



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

CONSTRUCCIÓN DE UN ANDAMIO DE GELATINA - ÁCIDO HIALURÓNICO
CON UNA MEMBRANA DE PDMS PARA EL TRATAMIENTO DE HERIDAS
CUTÁNEAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ARELLANO OLIVARES ROSA MARÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., NOVIEMBRE, 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

CONSTRUCCIÓN DE UN ANDAMIO DE GELATINA - ÁCIDO HIALURÓNICO
CON UNA MEMBRANA DE PDMS PARA EL TRATAMIENTO DE HERIDAS
CUTÁNEAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ARELLANO OLIVARES ROSA MARÍA

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

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM
DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., NOVIEMBRE, 2017




Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora 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 14 de agosto de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ARELLANO OLIVARES ROSA MARÍA** con número de cuenta 307004297, con la tesis titulada **"CONSTRUCCIÓN DE UN ANDAMIO DE GELATINA-ÁCIDO HIALURÓNICO CON UNA MEMBRANA DE PDMS PARA EL TRATAMIENTO DE HERIDAS CUTÁNEAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**:

Presidente: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
Vocal: DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ
Secretario: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
Suplente: DRA. CYNTHIA GEORGINA TREJO IRIARTE
Suplente: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 12 de octubre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

- Al apoyo recibido por:

CONACYT (beca para estudios de posgrado)

PAPIIT-DGAPA IA207917

PAPIIT-DGAPA IN218315

- A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Dra. María Cristina Piña Barba

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille

Agradecimientos a título personal

Al laboratorio de Inmunología experimental e ingeniería de tejidos

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
Dr. Miguel Ángel Herrera Enríquez
Dra. Gabriela Piñón Zárate
Dra. Katia Jarquín Yáñez
Biól. Beatriz Hernández Téllez
M. en C. Casandra Paulina Chaires Rosas

- Al laboratorio de microscopía electrónica
Biól. Armando Zepeda Rodríguez
Francisco Pérez Pasos
- Al laboratorio de biomateriales, IIM, UNAM
Dra. María Cristina Piña Barba
- Al LaNSBioDyT, Facultad de Ciencias, UNAM
Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille
- Al laboratorio de endocrinología comparada
Dra. Tatiana Fiordelisis Coll
M. en C. José Alfredo Jiménez Medina
- Al laboratorio Central de microscopía, IFUNAM
Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre
M. en C. Jaqueline Cañetas Ortega
- Al laboratorio de Nanopelículas, ICN, UNAM
Dra. María del Pilar Carreón Castro
I.Q. Socorro Cruz Angeles

Dedicatoria

A mis padres y a mis hermanos por su apoyo y comprensión incondicional, esta tesis es para ustedes con todo mi amor y esfuerzo.

A todos los miembros del laboratorio en especial a Gaby y Casandra.

Y a mi novio que estuvo acompañándome y apoyándome durante todo el transcurso de esta tesis.

Índice

Índice de figuras	I
Índice de tablas	II
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
La piel	3
Tipos y clasificación de lesiones cutáneas	6
Proceso de curación de heridas	7
Principales lesiones de la piel	9
Ingeniería de tejidos	14
Sustitutos cutáneos	17
Técnicas para la fabricación de sustitutos cutáneos	19
Tipos de materiales para la fabricación de sustitutos cutáneos	22
Gelatina	23
Ácido hialurónico	25
Entrecruzamiento	27
Cubiertas de silicón en los sustitutos dérmicos	30
Antecedentes	32
Justificación	38
Objetivos	38
Objetivo general	38
Objetivos particulares	38
Metodología	39
Materiales	39
Fabricación de los andamios	40
Microscopía electrónica de barrido	41
Microanálisis de dispersión de energía de rayos X	42
Espectroscopía de rayos infrarrojos	42
Capacidad de absorción	42
Degradación	42
Esterilización de los andamios para las pruebas <i>in vitro</i>	43
Citocompatibilidad	44
Adhesión celular	44
Análisis de expresión de procolágena	45
Análisis estadístico	45
Resultados	46
Fabricación de los andamios	46
Grosor de la membrana de PDMS	48
Morfología de los andamios mediante MEB	49
Porosidad	53
Microanálisis de dispersión de energía de rayos X	55

Espectroscopía de rayos infrarrojos	57
Capacidad de absorción	60
Degradación	63
Citocompatibilidad	65
Adhesión celular	69
Análisis de la expresión de procolágena	72
Discusión	74
Morfología y porosidad	74
Microanálisis de dispersión de energía de rayos X	77
Espectroscopía de rayos infrarrojos	78
Capacidad de absorción	81
Degradación	82
Citocompatibilidad	84
Adhesión	86
Expresión de procolágena	87
Conclusión	89
Perspectivas	92
Literatura citada	93

Índice de figuras

Figura 1.	Esquema de la piel humana	5
Figura 2.	Bases de la ingeniería de tejidos	15
Figura 3.	Mecanismo de acción del EDC	29
Figura 4.	Esquema de trabajo	39
Figura 5.	Andamios de Ge-AH a diferentes proporciones	47
Figura 6.	Grosor de la membrana de PDMS	48
Figura 7.	Fotomicrografías tomadas con MEB de los andamios A y D en corte transversal, vista superior e inferior	50
Figura 8.	Fotomicrografías tomadas con MEB de los andamios B y E en corte transversal, vista superior e inferior	51
Figura 9.	Fotomicrografías tomadas con MEB de los andamios C y F en corte transversal, vista superior e inferior	52
Figura 10.	Porosidad	54
Figura 11.	Dispersión de energía de rayos X	56
Figura 12.	Espectroscopia de difracción de rayos infrarrojos de los andamios y sus controles	59
Figura 13.	Capacidad de absorción	61
Figura 14.	Degradación	63
Figura 15.	Viabilidad de fibroblastos después de 24 horas de cultivo sobre los diferentes andamios	66
Figura 16.	Viabilidad de fibroblastos después de tres días de cultivo sobre los diferentes andamios	68
Figura 17.	Adhesión de fibroblastos a los diferentes andamios después de 24 horas de cultivo	70
Figura 18.	Controles de la prueba de adhesión	71
Figura 19.	Expresión de procolágena	73
Figura 20.	Comparación de piel normal y andamio de Ge-AH liofilizados	77

Índice de tablas

Tabla 1. Sustitutos dérmicos comerciales	18
Tabla 2. Asignación de nombres a los andamios y sus características	41
Tabla 3. Porcentaje de fibroblastos vivos después de 24 h de cultivo	67

Resumen

Introducción: La piel puede lesionarse por diferentes etiologías, sin embargo, las quemaduras, las úlceras vasculares y de pie diabético son las principales causas. Estas lesiones pueden tratarse mediante andamios o sustitutos dérmicos fabricados mediante ingeniería de tejidos. Los andamios son estructuras fabricadas a base de biomateriales que ofrecen soporte mecánico a las células para que proliferen y regeneren diferentes tejidos. La gelatina y el ácido hialurónico son biomateriales usados frecuentemente en la ingeniería de tejidos, debido a que ambos forman parte de la matriz extracelular y tienen características físicas, químicas y biológicas adecuadas para la fabricación de andamios.

Método: En este trabajo se fabricaron andamios con una mezcla de Ge y AH en diferentes proporciones (70-30, 80-20 y 90-10, respectivamente) y se entrecruzaron con EDC. En orden de mimetizar las funciones de un epitelio y proteger al andamio, se le colocó en la parte superior una membrana de PDMS. Es importante mencionar que el PDMS es un silicón biocompatible, fácil de manipular y de bajo costo que frecuentemente se usa en la ingeniería de tejidos. El tamaño de los poros y el grosor de la membrana de PDMS fueron medidos mediante MEB. Se analizaron los espectros IR, la dispersión de energía de rayos X, la capacidad de absorción y el porcentaje de degradación. Y por último, se evaluó la citocompatibilidad, la adhesión celular y la expresión de procolágena I de fibroblastos sembrados en los andamios.

Resultados: Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que la media del tamaño de poro fue adecuado para el cultivo celular, los poros fueron homogéneos en todos los andamios y la membrana de PDMS fue más delgada en comparación con otros sustitutos dérmicos. El análisis de dispersión de energía de rayos X y los espectros de IR corroboraron que las proporciones de Ge-AH y el proceso de entrecruzamiento no modificaron las bandas de absorción y los elementos presentes en los andamios, los cuales pueden tener lugar durante el proceso de fabricación. La capacidad de absorción y el porcentaje de degradación se modificaron ligeramente debido a las proporciones de Ge-AH, el proceso de entrecruzado y la cubierta de PDMS. Finalmente, con los ensayos *in vitro* demostramos que tampoco las proporciones de Ge-AH, el entrecruzamiento y la membrana de PDMS afectan la viabilidad, la adhesión y la síntesis de procolágena I de fibroblastos cultivados sobre los andamios.

Con este trabajo podemos concluir que los andamios de Ge-AH en proporciones 70-30, 80-20 y 90-10, respectivamente; entrecruzados con EDC y con una membrana de PDMS son buenos candidatos para el tratamiento de heridas cutáneas, ya que pueden evitar las infecciones y la pérdida de agua de la herida y que al mismo tiempo ayudan a reparar el tejido. Sin embargo, es importante continuar la caracterización de los andamios en términos de sus propiedades mecánicas para posteriormente evaluar su comportamiento en modelos *in vivo*.

Abstract

Introduction: The skin can be injured by different etiologies; nevertheless, burns, vascular ulcers and diabetic foot are the main injured causes. These lesions may be treated by scaffolds or dermal substitutes manufactured by tissue engineering. Scaffolds are structures made of biomaterials that provide mechanical support to cells to proliferate and regenerate different kind of tissues. Gelatin (Ge) and hyaluronic acid (HA) are biomaterials frequently used in tissue engineering, since they are essential part of the extracellular matrix and posses the optimal physical, chemical and biological characteristics to scaffolds manufacture.

Method: In this investigation, scaffolds were first fabricated by mixture of different proportions of Ge and HA (70-30, 80-20 and 90-10, respectively) and then crosslinked with EDC. In order to mimic an epithelium and also protect the scaffold, a PDMS membrane was placed at the top of the Ge/HA scaffold. It is important to note, that PDMS is a biocompatible and inexpensive silicone easy to handle and often used in tissue engineering. Scaffold pore size measure and PDMS membrane thickness were characterized and analyzed by SEM. Besides, scaffold absorption capacity, percentage of degradation, infrared spectra and X-ray energy dispersion also were examined. In addition, citocompatibility tests, adhesion and procollagen synthesis of fibroblast seeded on scaffolds were measured.

Results. The results obtained were satisfactory since the mean pore size was adequate for cell culture, the pores were homogeneous in all scaffolds and the PDMS membrane was thinner than in other dermal substitutes. Moreover, the adsorption capacity and percent degradation of the different scaffolds was slightly modified on scaffolds depending the proportions of AH, the crosslinked and the PDMS membrane. Analyzes of IR spectroscopy and X-ray energy dispersion corroborated that the proportions of Ge-AH and the cross-linking process did not modify the absorption bands and that the elements found in the sample did not present significant alterations, which may have been taken place during the manufacturing process. Finally, the in vitro assays we showed that neither the proportions of Ge-AH, nor the cross-linking and the PDMS membrane affected the viability, adhesion and synthesis of procollagen I of cultured fibroblasts on the scaffolds.

With this work, we concluded that the Ge/HA scaffolds in proportions 70-30, 80-20 and 90-10, respectively; EDC crosslinked and with a PDMS membrane are suitable candidates for the treatment of cutaneous wounds, in order to reduce the risk of infections and prevent water loss in the wound healing. Nevertheless, scaffolds characterization in terms of mechanical properties and biocompatibility in vivo would be important to develop.

Introducción

La piel

Se considera el órgano más grande del cuerpo humano, en el adulto llega a tener una extensión de 1.4 a 1.8 m². Sus características varían dependiendo el área del cuerpo humano, puede ser abundante en folículos pilosos o carente de ellos, gruesa o delgada, dura o suave y tiende a reflejar la edad y el estado de salud. La piel tiene un peso aproximado de 4 kg y el grosor promedio es de 4 mm, la más gruesa llega a medir hasta 8 mm dependiendo del sitio anatómico. La piel está constituida por tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Magaña Garcia & Magaña Lozano, 2011).

La epidermis está compuesta por un epitelio plano estratificado que crece continuamente, pero mantiene su espesor normal, debido a que las células más superficiales se descaman continuamente. Este epitelio está formado por cuatro tipos celulares: los queratinocitos, los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel. Los queratinocitos son los más abundantes y conforman el 85% del total de las células de la epidermis, organizándose en varias capas o estratos, del más interno al externo son: el estrato basal, en donde se localizan las células troncales que mantendrán el epitelio, el estrato espinoso, que se caracteriza porque los queratinocitos tienen múltiples evaginaciones citoplásmicas o espinas que están unidas a otros queratinocitos mediante desmosomas, el estrato granuloso, en el que los queratinocitos poseen una gran cantidad de gránulos de queratohialina los cuales organizan a los filamentos de queratina en los estratos superiores y finalmente el estrato córneo, compuesto por queratinocitos aplanados llenos de filamentos de queratina, sin núcleo y organelos. Existe un estrato más que sólo se observa en piel de las palmas de las manos y plantas de los pies y en engrosamientos de la piel como callosidades, se observa como un estrato poco teñido y birrefringente, en donde las células están en proceso de cornificación avanzado. El espacio intercelular de los estratos espinoso, granuloso y córneo tiene una gran cantidad de lípidos que forman el componente principal de la barrera contra el agua, lo cual hace a la epidermis una barrera parcialmente permeable. Por otro lado, los melanocitos son los responsables de la coloración de la piel

debido a la síntesis de melanina, un pigmento que es transferido a los queratinocitos y que atrapa radicales libres ayudando a la protección del DNA contra los rayos UV. Los melanocitos constituyen el 5% del total de las células en la epidermis. Las células de Langerhans conforman del 2 al 5% de células totales en la epidermis y tienen la función de presentar antígenos endógenos y/o exógenos a linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente, siendo las responsables de la inmunovigilancia de la epidermis. Finalmente, las células de Merkel las encontramos en un porcentaje que va del 6 al 10%, tienen un citoplasma claro, con vesículas electrón densas que tienen neurotransmisores y se unen a queratinocitos mediante desmosomas teniendo la función de la percepción a tacto fino. Estas células están estrechamente asociadas a bulbos terminales de fibras nerviosas. (Ross & Pawlina, 2016). Cabe mencionar que estudios recientes indican la presencia de subpoblaciones linfocitos T en la epidermis en condiciones normales, las cuales participarían en la respuesta inmune contra algún patógeno de manera rápida (Pasparakis, *et al.*, 2014).

Todas estas células que forman la epidermis descansan sobre la dermis, la segunda capa de la piel la cual se subdivide en dermis papilar, localizada inmediatamente después de la epidermis y la dermis reticular que se localiza de manera más profunda llegando hasta los inicios de la hipodermis. La dermis es un tejido conjuntivo abundante en fibroblastos que secretan fibras de colágena tipo I, III y V en la dermis papilar y fundamentalmente colágena tipo I en la dermis reticular. En la dermis también hay diferentes clases de fibras elásticas como las de elastina, elastina y oxitalán, vasos sanguíneos de diferentes calibres, terminaciones nerviosas como los corpúsculos de Pacini, de Meissner, de Ruffini y de Krause, folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas.

La última capa de la piel o la capa más profunda es la hipodermis que está formada por tejido adiposo, músculo liso y en algunas partes del cuerpo músculo estriado (Ross & Pawlina, 2016).

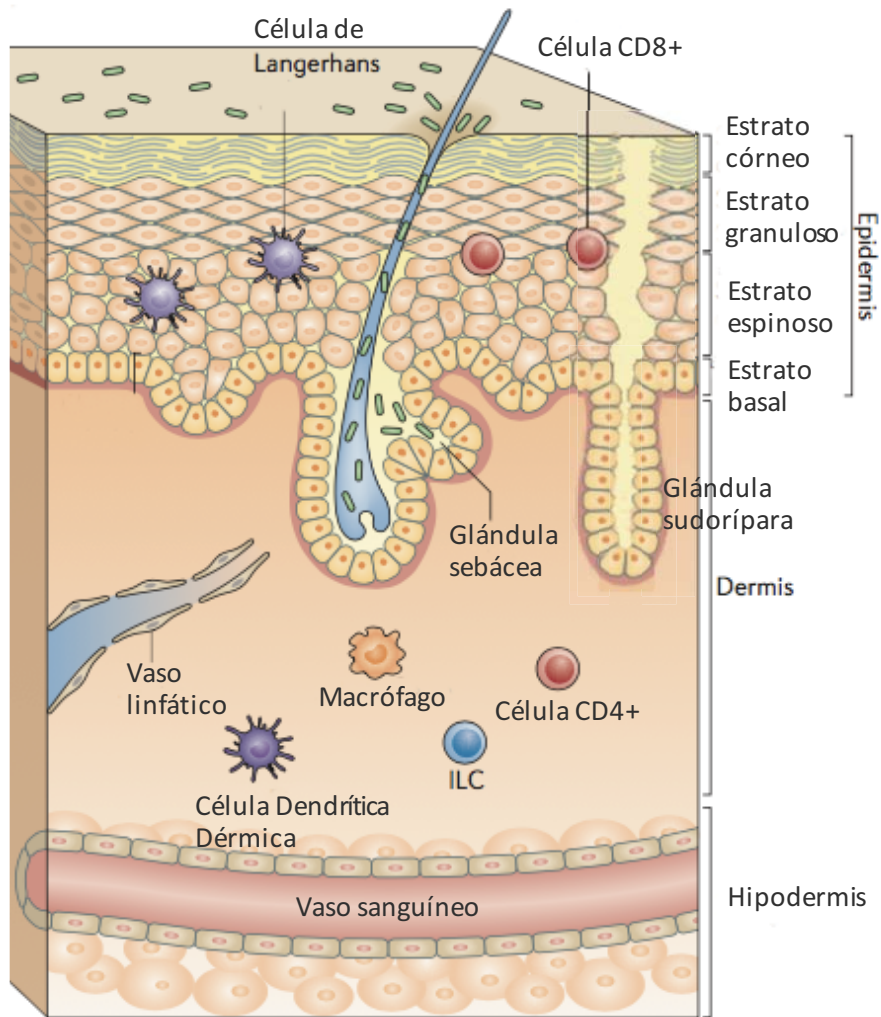


Figura 1. Esquema de piel humana. Tomada y modificada de (Pasparakis, et al., 2014)

Dado su estructura, la piel desempeña diferentes funciones:

- ❖ actúa como una barrera que protege al cuerpo contra agentes físicos, químicos y biológicos,
- ❖ mantiene la homeostasis mediante la regulación de la temperatura corporal y la pérdida de agua,
- ❖ nos permite percibir estímulos del medio externo ya que es un órgano que posee diferentes receptores sensoriales como al tacto fino y profundo, al estiramiento, a la presión, al dolor y a la temperatura.

- ❖ participa en la respuesta inmune mediante el procesamiento antigénico para presentarlo a las células efectoras,
- ❖ secreta citocinas y factores de crecimiento, y la
- ❖ excreción de iones, solutos, sebo mediante las glándulas presentes en la dermis

Así, la piel posee varias funciones vitales para el organismo y puede ser dañada o lesionada de diferentes maneras.

Tipos y clasificación de lesiones cutáneas

Las lesiones en la piel se clasifican como epidérmicas, superficiales de espesor parcial, profundas de espesor parcial y de espesor completo. Las lesiones epidérmicas se producen por quemaduras solares, escaldaduras o raspones ligeros y se caracterizan por dar lugar a eritema e inducir poco dolor, por otro lado, no requieren de ninguna intervención quirúrgica porque sólo se daña la epidermis, tejido que se regenera rápidamente, o dejando cicatriz. Las heridas superficiales de espesor parcial tienden a ser dolorosas y afectan al espesor total de la epidermis y la capa superficial de la dermis. En este tipo de heridas el proceso de cicatrización inicia por los bordes de la lesión, de donde los queratinocitos del estrato basal migran y proliferan. Es de notar que en este tipo de lesiones están intactos los folículos pilosos y conductos de glándulas sudoríparas y sebáceas a partir de las cuales se puede recuperar la epidermis debido a que la pared de los conductos de la glándulas y en la vaina radicular externa de los folículos pilosos se tiene una población de células troncales de queratinocitos que contribuyen al cierre de las heridas. Las lesiones profundas de espesor parcial se caracterizan porque la lesión llega hasta la dermis profunda, perdiéndose los anexos cutáneos como los folículos pilosos y glándulas y por ende tardan mucho más tiempo en sanar. La cicatriz que se forma es más pronunciada debido a que el proceso de reparación es más intenso comparado con las heridas superficiales de espesor parcial. Por último, las lesiones de espesor completo se caracterizan por la destrucción completa de elementos que puedan regenerar el epitelio, a diferencia de las otras lesiones, éstas cierran por contracción y reepitelización sólo desde el borde de la herida, lo que provoca defectos

estéticos y funcionales ya que pueden afectar la movilidad y flexibilidad. Cabe mencionar que todas las heridas de espesor completo que tengan más de 4 cm de diámetro requieren de un injerto de piel ya que no pueden reepitelizar por sí mismas y pueden terminar en cicatrices extensas (Papini, 2004; Shevchenko, *et al.*, 2009).

Proceso de curación de heridas

En el proceso de cicatrización de heridas cutáneas se pueden identificar 3 fases o etapas: inflamación, proliferación y remodelación. La primera fase ocurre inmediatamente después de que se dañó el tejido y dura de 4 a 6 días. En esta fase el primer evento es la constricción de los vasos dañados, al mismo tiempo se induce una liberación de tromboplastina plaquetaria y tisular con lo que se inicia la cascada de la coagulación dando como resultado la formación de un coágulo. A este coágulo, se infiltran células del sistema inmune debido a diferentes citocinas que se liberan en el sitio de lesión. Por ejemplo, los neutrófilos son atraídos por la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6, la interleucina-8, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , el factor de crecimiento transformante (TGF)- β , el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y diferentes productos bacterianos. Una vez en el sitio de lesión, los neutrófilos fagocitan y destruyen restos celulares y bacterias. Transcurridas de 48 a 96 h después de la lesión, llegan los macrófagos y al activarse se inicia la transición a la fase proliferativa. En esta segunda fase, los macrófagos median la angiogénesis por la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGF-1), del factor de crecimiento de fibroblastos y de TNF- α . Además, los macrófagos median la hiperplasia de los fibroblastos por la liberación de TGF- β , del factor de crecimiento epidérmico (EGF), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la IL-1 y el TNF- α (Broughton, *et al.*, 2006; Gurtner, *et al.*, 2008).

La segunda fase dura de 4 y hasta 14 días y en esta fase los fibroblastos y las células endoteliales son los tipos celulares que más proliferan estimulados por el VEGF-1, secretado predominantemente por los queratinocitos del borde de la herida. Los fibroblastos que llegan al sitio de la herida proliferan e inician la síntesis de colágena I y se diferencian en

miofibroblastos que ayudan a la contracción de la herida, sin embargo, cuando se diferencian su capacidad de proliferación disminuye y aumenta la secreción de gran cantidad de colágena. Los fibroblastos en respuesta a PDGF comienzan a sintetizar una matriz provisional formada por colágena tipo III, glicosaminoglucanos y fibronectina. También en esta fase comienzan a proliferar los queratinocitos del borde de la herida debido a la estimulación del EGF y del TGF- α liberado por las plaquetas y los macrófagos y a su vez los fibroblastos liberan el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) 1 y 2 e IL-6 para que los queratinocitos migren a la zona de lesión en donde proliferan y se organizan para formar la epidermis (Broughton, *et al.*, 2006; Gurtner, *et al.*, 2008).

Finalmente, la tercera fase es la de remodelación y maduración que inicia dos o tres semanas después de la lesión y se puede extender hasta un año o más. En esta fase todos los procesos activados después de la lesión disminuyen y cesan, muchas células endoteliales, macrófagos y miofibroblastos mueren por apoptosis y algunos macrófagos se retiran del sitio de lesión para que los fibroblastos inicien la síntesis y depósito de colágena, que es la principal característica de esta fase. La matriz inicial (la que se forma para mantener la homeostasis, inmediatamente después de que originó el daño) está formada principalmente por fibrina y fibronectina, después los fibroblastos adicionan glicosaminoglucanos, proteoglicanos y otras proteínas. Esta red preliminar es un molde para la formación de una nueva matriz bien organizada formada principalmente por colágena tipo I (80-90%) y en menor cantidad por colágena tipo III (10-20%). En el tejido de granulación que es el tejido conjuntivo fibroso que reemplazará a la primera matriz, la colágena tipo III alcanza hasta el 30% y en la cicatriz madura regresa a su porcentaje inicial. Para poder remodelar la MEC en el sitio de lesión, los fibroblastos secretan metaloproteasas de matriz (MMP). Estas proteínas son enzimas que degradan los componentes de la MEC. Existen diferentes tipos de MMP y cada una es específica para ciertos componentes de la matriz y son influenciadas por los cambios de concentración de TGF- β , PDGF, IL-1, EGF y sus inhibidores enzimáticos. En esta última fase se requiere de un delicado equilibrio entre el depósito de matriz y su degradación para lograr una buena cicatrización tanto funcional

como estética y evitar la formación de una cicatriz hipertrófica queloide (Broughton, *et al.*, 2006; Guo & DiPietro, 2010; Gurtner, *et al.*, 2008)

Es de notar que las fases del proceso de cicatrización deben ocurrir en la secuencia adecuada, en tiempos específicos y continuar cada una de ellas con una duración e intensidad específica, sin embargo, existen factores que pueden alterar el proceso de cicatrización y pueden llevar a un estado de inflamación patológica, lo que provoca heridas agudas retardadas, heridas crónicas o heridas con defectos en la cicatrización. La mayoría de las heridas crónicas son úlceras que están asociadas a isquemia, diabetes mellitus y enfermedades vasculares (Guo & DiPietro, 2010).

Principales lesiones a la piel

La pérdida de piel puede ser ocasionada por traumas agudos, desordenes genéticos o heridas crónicas (úlceras vasculares, de pie diabético y de presión). Las quemaduras y las úlceras cutáneas son las principales causas de lesiones en la piel. En especial, las quemaduras provocan lesiones profundas y extensas en poco tiempo, las cuales pueden desencadenar en la muerte (Shevchenko, *et al.*, 2014).

Quemaduras

Las quemaduras que se clasifican como lesiones superficiales, profundas de espesor parcial o de espesor completo, en el mundo occidental o bien en países desarrollados, no son numéricamente significativas, ya que se ha demostrado que pueden ser en gran medida evitables debido a la educación y el estilo de vida que manejan estas poblaciones, sin embargo, para países en vías de desarrollo y en los países subdesarrollados estas lesiones son un problema importante de salud. En estas comunidades no existen ni los recursos económicos ni la infraestructura para establecer tecnologías capaces de desarrollar materiales que ayuden a disminuir la incidencia de este tipo de lesiones, pero la simple transferencia de conocimientos podría hacer una diferencia considerable (Macneli, 2007). México está considerado como un país en vías de desarrollo y por lo tanto las quemaduras

siguen siendo un problema de salud importante, de acuerdo con la Dirección General de Epidemiología y la Secretaría de Salud, en 2015 (últimos datos registrados a la fecha) se presentaron 10,436 casos de quemaduras al mes, donde los principales Estados afectados fueron los Estados del Norte del país y la Ciudad de México, en donde los grupos de edad más afectados son los niños de 1 a 4 años, los adultos entre 20 y 44 años y los adultos mayores de 50 a 59 años. La incidencia que se registró fue de 103.48 por cada 100,000 habitantes (Dirección general de Epidemiología Anuario de morbilidad 1984-2015, 2015). Estas defunciones se deben como ya se mencionó a que cualquier pérdida de espesor total de más de 4 cm de diámetro no cerrarán sin un injerto y las consecuencias de las lesiones de la piel son la pérdida de agua, electrolitos, proteínas y las infecciones sobre agregadas, lo que resulta en una sepsis bacteriana y posteriormente la muerte (Macneli, 2007).

Así, el tratamiento “estándar de oro” para las quemaduras que comprometen a la dermis es el autoinjerto que consiste en tomar injertos de piel que contengan epidermis y la parte superficial de la dermis de áreas sanas del cuerpo del mismo paciente para tratar el área afectada. Si las lesiones son demasiado grandes se necesita hacer una malla con el autoinjerto para que se pueda estirar y de esta forma aumentar la superficie que cubrirá el autoinjerto. Esta técnica es hasta cierto punto exitosa, sin embargo, en las zonas que quedan desprovistas de injerto, al no haber una dermis provisional se genera una cicatrización excesiva y por ende un resultado cosmético no deseado, además de la pérdida de líquidos y el riesgo de infección (Waymack, *et al.*, 2000). Otro inconveniente de los autoinjertos es que si la persona sufrió una quemadura de más del 50% de su cuerpo no es recomendable retirar piel de regiones sanas, debido a que se hace una herida más en el paciente el cual tardará mucho más en recuperarse debido a que su sistema inmune se encuentra por debajo de los niveles óptimos y son extremadamente propensos a contraer infecciones (Shevchenko, *et al.*, 2009). Otra opción son los aloinjertos, los cuales consisten en piel de otra persona, lo cual es difícil de conseguir y normalmente tienden a ser injertos de donador cadavérico. Dichos injertos proporcionan una cubierta temporal que evita la pérdida de líquidos y proteínas y pueden iniciar el proceso de curación, sin embargo, tienen

sus inconvenientes debido a que puede haber transmisión de enfermedades o el aloinjerto puede ser rechazado por el paciente (Metcalfe & Ferguson, 2006). Además, la piel cadavérica es difícil de conseguir debido a la falta de cultura de la donación de órganos en el país y a deficiencias en el sistema de procuración de tejidos. Aun así, existen bancos de piel cadavérica pero debido su difícil obtención éstos injertos tienden a ser caros. Una opción más son los xenoinjertos, los cuales son injertos de piel de alguna otra especie diferente al humano, utilizando frecuentemente piel porcina, pero al provenir de una especie diferente se incrementa el riesgo de contraer alguna enfermedad y se incrementan las probabilidades de rechazo al injerto (Metcalfe & Ferguson, 2006).

Úlceras de pie diabético

Las ulceraciones crónicas de la piel como las úlceras en diabéticos tienen un gran impacto tanto en los países desarrollados y en vías de desarrollo (Pop & Almquist, 2017). Además, el número de personas con diabetes incrementa debido al crecimiento de la población, la edad, la urbanización y al incremento en la prevalencia de la obesidad y la inactividad física a lo largo del planeta. Según el estudio realizado en 2004 por Wild y cols., se prevé que para el año 2030 el número de personas con diabetes a nivel mundial se incrementará poco más del doble, en donde los países en vías de desarrollo serán los más afectados. En México (2016), la diabetes y sus complicaciones son la primera causa de muerte (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, OECD, 2016).

Con frecuencia, las personas con diabetes presentan daño a nervios periféricos resultante de alteraciones metabólicas agravadas por la enfermedad. Este el daño afecta la captación de estímulos sensoriales como el de la temperatura y dolor y los propioceptivos, por lo que se ven afectados pequeños músculos del pie y el control motor fino de las articulaciones del pie. Esta neuropatía motora afecta los músculos necesarios para el movimiento normal del pie, alterando la distribución de las fuerzas durante el caminar lo que provoca la aparición de una “callosidad” anormal en sitios de carga. A continuación, la necrosis isquémica de los tejidos por debajo del callo conduce a la necrosis de la piel y del tejido subcutáneo, dando

lugar a una úlcera. El inicio de la ulceración, como ya se mencionó, es debido a la movilidad articular limitada y las consecuencias vasculares (defectos en la microcirculación y procesos de isquemia), sin embargo, la causa más frecuente de la aparición de úlceras de pie diabético son los traumas accidentales y traumas debido a calzado mal ajustado. Una vez que se rompe la piel muchos procesos metabólicos alterados en los diabéticos contribuyen a un proceso de curación defectuoso que no puede completarse y las heridas quedan expuestas y propensas a infecciones, lo que las convierte en heridas crónicas (Jeffcoate & Harding, 2003). Las personas con diabetes tienen un 12-25% riesgo de desarrollar una úlcera en el pie (Cavanagh, *et al.*, 2005), de las cuales el 85% tienen que ser amputadas y si surgen complicaciones pueden llegar a la muerte, incluso las tasas de mortalidad a 5 años asociadas a úlceras de pie diabético o a sus amputaciones llegan a ser más altas que las del cáncer de mama y próstata (Pop & Almquist, 2017). Tan sólo en México en 2013 se registraron 75 mil amputaciones por úlceras de pie diabético (Valdez, 2014).

Los tratamientos de las úlceras de pie diabético tienden a ser costosos y desafortunadamente muy a menudo son inadecuados, resultando en complicaciones evitables y tiempos de cicatrización innecesariamente prolongados (Ragnarson Tennvall & Apelqvist, 2004). El tratamiento actualmente incluye terapia de presión negativa, equivalentes cutáneos (Saap, *et al.*, 2004), terapia con factores de crecimiento y el uso de células troncales derivadas de la médula ósea (Badiavas, *et al.*, 2003), sin embargo, el tratamiento más utilizado en los hospitales es el debridamiento rutinario del tejido en las visitas de seguimiento y lavados energéticos, pero la evidencia de que se acelere el proceso de curación es escasa. La terapia mediante larvas de gusanos o moscas parece ser eficaz para el debridamiento y la cicatrización de la herida, pero no todos los pacientes tienen la posibilidad de tener acceso a este tipo de terapias. Cabe mencionar que el alivio de presión siempre debe ser parte de cualquier tratamiento para que en el mejor de los casos la úlcera pueda cerrar (Cavanagh, *et al.*, 2005).

Úlceras vasculares

Finalmente, un problema relacionado a lesiones crónicas en la piel son las úlceras vasculares. Estas son lesiones de espesor completo por lo que tienden a curar lentamente (incluso más de 6 meses). La mayoría de las úlceras de origen vascular en las extremidades inferiores son causadas por insuficiencia venosa en el 75-80% de los pacientes y el resto de la úlceras son causadas por insuficiencia arterial, diabetes o combinaciones de estos factores etiológicos (Mekkes, *et al.*, 2003; González-Consuegra, *et al.*, 2010). De éstas, la insuficiencia venosa afecta al 1-2 % de la población en países desarrollados y la incidencia y la prevalencia se incrementan con la edad al igual que las complicaciones de estas heridas (González-Consuegra, *et al.*, 2010). Este tipo de ulceraciones son causadas por el estancamiento de sangre en el sistema venoso y la principal causa de la insuficiencia venosa es la deficiencia de las válvulas del sistema venoso de las extremidades. La insuficiencia valvular puede ser adquirida por el síndrome post-trombótico o por debilidad valvular congénita, pero la cascada patogénica exacta que conduce de la insuficiencia valvular a la ulceración no está totalmente definida. Se sabe que los capilares se dilatan por un incremento en la tensión en el sistema venoso, lo que conduce a la reducción del flujo sanguíneo, alteraciones reológicas, incremento de la permeabilidad del vaso, agregación de células del sistema inmune y finalmente a la formación de microtrombos, edemas y la oclusión de los capilares. El edema por sí mismo puede contribuir a la hipoxia del tejido circundante y en última instancia resulta en una zona fibrosa y edematosa de la piel en donde falta un número considerable de capilares y los que permanecen se encuentran deformados y disfuncionales. Un traumatismo pequeño o una infección cutánea pueden perturbar el equilibrio entre la oferta y demanda de oxígeno y desarrollar una úlcera crónica no cicatrizante (Mekkes, *et al.*, 2003).

Los tratamientos con presión controlada para el cierre de estas heridas han mostrado buenos resultados en algunos casos, por otro lado, la restauración quirúrgica o el reemplazo de válvulas venosas profundas no es una opción rutinaria. Las venas incompetentes superficiales pueden ser ligadas y/o eliminadas, como es el caso de la cirugía de

desprendimiento de la vena safena, sin embargo, esta cirugía se ha abandonado para evitar los riesgos de lesión del nervio safeno. Los pacientes con úlceras persistentes o de gran tamaño pueden requerir de hospitalización para la preparación de la herida y la aplicación de un injerto autólogo de piel completa (Mekkes, *et al.*, 2003).

Por lo tanto, la prevalencia de las quemaduras y las úlceras vasculares aunado con el incremento en la incidencia de diabetes y por ende el incremento de las úlceras de pie diabético son y seguirán siendo un problema de salud pública en México y en el mundo, el cual debe enfrentarse con la generación de sustitutos dérmicos que ayuden a curar dichas lesiones. Por lo cual, el desarrollar nuevos dispositivos médicos que proporcionen las características adecuadas para el cierre de heridas son necesarios y mediante ingeniería de tejidos y medicina regenerativa se pueden diseñar estructuras que ayuden a la restauración anatómica y funcional de órganos o tejidos dañados.

Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (TERM, por sus siglas en inglés) es un campo emergente que se nutre de diversas áreas del conocimiento como inmunología, cultivo de células biomateriales, transplantología y biología celular y tisular. El término TERM ha sido aplicado a los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido o un órgano en su totalidad.

El principal enfoque de la ingeniería de tejidos que era reparar o reemplazar tejidos u órganos perdidos o dañados por lesiones o enfermedades se ha ampliado a diferentes aplicaciones (Wobma & Vunjak-Novakovic, 2016). Ahora con el término TERM se incluyen varias ramas de investigación como lo es la reprogramación de células para volverlas pluripotentes y obtener de ellas varios tejidos sanos *in vitro* que puedan aplicarse a los pacientes que lo necesiten. Sin embargo, existen problemas para mantener su fenotipo indiferenciado, presentan diferencias entre lotes y pueden presentar respuestas

inmunológicas frente a antígenos, debido a esto se requieren más estudios para poder llegar a una aplicación clínica segura.

También con el término TERM se incluye la investigación en desarrollar ambientes 3D heterogéneos que mimeticen funciones de un órgano en específico, los organoides, los microtejidos y las plataformas “*organ on a chip*” que son usados como modelos controlados para evaluar fármacos o crear modelos de enfermedades *in vitro* y poder estudiarlas (Wobma & Vunjak-Novakovic, 2016; Harrison, *et al.*, 2014).

Finalmente, la ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que se basa en el uso de andamios porosos para proporcionar un entorno adecuado para la reparación de la estructura y función de un tejido u órgano dañado. Los andamios sirven como una plantilla para la formación del nuevo tejido, típicamente sobre estos andamios se siembran células y ocasionalmente se le incorporan factores de crecimiento. Esta combinación de andamios, células y factores de crecimiento se conoce como la triada de la IT (O'Brien, 2011) en donde el mayor reto es la complejidad de la arquitectura de la matriz de los diferentes órganos, ya que no pueden reproducirse usando la tecnología actual (Wobma & Vunjak-Novakovic, 2016; Harrison, *et al.*, 2014).

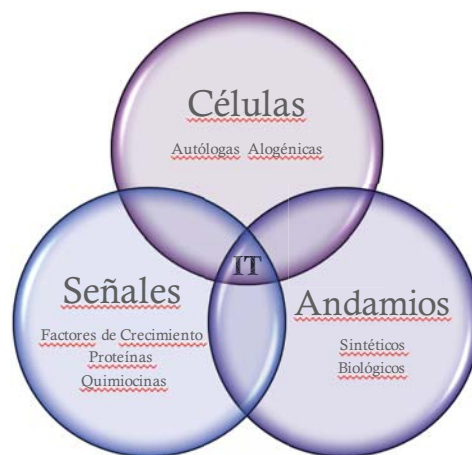


Figura 2. Bases de la Ingeniería de Tejidos (triada)

Numerosos andamios se han fabricado con diferentes materiales y técnicas en busca de regenerar diferentes tejidos y órganos del cuerpo. Sin embargo, existen algunas

consideraciones importantes al diseñar un andamio para ingeniería de tejidos independientemente de cual sea el órgano o tejido a reparar:

1. Biocompatibilidad. Deben ser biocompatibles, es decir, el andamio no debe provocar una reacción inmunológica o inflamatoria y si lo hace, ésta debe ser muy leve y transitoria ya que si se prolonga puede llegar a ser una inflamación crónica y podría reducir la capacidad de curación de la herida o bien podría ser rechazado.
2. Biodegradables. El objetivo de la IT es permitir que las propias células del cuerpo, con el tiempo reemplacen el andamio o constructo implantado, ya que no se pretende que sean permanentes. Los subproductos de degradación no deben ser tóxicos y deben ser eliminados del cuerpo sin interferir con otros órganos. Se necesita un balance entre la degradación y una respuesta inflamatoria que permita la migración de células requeridas como los macrófagos.
3. Propiedades mecánicas. Los andamios deben tener propiedades mecánicas compatibles similares al tejido y órgano que van a reemplazar, además de soportar la manipulación durante la implantación. Dichas características pueden variar de un individuo a otro por la edad, estilo de vida, dieta, etc. por lo cual permanece como un desafío para la IT.
4. Arquitectura del andamio. Deben tener poros interconectados y alta porosidad para asegurar la penetración de las células y una adecuada difusión de desechos y nutrimentos a las células dentro del constructo. Los poros deben ser lo suficientemente amplios y de materiales biodegradables, ya que la región central del andamio es la más difícil y la última región a donde llegan las células y los vasos, por lo tanto, en estas zonas los nutrimentos y las células son escasos y se pueden llegar a acumular desechos. Además, una estructura con poros grandes incrementa el área de contacto con el cual pueden interactuar las células.

5. Tecnología de fabricación. Antes de fabricar un andamio con fines de aplicación clínica se debe tener en cuenta que se requiere tener una técnica de fabricación, almacenaje y envío adecuadas que le permitan estar a la venta sin un costo excesivo y que puedan fabricarse por lotes en un laboratorio o de manera industrial (O'Brien, 2011; Grover, *et al.*, 2012).

Debido a que en las lesiones de piel el tratamiento “*estándar de oro*” es el autoinjerto y como ya se mencionó, en las quemaduras que abarcan más del 50 % de superficie corporal en donde los sitios donadores son muy limitados o bien en las personas diabéticas que no tienen un buen proceso de cicatrización los autoinjertos dejan de ser la mejor opción, debido a esto y a la gran demanda por los productos para reemplazar piel, han surgido nuevos enfoques para poder curar estas lesiones y varios grupos de investigación han desarrollado diferentes biomateriales para la sustitución de piel y actualmente en el mercado existen sustitutos que se aplican clínicamente y algunos otros continúan en estudio.

Sustitutos cutáneos

Los sustitutos cutáneos se pueden clasificar de diferentes maneras:

- Anatómicamente, dependiendo de la capa de la piel que sustituyen: epidérmicos, dérmicos o la combinación de estos, dermo-epidérmicos;
- Por el tiempo que duran en el sitio de lesión: permanentes, semipermanentes o temporales;
- Por el tipo de material por el cual están formados: biológicos o naturales como lo son los andamios autólogos (proviene del mismo paciente), alogénicos (proviene de otra persona), xenogénicos (proviene de diferentes especies animales), o formados por materiales provenientes de algún organismo y los sintéticos pueden ser materiales biocompatibles pero de fuentes diferentes a los organismos y se subclasifican en biodegradables o no biodegradables;

- Sustitutos con o sin componentes celulares, es decir celulares o acelulares, respectivamente (Shevchenko, *et al.*, 2009).

Debido a que en este trabajo se fabricará un sustituto dérmico acelular, en la siguiente tabla se muestran algunos de los sustitutos dérmicos acelulares que se encuentran actualmente disponibles en el mercado; se muestran sus componentes, técnicas de fabricación, sus ventajas y desventajas.

Tabla 1. Sustitutos dérmicos comerciales

Nombre	Composición	Ventajas	Desventajas
<i>AlloDerm</i> Life Cell Corporation EUA (Disponible en EUA)	Dermis acelular cadavérica liofilizada	Fácil almacenaje, éxito en quemaduras de grosor completo	Puede provocar inflamación crónica o rechazo
<i>Matriderm</i> Skin and HealthCare Alemania (Disponible en EUA)	Colágena liofilizada de dermis bovina no entrecruzada cubierta con hidrolizado de α -elastina	Formación de haces de colágena orientados, se degrada rápido, ha demostrado resultados comparables con injertos autólogos	Puede haber alergia a la colágena y elastina, afluencia celular reducida y pocos miofibroblastos
<i>Integra Dermal Regeneration Template</i> Integra NeuroSciences EUA (Disponible en EUA)	Andamio poroso entrecruzado de colágena tipo I de tendón bovino y condroitín 6 sulfato de tiburón con una delgada cubierta de polisiloxano	Estimula el crecimiento de fibroblastos y células epiteliales, promueve la vascularización y la formación de haces de colágena orientados, controla la pérdida de agua y la contaminación; está aprobado por la FDA	Alto costo, debido a su origen existe riesgo de presentar antigenicidad y no se integra en los tejidos
<i>Terudermis</i> Olympus Terumo Biomaterial Corp. Japón (No disponible en EUA)	Colágena bovina desnaturalizada por calor, entrecruzada y liofilizada con una cubierta de silicón	Buena infiltración celular, promueve la angiogénesis, controla la pérdida de agua y la contaminación	Existen pocos reportes de su aplicación, puede ser antigénico y provocar respuesta inflamatoria
<i>Pelnac</i> Kowa, Company Tokio Japón (No disponible en EUA)	Esponja liofilizada de atelocolágena de tendón de cerdo con una capa de silicón	Fibroblastos y capilares penetran bien, evita la pérdida de agua y la contaminación	Ligeramente antigénica, en extremidades puede formar cicatrices queloides, se conoce alergia al silicón, solo se distribuye en países asiáticos, no se tienen muchos reportes
<i>Hyalomatrix PA</i> Fifia Advanced Biopolimers, Italia (Disponible en EUA)	Derivado de hialuronano en capas con una membrana de silicón	Puede promover la migración y proliferación, evita la pérdida de agua y la contaminación	Puede presentar hipersensibilidad, no se tienen muchos reportes y estudios clínicos
<i>Biobrane</i> UDL Laboratories Inc. EUA (No disponible en EUA)	Colágena dérmica porcina entrecruzada, con una tela de nylon y una cubierta de silicón	Cuando se comienza a regenerar la piel se separa rápido la cubierta, la reepitelización es ligeramente rápida	Puede inducir reacción antigénica y no se tienen muchos reportes de su aplicación

(Brusselsaers, *et al.*, 2010; Böttcher-Haberzeth, *et al.*, 2010; Chen, *et al.*, 2004; Debels, *et al.*, 2015; Maver, *et al.*, 2015; Metcalfe & Ferguson, 2006; Mizunuma, *et al.*, 2000; Shevchenko, *et al.*, 2009)

Técnicas para la fabricación de sustitutos cutáneos

En los últimos años, la reparación de la piel ha mostrado ser prometedora debido a la invención de varios productos nuevos que actualmente se encuentran en el mercado, sin embargo, no siempre son de fácil acceso y es por eso que aún existen grupos de estudio que se dedican a diseñar y mejorar los sustitutos dérmicos. Resultado de esta investigación se han desarrollado técnicas para fabricar diferentes andamios o matrices tridimensionales que promuevan el crecimiento celular. Los andamios 3D tienen un papel único en la reparación de los tejidos ya que proporcionan una plataforma o sustrato adecuado que permite el suministro esencial de diversos factores asociados con la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células (O'Brien, 2011). Diversas técnicas se han usado para la fabricación de andamios, sin embargo, para la reparación de piel se han usado con mayor frecuencia el electrohilado (*electrospinning*), la liofilización, la lixiviación de partículas, la sinterización selectiva por láser, la estereolitografía y el más reciente, la impresión en 3D (Zhong, *et al.*, 2010). Estas técnicas aunque son muy diversas pretenden formar un andamio con poros interconectados para que exista una buena difusión del oxígeno, nutrimentos y sustancias de desecho (Loh & Choong, 2013).

Brevemente, para desarrollar andamios mediante electrohilado se requiere de una solución polimérica que pueda cargarse eléctricamente para que al ser inyectada desde una punta metálica, por la carga, se rompa la tensión superficial de la solución y se forme un delgado filamento que llegará a un colector, el cual tiene carga opuesta para que las fibras sean atraídas a él. Esta técnica permite la creación de micro y nano fibras que son colectadas al azar y que se sobreponen unas y otras para formar una lámina. Sin embargo, los poros que se forman son muy pequeños, se necesita de solventes que puedan cargarse eléctricamente, evaporarse y que sus residuos no sean tóxicos. Además, para que las fibras sean homogéneas y del calibre adecuado intervienen muchos factores como el peso molecular del polímero, la solubilidad, la viscosidad de la solución, la concentración, la tensión superficial, la conductividad, el solvente, el voltaje, la velocidad de inyección, la

distancia desde la inyección hasta el colector, entre otras (Zhong, et al., 2010), incluso para poder formar una lámina lo suficientemente amplia y gruesa para un paciente con quemaduras de más del 50 % corporal, el proceso de hilado tardaría días.

En la lixiviación de partículas se utilizan sales o polímeros que funcionan como porógenos que se mezclan con una solución polimérica y después las sales se disuelven para formar poros, con esta técnica se logran obtener estructuras 3D. Se debe de elegir un solvente que sea capaz de disolver el compuesto porógeno y al mismo tiempo debe ser mal solvente para la matriz polimérica, la cual finalmente va a formar la estructura o red 3D. Las complicaciones para esta técnica son la elección cuidadosa de los polímeros, porógenos y solventes ya que ninguno de ellos debe ser tóxico porque quedan restos en la estructura final, pueden afectar la reparación de la herida (Sabino, *et al.*, 2017).

La sinterización selectiva por láser hace posible la impresión de estructuras previamente diseñadas por un software de CAD (computer-aided design/ diseño asistido por computadora) para que sea enviado a una impresora en formato numérico, luego la impresión se realiza capa por capa a partir de polvos de polímeros que se fusionan gracias a la temperatura generada por un láser. Sin embargo, esta técnica es más frecuente para materiales metálicos y en el área de la industria automovilística y aeronáutica y los estudios en ingeniería biomédica son escasos. El diseño previo, la resolución adecuada del láser, las altas temperaturas, los residuos que pueden permanecer en el andamio y la selección de los biomateriales la hacen complicada (Tan, *et al.*, 2005).

Por otro lado, el concepto básico de la estereolitografía es formar estructuras 3D mediante la laminación de capas delgadas en dos dimensiones superpuestas. Consiste en el curado o solidificación de un polímero mediante un rayo de luz ultravioleta (UV). La luz UV suministra la energía para inducir una reacción química que enlaza los monómeros del polímero formando así una red altamente entrecruzada. Es un método aditivo porque construye objetos capa por capa. Al igual que la sinterización selectiva por láser, esta técnica se utiliza

frecuentemente para otros fines, la resolución del láser es importante y la elección de materiales la hace una técnica limitada ya que deben ser fotosensibles y biocompatibles (Liu Tsang & Bhatia, 2004).

La impresión 3D es una técnica en donde también se requiere de un diseño por computadora que se utilizará para que la impresora pueda adicionar capa por capa el polímero. El material depositado para la formación del andamio debe ser entrecruzado, curado o polimerizado por calor, luz UV, o por soluciones con agentes entrecruzantes. En este campo de impresión 3D se ha logrado una resolución a niveles celulares, lo que nos permite crear estructuras parecidas a la MEC. Al igual que las demás técnicas que se requiere de un diseño previo, la elección de materiales es limitada y esto provoca que sea difícil reducir la resolución por debajo del tamaño de la partícula del polímero (Lu, *et al.*, 2013).

Finalmente, la liofilización, que es la técnica que se utiliza en el presente trabajo, en la cual una solución polimérica se disuelve en agua y se congela, después se somete a un proceso de liofilización en donde se extrae el agua congelada (porógeno) mediante vacío, es decir, el agua congelada es sometida a un proceso de sublimación, en donde es retirada de la solución polimérica en estado gaseoso. La porosidad y el tamaño de poro de los andamios fabricados mediante esta técnica es altamente dependiente de algunos parámetros como lo son: la proporción de agua con respecto a la del polímero, la viscosidad y la temperatura y proceso de congelación. Las ventajas de esta técnica son la eliminación de los pasos de lavado para retirar residuos del porógeno debido a que se retiran directamente de la solución polimérica y la técnica es fácil de realizar. Sin embargo, el proceso de liofilización debe controlarse con objeto de reducir la heterogeneidad de la congelación y permitir aumentar la homogeneidad de los poros del andamio (Loh & Choong, 2013). Los andamios porosos obtenidos mediante esta técnica con frecuencia se pueden considerar como hidrogeles (Camci-Unal, *et al.*, 2013).

Los hidrogeles son redes 3D que pueden ser estructuras porosas o pueden ser geles compuestos por polímeros hidrofílicos que a menudo tienen que entrecruzarse para formar enlaces covalentes o atracciones intra e inter moleculares para mantener unidas las cadenas del o los polímeros. Los hidrogeles tienden a absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos por lo cual se hinchan fácilmente y para no degradarse rápidamente deben de entrecruzarse. La alta capacidad de absorber agua se debe a los grupos hidroxilo, amino, amida y carboxilo distribuidos a lo largo de las cadenas del polímero. Los hidrogeles, a diferencia de los geles tienen un mayor nivel de entrecruzamiento lo que les permite hincharse sin perder su estructura tridimensional y sin disolverse (El-Sherbiny & Yacoub, 2013).

Tipos de materiales para la fabricación de andamios

Los andamios para ingeniería de tejidos de piel pueden fabricarse con diferentes materiales, pueden ser naturales o sintéticos. Los naturales provienen de organismos vivos de diferentes especies como la colágena, la fibrina, la elastina, el quitosán, glicosaminoglucanos, ácido hialurónico, gelatina, seda de algunos gusanos, entre otros y algunos de los materiales sintéticos incluyen a la policaprolactona, el ácido poliláctico, el ácido poli-láctico co-glicólico, el poliuretano, entre otros (Zhong, *et al.*, 2010). Sin embargo, los materiales sintéticos generalmente tienen variaciones entre lotes lo que no es adecuado debido a que el proceso debe ser completamente reproducible y además, aunque algunos trabajos indican que se puede lograr una epitelización aceptable de queratinocitos sobre una superficie de polímero sintético, actualmente no se ha conseguido desarrollar un injerto epidérmico exitoso debido a su limitado reconocimiento celular y a su escasa compatibilidad con los tejidos. A pesar de estos inconvenientes, los polímeros sintéticos se han utilizado para fabricar sustitutos de piel, pero se centran en usar combinaciones con materiales naturales y así generar vendajes temporales con o sin células y equivalentes de piel de espesor total (Zhong, *et al.*, 2010).

La combinación de gelatina con ácido hialurónico no es muy frecuente en los andamios para piel y estos dos componentes al ser naturales y debido a sus características son potenciales para desarrollar un apósito dérmico.

Gelatina

La gelatina (Ge) es un derivado hidrolizado de la colágena utilizada para la fabricación de andamios para IT y comparten algunas propiedades biológicas. En primera instancia la colágena es una proteína estructural que se encuentra en la MEC de tejidos fibrosos en prácticamente todos los tejidos que forman el cuerpo humano y normalmente le proporciona al tejido resistencia mecánica y rigidez (Grover, *et al.*, 2012). La colágena en mamíferos llega a formar del 25 al 35 % del contenido protéico total del cuerpo. Se han identificado 29 tipos diferentes, sin embargo, la colágena tipo I es la más abundante (90%) y la podemos encontrar en los huesos, tendones, piel, vasculatura, ligamentos y otros órganos. La colágena se ha aislado y purificado de diferentes organismos y actualmente se encuentra disponible en el mercado, por lo cual están bien documentadas sus características (Gorgieva & Kokol, 2011). Cada molécula de colágena individual está formada por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas α , estas cadenas se enroscan entre sí para formar una triple hélice dextrógira. La estructura de la colágena se estabiliza mediante puentes de hidrógeno intra e inter-cadena. Las cadenas α son producto de la repetición de la secuencia Gly-X-Y, en donde "X" es principalmente prolina y "Y" hidroxiprolina. Por lo tanto, cada tercer aminoácido de la cadena es una molécula de glicina, excepto en los extremos de las cadenas α . Una hidroxiprolina o una hidroxilisina con frecuencia precede a cada glicina de la cadena; y una prolina a menudo sigue a cada glicina de la cadena con un tamaño variable de entre 600 y 3,000 aminoácidos. Las cadenas α que conforman a la hélice de colágena pueden ser iguales (homotriméricas) o diferentes (heterotriméricas), dependiendo del tipo de colágena (Ross & Pawlina, 2016).

La gelatina es una proteína soluble obtenida por la hidrólisis parcial de la colágena, por lo tanto, la colágena nativa insoluble debe ser pre-tratada para convertirla en una forma adecuada para la extracción, que normalmente se hace calentando en agua a temperaturas

superiores de 45 °C. Este pretratamiento rompe los enlaces no covalentes para desorganizar la estructura de la proteína, produciendo así la hinchazón adecuada y la solubilización de la colágena. El paso siguiente es otro tratamiento térmico que rompe los enlaces covalentes y los puentes de hidrógeno para desestabilizar la triple hélice, dando como resultado la transición de hélice a hebras ligeramente enrolladas y con esto se logra la conversión a gelatina. El grado de conversión de colágena a gelatina está relacionado con el grado de los procesos de pre-tratamiento en función del pH temperatura y tiempo de extracción. Dependiendo del pretratamiento que se le dé a la colágena, sea ácido o básico, se pueden obtener dos tipos de gelatina: tipo A y tipo B (Gomez-Guillen, *et al.*, 2011). La gelatina tipo A se obtiene por un pretratamiento ácido con un punto isoeléctrico de 7-9 por este método quedan solubles pequeñas cantidades de cadenas α y la gelatina de tipo B se obtiene por un pretratamiento alcalino con un punto isoeléctrico de 4-5.5 y mediante este tratamiento el resultado es la desnaturalización de las cadenas α en solución (Gorgieva & Kokol, 2011).

La gelatina es una proteína de alto peso molecular, contiene todos los aminoácidos esenciales, excepto el triptófano, sin embargo, la composición de aminoácidos puede variar entre especies. Además, es digerible, reabsorbible, fácil de extraer, no es tóxica y a diferencia de la colágena, la gelatina es más económica y no es antigénica (Hong, *et al.*, 2004; Gorgieva & Kokol, 2011). La gelatina, mantiene la estructura de las cadenas alfa y conserva los motivos RGD (arginina-glicina-aspartato), los cuales son reconocidos por las integrinas, que son glucoproteínas transmembranales que activan vías de señalización intracelular para activar proliferación, diferenciación y migración, por lo tanto, los andamios fabricados con gelatina tienen un gran potencial en la Ingeniería de Tejidos (Hersel, *et al.*, 2003).

Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (AH) es un glicosaminoglucano (GAG), el único que no está sulfatado, se encuentra formando parte de la MEC de muchos tejidos conjuntivos suaves del cuerpo. En la MEC, el AH actúa como un agente viscoso para rellenar espacios, como lubricante en el líquido sinovial de las articulaciones o en el cuerpo vítreo del ojo, sin embargo, en la piel es en donde se encuentra en grandes cantidades, particularmente alrededor de los capilares. Es un polisacárido natural formado por unidades alternadas de ácido-D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos alternados β -1,4 y β -1,3. Es sintetizado en la parte interna de la membrana plasmática por la enzima ácido hialurónico sintetasa y es exportado a través de la membrana mediante el transportador ABC-C5 hacia la MEC (Schulz, *et al.*, 2007). En la MEC, el ácido hialurónico tiene un peso molecular alto (varios millones de Daltons) y a él se le asocian varios proteoglicanos, los cuales son agregados de GAG's unidos a una proteína central, la cual se une mediante proteínas de unión al AH (Ross & Pawlina, 2016), lo que contribuye a la integridad física y mecánica de la MEC. El AH de manera normal es degradado y remodelado por hialuronidasas y por especies reactivas de oxígeno presentes en la MEC sintetizados por diferentes tipos celulares (Xu, *et al.*, 2012).

El AH es un material atractivo para la ingeniería de tejidos debido a que es biocompatible, biodegradable, bioactivo, no inmunogénico, no tóxico, no trombogénico y promueve la migración celular. Además tiene una alta capacidad de absorción y retención de agua debido a que en todo su esqueleto posee abundantes cargas negativas provenientes de los grupos carboxilos, por lo cual, es un buen candidato para fabricar hidrogeles (Xu, *et al.*, 2012).

Se ha reportado que los andamios fabricados de AH pueden unirse a proteínas y células a través de los receptores de superficie CD44, receptor para hialuronano que media motilidad (RHAMM, por sus siglas en inglés) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) presentes en la membrana de muchas estirpes celulares (Collins & Birkinshaw, 2013). CD44

es un miembro de la superfamilia de las proteínas de unión a AH (HABPs, por sus siglas en inglés), y su principal ligando, precisamente, es el ácido hialurónico. Lo presentan diferentes tipos celulares, media la extravasación de leucocitos y es expresado en células endoteliales activadas. El RHAMM, también es parte de las HABPs y se expresa en la superficie celular, en donde también se conoce como CD168 y en citoplasma, así como en citoesqueleto y núcleo (Nedvetzki, *et al.*, 2004). La expresión de RHAMM intra y extracelular es necesaria para la locomoción celular mediada por andamios de AH. En la curación de heridas la unión de RHAMM a los andamios de AH se da principalmente por los queratinocitos, macrófagos y fibroblastos migrantes para mejorar la contracción de la herida y la reepitelización. Y finalmente, la ICAM-1, que es una molécula de adhesión ampliamente distribuida en células endoteliales y macrófagos, permite la adhesión de estas células a los andamios de AH y puede contribuir al control de la activación de la inflamación mediada por ICAM-1. La estructura química de AH presenta dos sitios que pueden ser utilizados para entrecruzarlo, estos sitios son los grupos hidroxilo y los ácidos carboxílicos. El AH puede tratarse con un ácido o una base lo que provoca una desacetilización parcial, que da como resultado la presencia de grupos amino libres. Estos grupos amino libres pueden reticularse o entrecruzarse mediante un enlace amida, imino o amina secundaria. Las reacciones de entrecruzamiento se han llevado en estas condiciones utilizando carbodiimidas, aldehídos, sulfuros y compuestos epoxi (Collins & Birkinshaw, 2013).

Sus propiedades físicas, químicas y biológicas hacen que el AH sea atractivo como biomaterial para la fabricación de andamios, ya sea en solución o formando un hidrogel, sin embargo, los andamios de AH presentan propiedades mecánicas y velocidades de degradación que a menudo deben de modificarse por entrecruzado físico, químico o biológico para mejorar sus propiedades y adecuarlas mejor al tejido que se pretende reparar. En este trabajo se utilizó un entrecruzante químico.

Entrecruzado

Esta capacidad de los andamios de no disolverse fácilmente en condiciones acuosas se atribuye como ya se mencionó al entrecruzado al que son sometidos. El entrecruzado, reticulado o “*crosslinking*” es el proceso químico, físico o biológico mediante el cual se forman enlaces o fuerzas de atracción intra e inter moleculares entre las cadenas de los polímeros, esto hace que las propiedades mecánicas y biológicas de los andamios se modifiquen y tengan un tiempo de vida útil más largo (Debels, *et al.*, 2015). Existen diferentes tipos de agentes entrecruzantes para los andamios hechos con componentes de la MEC. Se pueden clasificar como químicos o físicos. Los agentes químicos incluyen al glutaraldehído (GTA), carbodiimidas como el 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) compuestos epoxy, entre otros. Los naturales como la genipina, el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), el ácido tánico, entre otros y los físicos como los que requieren UV (photocrosslinking) (Ma, *et al.*, 2014).

El GTA es un agente entrecruzante que ha sido ampliamente usado, mejora las propiedades mecánicas de los andamios y hace que su tasa de degradación sea menor. Reacciona con los grupos amino disponibles en las proteínas y los une mediante la formación de bases de Schiff para formar una red entrecruzada. Sin embargo, se ha demostrado que los andamios entrecruzados con GTA tienden a ser tóxicos y pueden inducir calcificación, por lo cual limita a los andamios a ser implantados y para la reparación de piel fallan en su aplicación. Se han utilizado métodos para retirar los grupos aldehídos, los cuales son responsables de la toxicidad y se han obtenido buenos resultados al incrementar la biocompatibilidad, pero no evita la inducción de calcificación (Ma, *et al.*, 2014; Hennink & van Nostrum, 2012).

Los compuestos epoxy tienen múltiples grupos epoxy que pueden reaccionar con grupos amino, carboxilo e hidroxilo. Estos compuestos se han utilizado para conservar materiales de tejido biológico y esta nueva técnica de fijación se ha empleado recientemente para entrecruzar injertos vasculares. Sin embargo, la reticulación de los compuestos epoxy es lineal y tiene un bajo grado de entrecruzamiento, pobre estabilidad y los andamios de

colágena no resisten a la degradación enzimática. Además, andamios reticulados con compuestos epoxídicos han demostrado cierta toxicidad, incrementan la respuesta inmune y pueden inducir calcificación (Ma, *et al.*, 2014).

El NDGA es un compuesto natural obtenido del arbusto *Larrea tridentata*, tiene polifenoles vegetales que contienen dos grupos funcionales ortocatecoles en los extremos de un alcano corto. Primero el NDGA forma una red entre sí y después las fibras de colágena se incrustan firmemente en esta red y forman una red estable. Es antioxidante, tiene actividad anticancerígena e incrementa las propiedades mecánicas de los andamios de colágena, sin embargo, se ha visto que en concentraciones por arriba de 100 μM es tóxico (Ma, *et al.*, 2014).

El ácido tánico es un ácido compuesto de glucosa y ácidos fenólicos. Se encuentra distribuido ampliamente en frutas y semillas, tiene un peso molecular relativamente alto y puede interactuar con carbohidratos, proteínas y otras macromoléculas. Se conocía originalmente porque puede reaccionar con la colágena y transformar la piel de los animales en cuero, que es el método de curtido de cuero original. El mecanismo de interacción entre el ácido tánico y la colágena es a través de enlaces de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas influenciadas por su peso molecular y su estructura espacial tridimensional. Sin embargo, se tienen pocos registros de su uso para andamios (Ma, *et al.*, 2014).

La genipina es un compuesto químico extraído de la fruta de *Gardenia jasminoides* y es uno de los ingredientes activos en la medicina tradicional china. Pertenece a los compuestos iridoides que presentan múltiples grupos hidroxilo y carboxilo. La genipina puede reaccionar espontáneamente con los grupos amino libres de lisina, hidroxilisina y arginina de algunos biomateriales y generar nitruros de iridoide y luego formar un entrecruzado intra e intermolecular con una estructura cíclica. Se ha observado que los andamios entrecruzados con genipina presentan una menor respuesta inflamatoria en comparación con andamios entrecruzados con GTA, sin embargo, el proceso de extracción de la genipina

es complejo y tiene un precio exorbitante, lo que limita su aplicación para entrecruzar andamios de grandes dimensiones (Ma, *et al.*, 2014).

El entrecruzado por UV o “photocrosslinking” es un mecanismo mediante el cual las reacciones que entrecruzarán las proteínas o los polímeros requieren de energía UV para iniciar. Los grupos fotoreactivos son químicamente inertes y se activan con la luz UV por lo que se les llama foto-iniciadores. Los grupos fotoreactivos incluyen las arilazidas, azidometilcumarinas, benzofenonas, antraquinonas, diazirinas, entre otros, pero los más utilizados en la investigación biomédica son las arilazidas y diazirinas. Estos compuestos se activan mediante la luz UV y durante este breve tiempo se pueden conjugar a varios grupos funcionales comunes en las proteínas, sin embargo, el compuesto al finalizar la reacción tiende a formar parte del compuesto entrecruzado (ThermoFisher Scientific, 2017), lo que puede desencadenar cierta toxicidad.

El EDC es una carbodiimida soluble en agua que se usa preferentemente debido a que no se incorpora en la estructura final entrecruzada. El EDC es un compuesto que tiene un doble enlace que puede reaccionar con muchos grupos funcionales como los carboxilo, hidroxilo y sulfhidrilo. El resultado de esta reacción es la formación de un intermediario, la O-acilisourea activa que puede sufrir un ataque nucleofílico por los grupos amino libres para formar enlaces amida. Al finalizar la reacción, se forma un subproducto de isourea soluble en agua que tiene muy baja citotoxicidad. Los restos de EDC pueden ser fácilmente desactivados con agua destilada y los residuos inactivos, como los subproductos de isourea pueden ser fácilmente retirados del andamio mediante lavados constantes con agua destilada (Choi, *et al.*, 1999; Ma, *et al.*, 2014). Debido a lo anterior, el EDC es el agente entrecruzante que se utilizó en este trabajo.

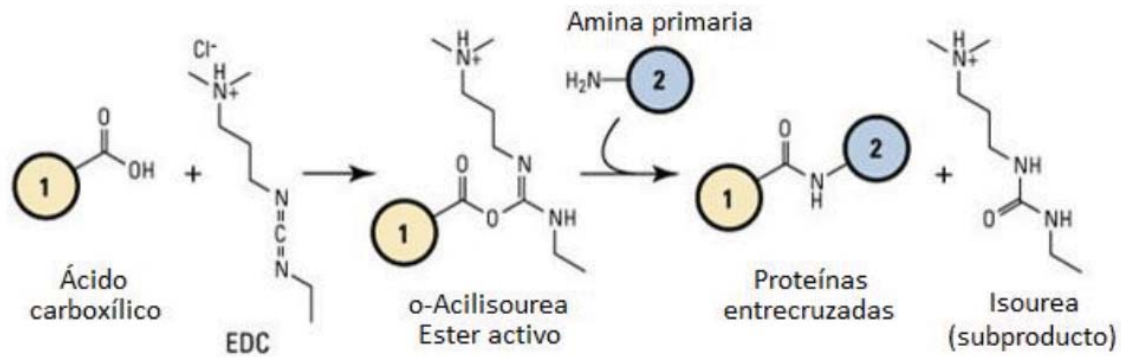


Figura 3. Mecanismo de acción del EDC. Las moléculas 1 y 2 pueden ser péptidos, proteínas o sustancias químicas que tengan grupos carboxilo o aminas primarias. Tomado de Thermo Fisher Scientific, s.f.

Cubiertas de silicón en los sustitutos dérmicos

El colocar una cubierta de silicón a un andamio para reparación de piel ayudaría a prevenir infecciones, impedir la pérdida de agua y si el silicón es lo suficientemente permeable a los gases, este permitiría la libre difusión de oxígeno al lecho de la herida. Se ha mostrado que cuando el proceso de cicatrización se lleva a cabo en un ambiente húmedo, la reepitelización se acelera, se cree que esto se logra debido a la retención de citocinas, solutos y nutrientes disueltos en el líquido presente en la herida y esto facilita la proliferación y migración de los queratinocitos y fibroblastos (Maver, *et al.*, 2015). Sin embargo, las cubiertas que usualmente se colocan en los andamios comerciales o bien en los estudios de investigación que se desarrollan actualmente, son cubiertas de silicón de grado médico que generalmente vienen con un grosor y tamaño determinado, lo que limita su manipulación y que además en varios reportes mencionan que el grosor de esta cubierta afecta la difusión del oxígeno impidiendo una buena reparación cutánea (Shevchenko, *et al.*, 2014; Shi, *et al.*, 2005). Debido a estos inconvenientes para manipular el grosor de la cubierta de silicón, en este trabajo se decidió trabajar con polidimetilsiloxano (PDMS).

El PDMS es un silicón elastómero con propiedades deseables que lo hacen atractivo para el desarrollo de sistemas microelectromecánicos, dispositivos médicos, sustratos para microfluídica, para crear plataformas como los llamados “lab on a chip” y para cultivo

celular. Su estructura química se basa en un esqueleto flexible de repeticiones de unidades de $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_n$, el número de repeticiones de estas unidades define el peso molecular y en consecuencia muchas de las características visco-elásticas del material (Seethapathy & Gorecki, 2012). Es químicamente inerte, térmicamente estable, transparente, no fluorescente, hidrofóbico, permeable a gases, poco permeable al agua, biocompatible, no tóxico, no biodegradable, fácil de manejar y manipular y es de bajo costo. Ha sido utilizado frecuentemente como biomaterial para la fabricación de catéteres, tubos de diálisis, aislamiento para marcapasos, oxigenadores de membrana e implantes de oído y nariz (Ciobanu, *et al.*, 2015; Mata, Fleischman, & Roy, 2005). Debido a que es fácil de manejar y manipular se decidió trabajar con PDMS para poder fabricar una cubierta temporal sobre el andamio que impida la pérdida de agua, pero que permita la difusión de oxígeno y evite la contaminación, para que así sobre el andamio de gelatina-ácido hialurónico entrecruzado con EDC funcione como una pseudoepidermis.

Antecedentes

Frecuentemente en la ingeniería de tejidos se han fabricado andamios de Ge-AH, sin embargo, no es muy común encontrar estudios en donde se enfoquen estos andamios a la curación de heridas cutáneas.

Por ejemplo, Choi y cols. en 1999 fabricaron andamios de Ge-AH a diferentes proporciones (9:1, 7:3 y 5:5, respectivamente) mediante liofilización, los entrecruzaron con diferentes concentraciones de EDC y evaluaron su potencial en la reparación de heridas cutáneas en ratas Wistar. En sus resultados muestran que conforme incrementan cantidad de EDC y la proporción de AH, disminuye el grado de entrecruzado y aún que no discuten muy bien la razón, parece ser que lo atribuyen a que el EDC participa competitivamente en la activación de los grupos carboxilo de la gelatina y el ácido hialurónico al mismo tiempo, sin embargo, no realizaron un andamio con mayor proporción de ácido hialurónico que de gelatina. En cuanto a la morfología, ellos observaron que si se incrementa el contenido de AH el tamaño del poro se incrementa de 48 μm a 67 μm . En esta parte no discuten el porqué, sin embargo, puede atribuirse a que el AH tiende a atraer más moléculas de agua y en esta técnica el porógeno es precisamente el agua, por lo cual, los poros tienden a ser más amplios. La capacidad de absorción aumentó proporcionalmente con el incremento de AH, por lo antes ya discutido. La resistencia a la tracción fue mayor si se incrementaba la concentración de EDC y en menor medida por el incremento de la proporción de Ge. También observaron que la disminución en la tasa de degradación por colagenasa, al igual que las pruebas mecánicas fueron independientes de las proporciones de Ge-AH, tuvo mayor influencia la concentración del entrecruzante. Para la evaluación *in vivo*, utilizaron un andamio en proporción 7:3 de Ge-AH y obtuvieron mejores resultados comparados con una gasa con vaselina comercial que fue tomada como grupo control.

En otro estudio, Hong y cols. en 2004 fabricaron andamios en proporciones 9:1 y 7:3 de Ge y AH, respectivamente, se liofilizaron y los entrecruzaron con EDC (150 mg en 20 ml). Al evaluar la porosidad de los andamios, observaron que los que tenían mayor cantidad de AH presentaban poros un poco más grandes en comparación con los que tenían mayor

proporción de gelatina. Los andamios 7:3 tuvieron una media de tamaño de poro de las 60-100 μm y los 9:1 de las 20-50 μm . La degradación *in vivo* de ambos andamios fue muy similar, sin embargo, para el día 10 el andamio 7:3 presentaba abundantes fibroblastos, se degradó más rápido y permitió el depósito de fibras de colágena antes que el andamio 9:1, en donde estos fenómenos se presentaron hasta el día 15. También contabilizaron los leucocitos en sangre y los resultados mostraron que los andamios con mayor proporción de AH inducían una mayor respuesta inflamatoria que los andamios 9:1 con mayor cantidad de Ge. Lo mismo encontraron cuando midieron la concentración de la proteína C reactiva. Microscópicamente se observó que el andamio 7:3 provocó un mayor grado de inflamación, ya que desde un inicio la infiltración de neutrófilos fue mayor y más rápida, incluso la migración de fibroblastos fue mejor en estos andamios en comparación con los 9:1. Finalmente, con la tinción de Tricrómico de Masson se evaluó la distribución de colágena y se demostró que los andamios con un mayor porcentaje de gelatina promueven mejor la infiltración y activación de los fibroblastos.

Más recientemente, en un estudio realizado por Zhang y cols, en 2011, fabricaron andamios porosos mediante liofilización y variaron las proporciones de Ge-AH (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100), pero a diferencia de Choi *et al.*, 1999, utilizaron solo una concentración de EDC (50 mM). En cuanto a la morfología observaron que los poros incrementaban de tamaño al aumentar la proporción de AH. En este estudio se logró mantener una tasa de congelación constante para todos los andamios y el incremento del tamaño de poro se atribuyó al AH por su capacidad de atraer moléculas de agua. De igual forma que el estudio anterior, el incremento en la capacidad de absorción de agua lo dio el incremento de las proporciones de AH. La degradación de los andamios en cultivo con PBS demostraron que los andamios con altas concentraciones de AH tienden a degradarse más rápido a diferencia de los que contienen más gelatina. En las pruebas mecánicas los andamios puros de gelatina fueron los que presentaron mejores resultados y en las pruebas elásticas y de compresión, como era de esperarse, con el incremento en la proporción de AH estas propiedades disminuyeron. También realizaron pruebas de viabilidad celular y se

observó que las células sembradas sobre los andamios con mayor cantidad de gelatina tienden ligeramente a ser más viables y a proliferar un poco más que cuando se incrementa la proporción de AH. En este sentido, ellos sugieren que estos resultados pueden deberse a que las cargas negativas del AH interfieran con la adhesión celular ya que muchas proteínas y grupos funcionales relacionados con la adhesión celular también se encuentran cargadas negativamente.

Finalmente, nuestro grupo de trabajo en 2016 publicó un estudio (Jarquin-Yañez, *et al.*, 2016) que se realizó sobre la fabricación de andamios de Ge-AH mediante liofilización y se entrecruzaron a diferentes concentraciones de EDC. Los resultados obtenidos fueron que al incrementar la concentración de EDC los poros eran más pequeños, la capacidad de absorción disminuía y la citotoxicidad incrementaba. Además, la adhesión y la presencia de células en cultivo disminuyó conforme se incrementó la cantidad de EDC. En contraste, al disminuirse la concentración de EDC, sucedió lo contrario. La conclusión a la que se llegó con este trabajo, fue que concentraciones de 50 mM o inferiores son adecuadas para entrecruzar andamios de Ge-AH. Sin embargo, a raíz de este estudio, con la investigación previa realizada por otros grupos y pensando en el problema de salud pública en México con relación a lesiones de piel, se decidió fabricar andamios de Ge-AH a diferentes proporciones entrecruzados con una concentración de EDC de 30 mM y a éstos colocarles una cubierta de PDMS.

Actualmente no se han encontrado reportes de andamios de Ge-AH con una cubierta de PDMS, pero sí existen estudios en donde utilizan otros biomateriales para fabricar andamios porosos con una cubierta de silicón. Por ejemplo, Shi, *et al.* en 2005 fabricaron un andamio poroso mediante liofilización de colágena-quitosán, lo entrecruzaron con GTA y le colocaron una membrana de silicón comercial de grado médico con un grosor estándar de 0.14 mm (Shanghai Xincheng Co). A este andamio le esparcieron una ligera capa de gelatina caliente, luego colocaron la membrana de silicón y lo dejaron secar para que la membrana quedara unida al andamio mediante la gelatina seca. El tamaño de poro que observaron fue de las

80-200 μm . Evaluaron la capacidad de absorción, la resistencia a la tensión y la citotoxicidad. Obtuvieron que los andamios entrecruzados reducen su capacidad de absorción debido a que los grupos funcionales que atraen agua se reducen por el uso de éstos en el entrecruzamiento, la resistencia a la tensión se incrementó ligeramente después de entrecruzar los andamios a causa de los nuevos enlaces que formó el GTA y el andamio entrecruzado y con el silicón no resultó ser tóxico en cultivo *in vitro*, sin embargo, lo que más nos interesó de este estudio fue la evaluación de dos membranas de silicón, en donde encontraron que la permeabilidad al vapor de agua con una membrana de silicón de 0.14 mm de grosor es mayor en comparación con otra de 0.22 mm, sin embargo, las membranas son muy gruesas y también dificultan la difusión de oxígeno y otros gases que son necesarios para la cicatrización de la herida.

Después el mismo grupo continuó con la caracterización y en 2007, en otra publicación de Ma, *et al.*, evaluaron las características *in vitro* e *in vivo* de los andamios de colágena-quitosán entrecruzados con GTA y con la membrana de silicón de 0.14 mm. Los andamios continuaron presentando la misma morfología y porosidad. Realizaron pruebas *in vitro* para evaluar la citotoxicidad y viabilidad de las células cuando se colocaban en cultivo con sobrenadante obtenido después de incubar los andamios con medio, en estos experimentos los andamios no presentaron reacciones que afectaran el crecimiento normal de las células. También realizaron pruebas de sensibilización e irritabilidad, en la primera prueba inyectaron de forma subcutánea el sobrenadante en cerdos y en la segunda le humedecieron algodones con el sobrenadante de los andamios y se colocaron sobre la piel de ratas depiladas. En ambas pruebas no hubo presencia de edema o eritema significativa. Después sembraron fibroblastos sobre el andamio y obtuvieron buenos resultados de citocompatibilidad mediante MTT. En estos cultivos también observaron mediante SEM abundantes fibroblastos y fibras de MEC dentro y en la superficie de los andamios. Finalmente, para las pruebas *in vivo*, utilizaron cerdos a los cuales les hicieron heridas de espesor completo de 3 cm de diámetro y se les colocó un anillo de polipropileno para evitar la contracción de la herida, después se colocaron los andamios y se dejaron hasta por 4

semanas. En las heridas tratadas con los andamios se presentó una neo-vascularización progresiva y observaron que al inicio había pocos fibroblastos y abundantes células inflamatorias que con el paso del tiempo los fibroblastos aumentaron y las células inflamatorias disminuyeron. Y finalmente, para la cuarta semana había abundantes fibroblastos en los remanentes del andamio en donde se observaron fibras de MEC neo-sintetizada.

Posteriormente, al andamio de colágena-quitosán entrecruzado con GTA y con la cubierta de silicón se le adicionaron partículas de quitosán cargadas con plásmidos de DNA codificante para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para mejorar la neo-vascularización (Guo, *et al.*, 2010). El modelo experimental *in vivo* fue el mismo que utilizaron en el estudio anterior y evaluaron la vascularización mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, RT-qPCR y Western-blot, contra proteínas relacionadas con la angiogénesis (VEGF, CD31 y α -SMA). Con este estudio demostraron que los plásmidos fueron incorporados a las células y éstas comenzaron a expresar VEGF, lo que provocó que la angiogénesis fuera ligeramente mayor que en los andamios que no contaban con el plásmido. Algunos de los beneficios de incorporar plásmidos con DNA codificante para VEGF, son que el factor se producirá localmente y se evitarán problemas de liberación, vida media e inestabilidad, sin embargo, el fabricar las partículas de quitosán, los plásmidos e incorporarlas a los andamios incrementarían el costo de los andamios.

Finalmente, en 2014, Shevchenko y cols. fabricaron mediante criogelación (una técnica poco utilizada en la ciencia de los biomateriales para fabricar andamios porosos (Rodrigues, *et al.*, 2012)) dos andamios de gelatina con diferentes grosores (1 y 2 mm) entrecruzados con GTA sobre una membrana de silicón de grado médico con grosor estándar de 0.12 mm (ATOS, Medical AB, Sweden). Los caracterizaron en términos de morfología, propiedades mecánicas, toxicidad, proliferación y también realizaron pruebas *in vivo* en cerdos. Los andamios presentaron un gradiente de porosidad que va desde las 30-61 μm y los poros más grandes de 76-131 μm . Los andamios con mejores propiedades mecánicas fueron el

más grueso con la cubierta de silicón y el control, Integra[®]. Los que tuvieron deficientes propiedades mecánicas fueron los andamios sin membrana de silicón y el andamio más delgado con la membrana de silicón. Observaron también que al día 28 había un alto contenido celular en el andamio control (sin silicón) y fue significativamente diferente contra los andamios con la membrana de silicón. En cuanto a la citotoxicidad y proliferación, no hubo diferencias significativas entre los grupos y la viabilidad no disminuyó por debajo del 80 % en ninguna de las muestras. En los andamios e Integra[®] sin la membrana de silicón evaluaron el potencial de epitelización y observaron que en sus andamios se logró formar una capa similar al estrato córneo, fue similar ya que las células aún presentaban núcleos, lo que indicó que el proceso de cornificación no se completó. Estos resultados no se obtuvieron con Integra[®]. Para evaluar la respuesta inflamatoria los andamios se colocaron en contacto con un modelo de epidermis *in vitro* y se evaluó la presencia de IL-1 en el sobrenadante. Los resultados no fueron significativamente diferentes contra los controles, por lo cual se concluyó que los andamios probablemente no provoquen una respuesta inflamatoria exacerbada. Finalmente, la evaluación *in vivo* a los 14 días mostró que el mejor andamio en cuanto a biointegración, presencia de fibroblastos y la resolución de la inflamación en términos de la presencia de células inflamatorias fue el andamio de gelatina más delgado con la cubierta de silicón, a diferencia de Integra[®] en donde aún se logró observar la estructura del andamio, zonas sin células y un mayor número de neutrófilos y macrófagos. Cabe mencionar que al día cuatro a los andamios de gelatina se les despegó la membrana de silicón, lo que no ocurrió con Integra[®]. Al final del artículo los autores mencionan que es un punto que deben mejorar en estudios futuros.

Justificación

En nuestro país, y a nivel mundial, las lesiones en la piel por diferentes etiologías son causa importante de morbilidad, por lo que la fabricación de un sustituto dérmico capaz de promover la curación de las heridas de manera más eficiente podría incidir de manera importante en el tratamiento de estos pacientes.

Objetivos

Objetivo general

- ❖ Fabricar y caracterizar un andamio de Ge-AH entrecruzado con EDC con una cubierta externa de PDMS

Objetivos particulares

- ❖ Fabricar andamios con diferentes proporciones de Ge-AH, entrecruzados con EDC y con una cubierta de PDMS.
- ❖ Analizar las características químicas, la absorción y la degradación de los distintos andamios de Ge-AH entrecruzados con EDC y con la cubierta de PDMS.
- ❖ Evaluar la citotoxicidad, adhesión celular y la expresión de procolágena de fibroblastos cultivados en los andamios de Ge-AH entrecruzados con EDC y con la cubierta de PDMS

Metodología

Materiales

Se utilizó gelatina tipo B de piel de bovino con peso molecular de 50,000 a 100,000 Da, AH recombinante de *Escherichia coli* con peso molecular de 1.5 a 1.8 x 10⁶ Da y el agente entrecruzante *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El polidimetilsiloxano para la cubierta del andamio que se utilizó fue Silgard® 184 Silicone Elastomer kit. Los anticuerpos secundarios para las inmunofluorescencias fueron anti-ratón acoplado a FIT-C y anti-cabra acoplado a Cy5, ambos de Jackson ImmunoResearch.



Figura 4. Esquema de trabajo.

Fabricación de los andamios

Se fabricaron andamios con diferentes proporciones de Ge-AH: Ge (70%)-AH (30%), Ge (80%)-AH (20%) y Ge (90%)-AH (10%). El primer paso fue disolver la gelatina y el ácido hialurónico por separado en la mitad del volumen de agua destilada requerido para obtener al final las concentraciones deseadas de Ge-AH, lo anterior se realizó para asegurar que la gelatina y el ácido hialurónico se disolvieran por completo. Después de agitarlos durante 30 min con una barra magnética y a baño maría a 50 °C, se mezclaron las soluciones de Ge y la de AH y se dejaron agitando a las mismas condiciones por una hora más. Las mezclas de Ge-AH a diferentes proporciones se colocaron sobre moldes de silicón y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez temperados, los moldes con la solución gelatinosa se colocaron en un congelador por convección a -20 °C durante 24 h para poder liofilizarlos 24 h a 0.0001 hPa a -110 °C (liofilizadora ScanVac). Al terminar el proceso de liofilización se obtuvieron andamios porosos que se procesaron para ser entrecruzados con EDC a una concentración de 30 mM disuelto en alcohol al 96 %. Los andamios se sumergieron por completo en esta solución y se dejaron por 24 h a 7 °C, después de este tiempo se lavaron los andamios con agua destilada 10 veces para remover el subproducto de la reacción de entrecruzamiento y retirar el excedente del agente entrecruzante. Luego se les retiró el exceso de agua y se congelaron a -20 °C por 24 h para ser liofilizados de nuevo a las mismas condiciones. De esta manera se obtuvieron los andamios de Ge-AH a diferentes proporciones entrecruzados con EDC. Finalmente, el PDMS (Silgard 184) se preparó siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, se mezcló el prepolímero con el agente curante en una relación de 10:1 y se mezcló manualmente durante 5 minutos, se degasificó la mezcla por vacío para retirar las burbujas y se esparció manualmente una capa delgada con una espátula sobre la cara inferior de los andamios. Para lograr una membrana homogénea y más delgada, los andamios se colocaron sobre un *spin coater* fabricado por el LaNSBioDyT y se pusieron a girar a 3,600 rpm durante 30 seg, después se curó el PDMS a 37 °C por 72 h. Una vez obtenidos los diferentes andamios, se cortaron a diferentes dimensiones para cada prueba y se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes herméticos.

Como podemos ver, se fabricaron diferentes andamios, los factores que se modificaron fueron las proporciones de Ge-AH, el proceso de entrecruzamiento y la membrana de PDMS debido a la variación de estos factores se obtuvieron andamios con diferentes características, a los cuales se les asignó una letra. Los andamios, sus nombres y características de muestran en la siguiente tabla, a partir de este punto nos referiremos a ellos por su letra asignada.

Tabla 2. Asignación de nombres a los andamios y sus características

Nombre	Proporción de Ge-AH	Entrecruzados con EDC	Cubierta de PDMS
A	70-30	X	X
B	80-20	X	X
C	90-10	X	X
D	70-30	✓	X
E	80-20	✓	X
F	90-10	✓	X
G	70-30	✓	✓
H	80-20	✓	✓
I	90-10	✓	✓

Microscopía electrónica de Barrido (MEB)

Los andamios fueron seccionados en aproximadamente ½ centímetro por lado, a continuación fueron ionizados con oro coloidal con objeto de ser observados con un microscopio electrónico de barrido. Se tomaron fotografías de los cortes transversales de los andamios para poder evaluar la porosidad y el grosor de las membranas de PDMS y también se fotografiaron las caras inferiores y superiores de los andamios, es decir, la cara que quedó expuesta al vacío al momento de liofilizar y la cara inferior, la que quedó en contacto con el molde de silicón. Las imágenes digitales se procesaron con el programa

Image Pro Plus 7.0 para medir el diámetro menor de los poros y obtener la media del tamaño de poro de cada uno de los andamios. Todos los andamios se analizaron por triplicado y de cada uno se tomaron 3 fotografías al azar de cada corte transversal del andamio y en ambas caras.

Microanálisis de dispersión de energía de rayos X (EDX)

Las muestras se colocaron directamente en el porta muestras del microscopio electrónico de barrido, el cual contaba con un detector de rayos X mediante el cual se obtuvo el porcentaje en peso de los elementos presentes en la muestra simultáneamente al tomar las fotografías.

Espectroscopía de rayos infrarrojos (IR)

Los andamios utilizados en esta prueba fueron andamios de 0.5 cm^3 y no se les realizó tratamiento previo para someterlos a los rayos IR, las muestras se colocaron directamente sobre la platina del equipo de IR y se obtuvieron los datos de los espectros que se procesaron con Excel para graficarlos.

Capacidad de absorción

Los andamios utilizados en esta prueba fueron seccionados con dimensiones de 1 cm por lado y se obtuvo el peso seco (Ps) mediante una balanza analítica. Luego se sumergieron en PBS durante 10, 30 min, 1, 2, 5, 24 y 48 h e inmediatamente después de estos tiempos, los andamios se colocaron sobre una malla durante 1 min para retirar el exceso de PBS y se registró el peso húmedo (Ph). Inmediatamente después se volvieron a colocar en PBS para continuar con la prueba. La fórmula que se utilizó para obtener la capacidad de absorción fue la siguiente: $((Ph-Ps/Ph^*)100)$.

Degradación

Para esta prueba los andamios que se utilizaron fueron de aproximadamente 1.5 cm^3 , de los cuales se obtuvo el peso seco inicial (Pi) mediante una balanza analítica y se sumergieron

en una solución de colagenasa I a una concentración del 0.005 % disuelta en buffer Tris HCl 0.1 M con CaCl 0.05 M. Los tiempos de degradación que se manejaron en esta prueba fueron 3 y 6 h a 37 °C, transcurrido este tiempo se lavaron los andamios 3 veces con agua destilada para retirar el exceso de solución de colagenasa y se liofilizaron por 12 h. Después de esto se registró el peso final (Pf) y se obtuvo la diferencia de pesos (Pi-Pf). Con estos valores se obtuvo el porcentaje de degradación de los andamios.

Esterilización de los andamios para las pruebas *in vitro*

Para las pruebas con cultivos celulares, finas rebanadas de los andamios menores a 1 mm de espesor fueron obtenidas y se esterilizaron colocando los andamios en alcohol al 70% y bajo radiación UV proveniente de las campanas de flujo laminar durante 20 min. Posteriormente, los andamios esterilizados se colocaron en una placa de 96 pozos, se lavaron con PBS estéril 3 veces y se incubaron con PBS-antibiótico al 2% durante 20 min, después se lavaron con HBSS estéril tres veces y finalmente se les dio un lavado con DMEM suplementado previo al sembrado de las células. Es importante mencionar en este punto que las células fueron sembradas sobre las delgadas láminas de los andamios que se cortaron, específicamente se colocaron en la región porosa central de los andamios.

Las células que se utilizaron para todos los cultivos fueron fibroblastos dérmicos de piel humana, que se expandieron cultivándolos hasta un 80-90 de confluencia con medio DMEM suplementado. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C en condiciones de humedad y CO₂ al 5 %. Cada tercer día se les realizaba cambio de medio. Una vez en confluencia se tripsinizaron y se sembraron 1x10⁴ células sobre los diferentes andamios en placas de 96 pozos. Inmediatamente después de sembrar las células sobre los andamios la placa de 96 pozos se mantuvo intacta durante 15 min para después agregarles medio lentamente por las paredes del pozo y con ello evitar flujos que impidieran que las células se adhirieran a los andamios. Una vez con el medio suficiente se dejó en cultivo y se les realizó cambio de medio cada 24 h. Independientemente de la prueba a realizar antes de colocar el kit o antes de fijar las muestras para las inmunofluorescencias los andamios se

lavaron tres veces con HBSS debidamente temperado para retirar el medio de cultivo. Los controles de las pruebas con cultivo *in vitro* fueron fibroblastos sembrados sobre cubreobjetos cultivados a las mismas condiciones que los experimentales.

Es importante mencionar que para los cultivos no se incluyeron los andamios A, B y C ya que se degradaron antes de poder realizar el cultivo.

Citocompatibilidad

Para esta prueba se efectuaron cultivos de 3 días que se observaron con microscopía de fluorescencia y después se realizaron cultivos de 24 h que se observaron con microscopía confocal. La prueba de citocompatibilidad se realizó con el kit Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, para células de mamífero (Termo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, las muestras se lavaron con HBSS 3 veces para retirar el medio de cultivo y se incubaron con una solución de HBSS con calceína y homodímero-1 de etidio por 45 min, después se lavaron 3 veces con HBSS y se procedió a observarlos con el microscopio.

El control de vida fueron las células sembradas sobre los cubreobjetos, cultivadas de manera normal y sin tratamiento previo y para los controles de muerte se utilizaron células cultivadas de manera normal sobre cubreobjetos pero se les dio un tratamiento con metanol al 70% por 30 min previo a la incubación con calceína y homodímero-1 de etidio.

Adhesión celular

Los cultivos de esta prueba fueron de 24 h, se lavaron 3 veces con HBSS y se fijaron con formol al 10% amortiguado con PBS durante 1 h, después se lavaron de nuevo con PBS 3 veces para retirar el formol y sobre estas muestras se realizó la inmunofluorescencia con el kit FAK 100 de Millipore para identificar contactos focales, el cual contiene el anticuerpo primario contra vinculina, faloidina acoplada a TRIT-C y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Brevemente, se permeabilizó la membrana incubando con tritón, se bloquearon Ig's

endógenas con albúmina y se incubó con el anticuerpo anti-vinculina (1:200) del kit durante 1 h a 37 °C, se lavó y se volvió a bloquear con albúmina para después incubar 30 min a 37 °C con el anticuerpo secundario fluorescente (FIT-C, 1:200) y faloidina (1:500) del kit, se lavaron y se incubaron con DAPI (1:1000) por 5 min a temperatura ambiente para finalmente montar las muestras y observarlas con microscopía de fluorescencia o confocal.

Análisis de expresión de procolágena

Para evidenciar indirectamente la síntesis de fibras de colágena se realizó una inmunofluorescencia contra procolágena IA (Santa Cruz). Brevemente, se fijaron las muestras con formol amortiguado y se lavó el exceso. Se permeabilizaron con tritón, se lavaron, se colocó albúmina para bloquear y se incubó con anti-procolágena I (1:200) toda la noche a 4 °C. Después se lavaron las muestras y se volvió a colocar albúmina para incubar con el anticuerpo secundario fluorescente (Cy5, 1:500) durante 45 min a 37 °C, se lavaron de nuevo y se incubó finalmente con DAPI (1:1000) por 5 min; se lavaron y se montaron las muestras para observarlas con microscopía confocal.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 6 con un valor de $p < 0.05$. Se aplicaron pruebas de Tukey para saber si existían diferencias significativas entre los diferentes grupos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados

Fabricación de los andamios

Se logró estandarizar la técnica en el laboratorio para obtener andamios con poros regulares con relación a tamaño y forma. Los resultados se explican en la tabla 2, en donde se muestran los nombres y las características de los diferentes andamios, ya que a partir de este punto haremos referencia a los andamios por las letras que se les asignaron en la tabla.

La figura 5 es una fotografía de los andamios de Ge-AH a diferentes proporciones en donde se puede observar que los tres macroscópicamente fueron homogéneos. De estos andamios se cortó una fina rebanada y se observó con microscopía óptica y en la figura 5 aparecen dos imágenes en donde se observa que los poros fueron homogéneos, lo que sugiere que el proceso de construcción de los andamios fue adecuado. Los andamios obtenidos tuvieron dimensiones de aproximadamente 3X3 cm por lado y con un grosor aproximado de 5 mm. Las dos últimas imágenes de la figura 5 muestra uno de los andamios entrecruzados con la cubierta de PDMS, en la imagen de la izquierda el PDMS se tiñó con colorante vegetal y la membrana es la que señalan las flechas en color verde. En la imagen inferior derecha observamos un corte del andamio B entrecruzado con la membrana de PDMS (flechas). Con estas imágenes pudimos observar que un poco de PDMS logra entrar a la cavidad de los poros, lo que probablemente nos ayude a que la membrana no se desprenda fácilmente del andamio. La presencia de los poros en la parte inferior del andamio se corroboró con la microscopía electrónica de barrido.

Cabe mencionar que las dimensiones de los andamios se pueden modificar dependiendo del molde y de las aplicaciones y para este estudio se requerían andamios que pudieran actuar como parches cutáneos o apósitos dérmicos para poder caracterizarlos. Macroscópicamente, los diferentes andamios fueron similares sin importar distintas proporciones de Ge-AH.

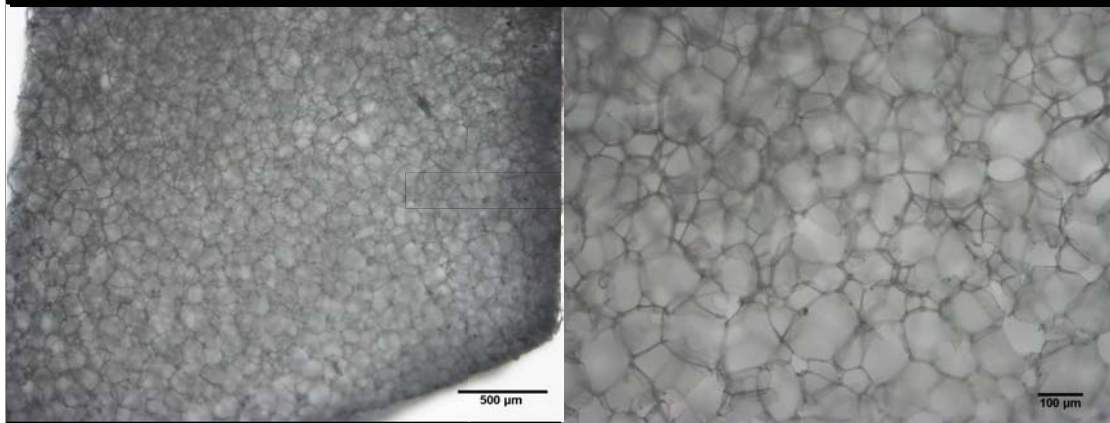
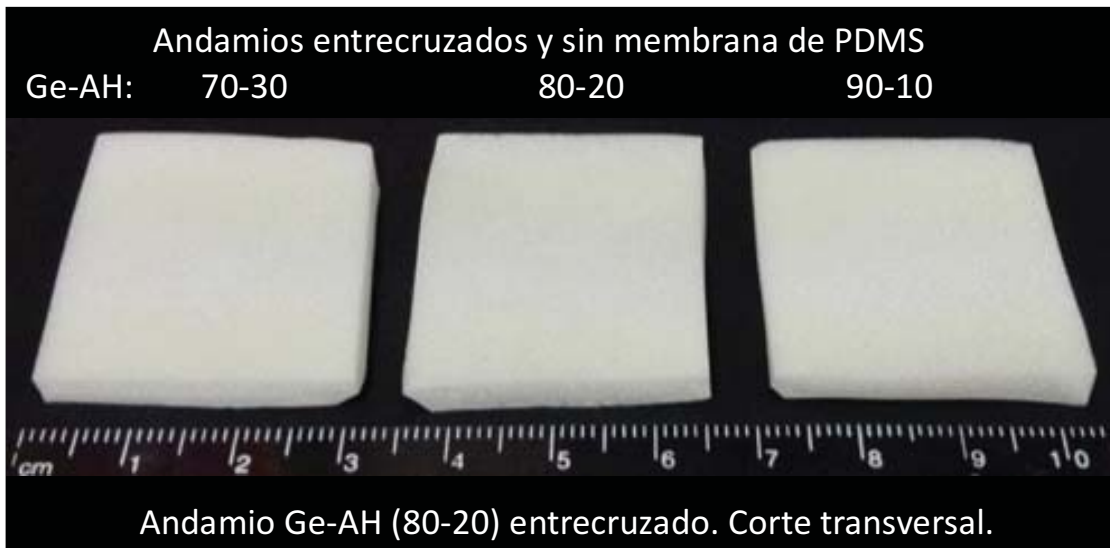


Figura 5. Andamios de Ge-AH a diferentes proporciones entrecruzados, con y sin la membrana de PDMS.

Grosor de la membrana de PDMS

Una vez obtenidos los andamios entrecruzados se les colocó al cubierta o membrana de PDMS y se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para poder medir su grosor. Como se puede observar la figura 6 muestra fotomicrografías obtenidas mediante MEB en donde se observa la estructura porosa del andamio en la parte inferior y por arriba de la mitad de la foto se puede apreciar la membrana de PDMS. Con el programa Image Pro Plus se pudo medir sobre la fotografía el grosor de las membranas. El grosor en promedio que se registró de las membranas de PDMS en los andamios fue de $16.76 \pm 5.35 \mu\text{m}$. Las membranas de PDMS variaron un poco con relación al grosor, sin embargo, se formó una membrana homogénea en toda la superficie del andamio.

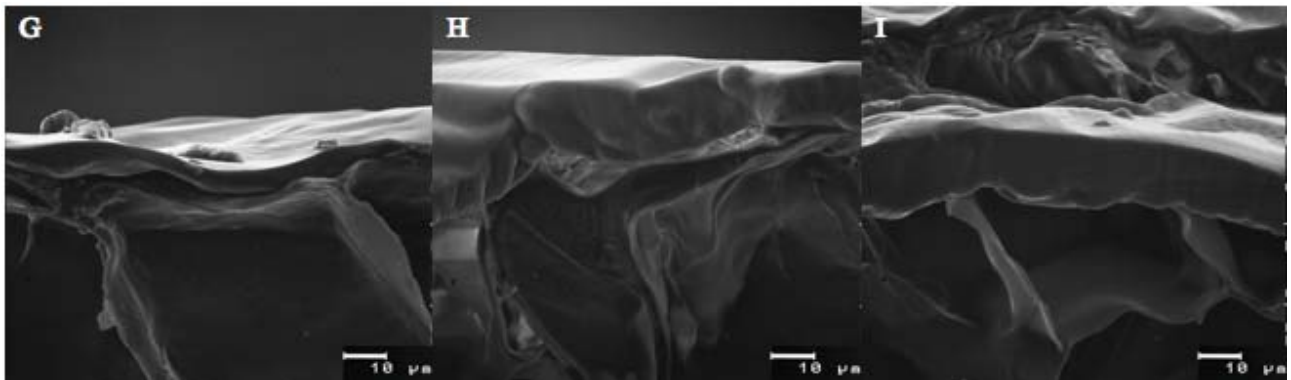


Figura 6. Grosor de la membrana de PDMS. Fotomicrografías obtenidas mediante MEB de los andamios de Ge-AH entrecruzados y con la membrana de PDMS. G: Ge(70)-AH(30), H: Ge(80)-AH(20) e I: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y con la membrana de PDMS.

Morfología de los andamios mediante MEB

Mediante MEB se obtuvieron fotomicrografías de cortes transversales de los andamios, de la cara superior (la superficie que quedó expuesta al vacío cuando se liofilizó en el molde de silicón), y la cara inferior (la que quedó en contacto con el molde de silicón) como se puede observar en las figuras 7, 8 y 9. En estas imágenes se observó que, en las secciones transversales, los poros en su mayoría tuvieron una morfología semi-circular y algunos llegan a ser ovalados, son homogéneos y en todas las fotos que se analizaron se logró observar la interconexión entre poros. Asimismo, en estas imágenes se midió el tamaño de poro, el cual se reporta más adelante. Además, se observó que en la parte superior (la que quedó expuesta al vacío) se formaron menos poros que en el corte transversal y asimismo fueron más pequeños. Finalmente, en la parte inferior (la que quedó en contacto con el molde de silicón) se formaron poros circulares y muy regulares, lo que sugiere que se formaron burbujas al momento de colocar la solución de Ge-AH sobre el molde de silicón. Cabe mencionar que en las fotomicrografías asignadas con los números 3 y 6 de las figuras 7, 8 y 9 se observan fotografías de la superficie inferior de los andamios sin la membrana y con la membrana de PDMS, en donde se puede observar que dicha membrana queda como una cubierta lisa y homogénea sobre los poros de la superficie inferior de los andamios.

En las imágenes de los cortes transversales se observó que los andamios tenían forma ovalada y se midió por computadora el diámetro menor de los poros. Con las mediciones de los diámetros menores de los poros se realizó una gráfica para apreciar la media del tamaño de los poros y qué tan grandes pudieron ser en los distintos andamios. La morfología de los poros con relación al tamaño y forma fue ligeramente diferente con relación a las proporciones de gelatina y ácido hialurónico y casi no se observaron cambios entre sí en los andamios entrecruzados y no entrecruzados con EDC. Los resultados con diferencias significativas entre estos grupos se muestran en la siguiente sección de porosidad.

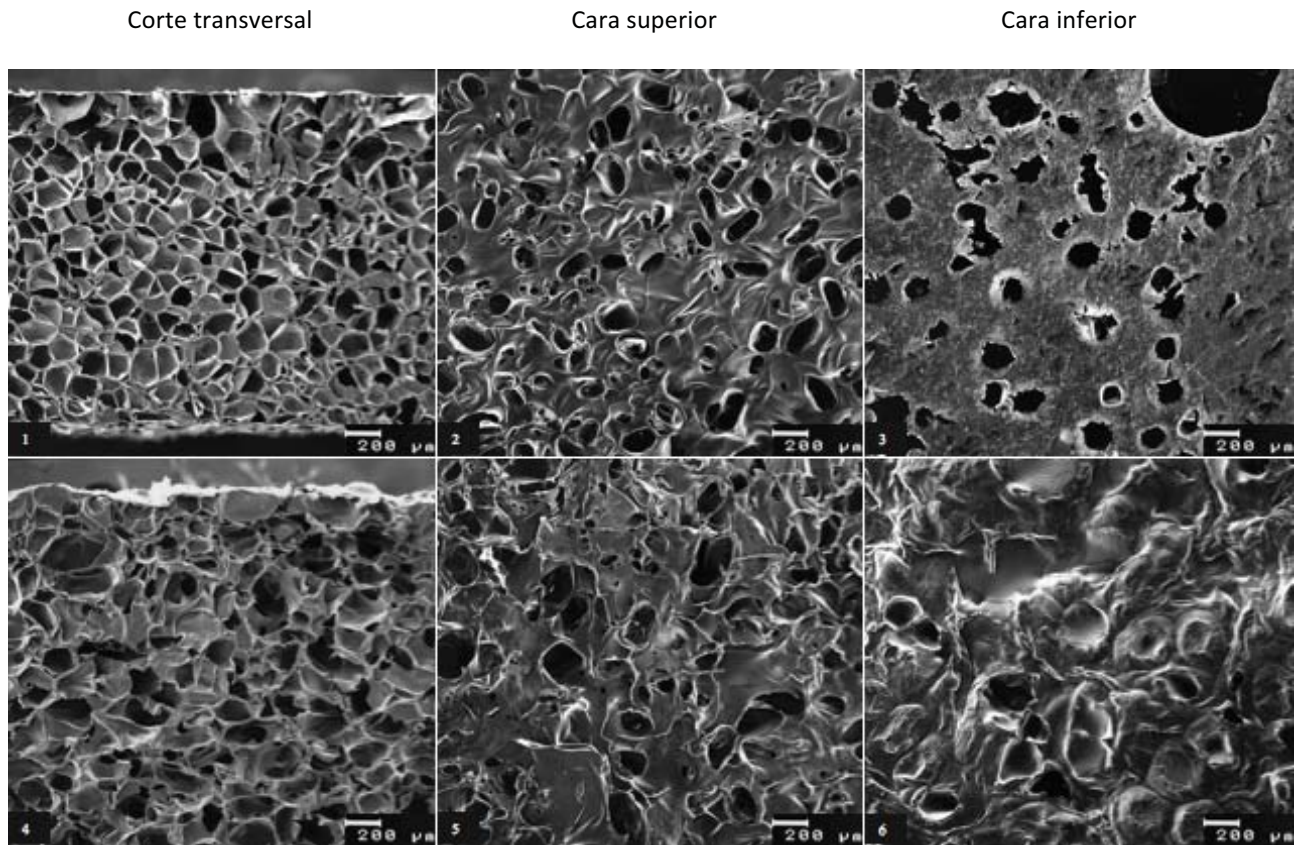


Figura 7. Fotomicrografías tomadas con MEB de los andamios A y D en corte transversal, vista superior e inferior. 1, 2 y 3 andamios de Ge-AH (70-30) sin entrecruzar y sin membrana de PDMS (andamios A). 4, 5 y 6 andamios de Ge-AH (70-30) entrecruzados y con membrana de PDMS (andamios D).

Corte transversal

Cara superior

Cara inferior

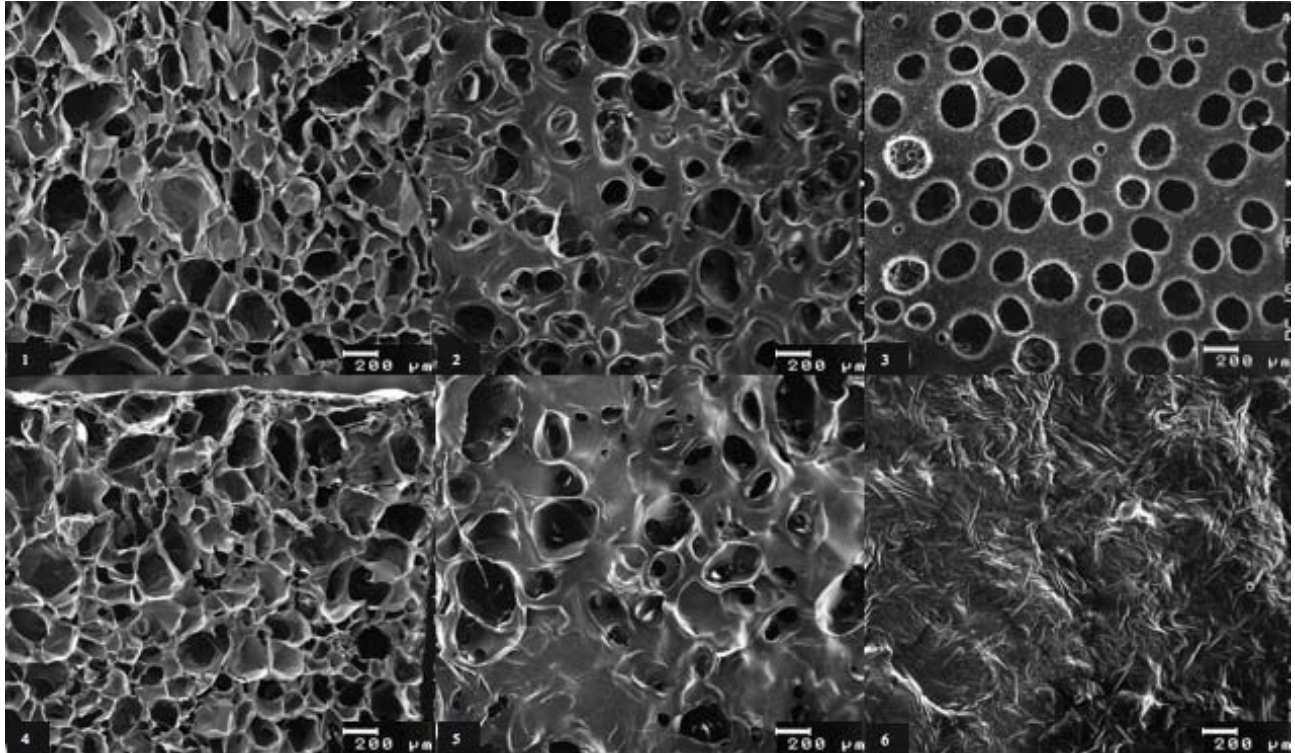


Figura 8. Fotomicrografías tomadas con MEB de los andamios B y E en corte transversal, vista superior e inferior. 1, 2 y 3 andamios de Ga-AH (80-20) sin entrecruzar y sin membrana de PDMS (andamios B). 4, 5 y 6 andamios de Ge-AH (80-20) entrecruzados y con membrana de PDMS (andamios E).

Corte transversal

Cara superior

Cara inferior

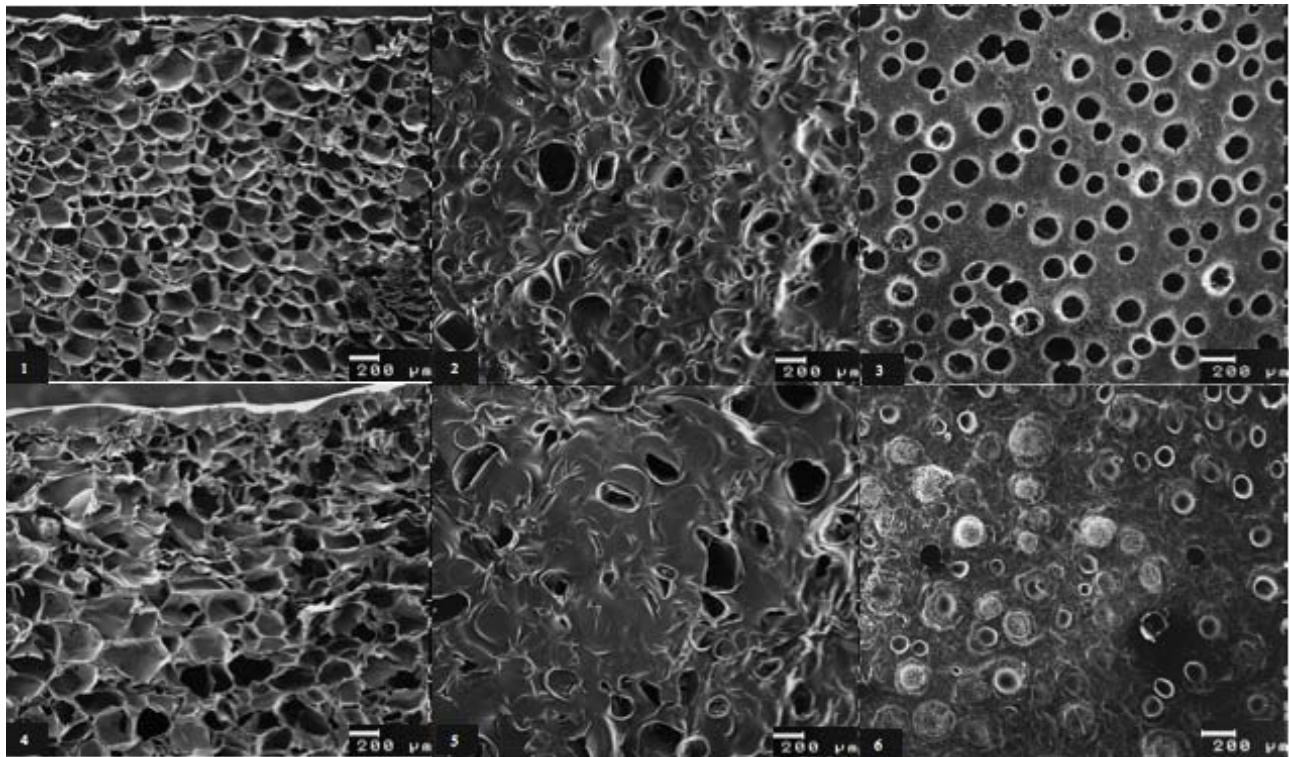


Figura 9. Fotomicrografías tomadas con MEB de los andamios C y F en corte transversal, vista superior e inferior. 1, 2 y 3 andamios de Ga-AH (90-10) sin entrecruzar y sin membrana de PDMS (andamios C). 4, 5 y 6 andamios de Ge-AH (90-10) entrecruzados y con membrana de PDMS (andamios F).

Porosidad

En la gráfica 1 de la figura 10 se puede observar la distribución del tamaño de los poros en los andamios con diferentes concentraciones de Ge-AH entrecruzados y no entrecruzados. En esta gráfica podemos observar que los tamaños de poro mayores a las 200 μm fueron escasos en todos los andamios. Sin embargo, podemos observar que los andamios con una mayor proporción de AH, es decir, los andamios A y D presentaron los poros más grandes lo cual se refleja en la gráfica número 2 de la figura 10 en donde se grafican las medias del tamaño de poro de los andamios. En esta gráfica lo que podemos observar es que el tamaño de poro de todos los andamios se mantuvo alrededor de las 60 μm , es decir, los andamios A presentaron una media del tamaño de poro de $64.81 \pm 32.28 \mu\text{m}$, los B $63.87 \pm 33.61 \mu\text{m}$, los C $57.64 \pm 30 \mu\text{m}$, los D presentaron una media de $69.16 \pm 38.16 \mu\text{m}$, los E de $66.31 \pm 41.17 \mu\text{m}$ y finalmente los F de $62.17 \pm 33.37 \mu\text{m}$. Es de notar que no hubo diferencias significativas entre los andamios entrecruzados y los no entrecruzados, pero sí hubo diferencias significativas entre los andamios A y C, y los D y F, lo que quiere decir que los andamios que presentaron mayores proporciones de AH (30%) y menores proporciones de Ge (70%) presentaron poros ligeramente más grandes que los andamios con menores cantidades de AH (10%) y mayores proporciones de Ge (90%).

Finalmente, en el panel inferior de la figura 10 se observan fotomicrografías de MEB de los andamios con diferentes proporciones de Ge-AH entrecruzados y sin entrecruzar. Las imágenes de todos los andamios son muy similares entre sí, los poros que se observan son homogéneos y regulares, es decir, presentan tamaños de poro similares y en su mayoría no sobrepasan las 250 μm . También en estas fotos se puede ver que algunos poros tienen paredes cerradas, pero también hay poros en donde se pueden ver conexiones con los poros que encuentran por detrás, lo que nos demuestra que la estructura de los andamios presenta poros interconectados.

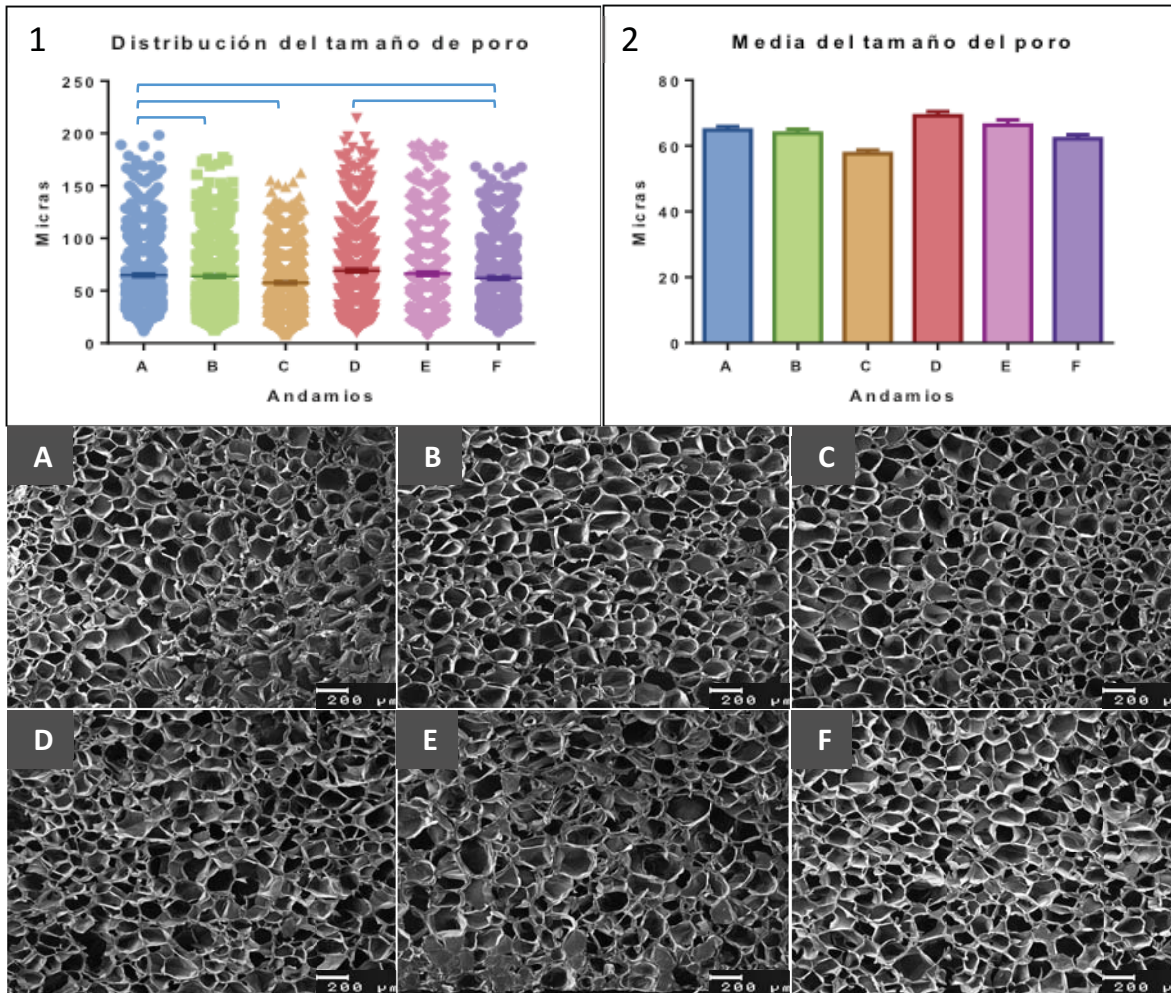
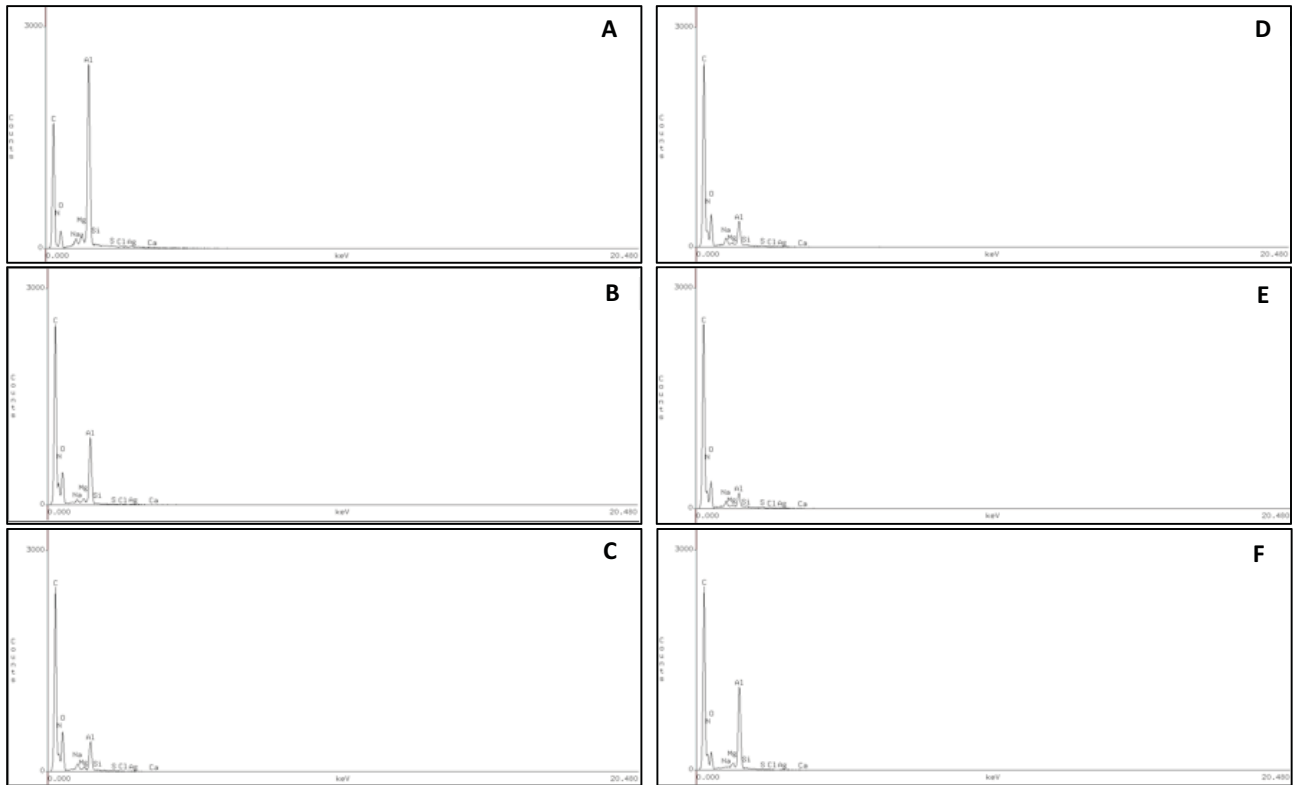


Figura 10. Porosidad. Gráfica 1: Distribución del tamaño del poro. Gráfica 2: Media del tamaño del poro de los andamios. Panel inferior; Fotomicrografías mediante MEB del corte transversal de los andamios. A: Ge(70)-AH(30), B: Ge(80)-AH(20), C: Ge(90)-AH(10) todos sin entrecruzar y sin membrana de PDMS. D: Ge(70)-AH(30), E: Ge(80)-AH(20), F: Ge(90)-AH(10) todos entrecruzados con EDC y sin membrana de PDMS.

Microanálisis de dispersión de energía de rayos X

Se realizó un análisis por dispersión de energía de rayos X y se obtuvieron los espectros que se muestran en la figura 11 en el panel superior y en la gráfica inferior se muestran los porcentajes en peso de los elementos encontrados. En general pudimos observar que los elementos presentes en todos los andamios corresponden a los componentes esperados, como el alto porcentaje de carbono (C), nitrógeno (N) y oxígeno (O). Además de la presencia de estos tres elementos mediante esta técnica también se lograron registrar escasas cantidades de sodio (Na) y azufre (S), las cuales se discriminaron debido a que, en todas las muestras y sus repeticiones, los valores obtenidos fueron menores al 0.1 %. Un último pico prominente que se muestra en los espectros es el del aluminio, el cual se adjudicó al lugar en donde se montó la muestra para la técnica, ya que su composición era de aluminio, por lo cual también este pico se discriminó.

Para los andamios no entrecruzados con diferentes proporciones de Ge-AH se obtuvieron los siguientes porcentajes de los elementos: el andamio A (70-30 Ge-AH) presentó 56.8% de C, 22% de O y 21.2% de N; el B (80-20 Ge-AH) 46.2% de C, 26.5% de O y 27.2% de N, el andamio C (90-10 Ge-AH) presentó 46.3% de C, 29.4% de O y 24.3% de N. Por otro lado, los andamios entrecruzados con EDC presentaron los siguientes porcentajes: el andamio D (70-30 Ge-AH) mostró un porcentaje del 48.2 de C, 25% de O y 26.8% de N; el andamio E (80-20 Ge-AH) presentó 46.9% de C, 25.2% de O y 27.9% de N y el andamio F (90-10 Ge-AH) con 49.2% de C, 20.8% de O y 29.9% de N.



	F	E	D	C	B	A
Carbono	49.2	46.9	48.2	46.3	46.2	56.8
Oxígeno	20.8	25.2	25.0	29.4	26.5	22.0
Nitrógeno	29.9	27.9	26.8	24.3	27.2	21.2

Figura 11. *Dispersión de energía de rayos X. Panel superior: Se muestran los espectros de absorción de rayos X en donde se muestran los picos correspondientes a los elementos encontrados en las muestras. Gráfica inferior: muestra el porcentaje en peso de los principales picos de absorción de los elementos que se observaron en los espectros.*

Espectroscopia de rayos infrarrojos

Los espectros de absorción obtenidos mediante la difracción de rayos infrarrojos se muestran en la figura 12. En esta figura se pueden identificar 3 paneles, en el panel número uno se colocaron los espectros de los andamios puros de gelatina en una proporción del 70%, ácido hialurónico puro al 30%, los andamios A (Ge-AH: 70-30 sin entrecruzar) y los D (Ge-AH: 70-30 entrecruzados). En el panel número 2 se muestran los andamios puros de Ge al 80 %, AH puro al 20 %, los andamios B (Ge-AH: 80-20 no entrecruzados) y los andamios E (Ge-AH: 80-20 entrecruzados). Por último, en el panel 3 se pueden observar los espectros de andamios sólo de Ge pero a una proporción del 90%, los de AH al 10%, los andamios C (Ge-AH: 90-10 sin entrecruzar) y los andamios F (Ge-AH: 90-10 entrecruzados). Como se puede observar en la figura 12, los espectros de los andamios puros de AH, sin importar su concentración y el proceso de entrecruzamiento, muestran bandas de absorción características de estos andamios. En el punto 3278 cm^{-1} se puede observar una banda de absorción grande y ancha, los picos de absorción que aparecen después son más delgados y se pueden observar a los 1606 , 1408 y a los 1036 cm^{-1} . De igual manera, en los andamios puros de Ge se logran observar bandas de absorción características, a los 3300 cm^{-1} se observa una banda amplia, a los 1632 , 1540 , 1238 y 1080 cm^{-1} se observan picos delgados.

En los espectros de los andamios de Ge-AH, independientemente de las proporciones de Ge-AH y del proceso de entrecruzamiento, los andamios mostraron espectros en donde se puede observar la fusión de algunos picos de absorción que se presentaban en la gelatina y el ácido hialurónico puros. En todos los andamios, los espectros presentan las mismas bandas de absorción, las cuales son características. Por ejemplo, el pico de absorción amplio ubicado a los 3300 se mantiene igual que en los andamios puros, ya sea de gelatina o de ácido hialurónico y las bandas de absorción que aparecen después de estos puntos, aparecen como un patrón en todos los andamios a los 1632 , 1546 , 1042 y 1080 cm^{-1} . La presencia de las bandas de absorción en los diferentes espectros y sus posibles fuentes de emisión dependiendo de las vibraciones de los enlaces se discutirán más adelante, sin embargo, podemos decir que los picos fuertes y agudos incluyen bandas de absorción

prominentes asociadas directamente con la estructura secundaria de las proteínas presentes en los andamios.

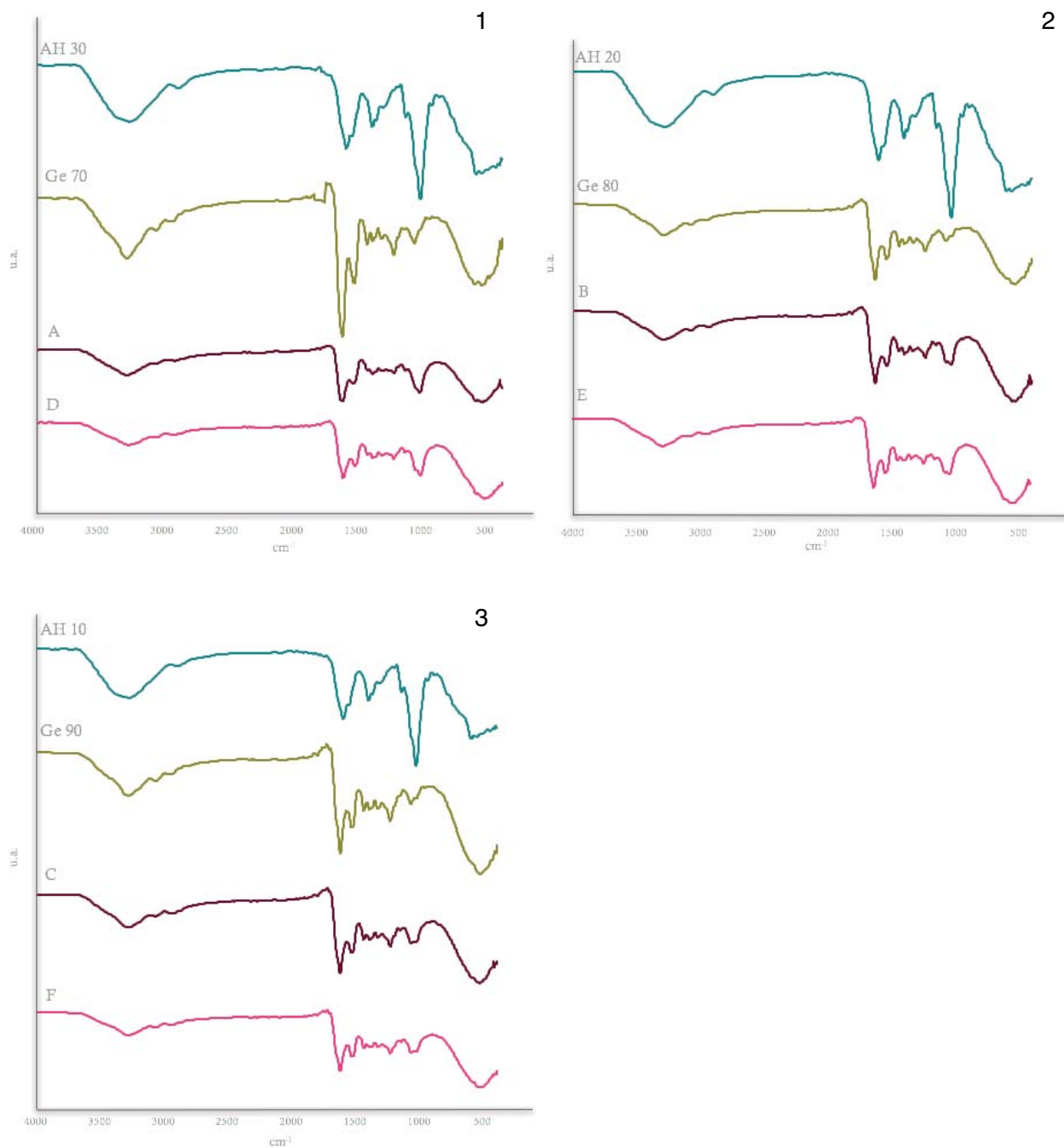


Figura 12. Espectroscopia de difracción de rayos infrarrojos de los andamios y sus controles. Panel 1: espectros de andamios puros de AH al 30 %, Ge al 70 %, A: Ge(70)-AH(30) sin entrecruzar y D: Ge(70)-AH(30) entrecruzados. Panel 2: espectros de andamios puros de AH al 20 %, Ge al 80 %, B: Ge(80)-AH(20) sin entrecruzar y E: Ge(80)-AH(20) entrecruzados. Panel 3: espectros de andamios puros de AH al 10 %, Ge al 90 %, C: Ge(90)-AH(10) sin entrecruzar y F: Ge(90)-AH(10) entrecruzados.

Capacidad de absorción

Para evaluar la capacidad de absorción de los diferentes andamios, se sumergieron en PBS y a diferentes tiempos fueron pesados con objeto de saber cuánto peso habían ganado o cuanto PSB pudieron absorber. Los resultados se muestran en la figura 13 en donde se muestran dos imágenes de los andamios. La primera imagen (Figura 13-1) muestra a los andamios después de estar sumergidos en la solución de PBS durante una hora y la segunda imagen (figura 13-2) después de 5 h. En la gráfica que se encuentra por debajo de las imágenes (figura 13-3) se observa el comportamiento de la absorción de PBS que tuvieron los andamios, el porcentaje que se muestra es el porcentaje máximo de incremento de peso que alcanzaron los andamios. Además, se puede observar, en los primeros minutos y horas, que los andamios con diferentes proporciones de Ge-AH que no estaba entrecruzados y no tenían la membrana de PDMS (A, B y C) absorbieron grandes cantidades de PBS acercándose al 100 % a las 3 h, sin embargo, para las 5 h se puede observar una ligera pérdida en el porcentaje de absorción, misma diferencia que se acrecienta para las 24 h en donde se observa un cambio significativo en el peso comparado con los demás andamios. En el último tiempo (48 h) analizado, los andamios A, B y C se desintegraron y por lo tanto perdieron la capacidad de absorción. También en la misma gráfica están los datos de los andamios D, E y F que son los andamios entrecruzados pero sin membrana de PDMS. Éste grupo de andamios, al igual que los andamios anteriores en los primeros tiempos comenzaron rápidamente a absorber PBS, sin embargo, estos andamios mantuvieron su capacidad de absorción a las 24 h y hasta las 48 h, esto debido a que no se degradaron como los andamios no entrecruzados. Finalmente, en esta prueba se observó el comportamiento de los andamios de Ge-AH en diferentes proporciones, pero en este caso sí se entrecruzaron y se les colocó la membrana de PDMS (G, H e I). Éstos andamios a diferencia de los descritos anteriormente absorbieron menores cantidades de PBS en los primeros intervalos, pero paulatinamente continuaron absorbiendo PBS y a las 24 h el porcentaje de absorción era casi idéntico a los andamios A, B y C y para las 48 h se pudo observar que absorbieron tanto PBS como los andamios D, E y F. Cabe mencionar que los andamios que se desintegraron después de los que no estaban entrecruzados, fueron los andamios entrecruzados pero sin

la membrana de PDMS y los últimos en desintegrarse fueron los andamios entrecruzados y con la cubierta de PDMS.

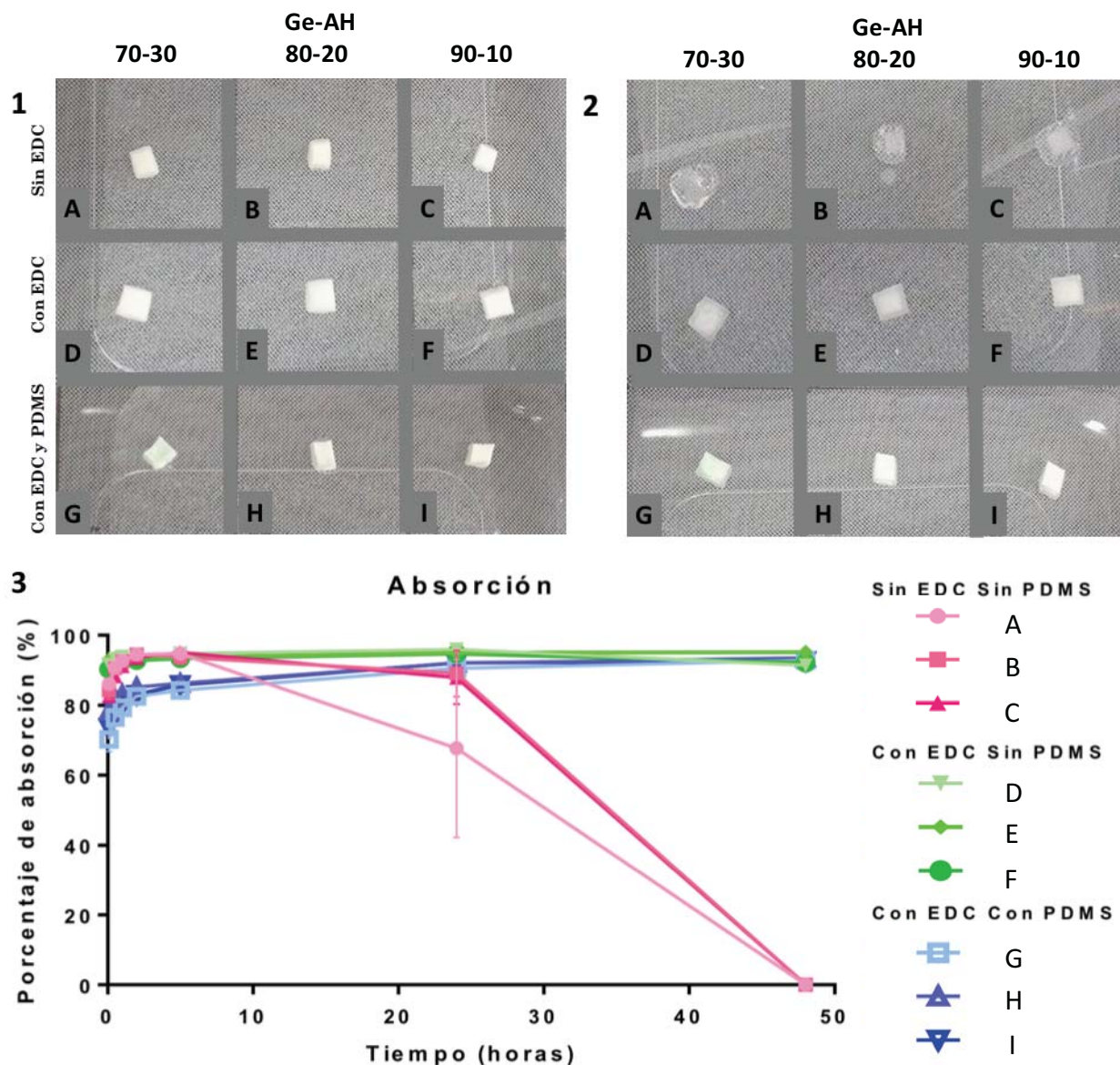


Figura 13. Capacidad de absorción. Panel 1: Andamios de Ge-AH sumergidos en PBS durante una hora. Panel 2: Andamios de Ge-AH sumergidos en PBS durante 5 horas. Panel 3: Gráfica de la capacidad de absorción a diferentes tiempos. A: Ge(70)-AH(30), B: Ge(80)-AH(20), C: Ge(90)-AH(10) sin entrecruzar y sin membrana de PDMS, D: Ge(70)-AH(30), E: Ge(80)-AH(20), F: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y sin membrana de PDMS. G: Ge(70)-AH(30), H: Ge(80)-AH(20), I: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y con membrana de PDMS.

Es importante mencionar que las diferencias fueron un poco más evidentes entre los grupos de andamios sin entrecruzar, entrecruzados sin PDMS y los entrecruzados con PDMS, ya que las diferencias entre grupos de andamios por las proporciones de Ge-AH fueron poco distinguibles como se observa en la gráfica, sin embargo, en las imágenes se puede observar que en el momento de estar sumergidos en PBS los andamios que eran más translúcidos eran los que tenían un proporción de AH de 30 y éstos andamios con el paso del tiempo eran los primeros en mostrar una consistencia viscosa más parecida a un gel. También es importante hacer notar que los andamios con AH a una proporción de 30 fueron los primeros que comenzaron a presentar problemas con la manipulación, ya que después de las 5 h como se puede ver en la figura 13-2, los andamios en su totalidad eran transparentes y al tratar de retirarlos de la solución de PBS teníamos que cargar la masa viscosa. En el intervalo de las 24 a las 48 al tratar de manipular estos andamios se rompían y se perdían porciones de los mismos. Sin embargo, podemos observar en la misma foto que los andamios con mayor proporción de gelatina C, F y G a las 5 h aún mantenían su estructura, con excepción del andamio C el cual ya presentaba en la periferia un aspecto como de gel, pero en el centro aún se lograba observar una estructura porosa.

Degradación

En esta prueba se evaluó el porcentaje de degradación de los andamios después de someterlos a la acción de la enzima colagenasa I por 3 y 6 h. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 14, en donde se puede observar una imagen a las 6 h del tratamiento con colagenasa. En el panel 2 se muestra la gráfica del porcentaje de degradación a las 3 h, aquí se puede apreciar con claridad que los andamios de Ge-AH en diferentes proporciones sin entrecruzar y sin la membrana de PDMS se degradaron por completo, a excepción de los andamios B en donde mostraron un 98% de degradación, y prácticamente fueron remanentes del andamio lo que se pudo recuperar y pesar. Los andamios entrecruzados pero sin la membrana de PDMS presentaron porcentajes de degradación menores, y en particular los andamios D presentaron un 37%, los E un 34% y los F un 11% y los andamios entrecruzados y con la membrana de PDMS mostraron menores porcentajes de degradación: los andamios G un 20% de degradación, los H un 12% y los I 7%.

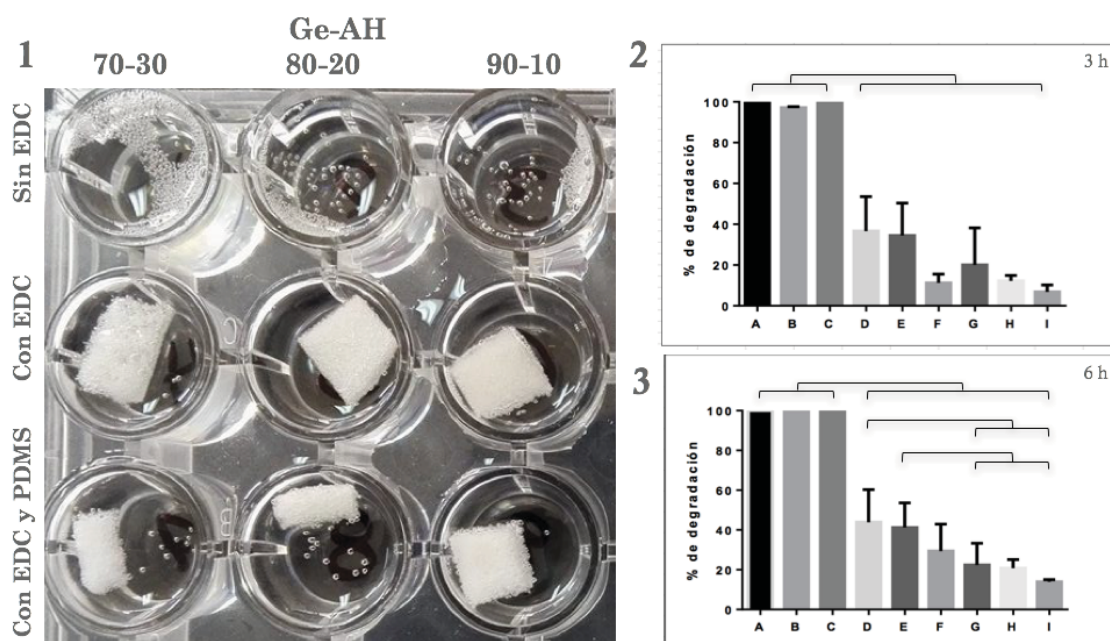


Figura 14. Degradación: fotografía de los andamios después de estar sometidos a la acción de la colagenasa durante 6 h. 2: Gráfica del porcentaje de degradación de los diferentes andamios después de 3 h del tratamiento. 3: Gráfica del porcentaje de degradación de los diferentes andamios después de 6 h del tratamiento. A: Ge-AH (70-30), B: Ge-AH (80-20) y C: Ge-AH (90-10) sin entrecruzar y sin membrana de PDMS; D: Ge-AH (70-30), E: Ge-AH (80-20) y F: Ge-AH (90-10) entrecruzados y sin membrana de PDMS y G: Ge-AH (70-30), H: Ge-AH (80-20) y I: Ge-AH (90-10) entrecruzados y con membrana de PDMS.

Para las 6 h de tratamiento, como era de esperarse, los porcentajes de degradación se incrementaron. Los andamios controles, A, B y C (sin entrecruzar y sin PDMS) ya se habían degradado por completo, es decir, tuvieron el 100% de degradación. Sin embargo, eso no sucedió con los andamios entrecruzados sin y con la membrana de PDMS, que presentaron porcentajes de degradación menores al 50%, los andamios D presentaron un 44%, los E un 42%, los F un 29%, los G un 22%, los H un 20% y los I un 14%, estos últimos tres fueron los andamios entrecruzados con la membrana de PDMS.

En estos resultados sí se logró observar una tendencia ya que los andamios con mayores proporciones de gelatina (F e I) tuvieron menores porcentajes de degradación sin importar que los andamios estuvieran entrecruzados o si presentaban o no la membrana de PDMS. Caso contrario a los andamios que tenían un 30 % de AH (D y G). Estos andamios presentaron porcentajes de degradación mayores, dejando a los andamios E y H en términos intermedios.

Citocompatibilidad

Para la prueba de citocompatibilidad se realizaron cultivos celulares y después las células se tiñeron con el kit live/dead, dicho kit marca las células vivas con verde (positivas a calceína) y las muertas con rojo (positivas a homodímero-1 de etidio). En este punto es importante recordar que los andamios controles, A, B y C no se incluyeron en las pruebas de cultivo, debido a que como se mostró en los resultados de absorción y degradación, los andamios no resistieron al proceso de esterilización y se desintegraron antes de poder sembrar los fibroblastos. Debido a eso, de este punto en adelante, solo se muestran los andamios D, E, F, G, H e I los cuales son andamios que pasaron por un proceso de entrecruzamiento y los últimos tres tenían la membrana de PDMS.

En la figura 15 se muestran los resultados de los andamios con células cultivados por 24 h que se observaron mediante microscopía confocal. En los controles se puede ver claramente que las células vivas emiten una fluorescencia verde intensa y en las células muertas la fluorescencia en color rojo se aprecia principalmente en el núcleo. Las células vivas que se lograron localizar mediante esta técnica se observan intensamente verdes y con formas celulares ahusadas similares a las que presentan los fibroblastos en cultivo. En estas imágenes se puede observar que la mayoría fueron células vivas y viables mostrando un color verde brillante muy similar a las células controles. Por otro lado, las células muertas fueron mucho menos y era difícil identificarlas ya que el núcleo no se teñía del todo bien como en los controles. Todos los andamios presentaron un comportamiento similar, lo que nos indica que la viabilidad de las células no se ve afectada por los andamios.

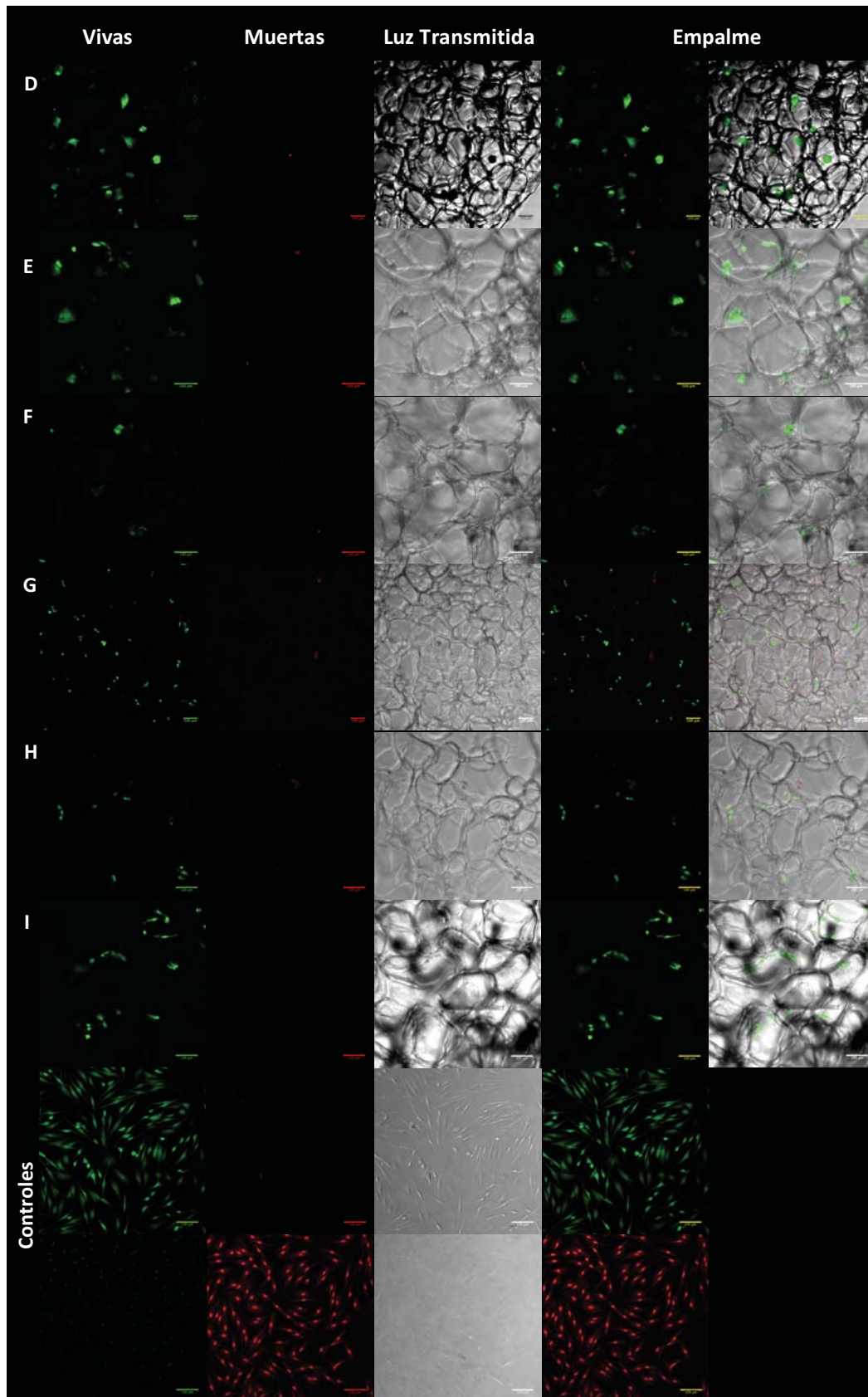


Figura 15. Viabilidad de fibroblastos después de 24 horas de cultivo sobre los diferentes andamios. Microscopía confocal. D: Ge(70)-AH(30), E: Ge(80)-AH(20), F: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y sin membrana de PDMS. G: Ge(70)-AH(30), H: Ge(80)-AH(20), I: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y con la membrana de PDMS.

En la tabla 3 podemos observar los porcentajes de las células vivas obtenidos a partir de las imágenes de las inmunofluorescencias de vida/muerte, en donde podemos observar que todos los andamios presentaron más del 90% de viabilidad celular independientemente del porcentaje de Ge-AH y la presencia o ausencia de membrana de PDMS.

Tabla 3. Porcentaje de fibroblastos viables después de 24 de cultivo.

Andamios	D	E	F	G	H	I	Control de vida
% células vivas	92.1	92.3	94.9	90.0	92.7	95.1	100.0

Andamios de Ge-AH: D (70-30), E (80-20) y F (90-10) entrecruzados con EDC sin membrana de PDMS. G (70-30), H (80-20) e I (90-10) entrecruzados con membrana de PDMS.

En la figura 16 se muestran los resultados de un cultivo de 3 días teñido con el kit live/dead que se observó mediante microscopía de epifluorescencia. En la figura se muestran los andamios con diferentes proporciones de Ge-AH entrecruzados con EDC sin la membrana de PDMS (D, E y F) y los andamios de Ge-AH a diferentes proporciones entrecruzados con la membrana de PDMS (G, H e I). En todos los andamios se logró observar una abundante población de células a los tres días en donde la mayoría de las células continuaron mostrando su positividad a calceína, lo que nos indica que la biocompatibilidad de las células con los andamios no solo fue a las 24 h, sino que además la cantidad de células se vio aumentada. Las células con daño en su membrana, marcadas con rojo fueron escasas en todos los andamios similar a lo que se observó a las 24 h. Cabe mencionar que para este experimento no se observó una diferencia entre los andamios entrecruzados sin la membrana de PDMS y los entrecruzados con la membrana de PDMS y tampoco se observaron diferencias significativas relacionadas a las diferentes proporciones de gelatina y ácido hialurónico, sin embargo, la discusión de estos resultados se verá más adelante.

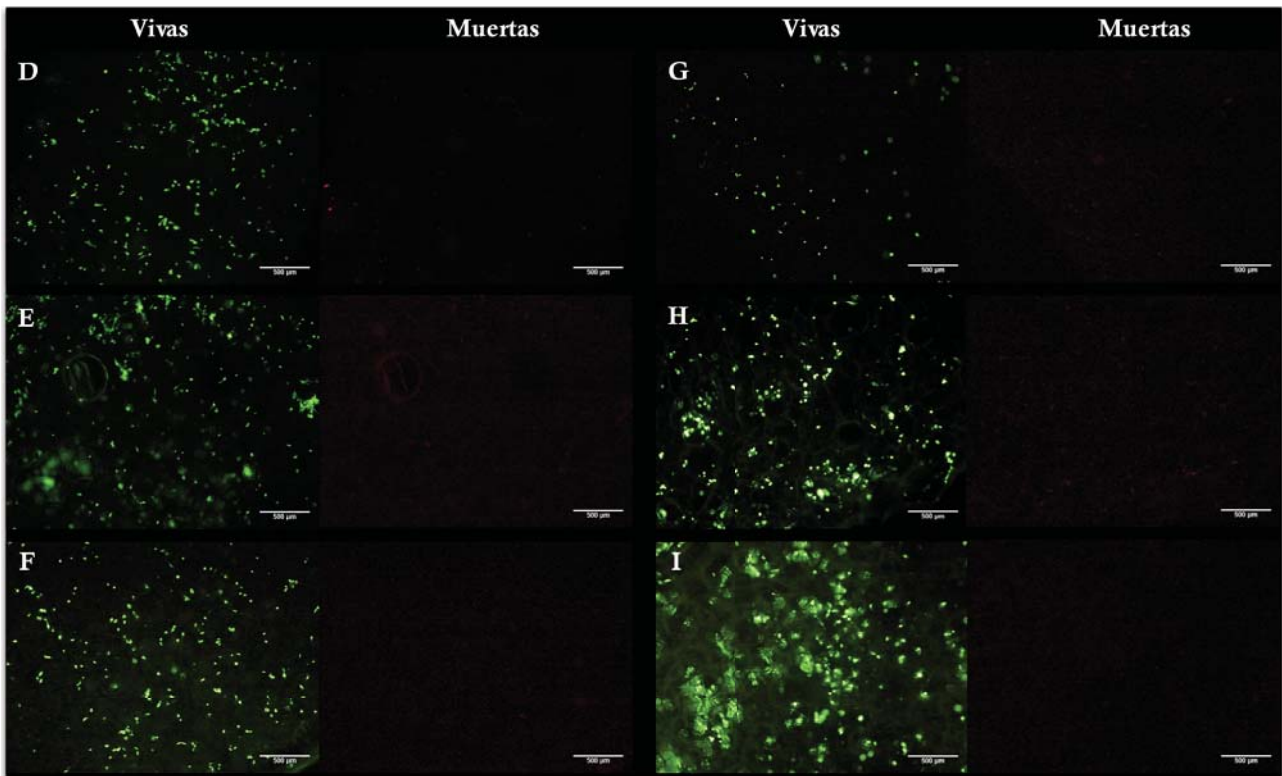


Figura 16. Viabilidad de fibroblastos después de 3 días de cultivo sobre los diferentes andamios. Microscopía de fluorescencia. D: Ge(70)-AH(30), E: Ge(80)-AH(20), F: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y sin membrana de PDMS. G: Ge(70)-AH(30), H: Ge(80)-AH(20), I: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y con la membrana de PDMS.

Adhesión celular

Para evidenciar la adhesión de los fibroblastos a los andamios se realizó una inmunofluorescencia contra vinculina, una proteína involucrada con la formación de contactos focales. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17 en donde se pueden observar fotomicrografías de las células sembradas sobre cubreobjetos (controles) y sobre los andamios. En este experimento se observan los núcleos marcados con DAPI en color azul, los filamentos de actina en color rojo, la marca de vinculina en verde y finalmente se puede observar el andamio con contraste de fases. En los controles se observan las células adheridas al cubreobjetos, en estas células se pueden observar claramente los núcleos, los filamentos de actina que son parte del citoesqueleto y que forman fibras de estrés y la marca positiva a vinculina citoplásmica en verde. En los andamios D, E, F, G, H e I después de 24 h de cultivo se lograron observar claramente células con abundante vinculina en el citoplasma, con un citoesqueleto de actina bien organizado a lo largo de todas las células y que en ciertos puntos de las células formaban fibras de estrés que se aprecian como conjuntos de fibras rojas orientadas en una misma dirección, estas dos marcas tuvieron una colocación perfecta con la marca de los núcleos. Con el empalme pudimos corroborar que las células se encontraban adheridas a las fibras del andamio y que incluso en algunos casos las células extendían prolongaciones para alcanzar otras fibras del andamio. La morfología de las células en los controles fue principalmente alargada y las células se acomodaron y se orientaron conforme las guiaban las fibras del andamio y en algunas ocasiones se pudieron observar prolongaciones citoplásmicas parecidas a filopodios que se extendían por las fibras de los andamios.

De igual forma que en la prueba de viabilidad no se observaron diferencias significativas entre los andamios con diferentes proporciones de gelatina y tampoco hubo diferencias evidentes entre los andamios entrecruzados con y sin la membrana de PDMS.

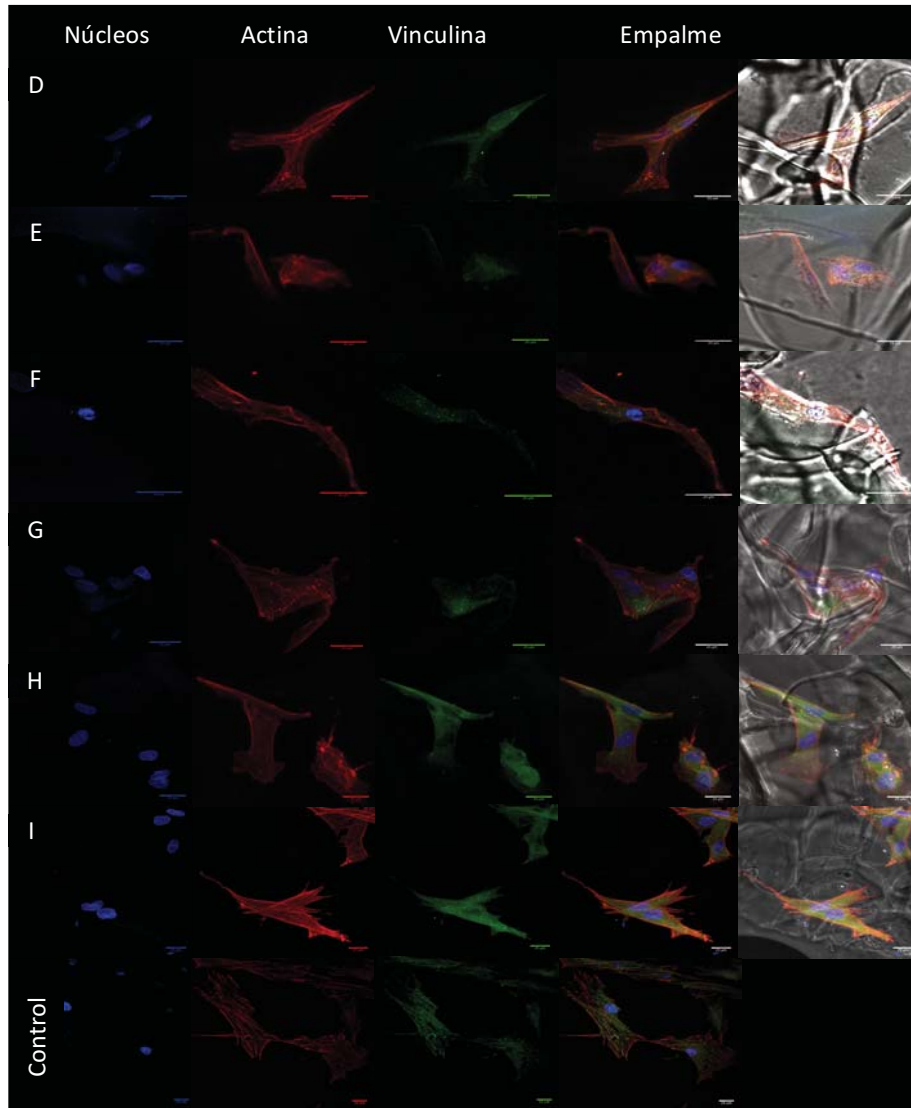


Figura 17. Adhesión de fibroblastos a los diferentes andamios después de 24 horas de cultivo. Microscopía confocal. En azul DAPI, en rojo faloidina y en verde vinculina. D: Ge(70)-AH(30), E: Ge(80)-AH(20), F: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y sin membrana de PDMS. G: Ge(70)-AH(30), H: Ge(80)-AH(20), I: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y con la membrana de PDMS.

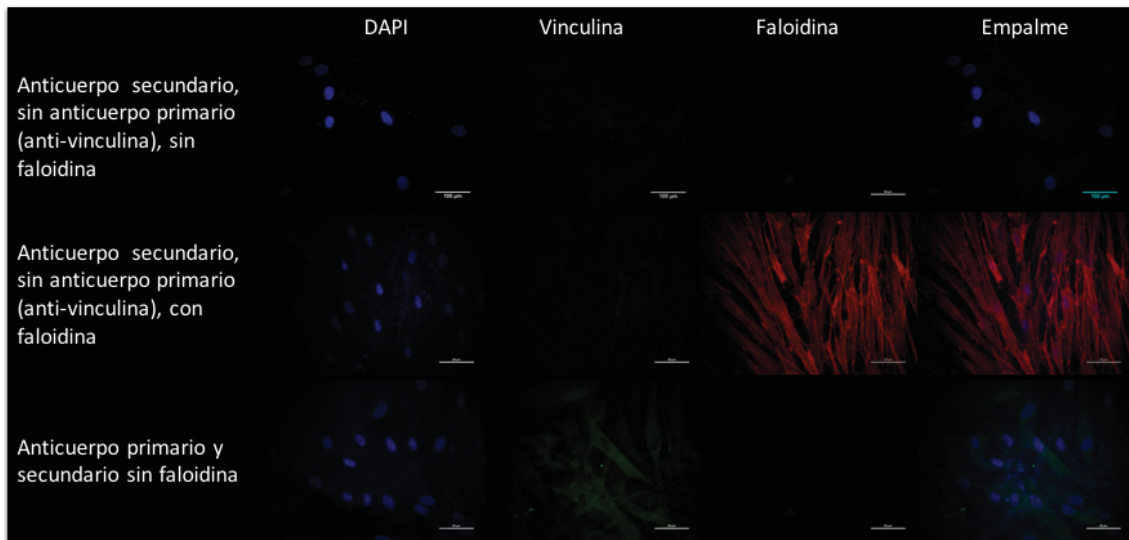


Figura 18. Controles de la prueba de adhesión.

Análisis de la expresión de procolágena

Para evaluar la producción de fibras de colágena se realizó una inmunofluorescencia contra procolágena I, que es una proteína precursora de las moléculas de colágena. Los resultados que se obtuvieron después de 7 días de cultivo se muestran en la figura 19 en donde se pueden observar las células marcando la presencia citoplásmica de la procolágena I en color rojo brillante, los núcleos en azul y también se pueden observar las fibras del andamio translucidas. En todos los andamios, sin importar las proporciones de Ge-AH, el proceso de entrecruzamiento y la membrana de PDMS las células se localizaron en la periferia de los poros, adheridas a las fibras del andamio. En este caso se pudo observar que se incrementó la población celular que tapizó al andamio y como se puede apreciar en todas las fotomicrografías, las células presentaron marca positiva para la procolágena I. También en todos los andamios las células mostraron morfología alargada adheridas a las fibras y se orientaron bordeando la pared de los poros del andamio.

En esta prueba tampoco se observaron diferencias significativas entre los andamios con diferentes proporciones de Ge-AH y entre los andamios entrecruzados con y sin la membrana de PDMS. Por lo tanto, como se discutirá en la siguiente sección del trabajo, estos resultados apuntan a que los andamios se pueden utilizar para cultivo *in vitro* y se puede continuar la realización de pruebas *in vivo* ya que las concentraciones de gelatina-ácido hialurónico, el entrecruzado y la membrana de PDMS no modifican la viabilidad, adhesión y la producción de fibras de colágena de las células.

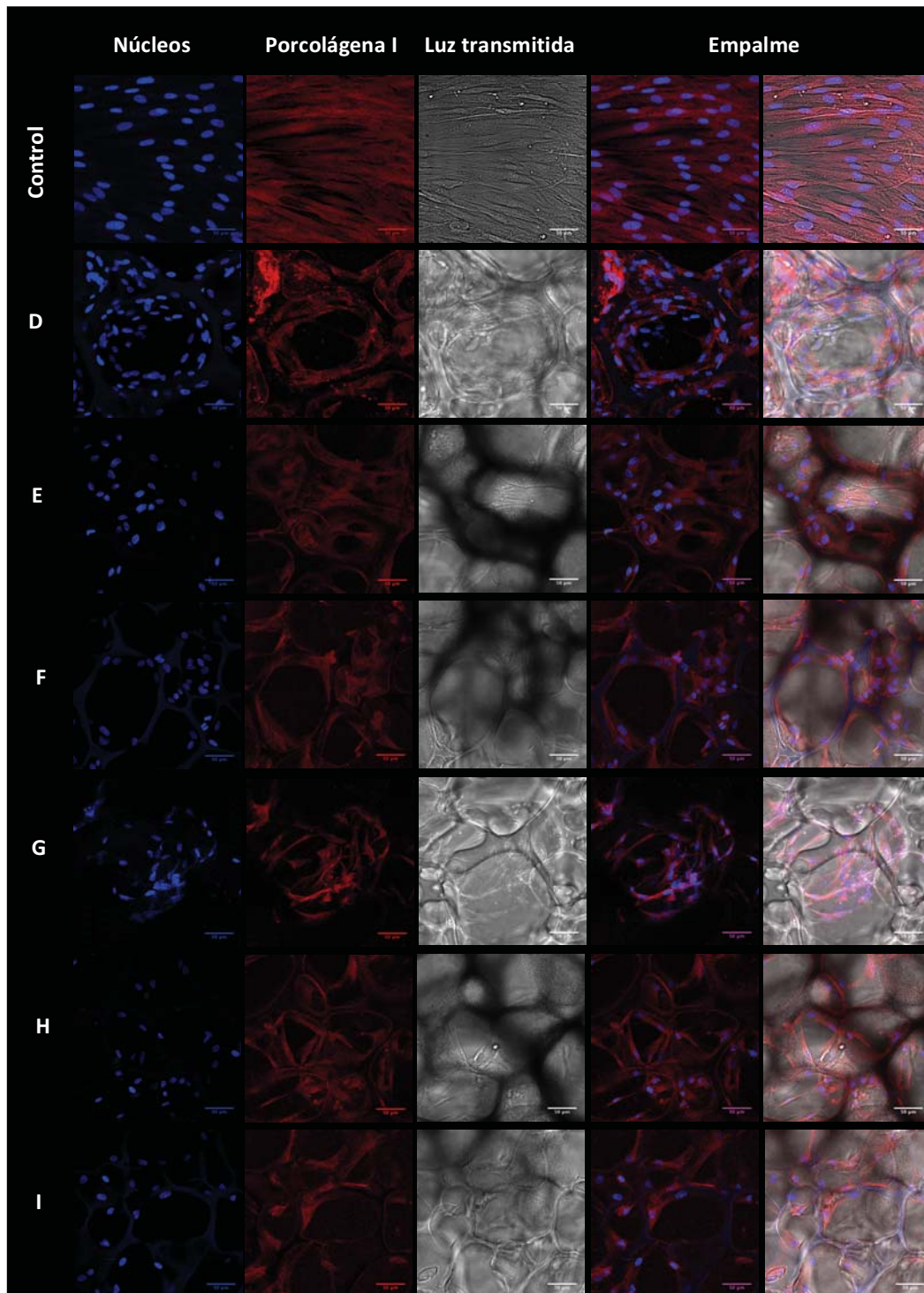


Figura 19. Expresión de procolágena. Inmunofluorescencia contra procolágena I a 24 horas de cultivo sobre los diferentes andamios. Microscopía confocal. En azul se observan los núcleos marcados con DAPI y en rojo procolágena I. D: Ge(70)-AH(30), E: Ge(80)-AH(20), F: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y sin membrana de PDMS. G: Ge(70)-AH(30), H: Ge(80)-AH(20), I: Ge(90)-AH(10) entrecruzados y con la membrana de PDMS.

Discusión

Morfología y porosidad

En este trabajo de investigación se lograron obtener andamios de Ge-AH con diferentes proporciones, los cuales se entrecruzaron con EDC y finalmente se les colocó una membrana de PDMS. Estos andamios se fabricaron con el fin de poder aplicarlos en estudios *in vivo* y posteriormente llegar a su aplicación clínica en pacientes que tengan heridas en la piel como quemaduras, úlceras vasculares y de pie diabético, entre otras.

Como se pudo observar en los resultados, los andamios fabricados con gelatina y ácido hialurónico fueron porosos en toda su extensión. Cabe mencionar que el proceso de liofilización para la obtención de andamios con poros homogéneos y regulares, depende de varios factores como la concentración del polímero o la velocidad y método de congelación de las muestras (Annabi, *et al.*, 2010). Para lograr la estandarización de la técnica para fabricar los andamios se probó congelándolos a diferentes temperaturas y en diferentes congeladores (no se muestran los resultados de estas pruebas). Primero se intentó congelando las muestras con nitrógeno líquido, sin embargo, los poros de estos andamios no eran homogéneos e incluso quedaban poros extremadamente grandes que llegaban a medir milímetros y centímetros. Además de que congelar los andamios con el molde de silicón fue complicado, ya que en muchas ocasiones el molde se quebró y no nos permitió mantener la forma deseada del andamio. Después se probó congelar los andamios a -20 °C en un congelador por convección, pero debido a que en este congelador la transferencia de calor era por medio de aire frío, el andamio se congeló por zonas y esto provocó que los andamios continuaran presentando poros grandes e irregulares. Finalmente, se consiguió congelar los andamios en un congelador por conducción en donde la transferencia de calor se llevó a cabo por el contacto directo de la placa o plancha refrigerante y los moldes en donde se encontraban los andamios. Con éste método se lograron obtener andamios con poros regulares y con diámetros menores a las 500 micras. Cabe mencionar que éste mismo método de congelación lo utilizó Liu, *et al.*, en 2004 y también obtuvieron andamios con poros homogéneos, pero en su caso, los congelaron a -40 °C y el tamaño de poro fue menor (menores a las 90 μm) a los que obtuvimos nosotros.

Existen reportes que explican que también el tamaño de poro de los andamios depende de la concentración de polímero que se tenga en la solución (Lloyd, *et al.*, 2015). Hay estudios que muestran que los andamios fabricados con altas proporciones de ácido hialurónico tienden a presentar poros largos y grandes, esto debido a que como ya se mencionó, el AH tiende a atraer grandes cantidades de agua (Zhang, *et al.*, 2011). El agua, en este proceso de liofilización es el porógeno, por lo tanto, el AH al atraer muchas moléculas de agua tiende a formar poros grandes. En este estudio se encontraron algunos poros de mayores dimensiones en los andamios con mayores proporciones de AH, sin embargo, no fueron diferencias significativas. Estos resultados los atribuimos a que se controló de manera estricta la velocidad y temperatura de congelación ya que al liofilizar la mezcla de Ge-AH en solución los andamios obtuvieron su estructura porosa definitiva, es por esta razón que no encontramos diferencias significativas entre los andamios entrecruzados y los que no pasaron por este proceso, ya que el EDC lo que hace es formar enlaces entre grupos funcionales que se encuentren lo suficientemente cerca para poder formar dicho enlace. Sin embargo, logramos fabricar andamios con diferentes proporciones de Ge-AH, que poseen tamaños de poros, capacidad de absorción y tasas de degradación diferentes, pero que pueden ser regulados y útiles para diferentes aplicaciones en ingeniería de tejidos. Así, este andamio no sólo podría ser usado para la fabricación de sustitutos cutáneos, sino también para la construcción de sustitutos óseos o cartilagosos, condición que debería probarse más adelante.

Además de analizar la porosidad al interior de los andamios, también observamos la cara superior y la inferior, y nos dimos cuenta de que los andamios por ambas caras son porosos. Por la parte superior se observó una menor cantidad de poros y más pequeños que al interior de los andamios, lo cual es un beneficio, ya que si se planea sembrar células sobre esta superficie, no tendrían problema para ingresar a la estructura porosa del andamio. Por el otro lado, la cara inferior presentaba poros regulares que se formaron debido a burbujas de aire atrapadas después de colocar la solución de Ge-AH sobre el molde de silicón. Estos poros en la parte inferior o en la base de los andamios también nos fueron útiles, ya que se decidió colocar sobre esta cara la membrana de PDMS, para que al colocar el PDMS sobre los andamios, éste pudiera ingresar en los

poros y de esta forma evitar que la membrana se desprenda fácilmente de los andamios, es decir, funcionó como un soporte mejor para el PDMS.

Por otro lado, la membrana de PDMS se logró extender por toda la superficie inferior del andamio de manera homogénea y con un grosor que se puede manipular para hacer las membranas más gruesas o delgadas. Para estos experimentos y teniendo en mente la aplicación que se pretende, el grosor de las membranas fue menor a los que se reportan en los apósitos dérmicos comerciales y los que se encuentran en investigación, ya que logramos grosores menores a las 1,000 μm como se mencionó en los antecedentes, con los grosores obtenidos en este trabajo se permitirá una mayor difusión de oxígeno pero al mismo tiempo se mantendrá la humedad en el lecho de la herida, con lo que probablemente el cierre de la misma sea más rápido y eficaz, condición que necesita ser comprobada.

Para finalizar, con el análisis morfológico mediante SEM, se comparó una fotomicrografía de piel humana normal liofilizada (Loh & Choong, 2013) con un andamio de Ge-AH (90-10) entrecruzado sin la membrana de PDMS (figura 20). En esta figura se puede observar que la piel liofilizada muestra en la superficie la epidermis e inmediatamente después la dermis. Esta última aparece como un andamio con poros interconectados con diferentes diámetros, pero en su mayoría en la dermis papilar se observan poros homogéneos pequeños en el orden de las 20 micras y conforme bajamos hacia la dermis reticular, los poros se van haciendo más grandes y alargados. Si tenemos en mente que nuestros andamios están enfocados para la reparación de heridas cutáneas en donde se ve afectada parte de la dermis, la estructura que presentan los andamios construidos en el presente trabajo son muy similares a lo que se observa en la dermis papilar de la piel normal liofilizada, por lo que estos resultados alientan a continuar con las pruebas para poder llegar a la aplicación de los andamios fabricados en este trabajo.

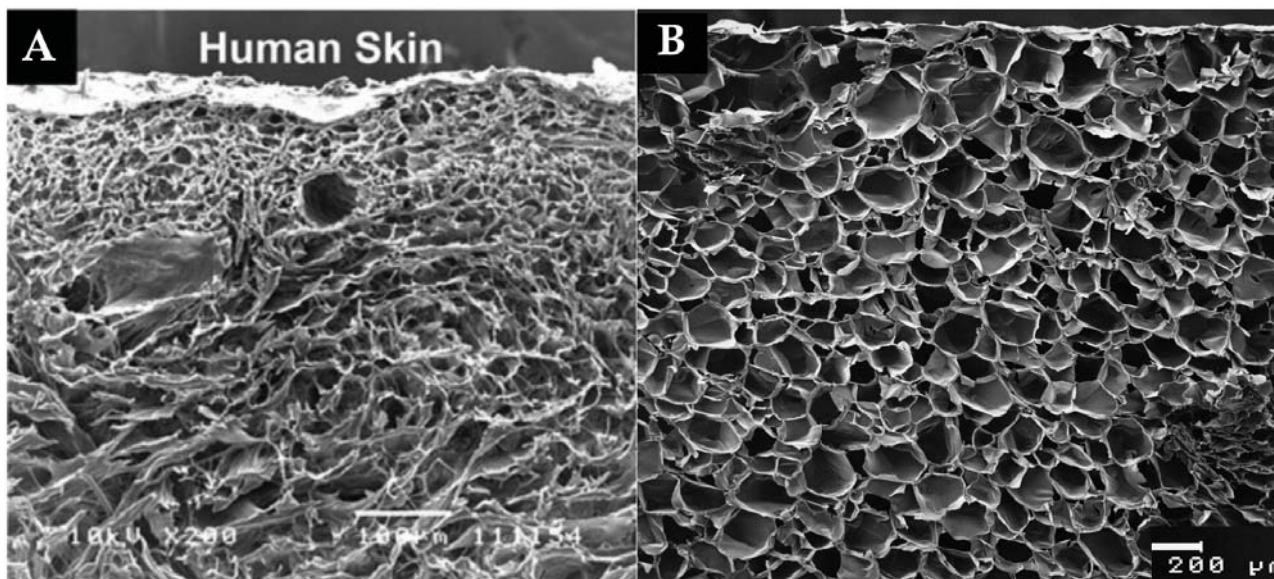


Figura 20. Comparación de piel normal y andamio de Ge-AH liofilizados. A: piel humana en estado normal liofilizada (Tomada de Loh & Choong, 2013). B: andamio de Ge-AH (90-10) entrecruzado sin membrana de PDMS. Cabe mencionar que ambas imágenes se tomaron a diferentes aumentos.

Microanálisis de dispersión de energía de rayos X

Este microanálisis se realizó debido a que se considera una prueba de caracterización de andamios para ingeniería de tejidos y porque se requería corroborar la presencia de nitrógeno en todos los andamios, pues es un elemento que se encuentra formando parte de los aminoácidos, y que en estudios previos realizados en el laboratorio con andamios de Ge-AH este elemento no logró ser detectado. Estos elementos aquí reportados coinciden como los reporta Mao *et al.*, en 2003 y forman parte de los aminoácidos presentes en la gelatina, como lo son los residuos de glicina, prolina, hidroxiprolina, ácido glutámico, arginina, alanina, ácido aspártico y otros aminoácidos como también lo reportan Hong *et al.*, en 2004, Jui *et al.*, en 2010 y Grover *et al.*, en 2012 en sus andamios

En los resultados que se obtuvieron en este trabajo logramos identificar la presencia de C, O y N en los andamios de Ge-AH a diferentes proporciones y como era de esperarse estas diferencias no fueron significativas. Con lo que podemos decir que los elementos presentes en nuestros andamios de Ge-AH a diferentes proporciones y después de pasar por el proceso de entrecruzamiento, la composición química no sufre modificaciones, lo que también encontramos en el análisis de difracción de rayos IR que se discute en la

siguiente sección. Además, en esta ocasión el N estuvo presente en todas las muestras, a diferencia de lo que se obtuvo en resultados previos del laboratorio.

Espectroscopia de rayos infrarrojos

Con estos resultados pudimos observar que los espectros de absorción de los andamios se mantienen independientemente de las variaciones en la proporción de la Ge, AH y el proceso de entrecruzamiento. Los andamios controles fabricados solo de gelatina presentaron bandas de absorción características correspondientes a los grupos amidas. Por ejemplo, Cebi, *et al.* en 2016 realizó espectroscopia de rayos infrarrojos de soluciones de gelatina y localizó tres picos de absorción característicos, uno en los 1700-1600 cm^{-1} (amida-I), otro en 1565-1520 cm^{-1} (amida II) y a los 1240-670 cm^{-1} (amida III). En donde mencionan que la banda de absorción de la amida I está conformada por las vibraciones de estiramiento de los enlaces C=O de los grupos amida I y en menor grado por las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-N, mientras que la banda de absorción correspondiente a la amida II, provienen de ondas de flexión en los enlaces N-H y vibraciones de estiramiento de los enlaces C-N. Finalmente ellos mencionan que las amidas III generalmente son representadas por las vibraciones de estiramiento C-N acopladas a las vibraciones de flexión de N-H y poca contribución de estiramientos C-C y flexión en plano de los enlaces C=O y que las bandas de absorción alrededor de 1083 y 1031 cm^{-1} están relacionadas con las vibraciones de estiramiento C-O de los residuos de carbohidratos presentes en la colágena y representa la amida I en los proteoglicanos. Con base en estos estudios, en los resultados obtenidos en esta tesis se ubicaron y se asignaron las bandas de absorción características. En los andamios puros de gelatina con diferentes proporciones cada uno (70, 80, y 90%), logramos identificar una banda ancha aproximadamente en los 3300 cm^{-1} , la cual se asignó a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H, los cuales se encuentran formando los grupos hidróxido de los diferentes aminoácidos presentes en la gelatina. También logramos identificar las bandas correspondientes a las amidas I, II y III, las cuales se ubicaron aproximadamente en los 1635, 1542 y 1080 cm^{-1} , respectivamente.

Por otro lado para el ácido hialurónico se han reportado bandas de absorción características de polisacáridos a los 3436 cm^{-1} las cuales se asocian a vibraciones de

estiramiento de los enlaces O-H, a 2921 y 2853 cm^{-1} tienden a asociarse a las vibraciones de estiramientos de los enlaces C-H de los grupos metilo, en 1647 cm^{-1} que se puede asociar a grupos carbonilos y en 1084 cm^{-1} aparece también una banda correspondiente a las vibraciones de los enlaces C-N alifáticos (Lago, 2007). Donghui, *et al.* en 2006 mostraron que los picos de absorción del AH aparecen a los 1616, 1411 y 612 cm^{-1} , estos tres son característicos de las amidas. También indicaron que las bandas de absorción a los 1149, 1045, 1078 y 946 cm^{-1} muestran la existencia de enlaces C-O-C; los picos en 3412 y 946 cm^{-1} provienen de la existencia de grupos hidroxilo y a los 1616 y 1377 cm^{-1} son causados por las vibraciones características de los carboxilos. Por otro lado en 2014, Lopes *et al.* mostraron que en el espectro del AH aparece una fuerte banda cerca de los 3412 cm^{-1} la cual es bastante ancha, que al igual que los autores antes mencionados, la asignaron a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H y N-H. También observaron un grupo de bandas superpuestas de intensidad moderada alrededor de los 2916 cm^{-1} , los cuales mencionan que se deben a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H. Las bandas en 1617 y 1411 cm^{-1} las atribuyeron a las vibraciones simétricas y asimétricas de los enlaces C-O de los grupos carboxilo y asignaron las bandas de absorción características de las amidas I, II y III a los puntos 1653, 1563 y 1320 cm^{-1} , respectivamente. También Zhang, *et al.* en 2011 encontraron que los espectros de los andamios puros de AH presentaron picos de absorción en los 1650, 1545, 1455 y 1080 cm^{-1} que asignaron a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C=O (amida I), a las vibraciones de flexión de los enlaces N-H (amida II) y a los estiramientos de los enlaces C-O y C-H, respectivamente. Y a los picos de absorción en los 1048 cm^{-1} los asignaron a las vibraciones de los enlaces C-O-C y las bandas de absorción en 1414 y en 1614 cm^{-1} las asignaron a las vibraciones simétricas y asimétricas de los enlaces en los grupos carboxilo.

Para todos los andamios puros de ácido hialurónico fabricados en esta tesis (10, 20 y 30 %) también logramos identificar bandas características alrededor de los 3300 cm^{-1} , que al igual que en los espectros de la gelatina, también fue una banda ancha que asignamos a las vibraciones moleculares de los grupos hidroxilos y vibraciones de los enlaces N-H. Después, el pico de absorción a los 2892 cm^{-1} se asignó a los enlaces C-H de los grupos metilo, a los 1600 cm^{-1} aproximadamente se asignaron las vibraciones de los enlaces

presentes en los grupos carboxilos y de igual manera que en los andamios de gelatina se asignaron las bandas de absorción a las amidas I, II y III alrededor de los 1600, 1570 y 1376 cm^{-1} , respectivamente.

Para los andamios con diferentes proporciones de Ge-AH entrecruzados y no entrecruzados, encontramos que Zhou, *et al.* en 2013 realizó FTIR de andamios de Ge/AH, en donde identificaron una banda de absorción intensa cerca de los 3425 cm^{-1} indicando la presencia de enlaces O-H, como ya se venía mencionando con los andamios puros de Ge o AH. También identificaron picos de absorción representativos de estos hidrogeles alrededor de 1646 y 1558 cm^{-1} , los cuales asignaron a las amidas I y II, respectivamente. Choi, *et al.* en 1999, fabricaron andamios de Ge-AH y mediante espectroscopía de rayos infrarrojos identificaron picos de absorción característicos en los 1654 cm^{-1} que asignaron a las amidas I, en 1549 cm^{-1} a las amidas II, en 1495 cm^{-1} a las amidas III, vibraciones de estiramiento simétrico de las sales de carboxilato en los 1406 cm^{-1} y vibraciones de enlaces éster en los 1100 cm^{-1} . Ellos discuten que a pesar de que no aparecieron nuevos picos de absorción visibles antes y después del proceso de entrecruzado, sí lograron observar un ligero aumento en las amidas I, II y III y una disminución en las bandas correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los grupos carboxilo e hidroxilo, esto debido a la reacción que favorece el EDC entre ellos para formar enlaces amida y éster.

Basándonos en los resultados obtenidos por los autores antes mencionados, identificamos bandas de absorción características de andamios de Ge-AH entrecruzados y no entrecruzados. Alrededor de los 3300 cm^{-1} , se identificó la misma banda de absorción ancha presente en los andamios puros de gelatina y de ácido hialurónico, la cual también fue asignada a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H, en este pico de absorción se observó una ligera disminución en los andamios entrecruzados. Las bandas de absorción correspondientes a las amidas I, II y III, también fueron características y se asignaron alrededor de los 1630, 1540 y 1444 cm^{-1} , respectivamente. Una banda de absorción alrededor de los 1400 cm^{-1} fue asignada a las vibraciones de los enlaces presentes en los grupos carboxilo, la cual disminuyó ligeramente en los andamios entrecruzados. Y finalmente una banda de absorción a los 1070 cm^{-1} se asignó

a los enlaces éster. En los resultados obtenidos de los andamios de Ge-AH entrecruzados y no entrecruzados, las diferencias fueron muy ligeras en la disminución de las bandas de absorción asignadas a los enlaces O-H y los grupos carboxilo en los andamios entrecruzados, lo que se puede explicar debido a la participación de estos en la formación de enlaces amida que provoca el EDC, como lo menciona Zhang y cols. en 2011. Al igual que ellos, tampoco observamos la formación de nuevos picos, debido a que las bandas de absorción de los grupos amidas y éster presentes en la gelatina y el ácido hialurónico se superponen con los recién formados después de ser entrecruzados. El uso de EDC ha sido ampliamente utilizado para la reticulación de proteínas y polisacáridos a través de la formación de enlaces amida y éster entre los grupos de las cadenas laterales.

Capacidad de absorción

Una buena capacidad de absorción de agua hace que los andamios tengan condiciones favorables para la adhesión y el crecimiento celular, ya que pueden contener dentro de su estructura fluidos ricos en nutrimentos durante el cultivo *in vitro* y como implante en el cuerpo (Zhang, *et al.*, 2011). además de que se tienen reportes de que el ambiente húmedo en una herida muestra una reepitelización acelerada, ya que al no perder fluidos, los andamios son capaces de retener las diferentes citocinas (Maver, *et al.*, 2015) que facilitan la estimulación de células involucradas en la reparación de la herida. Por el contrario, en un ambiente seco no se retienen los nutrientes y citocinas necesarias y la matriz extracelular se deshidrata, las células mueren y se forma una costra en donde los queratinocitos deben migrar por debajo hasta alcanzar el tejido viable y reparar la herida. Por lo cual, este proceso consume más tiempo y energía y retrasa el cierre de la herida (Noorjahan & Sastry, 2004).

Como se pudo observar en los resultados, los andamios de Ge-AH entrecruzados y con la membrana de PDMS presentaron y mantuvieron su capacidad de absorción de PBS. únicamente los que no fueron capaces de mantenerla fueron los andamios no entrecruzados que por ausencia de enlaces formados por el EDC se desintegraron en tiempos cortos. Sin embargo, los andamios entrecruzados y los andamios entrecruzados

con la membrana de PDMS mantuvieron esta capacidad por más tiempo. Con la fórmula utilizada en este trabajo se obtuvo la capacidad máxima de absorción, pero cabe mencionar que los andamios fueron capaces de absorber cantidades mayores a 1000 % de su peso, ya que los andamios secos, llegaban a pesar miligramos y húmedos podían alcanzar hasta los 2 gramos, sin embargo, estos datos no se reportaron y solo se reportó el comportamiento de que tanto incrementaban su peso después de estar sumergidos en PBS durante diferentes tiempos.

Una diferencia que se observó fue que los andamios de Ge-AH con diferentes proporciones entrecruzados y con la cubierta de PDMS absorbieron menos PBS en las primeras horas que el resto de los andamios. Esto lo podemos atribuir a que el PDMS al ser hidrofóbico lograba impedir un poco la entrada de la solución al andamio, ya que al colocarlos en el PBS los andamios flotaban y no se humedecían por completo, sin embargo, con el paso del tiempo lograron absorber tanto PBS como los andamios que no tenían membrana de PDMS. En esta prueba, como se comentó en los resultados, no se observaron diferencias significativas con relación a las proporciones de Ge-AH y esto lo podemos atribuir de nuevo a que la estructura porosa homogénea de los andamios también influyó en la capacidad de absorción, ya que los poros son los espacios en donde puede entrar el agua y al igual de lo que se obtuvo con el diámetro de los poros entre estos andamios. Creemos que se podrían observar diferencias significativas se manejan mayores proporciones de AH, por ejemplo, mayores al 50 % como lo demostró Zhang, *et al.*, en 2011.

Degradación

Los andamios para ingeniería de tejidos deben ser biodegradables y eventualmente deben ser eliminados del cuerpo, ya que tienen que ser reemplazados por nuevo tejido (Collins & Birkinshaw, 2013). Los andamios y/o constructos no se pretende que sean implantes, por lo tanto, deben tener una vida media efectiva dependiendo del tejido a reparar, en donde la degradación no sea inmediatamente después de ser implantados o bien que tarden mucho en degradarse y afecten el cierre de la herida. Además, los subproductos de la degradación tampoco deben ser tóxicos y no deben interferir con la función de otros órganos (O'Brien, 2011). Incluso se ha demostrado que las células

sembradas sobre andamios biodegradables se distribuyen en todo el andamio y presentan tasas mayores de proliferación, migración y síntesis de MEC en comparación con células sembradas en andamios no biodegradables (El-Sherbiny & Yacoub, 2013).

Los andamios que fabricamos para este trabajo mostraron tasas de degradación diferentes, en primer lugar, encontramos diferencias entre los andamios que se entrecruzaron con EDC y los que no estaban entrecruzados. Esto debido a que como ya se mencionó en EDC forma enlaces covalentes entre los grupos funcionales de las moléculas de los polímeros, en este caso, entre la gelatina y el ácido hialurónico, por lo que la degradación fue menor en estos andamios. Los andamios entrecruzados y con la cubierta de PDMS presentaron aún menores tasas de degradación, lo que podemos atribuir a que probablemente el PDMS por su hidrofobicidad y por ende evitar la entrada de solución de colagenasa I al andamio, retrasó el proceso de degradación, o bien que la membrana de PDMS al mantener la estructura unida evitara que el andamio se hinchara más y más y comenzara a perder su estructura como sucedió con la absorción de PBS. En segundo lugar, la concentración de gelatina disminuyó las tasas de degradación, lo que podemos explicar debido a que probablemente la gelatina tienda a formar más enlaces ya que presenta una mayor cantidad y diversidad de grupos funcionales con los cuales pueda reaccionar el EDC a diferencia de los grupos funcionales que presenta el AH. Algo similar explican en sus resultados Zhang y cols. en 2011, dicen que el AH es un GAG no sulfatado que solo tiene dos tipos de grupos funcionales positivos: los grupos carboxilo y los hidroxilo, lo que hace que sea difícil de entrecruzar por agentes químicos como el EDC. Sin embargo, para poder afirmar estas suposiciones, es necesario realizar otro tipo de experimentos enfocados al análisis de reacciones, pero en términos de este trabajo nos quedamos con los datos que nos dicen que los andamios entrecruzados y con la cubierta de PDMS tienen menores tasas de degradación y al igual que si se incrementan las proporciones de gelatina.

En este trabajo se utilizó colagenasa tipo I (MMP-1), la cual es una enzima que escinde las colágenas tipo I, II, III, VII y X, a tres cuartos de distancia del extremo amino terminal en cada una de las tres cadenas polipeptídicas que forman la triple hélice. La colagenasa segmenta las cadenas $\alpha 1(I)$ en un enlace Gly-Ile (residuos 775y 776) y la cadena $\alpha 2(I)$ en

una unión Gly-Leu en la región homóloga. En realidad la colganeasa del fibroblasto humano cataliza muchas escisiones en las cadenas desnaturalizadas de todos los tipos de colágeno a nivel de las uniones Gly-Ile y Gly-Leu (Goldsmith, *et al.*, 2009), incluso se ha reportado que la gelatina, entactina, agrecano y tenascina también son sustratos de la colagenasa I (McCawley & Matrisian, 2001).

Existen otras MMP's que degradan específicamente gelatina, como lo son la MMP-2 y la 9 que degradan gelatina tipo A y B, respectivamente (McCawley & Matrisian, 2001), sin embargo, en este estudio se decidió trabajar con colagenasa I, debido a que también degrada gelatina y está involucrada en el recambio normal de la colágena de la piel. Cabe mencionar que con el ensayo realizado en este trabajo obtuvimos resultados preliminares del patrón de degradación de los andamios, pero deben complementarse con estudios de degradación *in vitro* con MMP-9 y hialuronidasa, las cuales son enzimas que degradan de manera específica a la gelatina y al ácido hialurónico. Una vez obtenidos estos resultados se puede proceder a realizar pruebas de degradación *in vivo*.

Citocompatibilidad

La compatibilidad celular es una característica fundamental para todos los andamios o materiales que pretendan estar en contacto con algún tejido vivo, por lo tanto, las pruebas de compatibilidad *in vitro* son necesarias para la caracterización de cualquier andamio.

La prueba que se utilizó para evaluar la compatibilidad *in vitro* fue mediante el kit live/dead , el cual marca las células vivas viables con verde fluorescente debido a que utiliza calceína AM, que es un reactivo que es transportada a través de la membrana y dentro de las células las esteraras provocan cambios en la calceína y la transforman en un compuesto fluorescente. Por otro lado, las células muertas son teñidas de color rojo debido a que presentan dañada su membrana, el homodímero-1 de etidio pasa al interior de las células debido al daño y se unen al material genético, una vez que se unen al material el compuesto se estabiliza e incrementa su fluorescencia.

En el primer ensayo que se realizó a las 24 h y que se observó con microscopía de fluorescencia las células presentes en el andamio fueron muy difíciles de enfocar y

fotografiar, ya que las células se encontraban en diferentes planos adheridas a las fibras del andamio, por lo tanto, al querer enfocar una, las otras se veían como puntos verdes difusos. Aunado a esto los andamios al ser transparentes difractaban la luz y complicaba aún más el observar y fotografiar las células. El ensayo también se realizó a los tres días y se observó con microscopía de fluorescencia pero a pocos aumentos, como se puede observar en la figura 16, sin embargo, se decidió realizar microscopía confocal para poder observar detalladamente las células sobre los andamios. En los resultados las células presentes a las 24 h de cultivo fueron menos que en los cultivos a tres días, empero, lo que quería evaluarse con esta prueba era la viabilidad de las células después de estar poco tiempo en contacto con el andamio.

Con los resultados obtenidos, como ya se mencionó brevemente, no hubo diferencias significativas entre los andamios entrecruzados con y sin la membrana de PDMS, y tampoco hubo diferencias entre las diferentes proporciones de gelatina y ácido hialurónico que se utilizaron para fabricar los andamios. Estos resultados nos indican que los andamios con las proporciones de Ge-AH que se utilizaron en este trabajo y el proceso de entrecruzamiento no afectan la viabilidad de las células, incluso la presencia de la membrana de PDMS tampoco interfiere o provoca daños a la integridad de las células.

Se ha reportado que el proceso de entrecruzamiento a menudo puede dejar residuos que vuelvan tóxicos a los andamios, como el glutaraldehído o como el mismo EDC. En trabajos previos del laboratorio se evaluaron diferentes concentraciones de EDC y encontramos que concentraciones por debajo de 50 mM no presentan efectos citotóxicos significativos (Jarquín, *et al.*, 2016). Con estos antecedentes se decidió trabajar con concentraciones de 30 mM de EDC y con los resultados de viabilidad que se obtuvieron en este trabajo, se corroboró que los andamios entrecruzados con EDC a esta concentración no vuelven citotóxicos a los andamios.

Se menciona esto del PDMS ya que al momento de entrecruzar o curar el polímero, no se logra entrecruzar al 100 %, sin importar si se modifican o extienden los tiempos y la temperatura del curado aproximadamente el 5 % del polímero permanece sin

entrecruzar y se puede extraer mediante solventes orgánicos. Estos oligómeros que pueden difundir libremente, a menudo son nombrados como especies de bajo peso molecular (por sus siglas en inglés: LMW), las cuales son responsables de las características de superficie de los elastómeros. Estas LMW pueden difundir hacia el medio de cultivo y pueden llegar a causar citotoxicidad o pueden interferir con vías de señalización fundamentales para el desarrollo y proliferación de las células (Regehr, *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos no indican que la membrana de PDMS fue inocua para las células.

Adhesión

La presencia de células adheridas a los andamios no presentó diferencias a los controles, en todos los andamios las células fueron positivas a vinculina citoplásmica, con filamentos de actina bien organizados, núcleos prominentes y una morfología alargada. Estos resultados nos indican que las concentraciones de Ge-AH el proceso de entrecruzamiento mediante EDC y la presencia de una membrana de PDMS, no son factores que modifiquen la adhesión celular, incluso se llegaron a observar células con morfología esférica sobre las fibras de los andamios, estas células presentaban marca de vinculina en su citoplasma y se encontraban adheridas a las fibras, ya que se alcanzaban a distinguir prolongaciones celulares tratando de rodear la fibra.

Cabe mencionar que la marca de vinculina fue citoplásmica en todas las células y en pocas de ellas se encontró de manera puntual como se esperaba que fuera la marca, cerca de la membrana colocalizando con extremos de los filamentos de actina, ya que la vinculina es una proteína involucrada en la formación de contactos focales, los cuales son agregados protéicos que unen las células con los componentes de la MEC mediante integrinas que se unen a los contactos focales y a su vez éstos con los componentes del citoesqueleto, como los filamentos de actina (Carisey & Ballestrem, 2011).

La vinculina se encuentra de forma citoplásmica en las células de forma inactiva plegada y cuando pasa a formar parte de los contactos focales cambia su estructura a una conformación desplegada (Brown & Izard, 2015). Esta información nos podría indicar que quizá las células no muestran contactos focales, pero esto no quiere decir que las

células no se encuentren unidas a los andamios, ya que existen otros tipos de proteínas que forman complejos de unión de las células con los componentes de la matriz extracelular y que debería analizarse en el futuro. Sin embargo, a pesar de no identificar contactos focales, las células estaban sintetizando vinculina que probablemente necesitaran más tiempo para formar estos complejos de adhesión, ya que no son las primeras interacciones que forman las células después de ser sembradas sobre algún sustrato. Aun así las células mostraron morfología alargada sobre las fibras de los andamios, lo que nos indica que estaban adheridas por otras interacciones, de no ser así no se hubieran encontrado células en los andamios después de realizar la inmunofluorescencia.

Expresión de procolágena

La procolágena I es una proteína citoplásmica que se encuentra dentro de vesículas en el citoplasma de la célula, es un precursor de la molécula de colágena, por lo tanto, realizar una inmunofluorescencia contra esta proteína nos ayudó a evidenciar la actividad de síntesis de colágena por los fibroblastos.

La presencia de procolágena I dentro del citoplasma de las células nos indicó que los fibroblastos se encontraban activos sintetizando moléculas de procolágena que movilizan hacia el espacio extracelular para formar fibras de colágena. En los resultados se puede apreciar que las células se adhirieron a las fibras de los andamios y que proliferaron, ya que si se comparan estas fotografías con los cultivos a las 24 h el número celular incrementa drásticamente y además, en todos los andamios se pudo observar la marca de procolágena y la disposición de las células al rededor y en el interior de los poros.

Tampoco en esta prueba se lograron observar diferencias significativas entre los andamios y sus variaciones, con lo que podemos decir que las proporciones de Ge-AH, el entrecruzado y la presencia de una membrana de PDMS no afectan la producción de colágena, sin embargo, en el futuro se piensa observar los andamios después de 7 días de cultivo con MEB y con tinciones como tricrómico de Masson o Herovici para poder

observar directamente las fibras de colágena neosintetizadas por los fibroblastos sembrados en los andamios.

Conclusión

En conclusión, podemos decir que los andamios de gelatina-ácido hialurónico en proporciones de 70-30, 80-20 y 90-10 entrecruzados con EDC y con una membrana de PDMS fabricados en este trabajo son prometedores para continuar con la investigación *in vivo*.

Los resultados obtenidos mediante MEB nos mostraron que la estructura interna de los andamios fue porosa e interconectada y que con el método de liofilización se utilizó las proporciones de Ge-AH y el tratamiento con EDC no modifican la media del tamaño de poro y en todos los andamios esta media fue adecuada para el cultivo *in vitro*.

La capacidad de absorción tampoco mostró diferencias significativas entre las diferentes proporciones de Ge-AH, sin embargo, se logró observar que los andamios con mayores proporciones de AH tienden a absorber ligeramente más solución y por ende se degradan ligeramente más rápido. En cuanto al proceso de entrecruzamiento logramos observar que los andamios no entrecruzados absorben grandes cantidades de PBS, pero no logran mantener su estructura a diferencia de los andamios que sí pasaron por el proceso de entrecruzamiento, los cuales absorben PBS de manera muy similar a los no entrecruzados, pero en este caso sí mantienen su estructura y por lo tanto su capacidad de absorción. De igual forma los andamios de Ge-AH entrecruzados y con una membrana de PDMS tienden a absorber menores cantidades de PBS en los primeros minutos y horas, sin embargo, con el paso del tiempo logran absorber la misma cantidad que los andamios que no presentan la membrana.

Por otro lado, el porcentaje de degradación de los andamios mediante colagenasa I nos mostró que los andamios con mayores proporciones de Ge presentan tasas de degradación menores que si se incrementa la cantidad de AH, que el proceso de entrecruzado disminuye también la tasa de degradación por los enlaces covalentes que realiza entre los polímeros y que de manera similar a lo que observamos en los resultados de la absorción, los andamios a los que se les coloca una membrana de PDMS,

retrasan ligeramente su degradación ya que la membrana ayuda a mantener estable su estructura.

Con las pruebas de infrarrojo obtuvimos espectros de absorción en los cuales pudimos observar que bandas de absorción características de los andamios de Ge-AH y que el proceso de entrecruzamiento con EDC no modifica dichos espectros. Las bandas de absorción identificadas fueron pertenecientes a vibraciones moleculares de los enlaces amida y éster formados por la reacción de entrecruzamiento y logramos encontrar en todos los andamios un patrón de bandeo característico de los andamios de Ge-AH.

El análisis de dispersión de energía de rayos X nos ayudó a saber el porcentaje en peso de los elementos presentes en la muestra (C, O y N) y con estos resultados mostramos que los andamios no presentan componentes extraños y que independientemente de las proporciones de Ge y AH con las que se preparen los andamios e incluso si se entrecruzan con EDC, los porcentajes no se modifican significativamente.

Finalmente con las pruebas *in vitro* se demostró que los andamios con las diferentes proporciones de Ge-AH entrecruzados con EDC y con una membrana de PDMS no provocan daños a las células, por lo cual podemos afirmar que no presentaron citotoxicidad, que los andamios presentaron una microestructura adecuada para la adhesión y proliferación de las células al andamio y que los fibroblastos cultivados sobre los diferentes andamios se encontraban sintetizando procolágena I, por lo tanto, los factores como la variación de proporciones de Ge-AH, el proceso de entrecruzamiento y la presencia de la membrana de PDMS no modifican o afectan la viabilidad, adhesión y la síntesis de fibras de colágena de los fibroblastos cultivados sobre los andamios.

Con todos los resultados obtenidos podemos fabricar andamios con diferentes proporciones de Ge-AH no solo para una aplicación cutánea, sino que se pueden modificar dichas concentraciones para poder aplicar estos andamios a diferentes tejidos. La membrana de PDMS es un complemento para fabricar un apósito dérmico que ayudará en la prevención de la deshidratación y la infección de la herida, fungiendo como una epidermis temporal. El utilizar la cubierta de PDMS nos da ventajas sobre los

sustitutos comerciales en donde la membrana de PDMS puede ser modificada en cuanto a su grosor y dimensiones, de esta manera nosotros tenemos el control sobre ella y podemos fabricar membranas más delgadas que permitan una mayor difusión de oxígeno hacia el lecho de la herida, lo cual frecuentemente es un problema en los apósitos o sustitutos dérmicos.

Como punto final, la fabricación de los andamios de Ge-AH con diferentes proporciones, entrecruzados con EDC y con una membrana de PDMS en nuestro laboratorio podría modificar el número de muertes por lesiones cutáneas. Además de que si se fabrican en el país los costos se reducirían y nuestro producto sería más accesible al público en comparación con los productos importados. Por ejemplo, no logramos obtener los costos de Integra (el “estándar de oro” en lesiones cutáneas en EUA), pero logramos obtener que el costo máximo que cubren las aseguradoras de gastos médicos en EUA por Integra es de entre \$30 y \$32 USD por cm^2 dependiendo de las prestaciones. En nuestro caso, calculando únicamente los costos por fabricación, el precio estimado de nuestro producto sería de aproximadamente de \$3.5 USD por cm^2 de tal modo que si se tiene una lámina de 60 cm^2 el precio sería de \$210 USD. Sin embargo, cabe mencionar que al costo estimado de fabricación se le deben hacer modificaciones debido a que en este costo no se incluyen las ganancias y costo de manufactura en cuanto a equipos y mano de obra, pero aun así creemos que el costo será más accesible que Integra. De esta manera se podría ayudar a la población para disminuir la mortalidad por lesiones cutáneas como lo son las quemaduras, las úlceras vasculares y las de pie diabético que son las principales y más importantes causas de muerte por lesiones en la piel en México.

Perspectivas

Como perspectivas del trabajo se tiene planeado continuar con la caracterización del andamio en términos de realizar pruebas de degradación con colagenasa I adicionando un grupo control para corroborar que la degradación fue debido a la colagenasa I y no al buffer en el cual se disolvió la colagenasa I. También se tiene pensado realizar pruebas para evaluar la permeabilidad de la membrana de PDMS al oxígeno y al agua, para que haya una buena difusión de oxígeno al lecho de la herida y que al mismo tiempo la membrana impida la pérdida de agua. Para la pruebas *in vitro*, se tiene pensado evaluar la proliferación de las células y posteriormente realizar pruebas de compatibilidad, degradación, inflamación y reparación del tejido en modelos *in vivo*. Además de que también se requiere hacer pruebas mecánicas para saber con qué proporción de Ge-AH los andamios presentan propiedades más similares a las de la piel.

Por otro lado, después de realizar la pruebas antes mencionadas, se pretende complementar el andamio con nanoesferas de quitosano que liberen factores de crecimiento como EGF, FGF o VEGF para estimular la proliferación y activación de fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, respectivamente. Cabe mencionar que dichos andamios se deben caracterizar *in vitro* e *in vivo*. Con estas mejoras se pretende obtener un sustituto dérmico que ofrezca mejores resultados en comparación con el “estándar de oro”: Integra. Cabe mencionar que dicho proyecto de investigación ya se encuentra en desarrollo en el laboratorio y se tiene contemplado realizar la evaluación *in vitro* e *in vivo* de los factores, ya que la fabricación y caracterización de las nanoesferas ya se tiene estandarizado en el laboratorio.

Si las pruebas *in vitro* e *in vivo* arrojan buenos resultados en cuanto a la biocompatibilidad, degradación y reparación del tejido se pretende continuar con experimentos de fase clínica para que estos sustitutos dérmicos puedan aplicarse a la población en general, ofreciendo mejores resultados a menores costos que los actuales.

Literatura citada

- Annabi, N., Nichol, J. W., Zhong, X., Ji, C., Koshy, S., Khademhosseini, A., & Deghani, F. (2010). Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Engineering: Part B*, *16*(4), 371-383.
- Badiavas, E. V., Abedi, M., Butmarc, J., Falanga, V., & Quesenberry, P. (2003). Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, *196*(2), 245-250.
- Broughton, G., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (Junio de 2006). The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and reconstructive surgery*, *117*(75), 12-34.
- Brown, D. T., & Izard, T. (2015). Vinculin-cell membrane interactions. *Oncotarget*, *6*(33), 34043-34044.
- Brusselaers, N., Pirayesh, A., Hoeksema, H., Richters, C., Verbelen, J., Beele, H., . . . Monstrey, S. (Febrero de 2010). Skin Replacement in Burn Wounds. *Journal of trauma and acute care surgery*, *68*(2), 490-501.
- Böttcher-Haberzeth, S., Biedermann, T., & Reichmann, E. (2010). Tissue engineering of skin. *Burns*, *36*, 450-460.
- Camci-Unal, G., Cuttica, D., Annabi, N., Demarchi, D., & Khademhosseini, A. (18 de Febrero de 2013). Synthesis and Characterization of Hybrid Hyaluronic Acid-Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules*, *14*(4), 1085-1092.
- Carisey, A., & Ballestrem, C. (Febrero de 2011). Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *European Journal of Cell Biology*, *90*(2-3), 157-163.
- Cavanagh, P. R., Lipsky, B. A., Bradbury, A. W., & Botek, G. (12 de Noviembre de 2005). Treatment for diabetic foot ulcers. *The lancet*, *366*, 1725-1735.
- Cebi, N., Durak, Z., Said Toker, O., Sagdic, O., & Arici, M. (2016). An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chemistry*, *190*, 1109-1115.
- Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., . . . Pillai, S. (25 de Noviembre de 2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International journal of molecular sciences*, *17*, 1-31.
- Chen, C.-M., Yang, C.-F., Huang, I.-Y., Shen, Y.-S., Shieh, T.-Y., Chen, C.-H., & Lee, H.-E. (October de 2004). Clinical evaluation of a new bilayer artificial dermis for repair of oral mucosal defects:report of two cases. *Kaohsiung Journal Medical Science*, *20*(10), 516-520.
- Choi, Y. S., Hong, S. R., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., & Nam, Y. S. (20 de Septiembre de 1999). Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. *Journal of biomedical research: Part A*, *48*(5), 631-639.
- Ciobanu, C. S., Groza, A., Iconaru, S. L., Popa, C. L., Chapon, P., Chifiriuc, M. C., . . . Predoi, D. (2015). Antimicrobial Activity Evaluation on Silver Doped Hydroxyapatite/Polydimethylsiloxane Composite Layer. *Biomedical research international*, *2015*, 1-13.
- Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate polymers*, *92*, 1262-1278.

- Debels, H., Hamdi, M., Abberton, K., & Morrison, W. (2015). Dermal Matrices and Bioengineered Skin Substitutes: A Critical Review of Current Options. *Plastic and reconstructive surgery*, 3, 63-72.
- Dirección general de epidemiología Anuario de morbilidad 1984-2015. (2015). *epidemiologia.salud.gob.mx*. Recuperado el 8 de Junio de 2017, de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
- Do, A.-v., Khorsand, B., Geary, S. M., & Salem, A. K. (2015). 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Advanced healthcare materials*, 4(12), 1-48.
- Donghui, F., Beibei, W., Zheng, X., & Qisheng, G. (2006). Determination of Hyaluronan by Spectroscopic Methods. *Journal of Wuhan University of Technology - Materials Science Edition*, 21(3), 32-34.
- El-Sherbiny, I. M., & Yacoub, M. H. (2013). Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global cardiology science and practice*, 38, 317-341.
- Goldsmith, L. A. y otros, 2009. *Fitzpatrick. Dermatología en Medicina General*. 7a edición ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food hydrocolloids*, 25, 1813-1827.
- González-Consuegra, R. V., Verdu, J., & Verdu, J. (4 de Diciembre de 2010). Quality of life in people with venous leg ulcers: an integrative review. *Journal of advanced nursing*, 67(5), 926-944.
- Gorgieva, S., & Kokol, V. (2011). Collagen-vs. Gelatine- Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. En R. Pignatello (Ed.), *Biomaterials applications for nanomedicine* (págs. 17-51). Europa: InTech.
- Grover, C. N., Cameron, R. E., & Best, S. M. (Junio de 2012). Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 10, 62-74.
- Guo, R., Xu, S., Ma, L., Huang, A., & Gao, C. (2010). Enhanced angiogenesis of gene-activated dermal equivalent for treatment of full thickness incisional wounds in a porcine model. *Biomaterials*, 31, 7308-7320.
- Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. (15 de Mayo de 2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453, 314-321.
- Harrison, R. H., St-Pierre, J.-P., & Stevens, M. M. (2014). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Year in Review. *Tissue engineering: Part B*, 20(1), 1-17.
- Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2012). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 223-236.
- Hersel, U., Dahmen, C., & Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24, 4385-4415.
- Hong, S. R., Chong, M. S., Lee, S. B., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., & Hong, S. H. (2004). Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue. *Journal of biomaterials science, Polymer edition*, 15(2), 201-214.
- Jarquín-Yañez, K., Arenas-Alatorre, J., Piñon-Zarate, G., Arellano-Olivares, R. M., Herrera-Enriquez, M., Hernandez-Tellez, B., & Castell-Rodríguez, A. E. (2016).

- Structural Effect of Different EDC Crosslinker Concentration in Gelatin-Hyaluronic Acid Scaffolds. *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, 6(2), 1-6.
- Jeffcoate, W. J., & Harding, K. G. (3 de Mayo de 2003). Diabetic foot ulcers. *The lancet*, 361, 1545-1551.
- Jui Y. L. (2010) Biocompatibility of chemically cross-linked gelatin hydrogels for ophthalmic use. *Journal of Mater Science*. 21, 1899-1911.
- Lago, M. G. (2007). Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones. *Tesis de doctorado* . La Habana, Cuba.
- Liu Tsang, V., & Bhatia, S. N. (2004). Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced drug delivery reviews* , 56, 1635-1647.
- Liu, H., Mao, J., Yao, K., Yang, G., Cui, L., & Cao, Y. (2004). A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(1), 25-40.
- Lloyd, C., Besse, J., & Boyce, S. (2015). Controlled Rate Freezing to Regulate the Structure of Collagen- GAG Scaffolds in Engineered Skin Substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* , 103(4), 832-840.
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue engineering: Part B*, 19(6), 485-502.
- Lopes, T., Riegel-Vidotti, I. C., Grein, A., Tischer, C. A., & De Sousa Faria-Tischer, P. (2014). Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. *International Journal of biological Macromolecules*, 67, 401-408.
- Lu, T., Li, Y., & Chen, T. (2013). Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 8, 337-350.
- Ma, B., Wang, X., Wu, C., & Chang, J. (2014). Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regenerative biomaterials* , 81-89.
- Ma, L., Shi, Y., Chen, Y., Zhao, H., Gao, C., & Han, C. (2007). In vitro and in vivo biological performance of collagen-chitosan/ silicone membrane bilayer dermal equivalent. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 2185-2191.
- McCawley, L. J. & Matrisian, L. M., 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(5), pp. 534-540.
- Macneli, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature, Insignth review* , 445, 874-880.
- Magaña Garcia, M., & Magaña Lozano, M. (2011). *Dermatología* (2ª edición ed.). México: Médica Panamericana.
- Mata, A., Fleischman, A. J., & Roy, S. (2005). Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems. *Biomedical microdevices*, 7(4), 281-293.
- Maver, T., Maver, U., Kleinschek, K. S., Rascan, I. M., & Smrke, D. M. (2015). Advanced therapies of skin injuries. *Wiener klinische Wochenschrift*, 127, 187-198.
- Mao, J. S., Feng liu, H., Yin, Y. J., De Yao, K. (2003). The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials*, 24, 1621-1629.

- Mekkes, J. R., Loots, M. A., Van der wall, A. C., & Bos, J. D. (2003). Causes, investigation and treatment of leg ulceration. *British Journal of dermatology*, *148*, 388-401.
- Metcalfe, A. D., & Ferguson, M. W. (2006). Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the royal society*, *4*, 413-417.
- Mizunuma, M., Yanai, A., Seno, H., & Hirabayashi, S. (2000). Experience in repair utilizing artificial skin for exposed bone surfaces. *European Journal of Plastic Surgery*, *23*, 305-308.
- Nedvetzki, S., Gonen, E., Assayag, N., Reich, R., Williams, R., Thurmond, R. L., . . . Naor, D. (2004). RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: A different interpretation of redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(52), 18081-18086.
- Noorjahan, S. E., & Sastry, T. P. (2004). An In Vivo Study of Hydrogels Based on Physiologically Clotted Fibrin–Gelatin Composites as Wound-Dressing Materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *71B*(2), 305-312.
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, *14*(3), 88-95.
- Organización para la cooperación y el desarrollo económico, OECD. (2016). *Crecimiento de mortalidad por diabetes mellitus por cada 100 mil habitantes*. Recuperado el 11 de Junio de 2017, de OECD.sat: <http://stats.oecd.org/#>
- Papini, R. (2004). Management of burn injuries of various depths. *British Medical Journal*, *329*(7458), 158-160.
- Pasparakis, M., Haase, I., & Nestle, F. O. (May de 2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *14*, 289-301.
- Pop, M. A., & Almquist, B. D. (2017). Biomaterials: A poten al pathway to healing chronic wounds? *Experimental Dermatology*, 1-4.
- Ragnarson Tennvall, G., & Apelqvist, J. (2004). Healt-economic consequences of diabetic foot lesions. *Clinical Infectious Diseases*, *39*(2), 132-139.
- Regehr, K. J., Domenech, M., Koepsel, J. T., Carver, K. C., Ellison-Zelski, S. J., Murphy, W. L., . . . Beebe, D. J. (2009). Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab Chip*, *9*(15), 2132-2139.
- Rodrigues, S. C., Salgado, C. L., Sahu, A., Garcia, M. P., Fernandes, M. H., & Monteiro, F. J. (2012). Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, *00A*(00), 1-15.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2016). *Histología Texto y Atlas Correlación con Biología Molecular y Celular* (7ª edición ed.). México: Wolters Kluwer.
- Sabino, M. A., Loaiza, M., Dernowsek, J., Rezende, R., & Da Silva, J. V. (2017). Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Revista latinoamericana de metalurgia y materiales*, *37*(2), 1-27.
- Saap, L. J., Donohue, K., & Falanga, V. (2004). Clinical Classification of Bioengineered Skin Use and Its Correlation with Healing of Diabetic and Venous Ulcers. *Dermatologic Surgery*, *30*(8), 1095-1100.

- Schulz, T., Schumacher, U., & Prehm, P. (2007). Hyaluronan Export by the ABC Transporter MRP5 and Its Modulation by Intracellular cGMP. *Journal of biological chemistry*, 282(29), 20999-21004.
- Seethapathy, S., & Gorecki, T. (2012). Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review. *Analytica chimica acta*, 750, 48-62.
- Shevchenko, R. V., Eeman, M., Rowshanravan, B., Allan, I. U., Savina, I. N., Illsley, M., . . . James, S. (2014). The in vitro characterization of a gelatin scaffold, prepared by cryogelation and assessed in vivo as a dermal replacement in wound repair. *Acta Biomaterialia* (10), 3156-3166.
- Shevchenko, R. V., James, S., & James, S. (2009). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the royal society*, 1-31.
- Shi, Y., Ma, L., Zhou, J., Mao, Z., & Gao, C. (Noviembre de 2005). Collagen/chitosan-silicone membrane bilayer scaffold as a dermal equivalent. *Polymers advanced technologies*, 16, 789-794.
- Tan, K. H., Chua, C. K., Leong, K. F., Cheah, C. M., Gui, W. S., Tan, W. S., & Wiria, F. E. (2005). Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 15(1,2), 113-124.
- Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Chemistry of crosslinking*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2013, de <http://www.piercenet.com/method/chemistry-crosslinking>
- ThermoFisher Scientific. (2017). *Photoreactive Crosslinker Chemistry*. Recuperado el 26 de Junio de 2017, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/photoreactive-crosslinker-chemistry.html>
- Valdez, B. (2014). *Milenio*. Recuperado el 11 de Junio de 2017, de http://www.milenio.com/politica/mil-amputaciones-pie-diabetico-Mexico_0_223177697.html
- Waymack, P., Duff, R. G., & Sabolinski, M. (2000). The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds. *Burns*, 26, 609-619.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (Mayo de 2004). Global Prevalence of diabetes, estimates for the year 200 and projections for 2030. *Diabetes care*, 27(5), 1047-1053.
- Wobma, H., & Vunjak-Novakovic, G. (2016). Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review. *Tissue engineering: Part B*, 22(2), 101-113.
- Xu, X., Jha, A. K., Harrington, D. A., Farach-Carson, M. C., & Jia, X. (2012). Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks. *Soft Matter*, 8(12), 3280-3294.
- Zhang, F., He, C., Cao, L., Feng, W., Wang, H., Xo, X., & Wang, J. (2011). Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. 48, 474-481.
- Zhong, S. P., Zhang, Y. Z., & Lim, C. T. (2010). Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 510-525.

Zhou, Z. H., Cao, D. F., Huang, T. L., Liu, L. L., Liu, Q. Q., Zhao, Y. M., . . . Yang, Z. M. (2013). Fabrication and characterisation of gelatin- hyaluronic acid/nanobioactive glass hybrid scaffolds for tissue engineering. *Materials Research Innovations*, 17(7), 532-536.