptores de factores de crecimiento y adhesión (integrinas) en la superficie celular. Las propiedades físicas externas de MEC también pueden tener un papel en el proceso de señalización ya que presentan moléculas flexibles y extensibles, así mismo la tensión mecánica puede exponer sitios críticos, que podrían interactuar con factores de crecimiento o sus receptores. Las proteínas y estructuras de MEC pueden determinar el comportamiento celular, la polaridad, la migración, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia comunicándose con el citoesqueleto intracelular y la transmisión de las señales del factor de crecimiento. Las Integrinas y proteoglicanos son los principales receptores de adhesión MEC que cooperan en eventos de señalización, la determinación de los resultados de señalización y, por tanto, el destino de las células (Soo *et al.*, 2011) (Figura 7).



**Figura 7.** A) Esquema de Matriz Extracelular con sus componentes (Wong, 2009) y B) Micrografía Electrónica de Barrido de Matriz Extracelular (Cintas largas son fibras de colágeno) (Megías *et al.*, 2014).

Las características estructurales de MEC, como las fibras y los poros, con dimensiones características, pueden influir en los mecanismos de orientación de contacto mediante los cuales las células migran a través de ambientes extracelulares tridimensionales. *In vitro* se han diseñado sustratos celulares que presentan diferentes topografías a nanoescala a través de una combinación de geometría y patrones. Por lo cual, a partir las características de las MEC, las características básicas de los andamios nanoscópicos en tres dimensiones (nanofibra) es imitar la estructura física de las proteínas en la MEC. La principal ventaja en el uso de estos

materiales es su elevada relación superficie-volumen, porosidad e interconectividad que todos los tipos de nanofibras pueden promover, así como la regeneración del tejido mediante la maximización de las interacciones célula-MEC; el transporte de factores tróficos, oxígeno, nutrientes, dióxido de carbono, desechos, migración celular y vascularización. Los principales métodos para fabricar nanofibras son electrohilado, que crea fibras alineadas y aleatoriamente distribuidas; Auto-ensamblaje, que emula el montaje nanofibroso de la MEC nativa; y la transición de fase, que permite la fabricación de estructuras de tipo esponja, en forma de una red fibrosa (Lutolf y Hubbell, 2005; Shi *et al.*, 2010).

### 2.3.2 Electrohilado

El electrohilado es un proceso de “*hilado*” en seco que utiliza la fuerza electrostática para obtener fibras a partir de una solución de polímero líquido o fundido. El proceso de formación de estas fibras es totalmente físico. Para llevarse a cabo, primero se bombea el polímero a través de una aguja, la cual se carga simultáneamente a una polaridad (+), en frente de esta se coloca un colector, el cual se carga a una polaridad contraria a la de la aguja (-), lo que provocará un efecto de atracción entre ambos, formando un campo electrostático. El voltaje aplicado provoca una deformación cónica de la gota del polímero infundido (Cono de Taylor), el cual tendrá una dirección hacia el polo opuesto (-), formándose por el aumento entre las fuerzas de repulsión, presentes en la solución; por lo que al aplicar una mayor tensión, producto del aumento del voltaje, se formará un chorro, a partir de la gota formada que se moverá hacia el cátodo (-). Con forme chorro se mueve, este disminuirá su tamaño, el ángulo que forma el cono de Taylor con respecto a la aguja es de 30 °. Durante la trayectoria entre la punta de la jeringa hacia el colector, el disolvente se evapora, dejando fibras sólidas al llegar a este, precipitándose a una velocidad de vuelo de partir de 40 m/s en adelante. Durante la trayectoria de vuelo del polímero, la dirección del chorro se da, en un principio, de forma recta, sin embargo con forme se aleja del ánodo (+), el chorro comienza a moverse lateralmente formando espirales (Greiner y Wendorff, 2007) (Fig. 10). El diámetro de las fibras producidas por este método va esta entre 10  $\mu$ m a 10 nm (Cramariuc *et al.*, 2013).

### 2.3.2.1 Fundamentos Físicos

#### 2.3.2.1.1 Cargas eléctricas

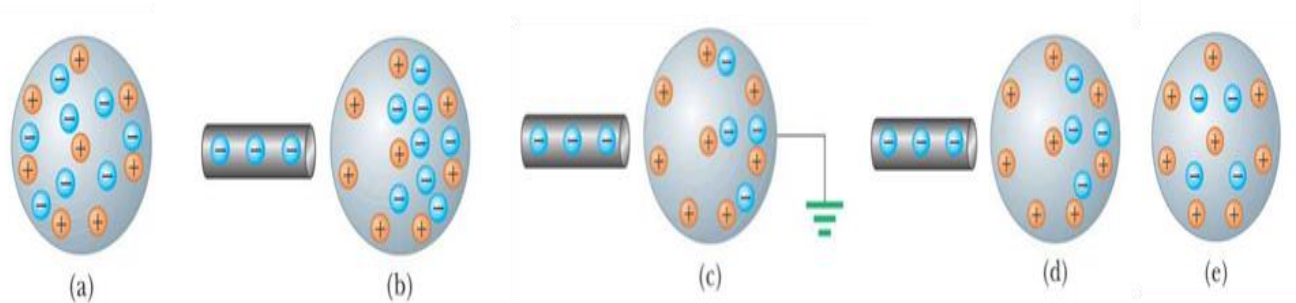
La materia ordinaria se compone de átomos o moléculas eléctricamente neutros, que contienen cantidades iguales de cargas positivas (en el núcleo) y negativas (los electrones). Cuando se frota objetos unos pocos electrones de los átomos de un objeto se transfieren al otro; mientras que la mayoría permanecen inalterados. Estas ligeras perturbaciones en el equilibrio, ocasionan la mayoría de los efectos eléctricos observados comúnmente.

Los materiales usualmente se clasifican atendiendo a la capacidad de los electrones para fluir sobre ellos (conductores y aislantes).

Los conductores eléctricos son materiales en los cuales los electrones más externos de ellos se comportan como electrones libres, estos no están ligados a los átomos, por lo que pueden moverse libremente a través del sólido, algunos ejemplos de estos son Cu, Al y Ag. Cuando un conductor se carga en una región pequeña, la carga rápidamente se distribuye sobre toda la superficie del material, contrario a lo que ocurre en los materiales aislantes, donde los electrones están unidos a los átomos de los sólidos, por lo que no pueden moverse con facilidad a través de la superficie del sólido como es el caso del vidrio, hule, madera, etc. Cuando se cargan en una pequeña región, la carga difícilmente se mueve a otras regiones del sólido (Resnick et al., 2011).

#### 2.3.2.1.2 Carga por contacto

Cuando se induce una carga eléctrica a un objeto, se realiza poniendo en contacto un objeto cargado (inductor) (-), al objeto a cargar, este proceso crea una redistribución de los electrones y protones presentes en el material al que se le está induciendo la carga eléctrica, de tal manera que los protones presentes en el material inducido estarán más próximos al inductor (-). Si se conectase a tierra dicho material, provocaría que algunos de los electrones del material dejaran el mismo a través del alambre a tierra, si se quita dicha conexión posteriormente, el material inducido presentaría más cargas positivas (carga por inducción) (Resnick et al., 2011) (Figura 8).



**Figura 8.** Distribución de protones y electrones en material expuesto a un inducido. A) Material; B) material con inductor; C) Material con conexión a tierra e inductor; D- E) Material tras desconectar conexión a tierra e inductor, redistribución de protones y electros posterior a la acción del inductor (Resnick et al., 2011).

### 2.3.2.1.3 Ley de Coulomb

Esta ley nos permite saber la fuerza eléctrica que existe entre dos cargas. Esta fuerza depende del valor de la carga y la distancia entre ellas. Dicha fuerza es inversamente proporcional al cuadrado de la separación que existe entre las dos cargas ( $r^2$ ) y se presenta a lo largo de una línea que las une. Además la fuerza es proporcional al producto de las cargas ( $q_1$  y  $q_2$ ) de las partículas.

$$F = K \frac{(q_1)(q_2)}{r^2}$$

Donde F es la fuerza del campo eléctrico, K es la constante de Coulomb ( $8.98 \times 10^9 \text{ Nm}^2/\text{C}^2$ ),  $q_1$  y  $q_2$  son las cargas en Coulomb (Resnick et al., 2011).

### 2.3.2.1.4 Campo eléctrico

En el espacio que rodea a una carga Q, se ejerce cierta influencia, de tal manera que cuando se coloca otra carga q, próxima a la primera, aparecerá sobre esta una fuerza de interacción, debido a que se encuentra en el campo eléctrico generado por Q. La intensidad del campo electrostático (E), generado por una carga Q, en un punto en el espacio, es la fuerza que dicha carga ejerce, se mide en N/C o V/m.

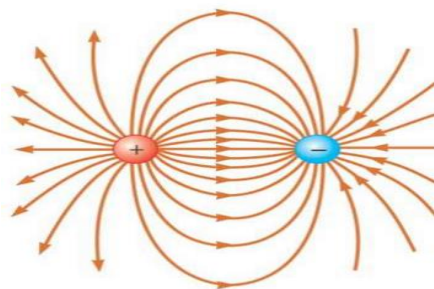
$$E = \frac{F}{q} = K \frac{Q}{r^2}$$

Donde E es el campo producido por Q y q denota la carga prueba (Resnick et al., 2011).

### 2.3.2.1.5 Líneas de campo

Son la representación gráfica de la existencia de un campo eléctrico con algunas de sus propiedades.

Estas líneas tienen una dirección que es la misma que la del vector del campo eléctrico (E). El número de líneas por unidad de área a través de una superficie perpendicular a las líneas de campo es proporcional a la magnitud del campo eléctrico en esa región. La tangente a la línea del campo eléctrico que cruza un punto cualquiera del espacio denota la dirección del campo eléctrico allí. La magnitud del campo eléctrico en un punto cualquiera es proporcional al número de líneas por unidad de superficie perpendicular a estas líneas, es decir, cuanto más cerca se encuentren las líneas de un punto, mayor es la fuerza del campo en ese punto. Para el caso de un dipolo, el número de líneas que parten de la carga positiva es igual al que llegan a la carga negativa (Resnick et al., 2011) (Figura 9).



**Figura 9.** Líneas de campo entre dos cargas de distinta polaridad (Resnick et al., 2011).

### 3. Antecedentes

Se ha buscado el desarrollo de técnicas para generar andamios vasculares con diámetros inferiores a los 6mm. Dentro de estas se encuentra el *electrospinning* o *electrohilado*, la cual permite generar fibras con diámetros que entre 10 nm a 10  $\mu$ m. Esta técnica provee la capacidad de producir materiales a escalas de tamaño similares a las que se encuentran *in vivo*; por lo que se ha elevado el interés para aplicaciones clínicas (Sill y Recum. 2008).

Dentro de los polímeros electrohilados más usados, se encuentran de dos clases; naturales y sintéticos. Presentando los primeros propiedades biológicas tales como bioactividad, presencia de ligandos de unión celular, susceptibilidad a la degradación proteolítica y remodelación natural (Agarwal *et al.*, 2008).

Entre los polímeros naturales está la gelatina (GE) la cual es un derivado de colágeno. Debido a la similitudes con colágeno, la GE se ha convertido en un polímero atractivo para la ingeniería de tejidos (Sell *et al.*, 2009). Por lo que se han generado investigaciones para optimizar las concentraciones de dicho polímero en solución, variándose las concentraciones desde 2 a 15%, siendo las concentraciones de 10 a 12.5% las mejores, ya que las fibras producidas a no mostraban aberraciones en forma de cuentas de collar en las fibras producidas (Zheng *et al.*, 2004).

Entre las investigaciones realizadas en GE se encuentran las elaboradas por Lia *et al.*, (2005), en las que reportan que el diámetro de las fibras de GE y colágeno electrohilados se redujeron de 500 a 200 nm, además presentaron resistencias a la tracción de 12.8 MPa y alargamientos de 0.08 a 0.1 mm. De igual manera, se han realizado investigaciones para injertos vasculares por Wang *et al.*, (2009), quienes electrohilaron GE/ fibroina de seda y PLA. Obteniendo fibras con un 82 % de porosidad, 2.21 MPa de resistencia, flexibilidad de 60% y una resistencia a presión de ruptura de 1596 mm Hg, superior a las reportadas en vasos sanguíneos naturales.

Aunado a esto, también se han realizado esfuerzos para la integración celular en las nanofibras producidas por esta técnica, como son las investigaciones de Chen *et al.*, (2010), donde electrohilaron colágeno y quitosano, colocando células endoteliales y de músculo estriado por separado, presentando una mayor proliferación celular en los días 7 y 14 de cultivo. Así mismo, Telemeco *et al.*, (2005), elaboraron nanofibras de ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), PGA/PLA, colágeno tipo I y gelatina, y posteriormente evaluaron la migración e

infiltración celular por medio de injertos cilíndricos en el vientre del vaso lateral de ratas, posteriormente se retiraron tras 7 días. Observaron que el colágeno tipo I poseía grandes ventajas, ya que permitió una rápida infiltración de células fibroblastos intersticiales y células endoteliales, dichas diferencias, dichas diferencias se debieron al tamaño de los poros de cada tipo de nanomaterial. También, se han elaborado nanofibras de colágeno revestido con PLA y policaprolactona (PCL), y se cultivaron sobre estas células endoteliales de arteria coronaria, observándose un aumento de la viabilidad celular sobre los andamios con mayor cantidad de colágeno (Hea *et al.*, 2005).

Un inconveniente de la GE es la solubilidad de las fibras en aplicaciones médicas a largo plazo, por lo que se ha propuesto la reticulación o “crosslinking”, como una estrategia para mejorar su vida media y resistencia (Panzavolta *et al.*, 2011). Se ha reportado que el uso de glutaraldehído (GTA) en el crosslinking, permite que las fibras electrohiladas presenten una resistencia hasta diez veces mayor; Zhang *et al.* (2006).

Otro de los parámetros en este proceso importe, durante el electrohilado, es el disolvente a utilizar. Algunos estudios utilizan disolventes ácidos, tales como ácido acético para disolver polímeros, entre ellos GE (Ju-Ha *et al.*, 2008).

Así mismo se ha observado que para la producción de nano y microfibras por este método, la morfología de las mismas es dependiente de distintos parámetros como es, voltaje aplicado (Yördem *et al.*, 2008) distancia entre jeringa y colector, velocidad de flujo (Sill y Recum, 2008) y la velocidad de rotación del colector.

Por lo que al variar estos parámetros las fibras obtenidas presentarán distintas características, como son las investigaciones de Ju *et al.* (2008), donde utilizaron parámetros de hilado de 12 kV y 8 cm de distancia entre la jeringa y colector, con GE al 10%, variándose las concentraciones de los disolventes (ácido acético y acetato de etileno), obteniéndose fibras con distintas propiedades reológicas, así como diámetros desde 45 145 nm. Así mismo Hsin *et al.*, (2008), elaboraron fibras con presencia de cuentas de collar (aberraciones en la formación de las fibras), así como carentes de las mismas, con parámetros de electrohilado de flujo de 1 ml/h y 10 cm de distancia entre aguja y colector, velocidad de colector de 120 rpm; variando voltajes de 15 a 25 kV y concentraciones de GE de 10 a 20%, obteniendo fibras de hasta 85 nm. Seok *et al.*, (2005), elaboraron fibras de GE con ácido fórmico como disolvente,

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

obteniendo diámetros de 70 a 170 nm, con parámetros de hilado de 6 a 25 kV, distancia entre el colector de 7.5 a 25 cm.

Así mismo, la mayoría de las nanofibras obtenidas son en forma no tejida, y por ello su utilidad es limitada. Dentro de las pocas investigaciones realizadas con nanofibras alineadas está la de Matthews *et al.*, (2001), que utilizaron un cilindro giratorio a 4500 rpm, utilizado colágeno. Los resultados muestran solo alineaciones limitadas.

Por lo anterior, ya que las variaciones en los parámetros dependerán muchas de las características de las fibras elaboradas, controlar el diámetro de estas es de vital importancia ya que *in vivo*, las proteínas que están presentes en la matriz extracelular tiene diámetros de entre 50 a 500 nm (Hasan et al., 2014), por lo que el diámetro de las fibras elaboradas debe estar dentro de estas medidas.



## 4. Justificación

Las enfermedades cardiovasculares corresponden a la primer causa de muerte del mundo, y por consiguiente la demanda de trasplantes de vasos sanguíneos va en ascenso, es necesaria la elaboración de substitutos biológicos que suplan estas necesidades, por lo que la producción de andamios para vasos sanguíneos por métodos más eficaces es de vital importancia.

## 5. Hipótesis

Si al variar el voltaje, velocidad de flujo, distancia entre jeringa y colector, así como velocidad de rotación del colector es posible obtener diferentes diámetros y morfologías de micro y nanofibras. Con una combinación de estos parámetros se podrá obtener fibras de tamaños y morfologías óptimos para un andamio vascular.

## 6. Objetivos

### 6.1 Objetivo principal

- Definir los parámetros óptimos del electrohilado de gelatina para la producción un andamio vascular.

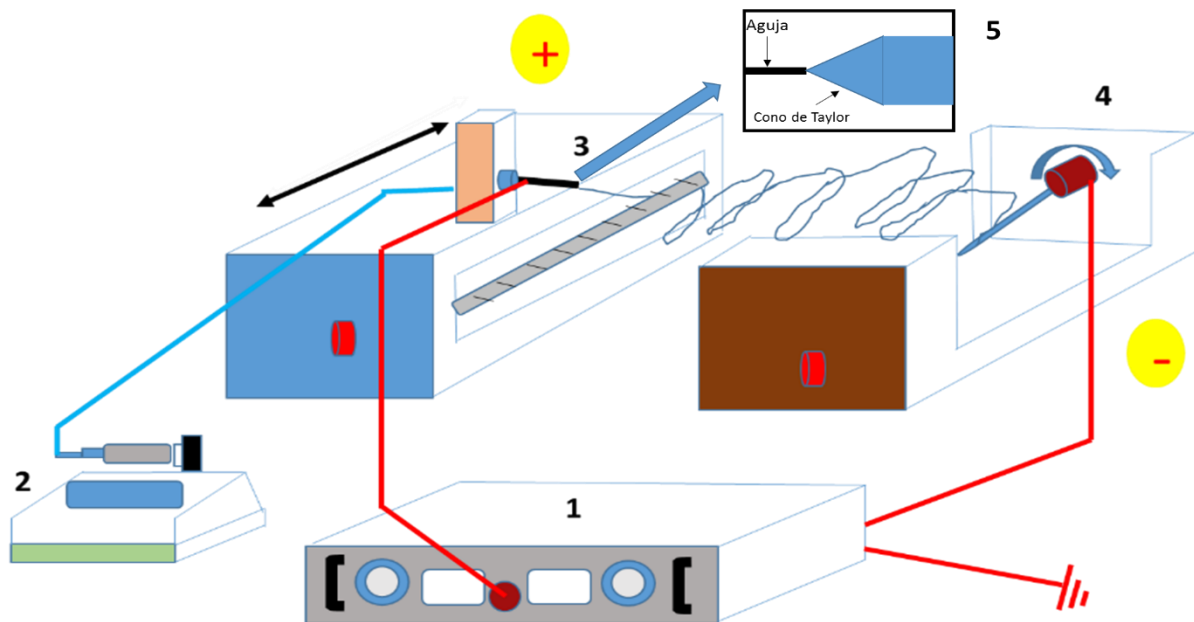
### 6.2 Objetivos Particulares

- Determinar la velocidad de flujo y voltaje, velocidad de rotación del colector y distancia entre punta de jeringa y colector óptimos de electrohilado.
- Probar la adhesión celular de Células Endoteliales (CE) y Células Troncales Embrionarias (CTE) en andamios de gelatina porcina.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Electrohilado

En el laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos, se cuenta con un equipo de electrohilado, el cual consta de: una bomba de infusión, un mandril giratorio y una fuente de poder de alta tensión (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema de aparato para electrohilado. 1) Fuente de alimentación de alta tensión; 2) bomba de infusión; 3) aguja con movimiento horizontal; 4) Colector con mandril giratorio y 5) Cono de Taylor formado por la ruptura de la tensión superficial de la solución.

Se realizó una solución de GE al 10% (p/v) en ácido acético Glacial (99%); se mantuvo en agitación durante 48 h.

Se utilizó un mandril giratorio que su funcionamiento se estableció a 1000, 2000 y 3000 rpm. Una bomba de infusión a un flujo entre 0.06 1.0 ml/ h, una fuente de alimentación de alta tensión en 10, 11 o 15 kV y la distancia de punta de la aguja y el colector entre 6, 10 y 12 cm.

A continuación se resume el modelo experimental aplicado:

Voltaje (kV)	Flujo (ml/h)	Distancia (cm)	Velocidad de colector (rpm)
10	1	6	1000
		10	1000
			2000
			3000
	12	1000	
	0.8	10	1000
10		1000	
12	1	10	1000
15	1	10	1000
	0.2	10	1000
	0.09	10	1000
	0.06	6	1000
		10	1000
			2000
			3000
	12	1000	

Figura 11. Variables evaluadas durante el proceso experimental, así como sus respectivos niveles.

## 7.2 Evaluación Morfológica

Todos los andamios elaborados fueron analizados por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), marca Jeol JSM-5310LV a 15 kV y 30 Pa. Para evaluar su morfología, se midió el diámetro de las fibras así como la presencia o ausencia de aberraciones mediante el programa de análisis de imágenes “Image J” (NIH, USA). Cada andamio, así como sus respectivas mediciones se realizaron por triplicado.

## 7.3 Prueba de degradación

Tras la obtención de los mejores tratamientos, se procedió a realizar una prueba de degradación, a uno de estos, en diferentes condiciones a lo largo del tiempo. Primero se trataron los andamios con vapor de GA al 1% durante 48 h y se dejaron secar por 2 h a

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

temperatura ambiente, posteriormente se colocaron los andamios en PBS (Buffer de fosfato) 1X pH 7.4, y se pesaron cada 24 h para así determinar la cantidad de masa perdida producto de la degradación de la GE, esto se realizó durante 7 días. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% D = ((W_o - W_f)100)/W_o$$

Donde D corresponde al porcentaje de masa degradada,  $W_o$  la masa inicial y  $W_f$  la masa final.

### 7.4 Prueba de adhesión celular

Se realizaron cultivos cultivaron sobre los andamios elaborados; se cultivaron células endoteliales (CE) y células troncales embrionarias (CTE) en cultivos independietes. Para ello se electrohilaron los andamios sobre cubre objetos de 4.82 cm<sup>2</sup> y se sometieron a un proceso de esterilización en óxido de etileno antes de la siembra celular.

Posteriormente se colocaron los andamios estériles en cajas de cultivo celular de 6 pozos y se inocularon CE o CTE. Cada uno de estos por triplicado. Se utilizaron dos controles, uno con cubre objetos y otro únicamente las células (CE o CTE).

Para el caso de las CE se cultivaron en medio de cultivo EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium) suplementado con 10 % de FBS (Suero Fetal bovino), se colocaron un total de 26,000 cel/ cm<sup>2</sup> mientras que para las CTE se cultivaron en medio de cultivo D-MEM (Dubecco's Modified Eagle Medium), suplementado con 10% de FBS, se inoculó un total de 188,000 células por andamio.

Para confirmar la adhesión celular, se observaron los constructos elaborados en Microscopia Electrónica de Barrido. Para ello previamente se fijaron las muestras con paraformaldehído al 4% y se deshidrataron en alcohol del 20 al 70 %, disuelto en PBS 1 X.

## 7.5 Inmunofenotipo

Por medio de una inmunocitoquímica se determinaron los fenotipos celulares de las células presentes en los constructos con CE (CD 133 +) y CTE (Nanog y Oct  $\frac{3}{4}$ ). Para ambos casos se utilizó como control negativo. Para ello se fijaron con paraformaldehído al 4% por 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 1X, posteriormente fueron permeados tratados con solución 0.1% de Triton DPBS 100X sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  se lavó con PBS 1X, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con PBS 1X por 15 min, se colocó Anticuerpo CD133 + para constructos con CE y para los constructos con CTE se colocaron Nanog y Oct-  $\frac{3}{4}$ , como marcador nuclear se colocó DAPI, para ambos.

## 7.6 Análisis Estadístico

Se realizó prueba de Kolmogórov- Smirnov, con  $p < 0.05$ , como estadísticamente significativo para determinar la normalidad de los datos.

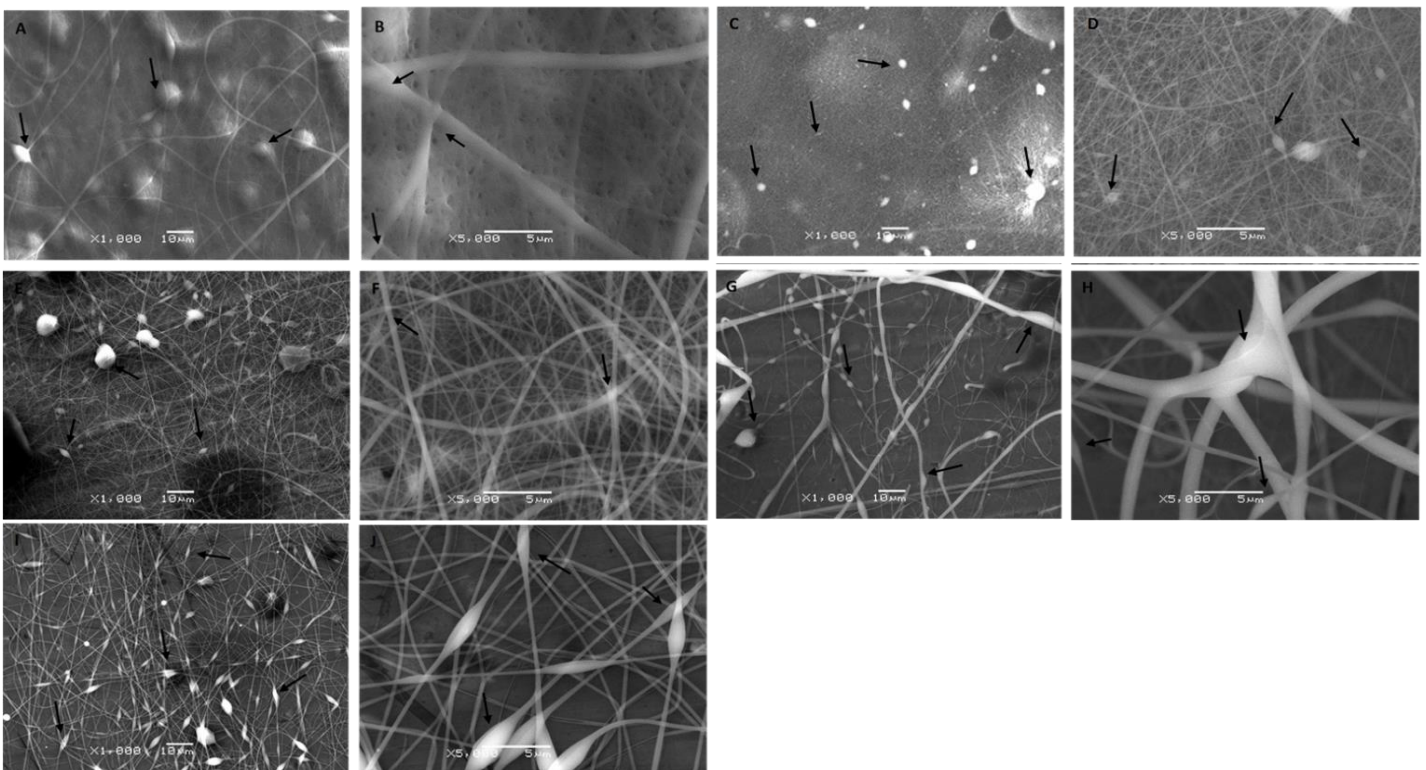
Para el análisis de los factores con sus respectivos niveles se realizó una prueba de Kruskal-Wallis., con  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo, seguido de una prueba de Bonferroni.

## 8. Resultados

### 8.1 Variación de voltaje y velocidad de flujo

Como primera etapa del proyecto, se evaluaron los parámetros, velocidad de flujo de infusión y voltaje aplicado. Se realizaron andamios de ácido acético/ GE al 10%. Las características del electrohilado fueron: 1) distancia entre aguja y colector: 10 cm, 2) Velocidad de rotación de colector: 1000 rpm, 3) Velocidad de flujo: 1, 0.8 y 0.6 ml/ h y 4) Voltaje: 10, 12 y 15 kV (Figura 11).

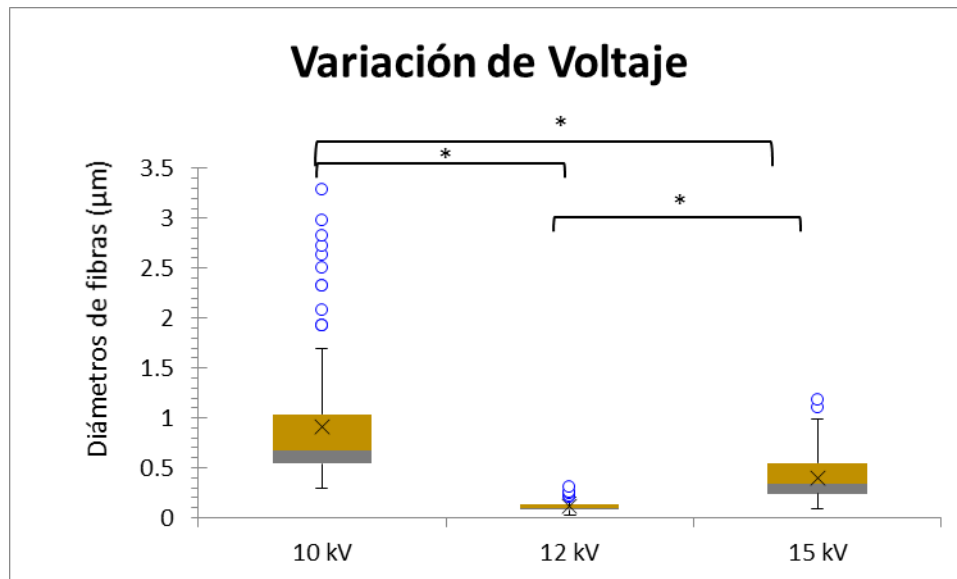
Tras la generación de los andamios, se procedió a un análisis morfológico a través del uso de MEB, utilizando aumentos de 1000X y 5000X. A continuación se presentan las electromicrografías, correspondientes a cada tratamiento, de las nanofibras de gelatina porcina obtenidas.



**Figura 12.** Electromicrografías de microfibras de GE porcina en Microscopio Electrónico de Barrido, obtenidas por electrohilado tras variación de Voltaje y velocidad de flujo; con parámetros fijos de velocidad de rotación de colector y distancia entre aguja y colector. Aumentos (A) y (B) andamio a 10 kV y 1 ml/h, (C) y (D) 12 kV y 1 ml/h, (E) y (F)

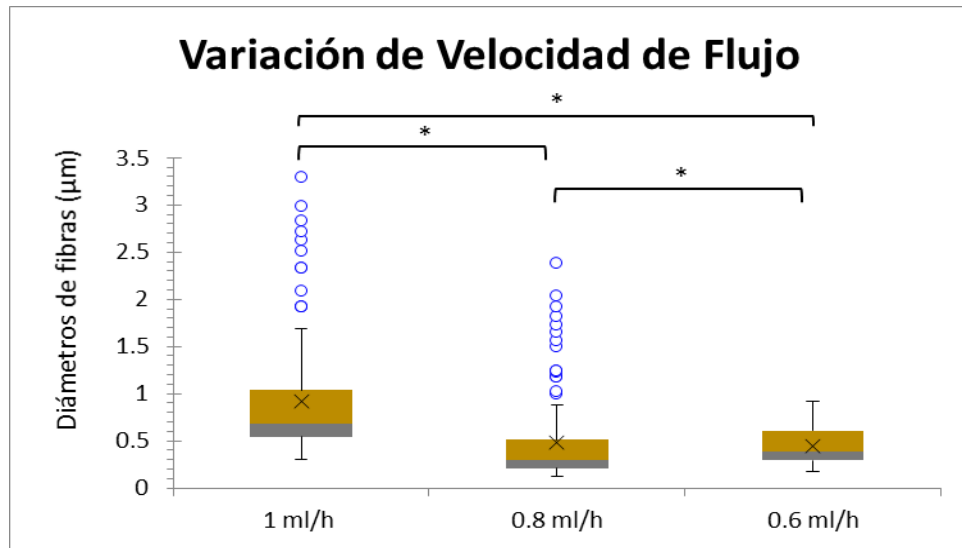
15 kV y 1 ml/h, (G) y (H) 10 kV y 0.8 ml/h, (I) y (J) 10 kV y 0.6 ml/h. Las fechas indican algunas de las aberraciones, en forma de cuentas de collar, que se detectaron.

Se pueden observar a partir de las electromicrografías (Figura 12) que existen variaciones en los diámetros de las microfibras para cada tratamiento, así como la presencia de aberraciones en forma de cuentas de collar, en mayor o menor grado. A continuación se presentan los gráficos de los diámetros promedio obtenidos para cada tratamiento, en las dos variables evaluadas (Figuras 13 y 14).



**Figura 13.** Diagrama de cajas de los diámetros de microfibras obtenidas tras la variación del voltaje aplicado, los asteriscos (\*) denotan la significancia de los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

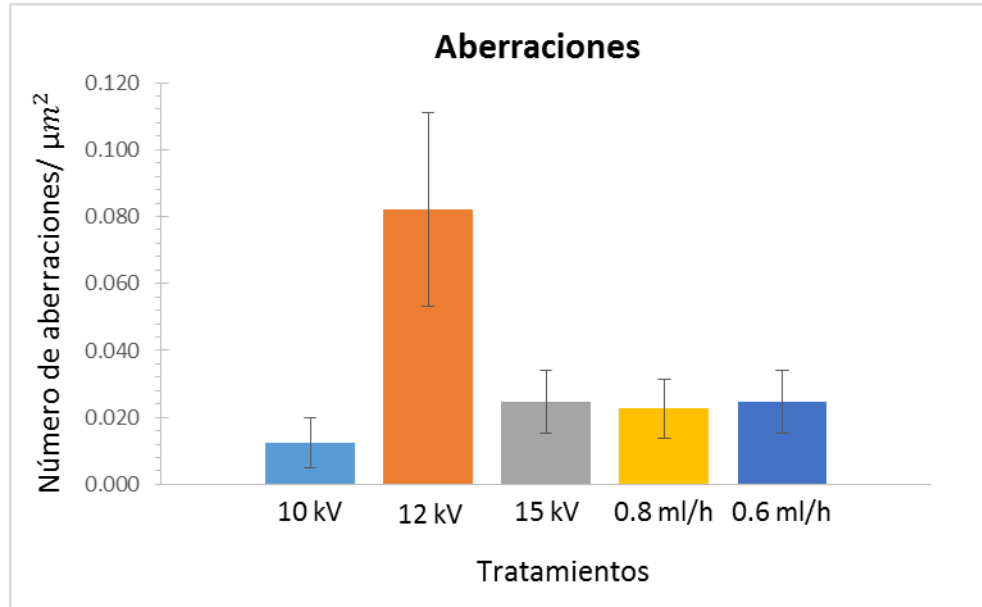




**Figura 14.** Diagrama de cajas de los diámetros de microfibras obtenidas tras la variación velocidad de flujo, los asteriscos (\*) denotan la significancia de los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Se realizó una prueba de homogeneidad de Kolmogórov- Smirnov, presentándose datos con un comportamiento no paramétrico para ambas variables ( $p < 0.05$ ), por lo que se optó por realizar un análisis de Kruskal- Wallis., presentándose diferencias significativas tanto entre los tratamientos, tanto para la variable voltaje, así como velocidad de flujo de GE ( $p < 0.05$ ). Se realizó una prueba de Bonferroni para ambas variables, siendo los andamios 12 kV y 0.6 ml/h los que presentaron los diámetros más pequeños (Figuras 13 y 14).

Posteriormente se procedió al conteo del número de aberraciones que se presentaron en los andamios realizados, ya que estas no son una característica deseada pues interfieren negativamente (Figuras 15).



**Figura 15.** Número de aberraciones que se presentaron en las variables voltaje y velocidad de flujo aplicado, para cada tratamiento.

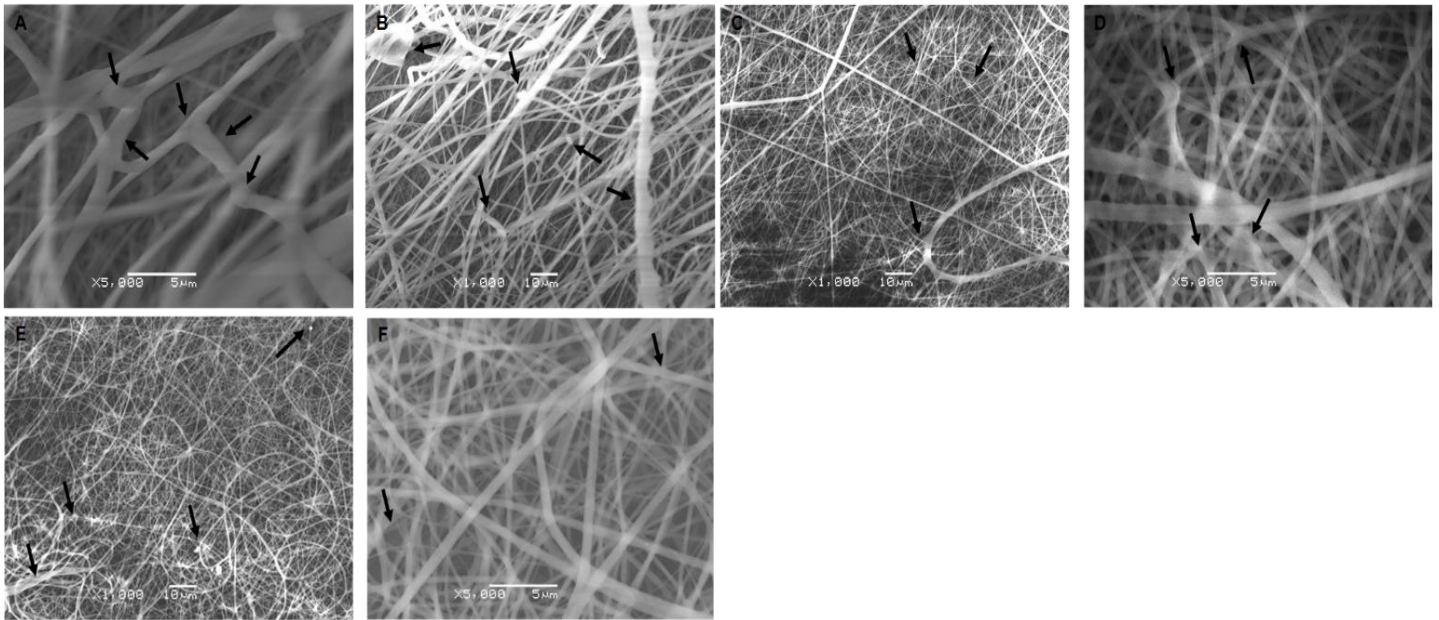
Se observó que el andamio a 1 ml/h y 12 kV, presentó el mayor número de aberraciones con 0.82 aberraciones/  $\mu\text{m}^2$ , mientras que el andamio a 1ml/ h y 10 kV, presentó el menor número.

Se considera, a partir de lo anterior, como los mejores tratamientos los andamios a 15 kV y 1 ml/ h, con microfibras a una mediana de 0.37  $\mu\text{m}$  de diámetro y aberraciones cada 0.011 $\mu\text{m}^2$ ; y el andamio a 10 kV y 0.6 ml/ h, con microfibras a una mediana de 0.44  $\mu\text{m}$  de diámetro y aberraciones cada 0.011 $\mu\text{m}^2$ .

A partir de los resultados anteriores se realizó un nuevo conjunto de andamios, reduciendo aún más la velocidad de flujo de 0.2 a 0.06 ml/ h, y utilizando el voltaje máximo del anterior conjunto de andamios (15 kV) (Figuras 16 y 17).

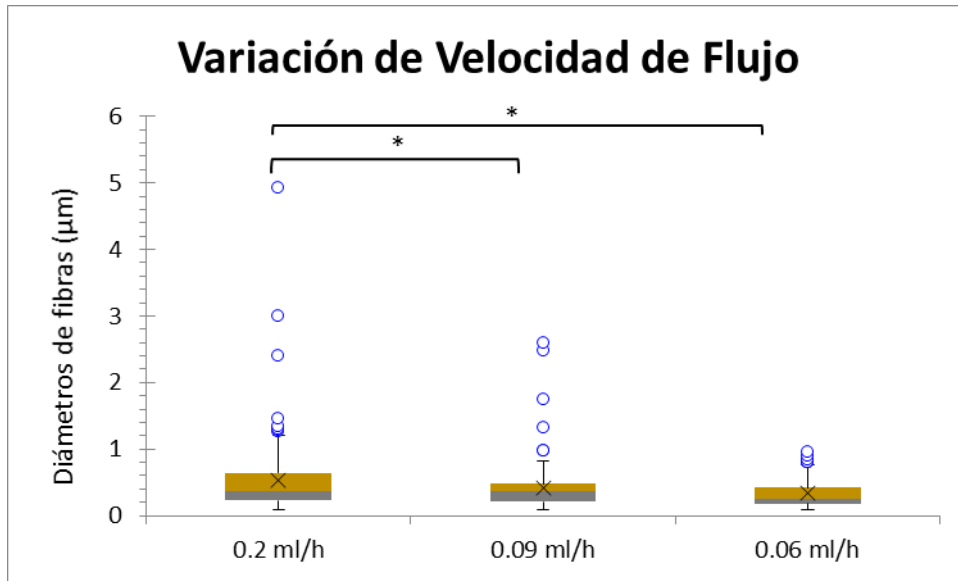
## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Tras la realización del segundo conjunto de andamios, se procedió a un análisis morfológico a través del uso de microscopio electrónico de barrido, utilizando aumentos de 1000X y 5000X. A continuación se presentan las electromicrografías, correspondientes a cada tratamiento.



**Figura 16.** Electromicrografías de microfibras de gelatina porcina en Microscopio Electrónico de Barrido, obtenidas por electrohilado por variación de velocidad de flujo, a 15 kV. Micrografías en aumentos (A) y (B) a 0.2 ml/h, (C) y (D) 0.09 ml/h, (E) y (F) 0.06 ml/h. Las fechas indican algunas de las aberraciones, en forma de cuentas de collar, que se detectaron.

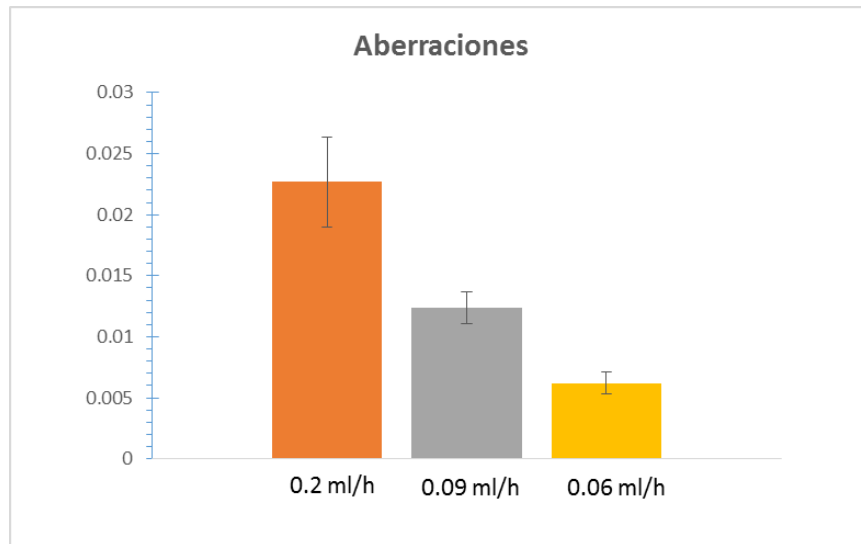
Se pueden observar a partir de las electromicrografías (Figura 16) variaciones en los diámetros de las microfibras para cada tratamiento, así como la presencia de aberraciones en forma de cuentas de collar, en mayor o menor grado. A continuación se presentan los gráficos de los diámetros obtenidos para cada tratamiento (Figura 17).



**Figura 17.** Diagrama de cajas de los diámetros de microfibras obtenidas tras la variación velocidad de flujo de 0.2 a 0.06 ml/h, los asteriscos (\*) denotan la significancia de los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Al igual que los anteriores andamios, se realizó una prueba de homogeneidad de Kolmogórov-Smirnov, presentándose datos con un comportamiento no paramétrico ( $p < 0.05$ ). Se aplicó un análisis de Kruskal- Wallis., presentándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Tras una prueba de Bonferroni se observaron diferencias significativas entre el flujo de 0.2 ml/h y los demás flujos, siendo los flujos a 0.09 y 0.06 ml/h los diámetros más bajos con medianas de 0.36 y 0.26  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 17).

Tras los anteriores análisis, se procedió al conteo del número de aberraciones que se presentaron en los andamios elaborados (Figura 18).



**Figura 18.** Número de aberraciones que se presentaron en cada tratamiento de los andamios realizados a 15 kV.

Para el caso de las aberraciones presentes en los andamios, el andamio a flujo de 0.06 ml/h, fue el que presentó el menor número de aberraciones, con 0.006 aberraciones/  $\mu\text{m}^2$ , mientras que a 0.2 ml/h se presentaron el mayor número.

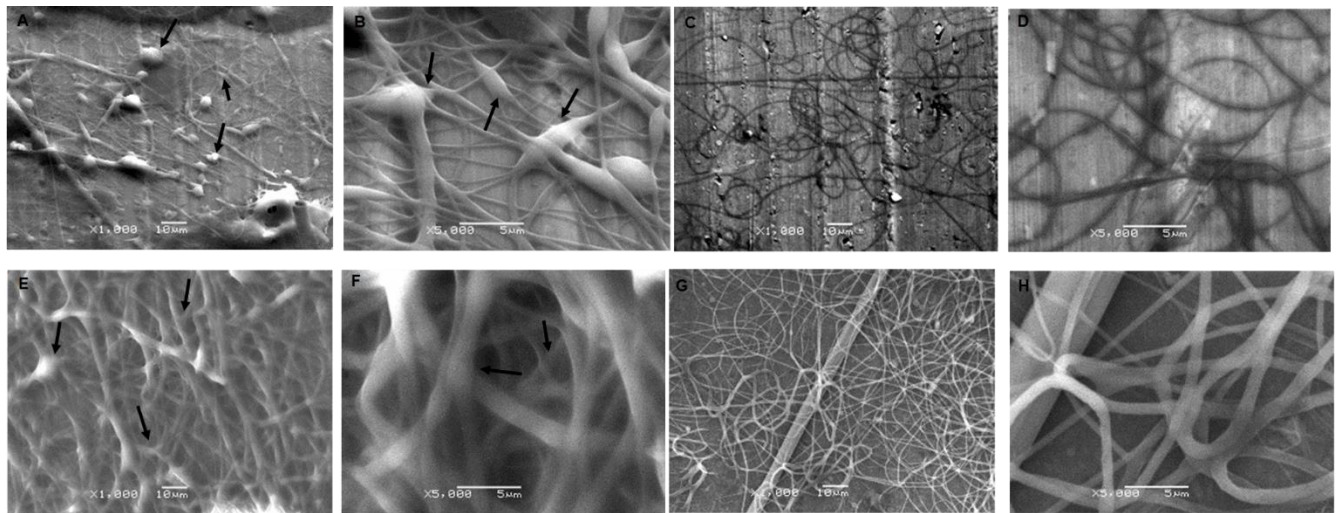
Se considera, a partir de lo anterior, con respecto a la variación de flujo, como el mejor tratamiento el andamio generado utilizando un flujo de 0.06 ml/h, a que presenta los menores diámetros de fibras así como el menor número de aberraciones.

## 8.2 Variación de distancia entre punta de jeringa y colector

Posterior a la evaluación de los parámetros de voltaje aplicado y velocidad de flujo, se procedió a la variación de la distancia entre la punta de la jeringa y el colector, las distancias evaluadas fueron de 6, 10 y 12 cm. Para ello se utilizaron como parámetros fijos la velocidad de flujo y voltaje de los experimentos anteriores (0.06 ml/h y 15 kV) que dieron las fibras más delgadas así como una menor cantidad de aberraciones. Se compararon respecto a las del andamio a 1 ml/h y 10 kV para así determinar si el cambio en la velocidad de flujo o voltaje tenía efectos distintos, o seguían el mismo comportamiento, al variar la distancia. Se mantuvo una velocidad de rotación del colector fija, a 1000 rpm.

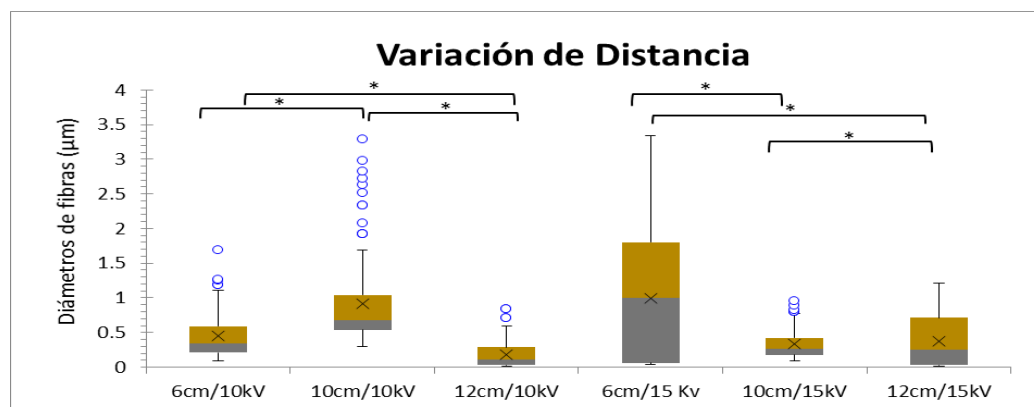
## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Se procedió a un análisis morfológico a través del uso de MEB, utilizando aumentos de 1000X y 5000X. A continuación se presentan las electromicrografías, correspondientes a cada tratamiento.



**Figura 19.** Electromicrografías de microfibras de GE porcina obtenidas por electrohilado, con distancia en entre punta y colector de 6 y 12 cm, voltaje aplicado de 10 y 15 kV y velocidad de rotación de colector fija. Aumentos (A) y (B) andamio a 10 kV y 6 cm, (C) y (D) a 10 kV y 12 cm, (E) y (F) a 15 kV y 6 cm, (G) y (H) a 15 kV y 12 cm. Las fechas indican algunas de las aberraciones, en forma de cuentas de collar, que se detectaron.

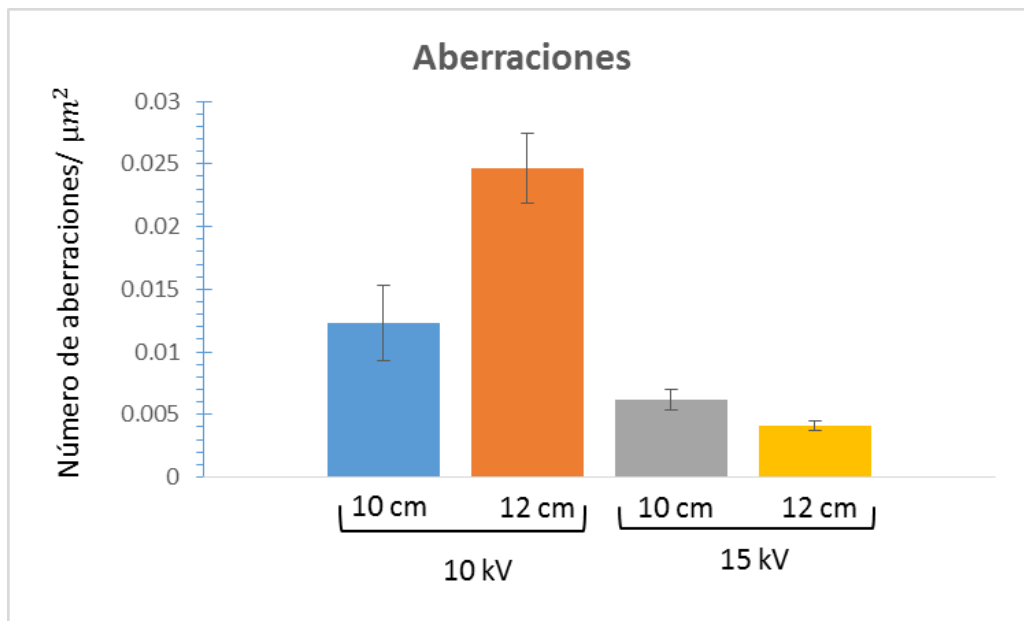
Se pueden observar a partir de las electromicrografías (Figura 19) variaciones en los diámetros de las microfibras para cada tratamiento, así como la presencia de aberraciones en forma de cuentas de collar e incluso fusiones de fibras, en mayor o menor grado. A continuación se presentan los gráficos de los diámetros obtenidos para cada tratamiento (Figura 20).



**Figura 20.** Diagrama de cajas de los diámetros de microfibras obtenidas tras la variación Distancia entre punta de jeringa y colector de 6, 10 y 12 cm con voltajes de 10 y 15 kV. Los asteriscos (\*) denotan la significancia de los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Se realizó una prueba de homogeneidad de Kolmogórov- Smirnov, presentándose datos con un comportamiento no paramétrico ( $p < 0.05$ ), al igual que los anteriores datos evaluados. Se aplicó un análisis de Kruskal- Wallis para ambos conjuntos, presentándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), por lo que se realizó una prueba de Bonferroni, observase diferencias entre todos los niveles, para ambos voltajes. Siendo las distancias a 6 cm con 15 kV los diámetros altos, con una mediana de  $0.998 \mu\text{m}$ , mientras que las microfibras más delgadas correspondieron a los andamios a 12 cm de distancia tanto a 10 como 15 kV, con medianas de  $0.115$  y  $0.251 \mu\text{m}$  respectivamente (Figura 20).

Posteriormente se procedió al análisis del número de aberraciones por  $\mu\text{m}^2$ , todos los andamios a 6 cm de distancia presentaron las fibras fusionadas, formando mallas gruesas. Solo los andamios a 10 y 12 cm presentaron fibras sin fusiones. A continuación se presentan las aberraciones presentes en dichos andamios (Figura 14).



**Figura 21.** Número de aberraciones que se presentaron en cada tratamiento por variación de distancia de 10 y 12 cm en 10 y 15 kV.

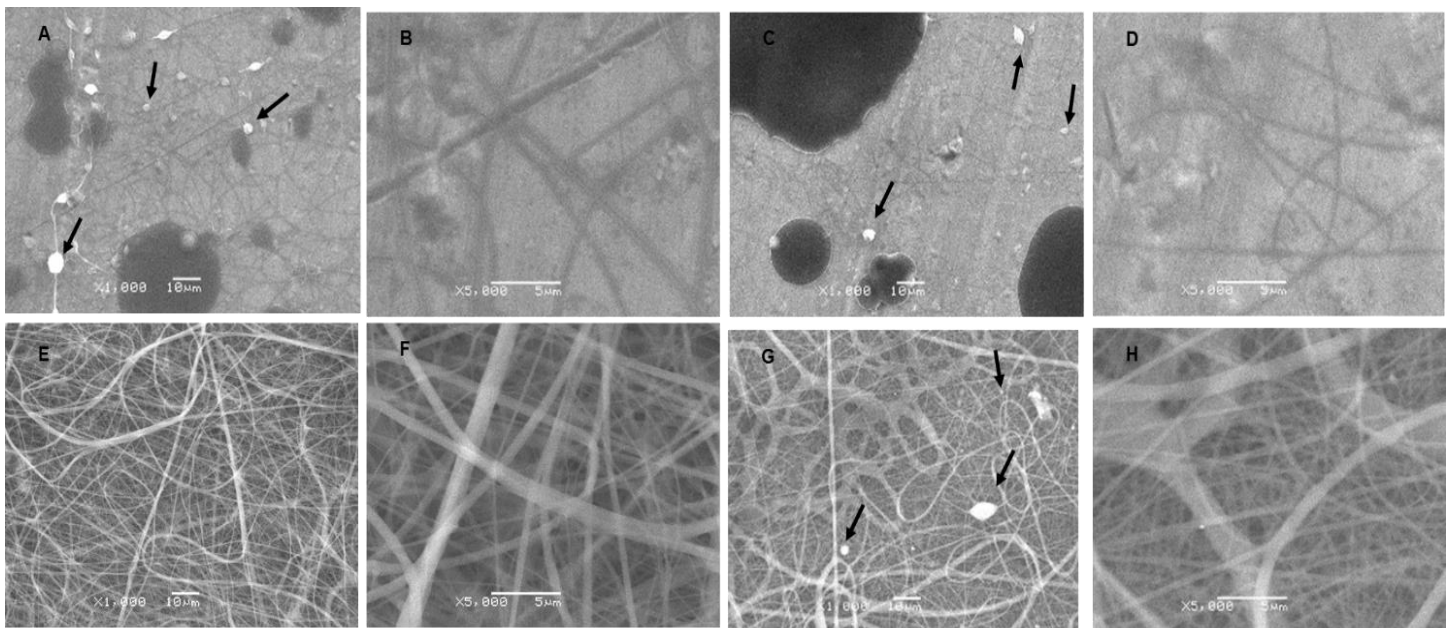
Para el caso de las aberraciones presentes en los andamios por variación de distancia, los andamios a 10 cm y 15 kV y a 12 cm y 15 kV presentaron el menor número de aberraciones con  $0.006$  y  $0.004$  aberraciones/  $\mu\text{m}^2$  respectivamente. Adicionalmente se observó que el con forme aumentaba la distancia entre la punta de la jeringa y el colector, aumentaba el tiempo para la deposición de las fibras.

La generación de andamios utilizando una distancia entre 10 y 12 cm presentaron los menores diámetros de fibras así como el menor número de aberraciones.

### 8.3 Variación de velocidad de rotación del colector

Finalmente se evaluó la velocidad de rotación de colector y su influencia en las fibras producidas, las velocidades evaluadas fueron de 1000, 2000 y 3000 rpm. Para ello, se utilizaron como parámetros fijos la velocidad de flujo y voltaje de 0.06 ml/h con 15 kV y se compararon respecto a 1 ml/h y 10 kV. Se mantuvo una distancia de entre la punta de la jeringa y colector fija (Figura 11).

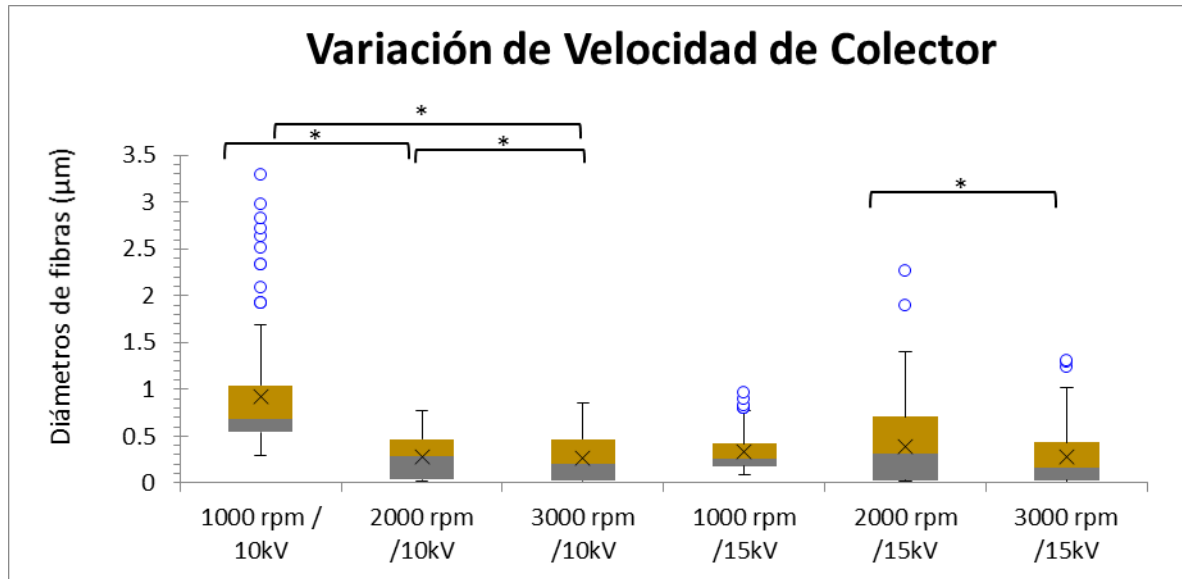
Tras la elaboración del conjunto de andamios, se procedió a un análisis morfológico por MEB, utilizando aumentos de 1000X y 5000X. A continuación se presentan las electromicrográficas, correspondientes a cada tratamiento.



**Figura 22.** Electromicrográficas de microfibras de GE porcina obtenidas por electrohilado, con velocidad de rotación del colector de 2000 y 3000 rpm, voltaje aplicado de 10 y 15 kV y velocidad de flujo de 1 ml/h y 0.06 ml/h fijos. Aumentos (A) y (B) andamio a 2000 rpm y 10 kV, (C) y (D) a 3000 rpm y 10 kV, (E) y (F) a 2000 rpm y 15 kV, (G) y (H) a 3000 rpm y 15 kV. Las fechas indican algunas de las aberraciones, en forma de cuentas de collar, que se detectaron.



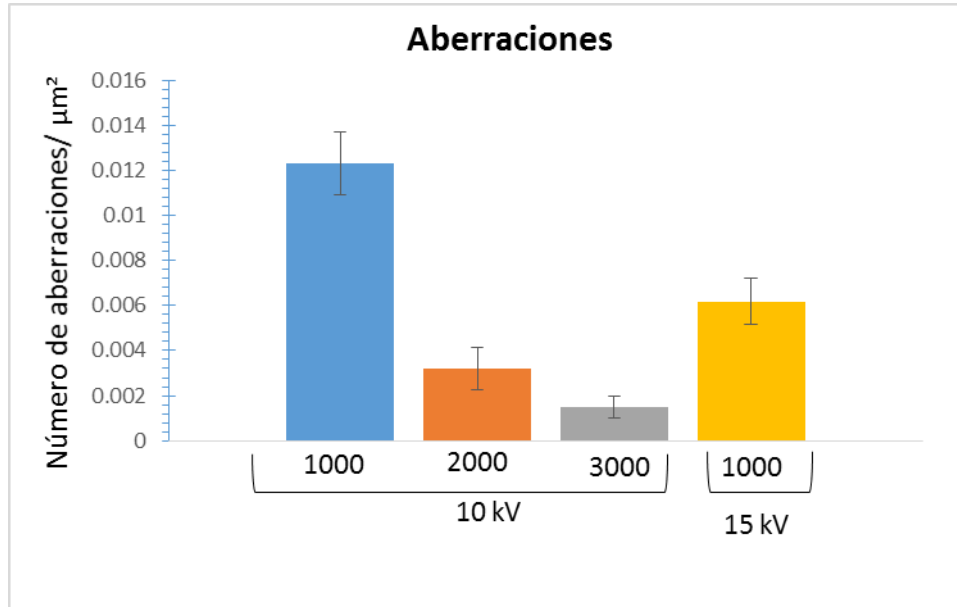
Se pueden observar a partir de las electromicrográficas (Figura 22) variaciones en los diámetros de las microfibras para cada tratamiento, así como la presencia de aberraciones en una menor cantidad. A continuación se presentan los gráficos de los diámetros obtenidos para cada tratamiento (Figura 23).



**Figura 23.** Diagrama de cajas de los diámetros de microfibras obtenidas tras la variación velocidad de rotación del colector de 1000, 2000 y 3000 rpm, con voltajes de 10 y 15 kV. Los asteriscos (\*) denotan la significancia de los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Los datos obtenidos presentaron un comportamiento no paramétrico (Kolmogórov- Smirnov,  $p < 0.05$ ), por lo que se aplicó un análisis de Kruskal- Wallis., presentándose diferencias significativas entre velocidades de 2000 y 3000 rpm a 15 kV y entre los tratamientos a 10 kV (Bonferroni,  $p < 0.05$ ), siendo las velocidades a 2000 y 3000 rpm las que presentaron los diámetros más reducidos para ambos voltajes con medianas de 0.282 y 0.204  $\mu\text{m}$  para 10 kV y 0.305 y 0.160  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 23).

Se realizó el análisis del número de aberraciones por  $\mu\text{m}^2$ . A continuación se presentan las aberraciones presentes en dichos andamios (Figura 24).



**Figura 24.** Número de aberraciones que se presentaron en cada tratamiento por variación de velocidad de rotación en 10 y 15 kV.

Para el caso de las aberraciones presentes en los andamios por variación de velocidad de rotación, los andamios a 2000 y 3000 rpm para ambos voltajes presentaron el menor número de aberraciones con 0.0032 y 0.0014 aberraciones/  $\mu\text{m}^2$  para los andamios a 10 kV y menores a  $8.25 \times 10^{-5}$  para el caso de las elaboradas a 15 kV.

Se considera, a partir de lo anterior, que los andamios generados a 2000 y 3000 rpm presentan menor número de aberraciones y menor diámetro de fibras independientemente del voltaje aplicado.

## 8.4 Prueba de degradación

Se realizó una prueba de degradación, eligiéndose para ella el andamio elaborado bajo condiciones de 15 kV, Flujo de 0.06 ml/h, 10 cm de distancia entre colector y punta de la jeringa y velocidad del colector de 2000 rpm.

A continuación se presenta los porcentajes de degradación de los andamios a lo largo del tiempo (Figura 25).



**Figura 25.** Porcentaje de degradación de andamios con y sin GA durante 7 días. El porcentaje de masa del andamio sin GA decayó hasta un 0% tras 72 h de experimentación.

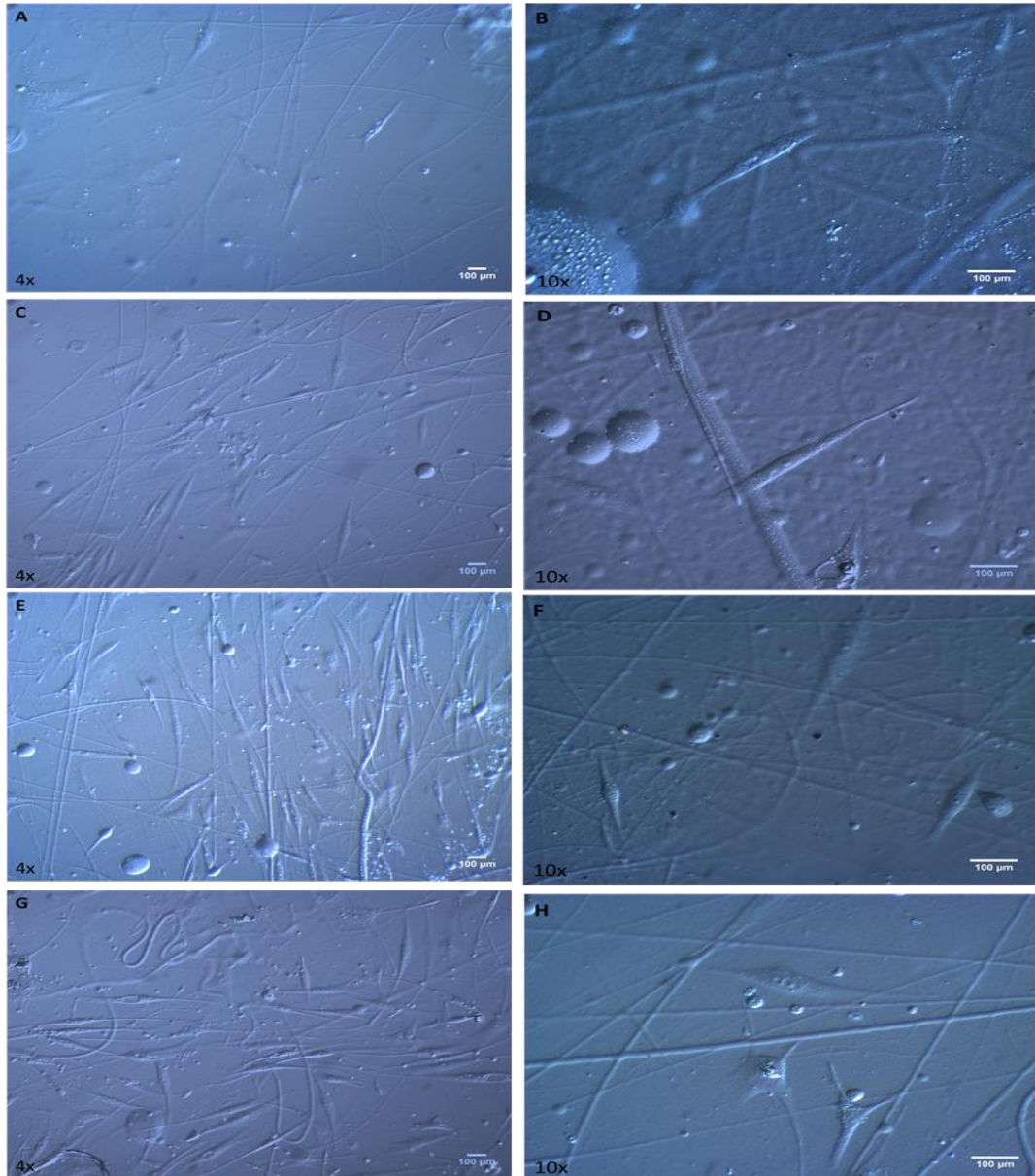
Se puede observar que a lo largo de 168 h (7 días) la masa del andamio se mantiene integra a lo largo del tiempo, mientras que para el andamio sin tratar con GA este pierde una cantidad de masa de hasta un 89 % en tan solo 24 h tras la inmersión en PBS 1X.

Así mismo se calculó el porcentaje de absorción del andamio, siendo esta de 157% del tamaño original del andamio.

## 8.5 Prueba de adhesión celular

Tras probar la viabilidad del andamio, se procedió al análisis de la adhesión en CE y CTE. Se realizaron cultivos separados con diferentes densidades de inóculo.

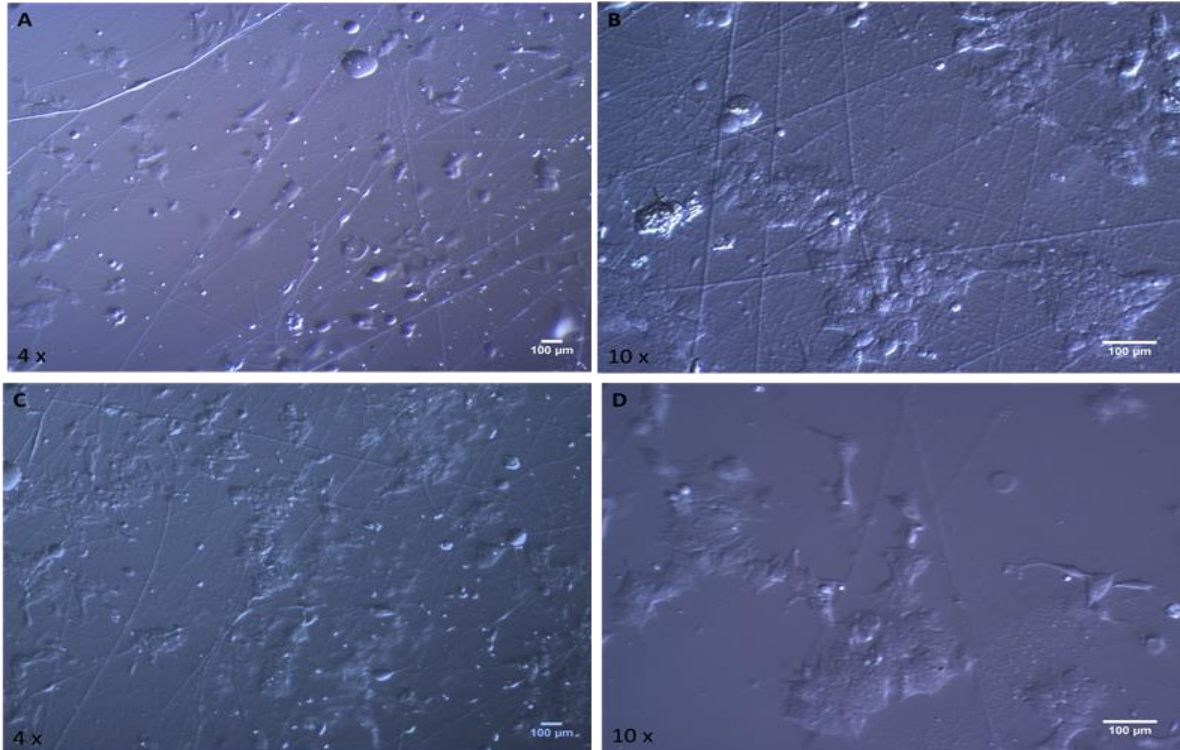
A continuación se presentan las micrografías correspondientes a los constructos de CE (Figura .26) y CTE (Figura 27).



**Figura 26.** Micrografías de constructos de GE porcina con CE a diferentes horas. Aumentos (A) y (B) Constructo a 24 h, (C) y (D) 48 h, (E) y (F) 72 h, (G) y (H) 96 h.

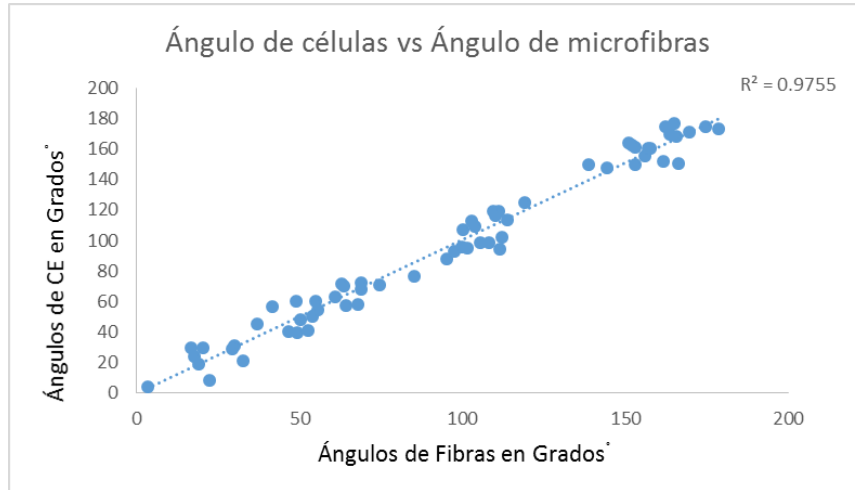
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

Se presentaron un bajo número de células en los primeros días respecto al número inicial inoculado, sin embargo, se detectó expansión celular conforme al paso del tiempo.



**Figura 27.** Micrografías de constructos de GE porcina con CTE. Aumentos (A) y (B) Constructo a 24 h, (C) y (D) 48 h.

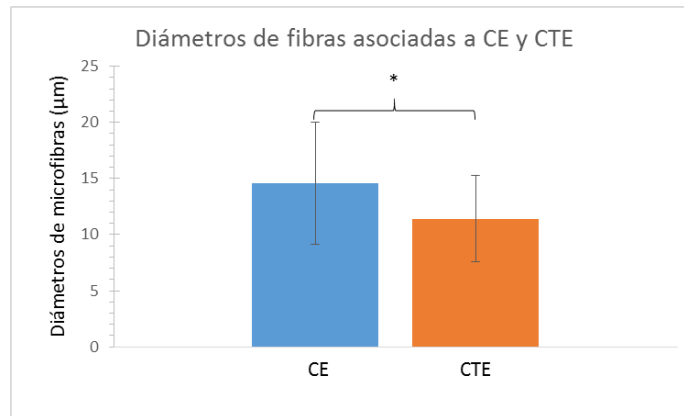
Se observaron claras interacciones entre las células y las microfibras del constructo, por lo que se midieron los ángulos de las microfibras así como el de las células más próximas a la misma, para las CE (Figura 28).



**Figura 28.** Ángulos de CE contra ángulos de fibras en constructo.

Tras un análisis de correlación se pudo observar que los ángulos de las células y microfibras presentaban una correlación lineal ( $R^2= 0.97$  y  $p < 0.05$ ).

De igual se evaluó el diámetro de las microfibras en los andamios que influían directamente en la dirección de crecimiento, tanto para las CE como para CTE (Figura 22).



**Figura 29.** Diámetros de microfibras que presentaron asociación en dirección de crecimiento en constructos de CE y CTE.

Se observó para el caso de las CE una mayor asociación en la dirección de crecimiento por microfibras con diámetro promedio de  $14.5 \mu\text{m}$ , mientras que para las CTE las diámetro promedio de las microfibras a las cuales se asociaron fue de  $11.4 \mu\text{m}$ , obteniendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p < 0.05$ ), por lo que hay un diámetro promedio de microfibras distinto a las cuales se asocian cada fenotipo celular.

Para confirmar los fenotipos celulares presentes en los constructos, se realizaron inmunocitoquímicas contra CE y CTE.

## 8.6 Inmunofenotipo

A continuación se presentan las micrográficas en microscopia de fluorescencia de inmunocitoquímicas de constructos de CE y CTE (Figuras 30 y 31).

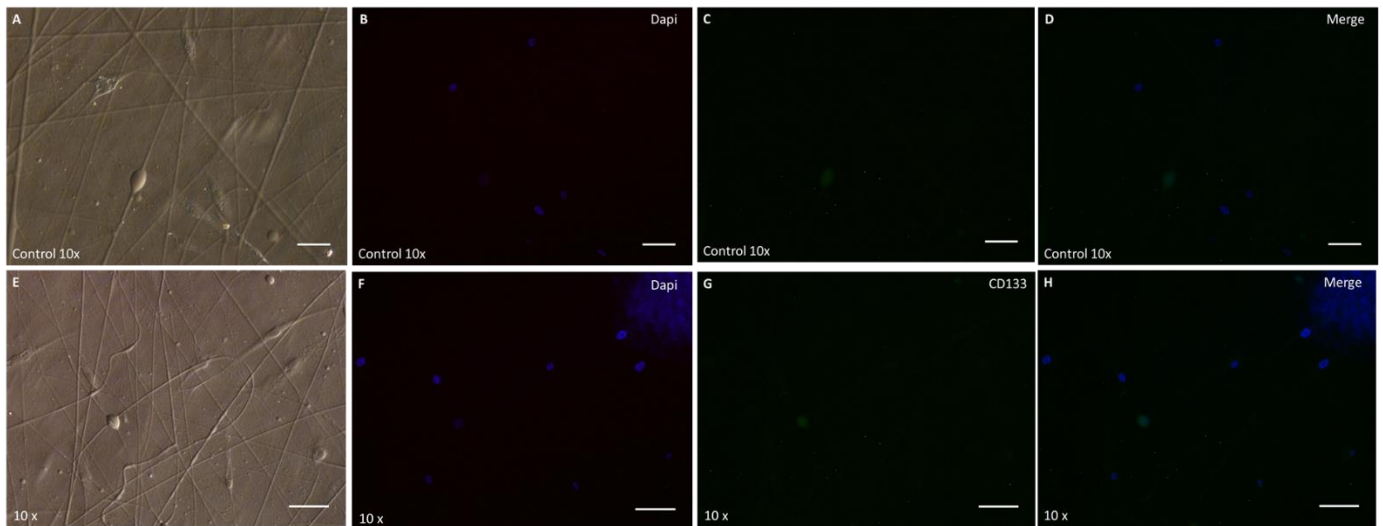


Figura 30. Micrográficas de Inmunofluorescencia de constructo de CE (A) a la (D) Control, (E) a la (H) CE CD 133 +.

Se observó presencia del marcador CD133+ en los constructos con CE, en baja intensidad.

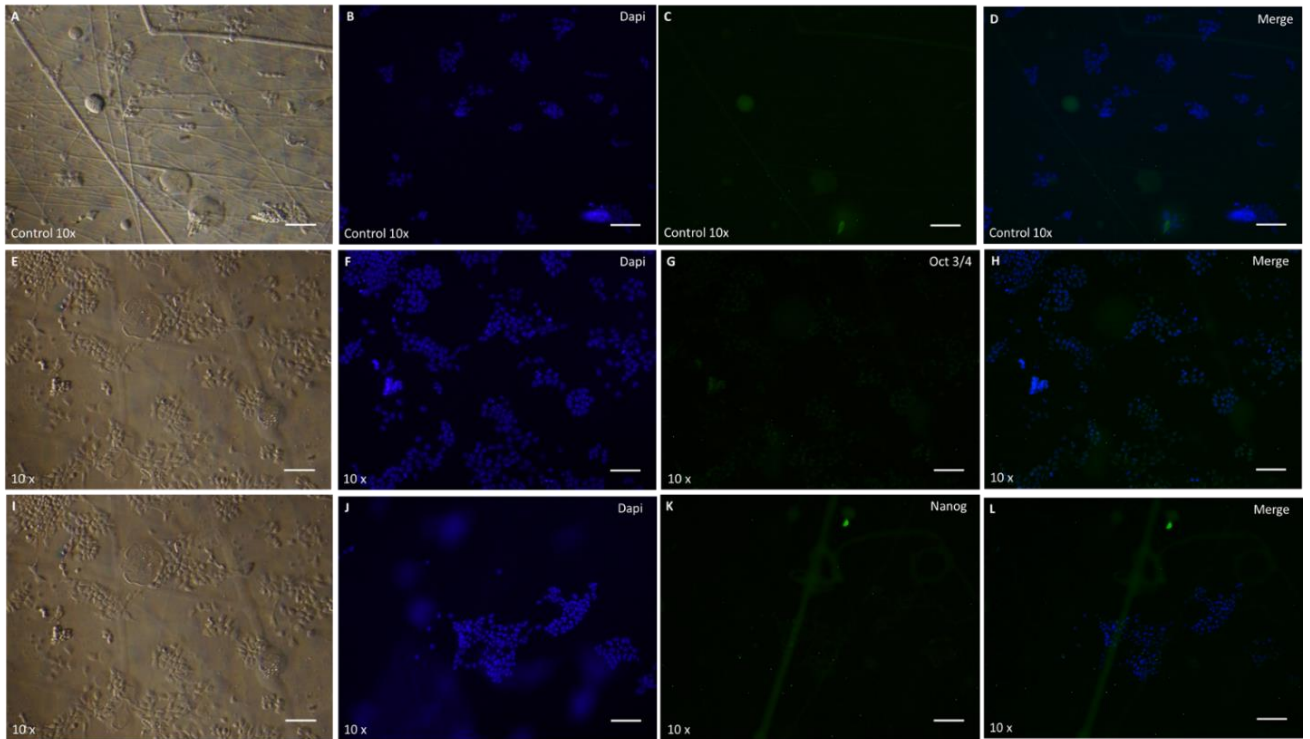


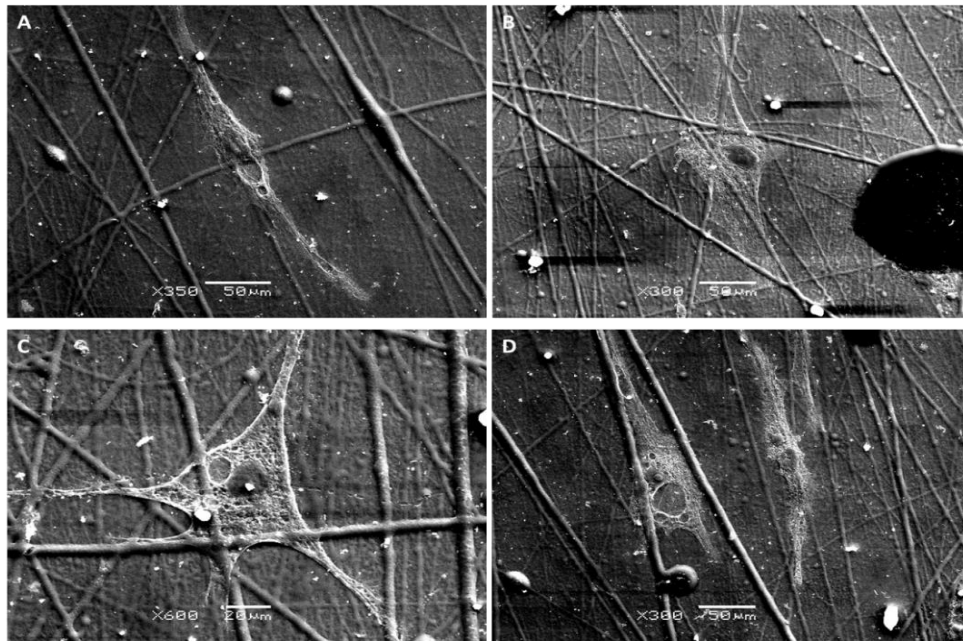
Figura 31. Micrográficas de Inmunofluorescencia de constructo de CTE (A) a la (D) Control, (E) a la (H) CTE Oct  $\frac{3}{4}$  + y (I) a la (L) CTE Nanog +.

Se observó presencia de los marcadores de troncalidad Oct  $\frac{3}{4}$  + y Nano + para los constructos con CTE.

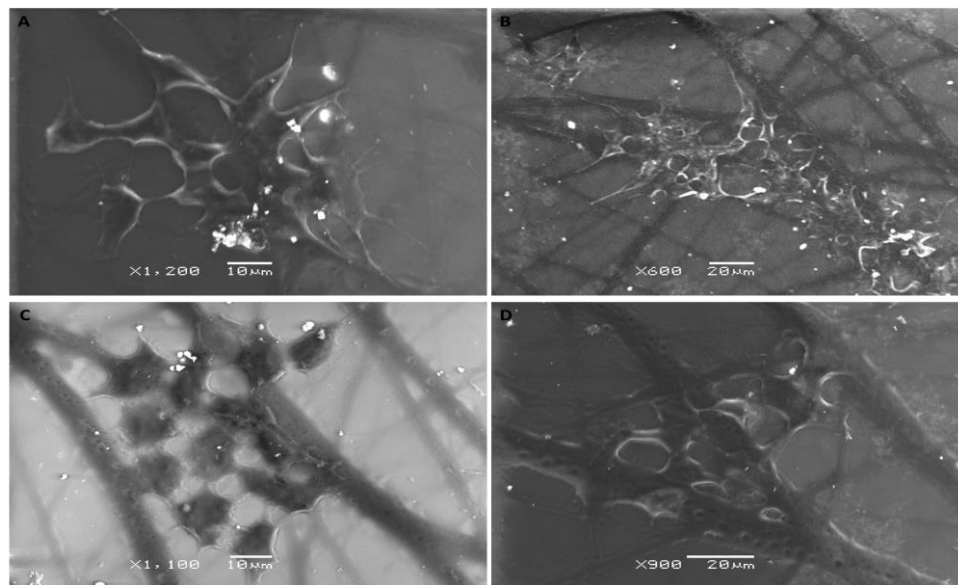
Por último para confirmar la adhesión de las CE y CTE en las microfibras, se observaron los constructos en MEB (Figs. 32 y 33).



## 8.7 Morfología de constructos por MEB



**Figura 32.** Electromicrografías de constructo de CE (A) a la (D) en microfibras de GE porcina en Microscopio Electrónico de Barrido.



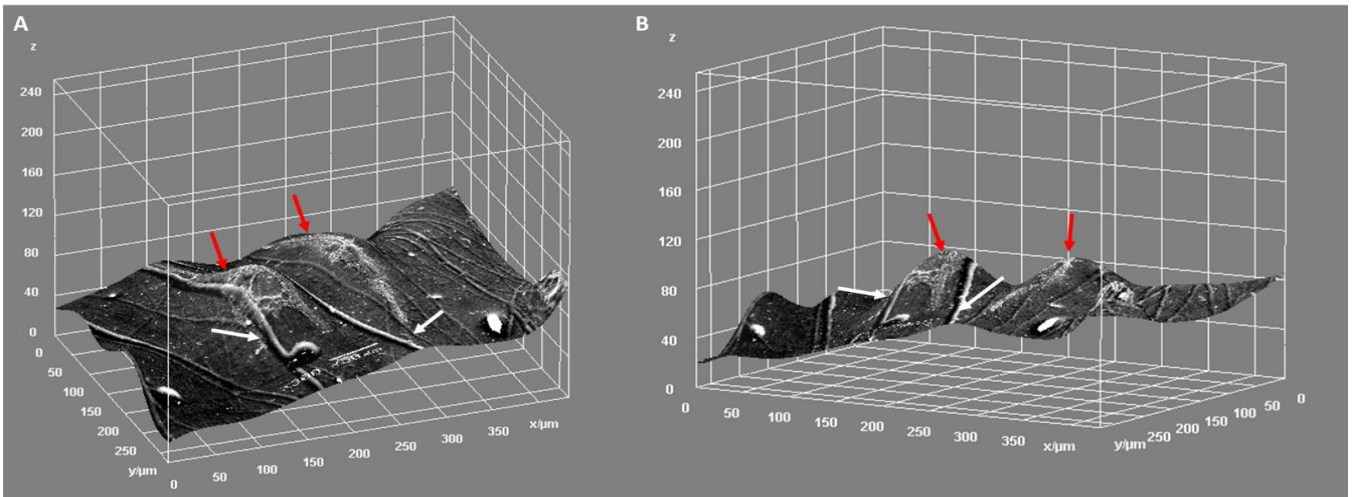
**Figura 33.** Electromicrografías de constructo de CTE (A) a la (D) en microfibras de GE porcina en Microscopio Electrónico de Barrido.

Tanto para los constructos con CE como con CTE (Figuras 32 y 33), se observan interacciones Célula- Fibra y Célula- Célula, así mismo la secreción de matriz

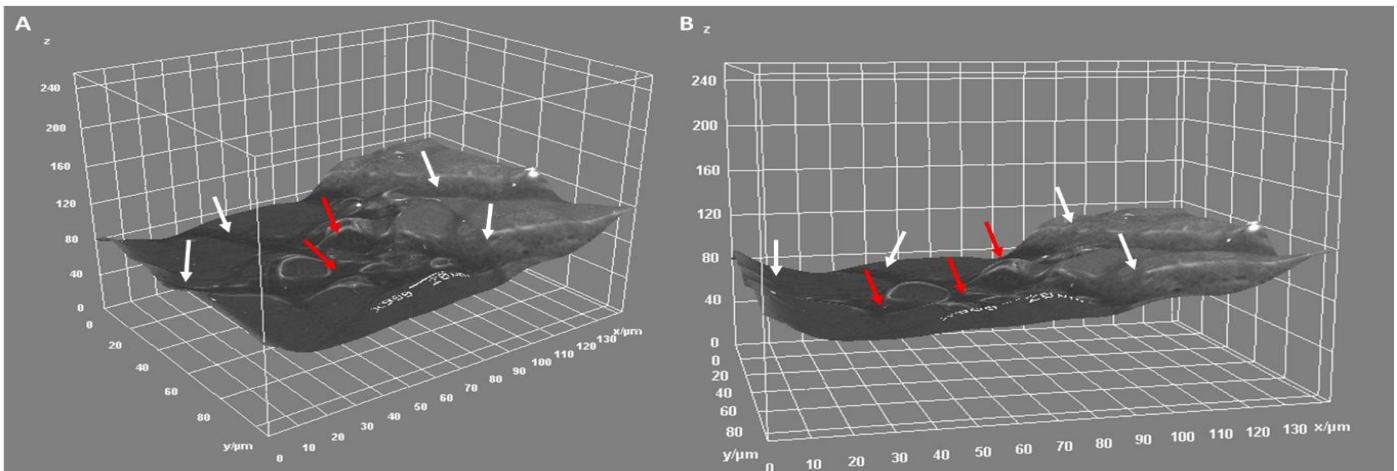
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

extracelular sobre la superficie de las fibras, por parte de ambos fenotipos celulares. Por lo que se denota claramente que las microfibras del constructo de GE porcina, participa como un soporte y ayuda a la comunicación celular. Sin que estas pierdan su morfología nativa.

Por ello, con objetivo de observar con mayor claridad dichas interacciones Célula-microfibra, se procedió a la elaboración de un modelo tridimensional de las electromicrografías de constructos con CE y CTE por medio del programa image J (Figuras 34 y 35).



**Figura 34.** Reconstrucción tridimensional de electromicrografía D (Figura 32) de constructo con CE en programa “Image J”, flechas rojas denota CE y blancas microfibras.



**Figura 35.** Reconstrucción tridimensional de electromicrografía A (Figura 33) de constructo con CTE en programa “Image J”, flechas rojas denota CTE y blancas microfibras.

## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

Se observa un cambio en la topografía del andamio con aumentos en el ancho de la superficie donde se encuentran las microfibras, como donde se encuentran presenten las células (Figuras 34 y 35). Así mismo, las fibras sirven como guía para el crecimiento de las células CE, como se había establecido anteriormente (Figuras 27 y 28).

De igual manera no se detectó un cambio morfológico de ambos fenotipos celulares con relación a su crecimiento sobre la microfibras de GE.

## 8. Discusión

Una de las características que se desea controla durante la fabricación de andamios por electrohilado es el diámetro de la fibras producidas ya que este será dependiente del tejido para el cual se desee utilizar.

En el caso de los variables estudiadas, se observó que el andamio obtenido con flujo de 1 ml/h y 12 kV presentó las fibras de menor diámetro, siendo el único que cumpliera con los diámetros deseados para andamios vasculares ya que de acuerdo a Hasan *et al.*, (2014), los diámetros de las fibras de proteínas y polisacáridos en la matriz extracelular nativa, oscila entre 50 a 500 nm. Así mismo podemos decir que las fibras obtenidas en los tratamientos se encontraron en el rango de los micro (> 100 nm) y nanómetros (1 a 100 nm), ya que presentaron diámetros entre los 0.03 a 3.29  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, dicho andamio presentó un gran número de aberraciones en forma de cuentas de collar (0.82 aberraciones/  $\mu\text{m}^2$ ), respecto a los demás tratamientos, por lo cual se considera inviable para su uso así como los otros ya que a pesar de presentar menor número de aberraciones los diámetros que estos presentaron fueron superiores a los necesarios para su uso en andamios vasculares.

Respecto a la variación en los diámetros de la microfibras producidas por la variación del voltaje, datos experimentales realizados por Piste *et al.* (2013), han mostrado que con forme aumenta el voltaje aplicado al polímero las fibras producidas tenderán a ser más delgadas y más gruesas al disminuirlo. Otra de las variables que tienen influencia en el diámetro de las fibras producidas es la velocidad de flujo del polímero. Se observa que al aumentar la velocidad de flujo aumenta el diámetro de las fibras (Subbiah *et al.*, 2004).

La relación entre ambas variables está en que al aumentar velocidad de flujo del polímero este no tiene el tiempo suficiente para polarizarse, lo cual impide un mayor estiramiento de la fibra producida (Li y Wang. 2013). De igual manera explica la presencia de aberraciones en las fibras ya que el no haber un correcto estiramiento de las fibras, estas presentan cuentas de collar, así como un aumento en el voltaje disminuye el tiempo de polarización de las fibras por lo que su estiramiento tampoco se verá interrumpido.

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Por lo anterior se optó por reducir la velocidad de flujo de 0.2 a 0.06 ml/h, así como el voltaje aplicado hasta 15 kV, el cual presentó los diámetros más delgados de microfibras. Se observó un comportamiento distinto a lo esperado, ya que los tratamientos, a pesar de presentar un voltaje mayor (15kV) y velocidad de flujo menor (0.4 ml/ h) al primer conjunto de andamios, presentaron diámetros similares a los andamios a 15 kV y 1 ml/h; y a 10 kV y 0.6 ml/h. Sin embargo al ir reduciendo aún más la velocidad de flujo del polímero se observó un comportamiento similar a los del conjunto evaluado de 1 a 0.6 ml/h, es decir, una disminución del diámetro de las fibras producidas, por lo que el diámetro de las fibras producidas podría depender más del voltaje y flujo específicos. Se observó que con forme disminuía la velocidad de flujo el número de aberraciones igualmente disminuía, llegando a ser hasta de 0.006 aberraciones/  $\mu m^2$ , para el caso del andamio a 0.06 ml/h con 15 kV, siendo incluso drásticamente menor al de sus conjuntos a mayores velocidades de flujo.

Una vez determinada la velocidad de flujo a la cual se obtenían microfibras, casi nítidas con respecto a las aberraciones así como a diámetros óptimos, se procedió a evaluar la repercusión de la distancia sobre la fibras producidas de 6 a 12 cm. Se observó un aumento en el diámetro de las fibras con forme la distancia entre la punta de la jeringa y el colector se acortaba. De acuerdo a datos experimentales de Gomes *et al.* (2007), donde evaluaron distancias de 2 a 20 cm a 15 kV utilizando poliacrilonitrilo como polímero, observaron que conforme aumentaba la distancia entre la punta de la jeringa y el colector, había una disminución del diámetro directamente proporcional. Dicho fenómeno se reprodujo en los experimentos realizados con GE. Respecto a la fibras colectadas a distancias más cortas, la fusión de fibras se debe a que durante el recorrido de la punta de la jeringa al colector, no hay suficiente tiempo para que, en las fibras, se evapore completamente el solvente del polímero, en este caso ácido acético, por lo que al llegar al colector tienden a fusionarse y formar estructuras como esponja o mallas. Para el caso del andamio a 6 cm con 15 kV, presentaron microfibras con diámetros superiores a su homologo a 10 kV, tanto para 6 como para 10 cm, esto se debe a una combinación entre la distancia y el voltaje aplicado, sumado a que dicho andamio se presenta más cerca del colector, por lo que no hay un correcto estiramiento de las fibras por la distancia así como una baja evaporación del solvente, de igual manera, el campo electrostático producido es más fuerte, siendo de por ello las microfibras producidas son diámetros superiores.

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Lo anterior igualmente explica la disminución del número de aberraciones presentes de los andamios realizados a mayores distancias. Siendo los andamios a 12 cm los que presentaron el menor número de estas.

Por último, para el caso del impacto de la variación de la velocidad de rotación sobre las microfibras electrohiladas, se utilizaron, como para la variable anterior, las condiciones óptimas para la obtención de fibras, a 15 kV y 0.06 ml/h. Se observó una disminución del diámetro de las microfibras conforme aumentaba la velocidad de rotación, siendo los andamios a 3000 rpm los que presentaron los menores diámetros, tanto para los evaluados a 10 como a 15 kV. Theron *et al.* (2001), explica que esto se debe a que conforme aumenta la velocidad de rotación del colector se presenta un aumento en la acción de la fuerza tangencial, que actúa sobre las fibras, lo que hace que estas se estiren aún más sobre el colector y, en consecuencia, reduce el diámetro de las fibras. Entendemos como dicha fuerza a la que actúa en la superficie de contacto entre dos cuerpos, que se opone al movimiento de uno de ellos respecto al otro, cuando uno de estos se desplaza sobre y con respecto al otro, la fuerza aplicada es mayor (Bedford, 2000). Para el caso de las fibras hiladas a 10 kV, el impacto de este parámetro tuvo un efecto mayor sobre las fibras ya que se encontraban menos estiradas, por influencia de los parámetros anteriores (voltaje y velocidad de flujo).

Respecto al número de aberraciones representes en los andamios sometidos a mayor velocidad de rotación del colector, estos presentaron menor número de aberraciones a partir de 2000 rpm, esto se debe a que hubo un mayor estiramiento de las fibras.

Con relación a las pruebas de degradación, se observó que la masa del constructo tratado con GA se mantuvo constante a lo largo del tiempo, al contrario del constructo no tratado, el cual se degradó tras 24 h del inicio de la prueba. Esto se debe a la alta solubilidad que presenta la GE en soluciones acuosas, en contraste con las fibras tratadas con GA, ya que este compuesto reacciona con los grupos amino libres de lisina o hidroxilisina en las cadenas polipeptídicas con los grupos aldehído del GA (Zhang *et al.*, 2006), sin este enlace, las cadenas polipeptídicas reaccionarían directamente con el agua, disolviéndose.

Tras la realización de las pruebas de resistencia, se procedió al cultivo de CE y CTE en los andamios, donde se observaron en un primer momento un elevado descenso en el número de células inicialmente inoculado, respecto al número de células adheridas en los primeros días, probablemente esto se deba a la hidrofobicidad del andamio, ya que de acuerdo a Meng *et al.*,

(2010), las células cultivadas sobre andamios más hidrofílicos presentan una mayor expansión celular. Siendo en un inicio este factor un problema para el reconocimiento de la célula-andamio, sin embargo se observa que existen interacciones directas entre las células y las microfibras de GE, y el número de estas aumenta con el tiempo, correspondiendo, por consiguiente, la primer fase de crecimiento como la fase Lag o de acondicionamiento, seguido de la fase exponencial cuando el número de células aumenta con mayor rapidez. Las interacciones entre la célula y las microfibras se ven con mayor claridad en las electromicrografías. Dicha interacción se da por reconocimiento entre integrinas  $\alpha1 \beta1$  y  $\alpha2 \beta1$ , las cuales su ligando de unión es el colágeno siendo, presentado para la primera, mayor afinidad al colágeno tipo IV, mientras que para la segunda al tipo I (Fougerolles *et al.*, 2000). De acuerdo a Albuschies y Volgel (2013), el proceso de migración celular se da en un principio por medio de filopodios, los cuales son proyecciones citoplasmáticas delgadas, que se extienden desde el extremo directriz de la célula en migración. Estas estructuras forman prolongaciones alrededor de toda la célula, probablemente asociado al reconocimiento de la topografía del medio extracelular, asociado a fase Lag de crecimiento celular, como es el caso de las CE y más evidentemente en las CTE. Posterior a esta fase de reconocimiento, los filopodios dan la direccionalidad de crecimiento de acuerdo al sustrato, formando adhesiones locales con este afirmándolo a la superficie celular, siendo para este caso el sustrato las microfibras de GE. Ballester *et al.*, (2015) establecen que cuando la migración se da en medios tridimensionales, el tipo protrusión se denomina lobopodia, los cuales son más prominentes y pueden ser impulsados en su mayoría por la presión intracelular que por polimerización de actina, como es en el caso de los filopodos. Así mismo la contracción lobopodial es mediada por la vía de señalización RhoA- ROCK-miosina II, se ha propuesto que la miosina II A actúa a través de los filamentos de vimetina, facilitando la migración celular. Otra forma de migración celular es por medio del flujo de iones y agua o el modelo del motor osmótico, utilizando un mecanismo dependiente de actina/miosina, basado en la permeabilidad de los iones y agua a través de canales transmembrana, la cual requiere una actividad coordinada los canales polarizados y las acuoporinas, los cuales modulan los flujos y corriente del agua (Stroka *et al.*, 2014).

Así mismo se observó para el caso de las CE, un crecimiento celular en dirección de ángulo de la fibra, dicho comportamiento se ha observado anteriormente (Meng, *et al.* 2010), de igual manera se observa tanto para las CE como para las CTE una preferencia sobre el tamaño de

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

la fibra con relación a la potencialidad de la misma a influir en la dirección de crecimiento celular, esto se puede deber a la superficie de contacto en relación al tamaño de la célula.

Por último se determinaron los fenotipos celulares utilizados por medio de una inmunocitoquímica, siendo para CE ligeramente positivas para CD133 (Prominina 1), esto pueda deberse a que dicho marcador es esta mayormente asociado a progenitores endoteliales, por lo que la baja intensidad del mismo correspondería a un mayor grado de diferenciación, es decir a un fenotipo mayormente endotelial especializado (Corbeil, 2012). Para el caso de las CTE, fueron positivas tanto para Oct  $\frac{3}{4}$  como para nanog, siendo estos marcadores de troncalidad presentes en dicho fenotipo celular (Zhao *et al.*, 2012).



## 10. Conclusión

Para la obtención de fibras de con los diámetros deseados (50 – 500 nm), así como el menor número de aberraciones presentes en los mismos, es necesario el uso de voltajes altos para un rápido y gran estiramiento, velocidades de flujo bajas para así permitir la correcta y completa polarización del polímero, distancias lejanas al colector para permitir una correcta evaporación de solvente, para el caso el polímero evaluado superiores a 10 cm, y velocidades de rotación altas para un mayor estiramiento (de las fibras), superiores a 1000 rpm. Los andamios con mejores diámetros así como con un menor número de aberraciones, para las variables y niveles evaluados, fueron correspondieron a los tratamientos a 0.06 ml/ h, 10 y 12 cm de distancia entre punta y colector y 1000 a 3000 rpm.

Es posible obtener andamios viables y resistentes para CE y CTE, así mismo cada fenotipo celular presenta un diámetro específico de fibra, la cual influirá directamente sobre su dirección de crecimiento.

## 9. Bibliografía

- Albuschies, J y Vogel, V. 2013. The role of filopodia in the recognition of nanotopographies. *Scientific Reports*. 3 (1): 1- 9.
- Agarwal, S.; J.H. Wendorff y A. Greiner. 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. 49 (26): *Polymer*. 5603–5621.
- Ballester-Beltrán, J.; Biggs, M. J. P.; Dalby, M. J.; Salmerón-Sánchez, M. y Leal-Egaña A. 2015. Sensing the difference: the influence of anisotropic cues on cell behavior. *Frontiers in Materials*. 2 (1): 1- 12.
- Bedford, A. 2000. Dinámica: mecánica para ingeniería. México. Pearson.
- Buján, J.; García-Honduvilla, N. y Bellón, J. M. 2004. Engineering conduits to resemble natural vascular tissue. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 39 (1): 17–27.
- Chen, Z.G.; Wang, P. W.; Wei, B.; Mo, X. M. y Cui, F. Z. 2010. Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomaterialia*. 6 (2): 372–382.
- Corbeil, D. 2012. Prominin-1 (CD133): New Insights on Stem & Cancer Stem Cell Biology. EUA, Springer.
- Cramariuc, B; Cramariuc, R.; Scarlet, R.; Manea, L. R.; Lupu, I. G. y Cramariuc, O. 2013. Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*. 71 (3): 189-198.
- Gomes, D. S.; Silva, N. R. A. y N. I. Morimoto. 2007. Characterization of an Electrospinning Process using Different PAN/DMF Concentrations. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 17 (3): 206-211.
- Grundy, S.M.; Ivor, B. S.M.; Burke, G. L.; Chait, A.; Eckel, R. H.; Howard, B.V.; Mitch, W.; Smith, S. C.; Sowers, J. R. 1999. MD. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for health care professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 101 (13):1629-1631.

- Eynard, A. R.; Valentich, M. A. y Rovasio, R. A. 2008. Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares. 4ª Edición. Argentina. Panamericana.
- Fougerolles, A.R.; Sprague, A. G.; Nickerson-Nutter, C.L.; Chi-Rosso, G.; Rennert, P. D.; Gardner, H.; Gotwals, P. J.; Lobb, R. R. y Koteliansky, V. E. 2000. Regulation of inflammation by collagen-binding integrins  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  in models of hypersensitivity and arthritis. 115 (6): 721- 729.
- Greiner, A. y Wendorff, J. H. 2007. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (1): 5670 – 5703.
- Hasan, A.; Memic, A.; Annabi, N.; Hossain, M.; Paul, A.; Dokmeci, M. R.; Dehghani, F.; Khademhosseini, A. 2014. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biometer.* 10 (1): 11- 25.
- He, W.; Ma, Z; Yong, T.; Eong, W. T. y Ramakrishna, S. 2005. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials.* 26 (36): 7606–7615.
- Hsin-Chieh, C.; Win-Chun, J. y Ming-Chien, Y. 2008. Characterization of gelatin nanofibers electrospun using ethanol/formic acid/water as a solvent. *Polym. Adv. Technol.* 20 (2): 98–103.
- Ju-Ha, S.; Hyoun-Ee, K. y Hae-Won, K. 2008. Production of electrospun gelatin nanofiber by waterbased co-solvent approach. *Springer.* 19 (1): 95–102.
- Lee, S.J.; Liu, J.; Oh, S.H.; Soker, S.; Atala, A. y Yoo, J.J. 2008. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions. *Biomaterials.* 29 (19): 2891-2898.
- Li, Z. y Wang, C. 2008. One-Dimensional Nanostructures. *Springer.*
- Li, M.; Mondrinos, M.J.; Gandhi, M.R.; Ko, F.K.; Weiss, A. S. y Lelkes, P.I. 2005. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials.* 26 (30): 5999–6008.
- Lutolf, M.P. y Hubbell, J.A. 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology.* 23 (1): 47- 55.

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

- Macías-Abraham, C.; Valle-Pérez, L. O.; Hernández-Ramírez, P. y Ballester-Santovenia, J.M. 2014. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 30(2): 162-170.
- Matthews, J.A.; Wnek, G.E.; Simpson, D. G. y Bowlin, G.L. 2001. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules*. 3 (2): 232-238.
- Meng, Z.X.; Wang, Y.S.; Ma, C.; Zheng, W.; Li, L. y Zheng, Y.F. 2010. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 30 (8): 1204- 1210.
- Megías, M.; Molist, P. y Pombal, M. A. 2014. Atlas de histología vegetal y animal. España. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.
- Moreno-Treviño, M. G. y Rivera-Silva, G. 2015. Donación de órganos, tejidos y células en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 53 (6):762-763.
- OMS. 2015. Organización Mundial de la Salud: Enfermedades cardiovasculares. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>.
- OMS. 2014. México: perfil de enfermedades cardiovasculares. *OMS/ OPS*. 1- 2.
- Pektok, E.; Nottelet, B.; Tille, J.C.; Gurny, R.; Kalangos, A.; Moeller, M. y Walpoth, B.H. 2008. Degradation and Healing Characteristics of Small-Diameter Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Vascular Grafts in the Rat Systemic Arterial Circulation. *Circulation*. 118: 2563–2570.
- Piste, D.D.; Ahuja, B.B. y Shendokar, S. M. 2013. Study of process parameters affecting the diameter and morphology of electrospun polyvinylidene fluoride (PVDF) nanofibers. *IJSR*. 4 (6): 2319-7064.
- Panzavolta, S.; Giofrè, M.; Focarete, M.L.; Gualandi, C.; Foroni, L. y Bigi, A. 2011. Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomater*. 7(4): 1702–1709.
- Resnick, R.; Halliday, D. y Krane, K. S. 2011. Física. 3a edición. México. Patria.
- Sánchez-Arias, A.G.; Bobadilla-Serrano, M.E.; Dimas-Altamirano, B.; Gómez-Ortega, M. y González-González, G. 2016. Enfermedad cardiovascular: primera causa de morbilidad en un hospital de tercer nivel. *Cardiología*. 27 (3): 98- 102.
- Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C. y Langer, R. 2010. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett*. 10 (9): 3223–3230.

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

- Sill, T.J. y Recum, H.A. 2008. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 29 (13): 1989- 2006.
- Silverthorn, D.U. 2008. Fisiología Humana: Un enfoque integrado. 4ª edición. México. *Panamericana*. pp.74-80.
- Sell, S.A.; McClure, M.J.; Garg, K.; Wolfe, P.S. y Bowlin, G.L. 2009. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (12): 1007–1019.
- Seok, K. C.; Hyun, B. D.; Don, G. K.; Hoon, L. K.; Chul, U. I. Hwan, P. Y. 2005. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer*. 46: 5094–5102.
- Sethuraman, S.; Krishnan, U. M. y Subramanian, A. 2017. Biomaterials and Nanotechnology for Tissue Engineering. EUA. Taylor & Francis Group.
- Stroka, K.; Jiang, H.; Gu, Z.; Sun, S. y Konstantopoulos, K. 2014. Bioengineering paradigms for cell migration in confined microenvironments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 30, 41–51.
- Soo-Hyun, K.; Turnbull, J. y Guimond, S. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *Journal of Endocrinology*. 209: 139–151.
- Telemeco, T. A.; Ayres, C.; Bowlin, G. L.; Wnek, G. E.; Boland, E. D.; Cohen, N.; Baumgarten C. M.; Mathews, J. y Simpson, D. G. 2005. Regulation of cellular infiltration into tissue engineering scaffolds composed of submicron diameter fibrils produced by electrospinning. *Acta Biomater.* 1 (4): 377–385
- Theron, A.; Zussman, E. y Yarin, A. L. 2001. Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. *Nanotechnology*.12: 384–390.
- Thiriet, M. 2014. Anatomy and Physiology of the Circulatory and Ventilatory Systems. Francia. Springer
- Wang, S.; Y. Zhang; H. Wang; G. Yin y Z. Dong. 2009. Fabrication and Properties of the Electrospun Polylactide/Silk Fibroin-Gelatin Composite Tubular Scaffold. *Biomacromolecules*. 10(8): 2240–2244.
- Weish, U. 2008. Histología. 2a Edición. España. Panamericana.

- Wong, E. V. 2009. Cells: Molecules and Mechanisms. EUA. Axolotl Academic Publishing.
- Yördem, O. S.; Papila, M. y Menciloglu, Y. Z. 2008. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology. *Materials and Design*. 29 (1): 34–44.
- Zheng-Ming, H; Zhang, Y. Z.; Ramakrishna, S. y Limb, C.T. 2004. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer*. 45 (15): 5361–5368.
- Zhang, Y.Z.; Venugopal, J.; Huang, Z. M.; Lim, C. T. y Ramakrishna, S. 2006. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer*. 47 (8): 2911- 2917.
- Zhao, W.; Ji, X.; Zhang, F.; Li, L. y Ma, L. 2012. Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules*. 17 (6): 6196-6236.
- Zhou, J.; Cao, C.; Ma, X. y Lin, J. 2010. Electrospinning of silk fibroin and collagen for vascular tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 47 (4): 514- 519.