



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

UNIDAD DE INGENIERIA DE TEJIDOS TERAPIA CELULAR Y MEDICINA
REGENERATIVA

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA
IBARRA”

**“Biocompatibilidad *in vitro* de un andamio macroporoso de poli metil
metacrilato (pMMA) utilizando fibroblastos humanos”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ESTEFANÍA VÁZQUEZ SUÁREZ

DIRECTORA DE TESIS: María Cristina Velasquillo Martínez

ASESORA INTERNA: María de Lourdes Mora García



Ciudad de México

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **VÁZQUEZ SUÁREZ ESTEFANÍA**, con número de cuenta **413024693**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **11 de febrero de 2020** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

VOCAL Dra. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ*

SECRETARIO Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE Dr. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

SUPLENTE M. en C. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

El título de la tesis que presenta es: **Biocompatibilidad *in vitro* de un andamio macroporoso de poli metil metacrilato (pMMA) utilizando fibroblastos humanos.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 16 de enero de 2020

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA



“A veces la ciencia es más arte que ciencia, Morty. Muchos no lo entienden” –Rick Sánchez de la tierra C-137.

“De pequeño hacia muchos planes que jamás me salían. La vida es difícil pero debes seguir intentando” –Moisés Vázquez.

“Las lecciones que no causan algún dolor, no valen la pena. Después de todo, la gente no gana nada de brazos cruzados. Pero una vez superado el dolor, se gana un corazón tan fuerte que no puede ser vencido. Sí, un corazón de acero”

-Edward Elric



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, específicamente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por darme las herramientas necesarias para prepararme profesionalmente y ser de utilidad a la sociedad.

A mi directora de tesis, la doctora María Cristina Velasquillo por darme la oportunidad de realizar mi servicio social y este trabajo en el Instituto Nacional de Rehabilitación, junto a CONACYT por financiar esta tesis con el proyecto CONACYT BASICA 287405. Sin su experiencia, consejos y correcciones no hubiera sido posible la elaboración de esta tesis.

A todos los investigadores del departamento de biotecnología e ingeniería de tejidos por brindarme el material y técnicas que permitieron finalizar este proyecto exitosamente.

Un especial agradecimiento a la maestra Joseline Janai Hidalgo quien, aparte de brindarme su guía, conocimiento y paciencia, me ofreció su amistad y cariño a lo largo de este camino que fue la tesis, muchas gracias.

Agradezco a la doctora María de Lourdes Mora por sus correcciones, paciencia y disponibilidad que ha tenido en todo momento.

A Martha Valencia, por hacer las tardes de trabajo más llevaderas y divertidas.

A papá y a mi abuelita María, Dios los tenga en su santa gloria.

A mis padrinos mágicos Pilar y Noé, sin su amor y apoyo no sé dónde estaría ahora. Este logro es para ellos.

A mamá aunque este amargada y a Chibis mi hermanito, quien me presionaba tiernamente para que acabara y le invitaré pizza con mi próximo salario. Ya verás que así será. Gracias por esas tardes de anime.

A mi prometido Dani mapachín, prueba de que la gente correcta puede inspirarte a grandes cosas. Que mejor que compartir mi vida con alguien a quien admiro,



respeto y amo. Espero sea mutuo este sentimiento y podamos vivir más experiencias únicas, nuestro viaje recién empieza.

A mis amigos de toda la vida que sin querer se volvieron hermanos: Susana, Arely y Armando. No importa cuánto tiempo pase, son como el viento, siempre a mi lado.

A Sebastián, quien representa a esos amigos que nos enseñan valiosas lecciones y después deben marcharse para continuar solos.

A mis amigos de toda la carrera: Ivonne, Edith, Ángel, Angie, Fany Ortega, Ángeles, David, Luisote, Javier, Lily y ese amigo desaparecido que recién volvió, Gerardo. Gracias por estar conmigo, apoyarme y preocuparse por mí. Gente tan maravillosa como ustedes hacen que la vida valga la pena.

Un especial agradecimiento a mis amigas del laboratorio 5: Gabs y Jessi, mis cómplices de las travesuras más osadas. Por los buenos recuerdos que me lleve de aquellas mañanas y tardes, las quiero mucho. Que la vida nos siga juntando... para bien.



ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	8
II. RESUMEN	10
III. INTRODUCCIÓN	11
A. PIEL.....	11
B. CAPAS DE LA PIEL	11
C. EPIDERMIS.....	12
C.1 Capa basal	12
C.2 Capa espinosa	13
C.3 Capa granulosa.....	13
C.4 Estrato córneo.....	13
D. DERMIS	14
D.1 Componentes celulares de la dermis	15
D.2 Fibroblastos.....	16
D.3 Uso del fibroblasto en laboratorio.....	17
D.4 Fibroblastos alogénicos y autólogos	18
D.5 Aplicaciones clínicas	18
E. HIPODERMIS	19
F. LESIONES CUTÁNEAS	20
G. TRATAMIENTO DE LESIONES CUTÁNEAS	22
H. ESTADÍSTICA DE LESIONES CUTÁNEAS.....	22
I. INGENIERIA DE TEJIDOS Y APLICACIONES	23
J. POLIMEROS SINTETICOS	25
K. SINTESIS HIPE	27
L. SINTESIS HIPE NO ACUOSA.....	28
IV. JUSTIFICACIÓN.....	31
V. HIPÓTESIS.....	32
VI. OBJETIVO GENERAL	32
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	32



VIII. MÉTODO	33
CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS HUMANOS	33
Proliferación.....	33
Actividad metabólica	34
CORTE Y ESTERILIZACIÓN DEL POLIHIPE	35
Hidratación del poliHIPE	36
VIABILIDAD DE LOS FIBROBLASTOS EN EL POLIHIPE	36
ACTIVIDAD METABÓLICA DE LOS FIBROBLASTOS EN EL POLIHIPE.....	37
IX. RESULTADOS.....	39
CARACTERIZACIÓN FIBROBLASTOS HUMANOS	39
Proliferación.....	39
Actividad metabólica de FBS <i>In vitro</i>	42
PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD DEL POLIHIPE	43
Viabilidad sobre el poliHIPE.....	43
Actividad metabólica del poliHIPE	47
X. DISCUSIÓN	50
XI. CONCLUSIÓN	60
XII. PROSPECTIVAS	61
XIII. REFERENCIAS	62



I. ABREVIATURAS

A.A – Antibiótico/Antimicótico

ABS – Absorbancia

CT – Cell Traker®

CFATA – Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada

CV – Cristal Violeta

DES – Por sus siglas en inglés “Mezclas Eutécticas Profundas”

DMEM – Dubelcco’s Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxid

DNA – Por sus siglas en inglés “Ácido Desoxirribonucleico”

FGF – Por sus siglas en inglés “Factor de Crecimiento de Fibroblastos”

GODT- Por sus siglas en ingles “Observatorio de Donación y Trasplantes”

HE – Homodímero de Etidio

HIPes – Por sus siglas en inglés “Emulsiones Altamente Concentradas”

M - Merge

m² - Metros cuadrados

mm – Milímetros

MEC – Matriz Extracelular

µl - Microlitros

MTT - 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-1-il) bromuro de difeniltetrazolio

nm - Nanómetros

PBS – Phosphate Buffered Saline

PCL – Policaprolactona

pMMA – Poli Metil Metacrilato



poliHIPE – Polímeros sintéticos de emulsiones altamente concentradas

PP – Polipropileno

R² - Coeficiente de determinación

rpm – revoluciones por minuto

SFB – Suero Fetal Bovino



II. RESUMEN

Una de las características más desafiantes en la obtención de biomateriales es generar una estructura que mimetice la compleja arquitectura de la matriz extracelular, así como brindar el microambiente efectivo para la regeneración de un tejido. De esta forma, la obtención de andamios por síntesis HIPE (*High Internal Phase Emulsion*) ha sido atractiva por la versatilidad para generar poros e interconectividad, que da como resultado un material con una configuración macroporosa y jerárquica (varios tamaños de poros). También son de fácil preparación ya que se genera una emulsión a partir de una fase acuosa y una fase orgánica, sin embargo la síntesis acuosa puede ser limitante para algunos materiales. Para abordar este problema, se obtuvieron andamios macroporosos de poli metil metacrilato (pMMA) por síntesis no acuosa utilizando mezclas eutécticas profundas (DES) como una estrategia de química verde. En este trabajo se evaluó la biocompatibilidad del poliHIPE de pMMA con fibroblastos humanos *in vitro*. El análisis de biocompatibilidad se realizó por ensayos de viabilidad celular (Celltraker Green dye/homodímero de etidio y MTT) de fibroblastos humanos. Los fibroblastos cultivados en el poliHIPE de pMMA presentaron un incremento en la población a las 72 horas de cultivo. Los resultados mostraron que el poliHIPE no fue citotóxico ya que permite la adhesión y proliferación celular. Además, el poliHIPE posee una estructura estable, fácil de maniobrar *in vitro*. Con base en estos resultados, la síntesis de materiales macroporosos interconectados utilizando HIPE como plantilla, es un método prometedor en ingeniería de tejidos.



III. INTRODUCCIÓN

A. PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, con una extensión aproximadamente de 2 m², el espesor varía entre los 0.5 mm (en párpados) y 4 mm (en talón) y con un peso de aproximadamente 5 kg (Ross et al., 2006).

Las funciones principales de la piel son: evitar la entrada de patógenos (al ser semipermeable al agua y a sustancias de uso externo). Promover la regulación térmica, ayuda a conservar la temperatura corporal y sintetiza moléculas como lo es la vitamina D. Excreción de sustancia tóxicas (mediante sudoración) además de poseer receptores para el tacto, presión, calor, frío y dolor, proporcionando información al individuo sobre el medio ambiente que lo rodea (Portas et al., 2002).

B. CAPAS DE LA PIEL

La piel está compuesta por tres capas (**Figura 1**): epidermis, dermis e hipodermis.

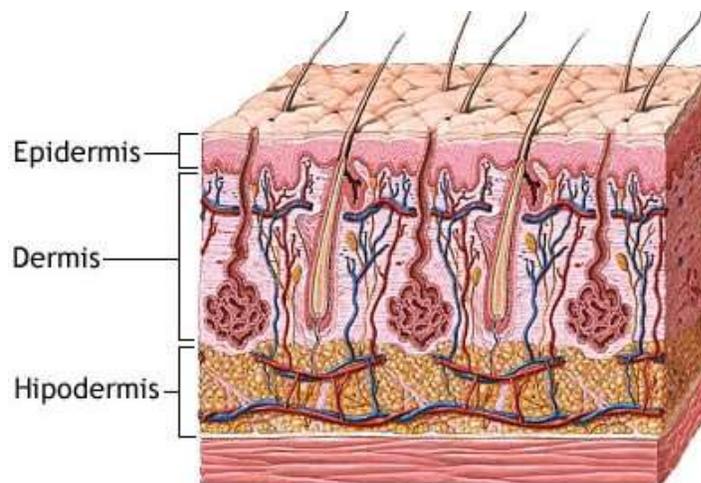


Figura 1. La imagen muestra la clara división de las capas de la piel en epidermis, dermis e hipodermis (Khavkin et al., 2011).



C. EPIDERMIS

La epidermis es una estructura en constante renovación que da origen a estructuras denominadas apéndices (uñas y glándulas sudoríparas). La epidermis posee un espesor de 0.4 a 1.5 mm. La mayor parte de las células en la epidermis son queratinocitos, los cuales se diferencian de manera progresiva a partir de las células proliferativas adheridas a la membrana basal epidérmica, hasta células terminales del estrato queratinizado (capa más externa que constituye la barrera de la piel). Intercaladas entre los queratinocitos se encuentran otro tipo de células como son: los melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y otras células como los linfocitos (habitantes transitorios escasos en piel sana). La epidermis a su vez, está conformada por cuatro capas: la capa basal, capa espinosa, capa granulosa y estrato córneo (Goldsmith et al., 2014).

C.1 Capa basal

La capa basal (estrato germinativo), constituida mayoritariamente por queratinocitos (80%), contribuye a los componentes que formarán la barrera epidérmica. La diferenciación del queratinocito (queratinización), consta de una serie de pasos complejos que da como resultado un queratinocito muerto, terminalmente diferenciado (corneocito), que contiene filamentos de queratina, proteínas de la matriz extracelular y una membrana plasmática reforzada por proteínas y lípidos asociados a superficie. Las queratinas son una familia de filamentos intermedios con papel estructural que constituyen una característica distintiva de todas las células epiteliales, incluyendo los queratinocitos (Goldsmith et al., 2014).

La capa basal contiene queratinocitos mitóticamente activos, en forma de columna que se adhieren mediante filamentos de queratina a la zona de la membrana basal y originan las células diferenciadas de las capas epidérmicas más superficiales. Otras células probablemente contenidas dentro de la capa basal, son células progenitoras de larga vida, las cuales tiene un extenso poder proliferativo y que también podrían estar localizadas en los folículos pilosos (Goldsmith et al., 2014).



C.2 Capa espinosa

Compuesta por células espinosas supra basales, cuya estructura, forma y propiedades tiene correlación con su lugar dentro de la epidermis media. Dichas células son de forma poliédrica y con un núcleo redondeado, a medida que se diferencian y se desplazan hacia arriba a través de la epidermis, se tornan progresivamente más planas y desarrollan orgánulos laminares, así como grandes fascículos de filamentos de queratina como son la K1 y K10 (Fox, 2008).

C.3 Capa granulosa

Denominada así por el predominio de gránulos queratohialinos, esta capa es el sitio de generación de numerosos componentes estructurales que formarán la barrera epidérmica, así como también numerosas proteínas que procesan estos componentes. Los gránulos queratohialinos están compuestos principalmente por profilagrina, queratina y loricina. En esta capa comienza a formarse la envoltura de células queratinizadas con la conversión de la profilagrina en monómeros de filagrina. Al irse degradando la filagrina se va formando la envoltura córnea en la queratinización epidérmica normal. Al terminarse el proceso, las células granulosa mueren por apoptosis, con excepción de los de los filamentos de queratina y la matriz de filagrina (Le Vay, 2008).

C.4 Estrato córneo

Proporciona a la piel protección mecánica, constituye una barrera para la pérdida de agua y la penetración de sustancias solubles desde el ambiente. La barrera está compuesta por una sub-barrera rica en proteínas y con escasa cantidad de lípidos, rodeados de una matriz lipídica extracelular. Tienen comportamientos independientes pero complementarios. La regulación de la permeabilidad, la descamación, la actividad de los péptidos antimicrobianos, la exclusión de toxinas y la absorción química selectiva, son funciones primarias de la matriz lipídica extracelular. Por otro lado, el refuerzo mecánico, la hidratación, la inflamación por citocinas y la protección del daño por rayos UV son todas las funciones a cargo de los corneocitos (Le Vay, 2008).



En la epidermis también existen células no queratinocíticas como los melanocitos (células dendríticas que segregan pigmentos) los cuales derivan de la cresta neural y residen en la capa basal. Las interacciones queratinocito-melanocitos son críticas para la homeostasis y diferenciación del melanocitos e influyen en la proliferación y formación de dendritas y mecanización (Le Vay, 2008).

Otros tipos celulares residentes en la epidermis, son las células de Merkel (células mecano-receptoras de adaptación lenta que se localizan en sitios de alta sensibilidad táctil) y las células de Langerhans (células dendríticas presentadoras antígenos) las cuales constituyen el 2 al 8% de la población total de la epidermis (Goldsmith et al., 2014).

D. DERMIS

La Dermis es un sistema integrado por elementos fibrosos, filamentosos, difusos y celulares del tejido conjuntivo en el que se localizan las redes vasculares y nerviosas, así como apéndices derivados de la epidermis. Esta capa de la piel también contiene muchos elementos celulares residentes como son los fibroblastos, macrófagos, mastocitos y células circundantes transitorias del sistema inmunitario (**Figura 2**). Existe interacción estrecha entre dermis y epidermis para mantener sus propiedades físico-químicas, colaborar durante el desarrollo de la morfogénesis y los apéndices epidérmicos, a la vez que: interactúan de igual manera en procesos de reparación y remodelación de la piel después de sufrir heridas (Goldsmith et al., 2014).

La dermis se extiende en dos regiones principales: a) dermis papilar superior y b) dermis reticular profunda. Estas regiones son fácilmente identificables en una sección histológica y difieren en la organización del tejido conjuntivo, la densidad celular y los patrones nerviosos y vasculares. La dermis papilar limita con la epidermis, se amolda a sus contornos y habitualmente posee un espesor que no supera el doble de la epidermis. La dermis reticular constituye la masa principal de la dermis, está compuesta principalmente por fibrillas de colágeno de gran diámetro, con fibras elásticas ramificadas que rodean a los fascículos. Las fibras elásticas y los haces de colágena aumentan de tamaño de forma progresiva hacia



la hipodermis. El plexo subpapilar, un plano horizontal de vasos, marca los límites entre la dermis papilar y reticular. El límite inferior de la dermis reticular se define por la transición del tejido conjuntivo fibroso al tejido conjuntivo adiposo de la hipodermis (Fitzpatrick, 2009).

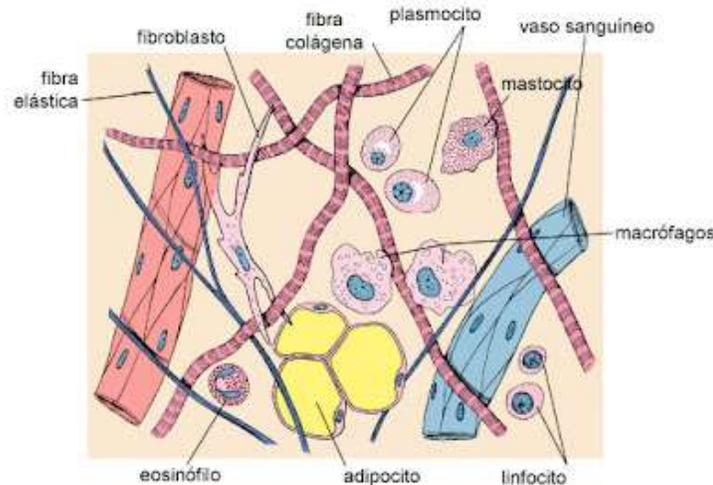


Figura 2. Dermis: sistema integrado de elementos fibrosos, difusos y celulares del tejido conjuntivo en el que se localizan las redes vasculares y nerviosas, los apéndices derivados de la epidermis; contiene muchos tipos de células residentes como fibroblastos, macrófagos, mastocitos y células circundantes transitorias del sistema inmunitario (Goldsmith et al., 2014).

D.1 Componentes celulares de la dermis

Fibroblastos, macrófagos y mastocitos son células habituales de la dermis, que se encuentra principalmente en la región papilar y rodeando los vasos del plexo subpapilar. También pueden ser localizados en la dermis reticular, en el intersticio entre los haces de fibras de colágena (Frantz et al., 2010).

El fibroblasto es una célula derivada del mesénquima y es responsable de la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz del tejido conjuntivo fibroso y no fibroso, y de numerosos factores solubles. Los fibroblastos proporcionan un marco estructural a la matriz extracelular (MEC), también promueven la interacción entre la epidermis y la dermis mediante la síntesis de mediadores solubles (Frantz et al., 2010). Más adelante se profundizará más sobre este tipo celular en específico.



Los monocitos, los macrófagos y los dendrocitos dérmicos constituyen el sistema fagocítico mononuclear de las células de la piel y son importantes en la presentación antigénica (Ross et al., 2006).

Los mastocitos son células secretoras especializadas que, en la piel, están presentes en gran densidad en la dermis papilar, en las vainas de los apéndices de la epidermis y alrededor de los vasos sanguíneos y nerviosos del plexo subpapilar. Secretan su contenido granular compuesto de histamina, heparina, triptasa, quimasa y factores anafilácticos, que actúan como mediadores en procesos inflamatorios (Ross et al., 2006).

D.2 Fibroblastos

Los fibroblastos (**Figura 3**) son las células más comunes y representativas del tejido conectivo. Son basófilos, fusiformes o aplanadas, miden aproximadamente entre 50 a 100 micras, con numerosas prolongaciones que se extienden entre haces de fibras extracelulares que la misma célula sintetiza, como el colágeno y glucoproteínas. El núcleo es esférico u ovoide, según la forma de la célula. Su apariencia morfológica varía de acuerdo con su estado funcional. Los fibroblastos que están fabricando activamente MEC, son voluminosos y poseen un núcleo de cromatina laxa y un nucléolo prominente. Contiene un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado y un notable aparato de Golgi (Ross et al., 2006).

El fibroblasto se encarga de elaborar proteínas como: 1) tropocolágena (proteína fibrosa que por su polimerización extracelular, da origen a las fibras de colágeno y reticulina), 2) elastina y fibrilina, 3) diversas glucoproteínas y 4) proteoglicanos. La porción de carbohidratos de los proteoglicanos, ricos en moléculas de glucosamina y grupos sulfato, se denominan glucosaminoglicanos (Eynard et al., 2008).

Los fibroblastos participan en la remodelación de la MEC endocitando y degradando los componentes estructurales o transformándose en células cargadas de filamentos contráctiles para favorecer los mecanismos de cicatrización. En estado de reposo los fibroblastos tienen un desarrollo menor de



sus organelos, adquieren una coloración más eosinófila y la cromatina nuclear se torna heterocromática. Cuando los fibroblastos se especializan en sintetizar fibras de reticulina, se denominan células reticulares, o elastocitos cuando producen la elastina, queratocitos en el estroma de la córnea y tenocitos en los tendones, denominaciones que hacen referencia a la gran capacidad adaptativa de esta célula. Su superficie contiene receptores para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF por sus siglas en inglés) (Eynard et al., 2008).

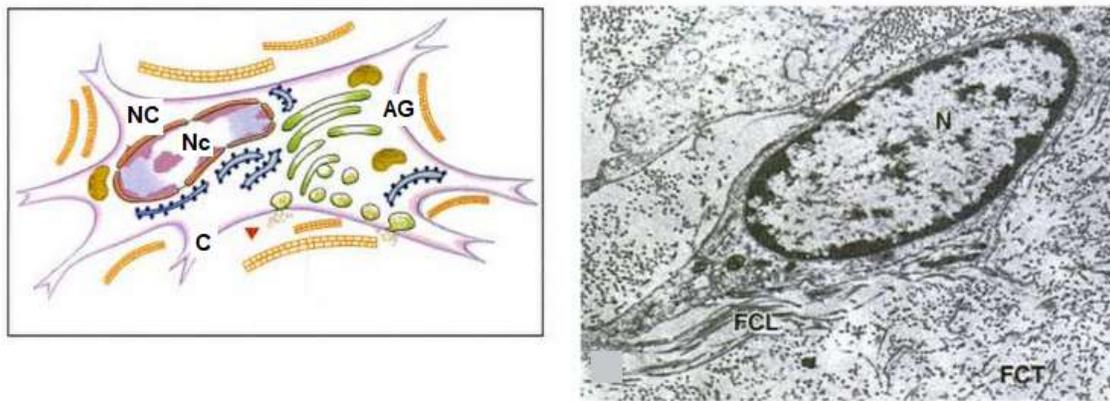


Figura 3. De izquierda a derecha, esquema de fibroblasto mostrando algunas organelos que lo componen: Núcleo (NC), nucléolo (Nc), aparato de Golgi (AG) y citoplasma (C). Micrografía del fibroblasto donde se distinguen las fibras de colágena. Tomado y modificado de Eynard y colaboradores, 2008.

D.3 Uso del fibroblasto en laboratorio

Los fibroblastos son células cultivadas frecuentemente *in vitro*, juegan un papel significativo en las interacciones epitelio-mesénquima secretando varios factores de crecimiento y citocinas que tienen efecto directo en la proliferación, diferenciación y formación de la MEC. Son una población heterogénea de células que se encuentran en distintos tejidos de origen mesenquimal. Sin importar el diferente sitio anatómico de los fibroblastos, todos tienen una morfología similar, sin embargo los estudios hechos con microarreglos de DNA, demostraron que, dependiendo del lugar anatómico, los fibroblastos tienen una expresión génica y características fenotípicas únicas al sintetizar proteínas de la MEC (Wong et al., 2007).



Los fibroblastos dérmicos tienen numerosas funciones, no solo depositar y sintetizar componentes de la MEC, también de la proliferación y migración en respuesta a factores quimiotácticos y modulación de citocinas, además de interacciones autocrinas y paracrinas (Wong et al., 2007).

D.4 Fibroblastos alogénicos y autólogos

Los fibroblastos son utilizados como herramienta para promover la cicatrización en la ingeniería de tejidos, pueden ser alogénicos o autólogos. Los fibroblastos autólogos ocasionan rechazo inmunológico. Sin embargo, existe un retraso en el cultivo de células autólogas, pues se debe esperar a que haya cierta confluencia celular, mientras que las células alógenicas normalmente criopreservadas con un número celular definido, pueden estar listas para ser utilizadas en los tratamiento de lesiones dérmicas. Para el uso de injertos permanentes, los fibroblastos autólogos son necesarios. Sin embargo, los fibroblastos alogénicos tienden a ser usados como apósitos biológicos o para el pre-acondicionamiento del lecho de la herida, antes de la aplicación de un injerto permanente. Utilizar fibroblastos autólogos en substitutos dermales, da mejores resultados en la regeneración dermal y minimiza la formación de cicatriz a comparación de los fibroblastos alogénicos (Lamme et al., 2002).

D.5 Aplicaciones clínicas

El cultivo de fibroblastos puede ser usado para aumentar la reparación de tejidos en una variedad de afecciones que van desde heridas agudas y crónicas hasta su aplicación estética y regenerativa. Los reemplazos cutáneos pueden ser acelulares o celulares y la adhesión de un componente celular dérmico estable como lo son los fibroblastos, dando el nombre de sustituto dérmico (Wong et al., 2007).

La manufactura de productos de ingeniería de tejidos es rigurosa y compleja, requiriendo una sepsis y prevención de contaminantes minuciosa; criopreservación del producto evitando la contaminación bacteriana o la degradación del mismo; fácil manejo por los médicos especializados y, desde un punto empresarial, con un costo-beneficio conveniente y accesible al público.



Como ejemplo de productos dermicos se tiene Dermagraft-TC (TransCyte®, La Jolla, USA) y Dermagraft® (Advanced BioHealing). Son sustitutos utilizados en México. Ambos son obtenidos a partir de un cultivo de fibroblastos neonatales dentro de un poli-gel (Vicryl™) y al ser aplicados se ha obtenido un grado de regeneración considerable, sin generar reacciones de rechazo y manteniendo la herida fuera de peligro de contaminación por microorganismos (Wong et al., 2007).

Sin embargo, por costo y por ser productos de importación, no están accesibles a todo el público en general.

E. HIPODERMIS

El tejido de la hipodermis aísla al cuerpo, sirve como suplemento de reserva energética, amortiguación y protección de la piel. El límite entre la dermis reticular profunda y la hipodermis es una transición abrupta de un tejido conjuntivo dérmico predominante fibroso a un tejido subcutáneo fundamentalmente adiposo. Las dos regiones siguen integradas de forma estructural y funcional, mediante redes nerviosas y vasos. Los folículos pilosos en crecimiento activo tensan la piel y se extienden hacia la grasa subcutánea, y las glándulas sudoríparas apocrinas y ecrinas se encuentran normalmente confinadas a esta profundidad de la piel (Le Vay, 2008).

Los adipocitos forman la masa celular principal de la hipodermis. Están organizados en lóbulos definidos por tabiques de tejido conjuntivo fibroso. Los nervios y vasos, están localizados dentro de los tabiques e inervan, nutren y drenan la región. La síntesis y almacenamiento de grasa continúa durante toda la vida por la acumulación facilitada en las células adiposas o por reclutamiento de nuevas células de mesénquima indiferenciadas (Le Vay, 2008).

La hormona leptina, secretada por los adipocitos, da una señal de retroalimentación a largo plazo que regula la masa adiposa. Los niveles de leptina son más altos en la grasa subcutánea que en la omental, lo que sugiere también un papel de esta hormona en el control de la distribución de grasa (Fitzpatrick, 2009).



Por último, se tiene conocimiento que en cuanto a daño mecánico, el tejido subcutáneo, está involucrado en diferentes trastornos inflamatorios (Fitzpatrick, 2009).

F. LESIONES CUTÁNEAS

La lesión cutánea es la pérdida de la continuidad y homogeneidad de la piel, resultando de una herida aguda o crónica. Las heridas agudas son aquellas causadas por traumatismo, intervención quirúrgica o quemaduras, mientras que los principales tipos de heridas crónicas son úlceras por presión, úlceras venosas y arteriales, úlceras de pie diabético, úlceras neoplásicas y dehiscencias (Federal, 2016).

Frente a mecanismos de daño agudos o crónicos que involucren la pérdida de la continuidad y homogeneidad de la piel, se activan mecanismos de reparación (**Figura 4**):

Homeostasis: Después de una herida cutánea, se encienden múltiples respuestas fisiológicas para detener la pérdida de sangre. El músculo liso contrae sus vasos sanguíneos para detener la pérdida de sangre, se produce la activación de plaquetas y factores coagulantes, que en conjunto con la fibrina, favorecen el cierre de la lesión y la migración de leucocitos, queratinocitos y fibroblastos (Sánchez et al., 2010).

Inflamación: Se presenta después de la lesión, por mediadores celulares denominados quimio-atrayentes, que inducen el infiltrado de células del sistema inmune (monocitos-macrófagos, células polimorfonucleares) las cuales favorecen la eliminación de las bacterias y la remoción de MEC dañada. La activación de dichas células favorecerá la secreción de factores que propicien la angiogénesis (Clark, 2001).

Proliferación: Los macrófagos, dan inicio a la fase de proliferación, al liberar factores de crecimiento que promueven la proliferación de fibroblastos y queratinocitos, como son: el factor de crecimiento derivado de plaquetas, FGF y



factor de crecimiento endotelial vascular, entre otros factores que promueven migración y proliferación celular, así como la formación de MEC (Clark, 2001).

Remodelación: Células progenitoras epidérmicas, comienzan la remodelación del tejido al diferenciarse a queratinocitos y reparando la capa epidérmica. Además se comienzan a formar nuevos vasos sanguíneos, gracias a la proliferación de fibroblastos, macrófagos y proteínas de la MEC, principalmente colágena tipo I y tipo III (Clark, 2001).

La curación de una lesión varía de acuerdo al tipo de herida y la extensión del tejido perdido. (Clark, 2001).

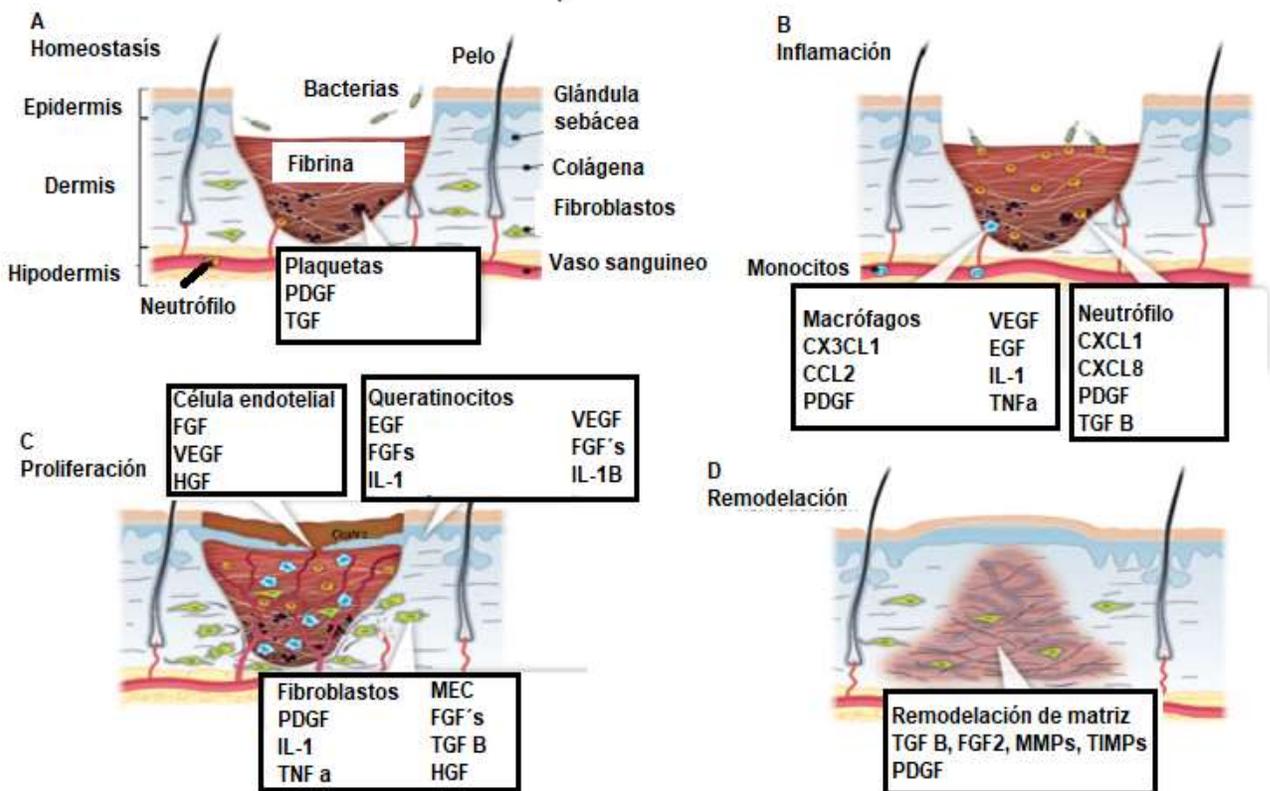


Figura 4. Etapas de la reparación de una lesión cutánea. Homeostasis, activación de plaquetas y factores coagulantes, que en conjunto con fibrina favorecen el cierre de la lesión; Inflamación, infiltrado de neutrófilos y macrófagos eliminan patógenos y residuos de tejido; Proliferación, gracias a fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales liberan factores de crecimiento que ayudan a la migración y proliferación celular; Remodelación, formación de vasos sanguíneos, proteínas de matriz extracelular y de la capa epidérmica, imagen obtenida (Bautista, 2018)



G. TRATAMIENTO DE LESIONES CUTÁNEAS

El tratamiento de una herida cutánea inicia utilizando suero fisiológico a temperatura ambiente o con agua y jabón neutro. Se debe evitar el agua fría porque retarda la cicatrización de la herida. No se debe irrigar a presión para no lesionar el tejido de granulación que empieza a desarrollarse (Trott & Díaz, 2006).

Es común la utilización de apósitos posterior a la sepsis de la herida. Un apósito es una cubierta, generalmente de algodón, estéril que se aplica para proteger la herida, también absorbe secreciones y facilita la curación (Trott & Díaz, 2006).

Los apósitos le brindan un ambiente húmedo a la herida. La humedad favorece la migración de leucocitos a la herida. Permite la acumulación de enzimas, favoreciendo la cicatrización. Rehidrata el tejido dañado además de prevenir la apoptosis y finalmente, promueve la angiogénesis y migración celular (Pujalte et al., 2008).

Los apósitos pueden ser 1) pasivos, como las gasas de algodón; 2) Bioactivos, los cuales interactúan con la herida. Están diseñados para mantener una humedad fisiológica y permitir la oxigenación. Estos se dividen en a) hidrocoloides, los cuales contienen peptina y colágeno favoreciendo la cicatrización. b) hidrogeles, hechos a base de agua, contienen propilenglicol y agentes absorbentes y c) alginatos, posee sales de calcio de ácido algínico que absorben exudados cutáneos y mantiene la homeostasis. Son utilizados en quemaduras, úlceras, zonas de donantes de injerto y en dermatitis agudas. 3) Apósitos mixtos, con diferentes niveles de permeabilidad que combina las características tanto de apósitos pasivos como bioactivos y se clasifican en absorbentes y desodorantes antimicrobianos (Pujalte et al., 2008).

H. ESTADÍSTICA DE LESIONES CUTÁNEAS

Las lesiones cutáneas afectan una amplia población de todas las edades y cuando se presentan lesiones que afectan capas más profundas de la piel, es necesaria la aplicación de diferentes intervenciones para asegurar el cuidado óptimo de los pacientes que las presentan. Se estima que en todo el mundo debido a lesiones cutáneas son realizadas 234 millones de cirugías por año, con una mortalidad



variando del 10% al 45%, teniendo un impacto negativo en la salud, la economía, las dimensiones física, social y psicológica de las personas que las padecen y de sus cuidadores (González et al., 2016).

I. INGENIERÍA DE TEJIDOS Y APLICACIONES

Como se ha mencionado con anterioridad, el daño en tejidos y órganos es considerado un problema de salud mundial. De acuerdo al Observatorio Mundial de Donación y Transplantes (GODT, por sus siglas en inglés *Global Observatory on Donation and Transplantation*) en 2015 se trasplantaron 126,670 órganos en todo el mundo, de los cuales 2,960 se realizaron en México (GODT, 2017) El número de personas que esperan un trasplante de órgano es muy alto, anudado a la escasez de donadores y el envejecimiento de la población, lo que ha promovido el desarrollo de nuevas tecnologías que aspiren a disminuir el número de trasplantes requeridos y mitiguen la escasez de donadores, para restaurar las funciones de los tejidos y órganos dañados (Seymor et al., 2002).

La ingeniería de tejidos es un área inter y multi-disciplinaria que conjunta la ingeniería de materiales y ciencias de la vida, con la finalidad de desarrollar estructuras biológicas para la reparación parcial o total de tejidos y órganos perdidos por daño o enfermedad (Langford et al., 2017). Busca el uso de estructuras porosas fabricadas, células y factores de crecimiento, llamadas típicamente andamios celulares.

Los andamios celulares son sintetizados de materiales tanto sintéticos como naturales y proveen una plataforma para la migración y adhesión de células en su superficie, mimetizando características del tejido u órgano que se intente reparar. Su estructura porosa interconectada, asegura la penetración celular y la difusión de nutrientes hacia las células dentro del material hacia la MEC. Además, permite la liberación de productos de desecho y subproductos de su degradación. Los andamios deben ser biocompatibles y biodegradables para evitar la necesidad de retirarlos quirúrgicamente, por lo tanto, su tiempo de degradación tiene que acoplarse con el de la formación del tejido de novo (Enríquez et al., 2011).



Los biomateriales son productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura y aceptable fisiológicamente, son temporal o permanentemente implantados en el cuerpo y tratan de restaurar el defecto existente en el cuerpo y conseguir la regeneración tisular (Landford et al., 2017).

Hay una gran diversidad de biomateriales sintéticos como pueden ser cerámicas, vidrios, aceros y otro tipo de aleaciones metálicas, polímeros sintéticos de múltiples clases, polímeros naturales, tejidos biológicos modificados etc. (**Figura 5**) (Lizarbe, 2007).

Existe una gran variedad de tejidos y órganos que se pueden beneficiar con el uso de los andamios celulares, como lo son: la piel, el hueso, cartílago y órganos enteros. (Colorado et al., 2013).

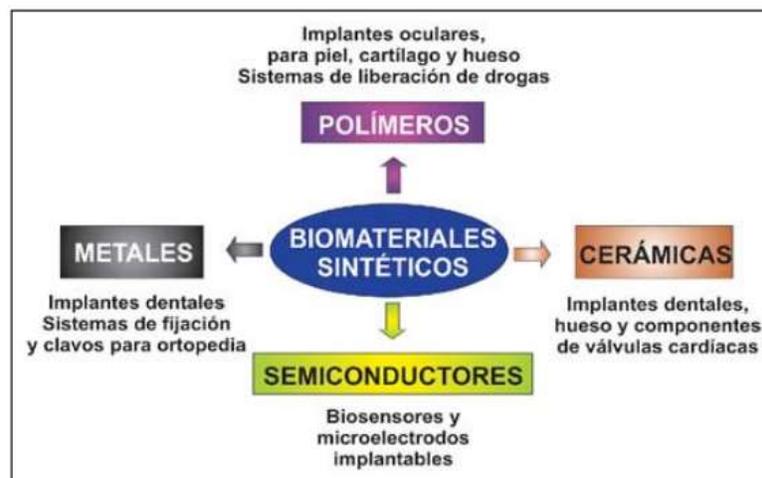


Figura 5. Clasificación de los biomateriales sintéticos de acuerdo a su composición química (Lizarbe, 2007).

Deben cumplir con propiedades biológicas, físicas, químicas y mecánicas aptas para procesos de locomoción y adhesión celular, tener baja toxicidad, alta promoción celular, estabilidad degradativa y un adecuado comportamiento térmico, entre otras características (Lizarbe, 2007). Existen materiales naturales como la *colágena* (usada como geles potenciadores de vascularización) la *fibrina*, sedas poliméricas de origen natural y el *quitosano*, un polisacárido lineal



compuesto de cadenas de D-glucosamina y de N-acetil-D-glucosamina; así como materiales sintéticos, cuyos beneficios radican las características modificables que poseen (Zhao et al., 2013).

J. POLÍMEROS SINTÉTICOS

La utilización de polímeros sintéticos en el campo de los biomateriales, dio inicio a finales de segunda guerra mundial. A los pilotos de guerra alemanes se les colocaba una cobertura en los ojos fabricada con poli metil metacrilato (pMMA) para evitar que pequeñas astillas pudieran cegarlos durante la batalla. Esto condujo al desarrollo de lentes intraoculares basados en este material; dicho polímero también se utiliza en odontología y en cirugía ortopédica como cemento para fijación de prótesis (Frazer et al., 2005). Con el tiempo se fueron incorporando otros polímeros, como el acetato de celulosa (componente de tubos de diálisis), el *dacron* (uso en injertos vasculares) y el polieteruretano (prótesis cardiacas) (Lizarbe, 2007).

Las propiedades físicas y estabilidad química de este grupo de biomateriales, dependen de un conjunto de variables tales como la composición química del polímero y de su grado de entrecruzamiento. Una de las ventajas que presentan, es que pueden dotarse de una amplia variedad de propiedades, incluso ser utilizadas junto a los polímeros naturales, favoreciendo así las propiedades mecánicas y biológicas del material tomando en cuenta el tejido blanco al cual vayan dirigidos (Wang et al., 2016).

Rodríguez et., al (2016) clasifica los polímeros de acuerdo con su origen, en petroquímicos (sintéticos) y recursos renovables (biopolímeros) (**Figura 6**).

Biopolímeros a partir de recursos renovables: son sintetizados naturalmente de plantas y animales, o totalmente sintetizados a partir de recursos renovables.

Biopolímeros a base de petróleo: se sintetizan a partir de recursos del petróleo pero son biodegradables al final de su funcionalidad.



Biopolímeros a partir de fuentes mixtas: fabricados de combinaciones de materiales de bases biológicas y monómeros derivados del petróleo.

Los polímeros sintéticos del tipo poliésteres alifáticos, como la polilactida, policaprolactona (PCL), poliglicólido y sus copolímeros son los más usados. El PCL ofrece biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad estructural y propiedades mecánicas, pero tiene baja bioactividad. El polipropileno (PP) tiene alta resistencia y durabilidad mecánica, se esteriliza con facilidad y es relativamente barato de fabricar. Una de las cualidades más deseables de PP para aplicaciones quirúrgicas es que se ha considerado biológicamente inerte. Los poliuretanos se pueden adaptar para aplicaciones específicas, pueden ser degradables o no degradables *in vitro*. En la ingeniería de tejidos, el colágeno mezclado con PCL incrementa el crecimiento de los fibroblastos y queratinocitos. La mezcla de PCL con poliuretano se ha aplicado en tejidos de células endoteliales (Rodríguez et., al 2016).

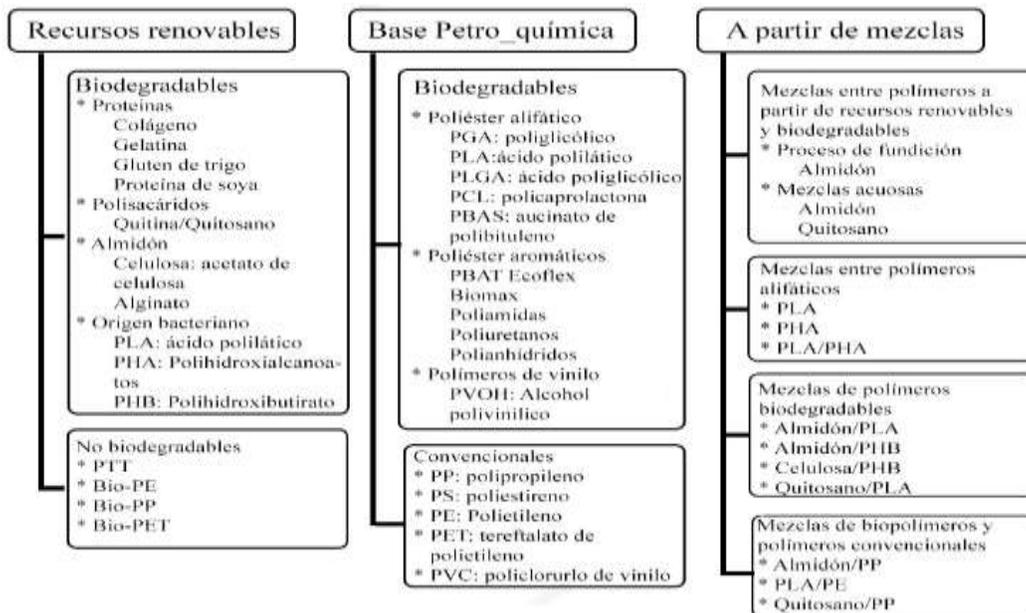


Figura 6. Clasificación de polímeros de acuerdo a su método de producción, biodegradabilidad y mezclas (Rodríguez et., al 2016)



Por lo anterior, los polímeros sintéticos son utilizados para crear andamios en ingeniería de tejidos implementando nutrientes y factores de crecimiento tratando así de restablecer estructura y función de tejidos u órganos (Wang et al., 2016).

K. HIPE

Una ruta interesante y novedosa para fabricación de polímeros sintéticos son las emulsiones altamente concentradas (HIPEs por sus siglas en inglés *high internal phase emulsions*) las cuales están constituidas por una fase continua que posee los monómeros que serán polimerizados y la fase interna (frecuentemente acuosa) que se encuentra dispersa en la fase continua en un volumen total de hasta el 80% de la emulsión que posteriormente es removida, lo que resulta en un material con estructura porosa. Esta porosidad del material lo hace un excelente candidato en la ingeniería de tejidos. Las propiedades morfológicas y mecánicas de los poliHIPEs pueden ser modificadas ajustando las condiciones de síntesis polimérica (Busby et al., 2000).

La base química de un HIPE son los disolventes, pues para crear la estructura polimérica de este tipo de andamios, se necesita un medio acuoso donde el monómero pueda integrarse y genere un andamio con propiedades morfológicas y químicas estables (Neira-Carrillo et al., 2013).

Una de las nuevas estrategias para HIPE, es una síntesis no acuosa en donde se utilizan líquidos inmiscibles llamados líquidos eutécticos o mezclas eutécticas profundas como disolventes (DES por sus siglas en inglés *Deep Eutectic Solvents*).

Una mezcla eutéctica es la composición única de dos o más sólidos inmiscibles que sufren un cambio completo de fase, de sólidos a líquidos a una temperatura precisa (**Figura 7**). El punto eutéctico es la temperatura de fusión mínima de todo el conjunto de composiciones. Un disolvente DES está formado por una mezcla eutéctica de dos o más sólidos que son líquidos a temperatura ambiente (Busby et al., 2000).

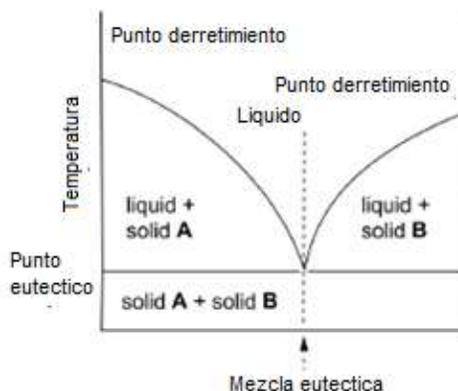


Figura 7. Diagrama de fase que representa una mezcla eutéctica. Tomado y modificado de Mota-Morales et al., 2011.

Mota-Morales et al. (2011) fueron pioneros en utilizar un DES para la polimerización de un andamio de ácido acrílico o ácido metacrílico para utilizarla en ingeniería de tejidos. También demostraron que se puede usar una amplia variedad de monómeros como componentes de los DES. Realizó pruebas con distintas temperaturas para liberación de fármacos y factores de crecimiento.

L. HIPE NO ACUOSA

Se han utilizado los DESs para preparar y polimerizar emulsiones HIPEs. Una emulsión consiste en una dispersión inestable termodinámica de gotas en una fase continua en un segundo líquido el cual es inmisible en el primero. Estos líquidos pueden estar estables por la adición del polímero o partículas sólidas, las cuales adsorben en la superficie de las gotas (Velasquillo et al., 2017).

Una emulsión HIPE contiene una fracción de volumen de la fase interna mayor a 74% y por lo tanto, es altamente viscosa. El primer criterio para la formación de los HIPEs es la presencia de dos líquidos inmiscibles, generalmente son líquidos hidrófobos. Usualmente, la formación de los HIPEs se realiza por la adición de la fase interna a una solución de surfactante en la fase externa, con agitación constante. Cuando se centrifuga una emulsión, las gotas son forzadas a estar en contacto con otras y se produce una deformación de estas en forma de poliedros.



La estabilidad de los HIPEs depende de la naturaleza y la concentración del surfactante, la naturaleza de cada fase líquida, la temperatura del sistema, el tamaño promedio de la gota y la tensión superficial entre las fases (Mota-Morales et al., 2011).

Una de las aplicaciones de los HIPEs en la ciencia de materiales, es su uso como plantillas para crear estructuras altamente porosas. Estos materiales se pueden producir si la fase interna de la emulsión se prepara como una fase continua que contiene uno o más especies monoméricas. Con la subsecuente eliminación de la fase interna se producen estos materiales altamente porosos (Silverstein, 2014).

Los PoliHIPEs (**Figura 8**) tienen morfologías complejas, poseen cavidades esféricas, conocidas como huecos las cuales se encuentran interconectadas. El tamaño del espacio total vacío dentro de los PoliHIPEs es relativamente grande como consecuencia de la porosidad e interconectividad del material, que resulta en un área superficial baja (Silverstein, 2014). Un material con distinto niveles de porosidad e interconectividad es esencial para la nutrición, proliferación y la migración celular en los andamio destinados a ingeniería de tejido (Loh&Choong, 2013).

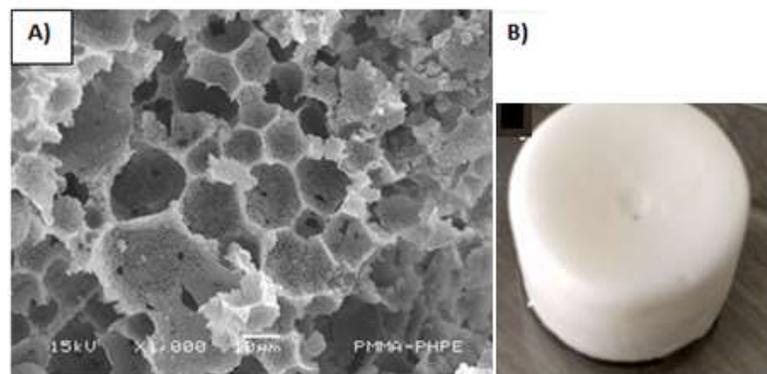


Figura 8. Munive (2018) sintetizo poliHIPEs a base de pMMA. A) Muestra una micrografía del poliHIPE-pMMA; se observan las cavidades porosas que ha adquirido gracias a la técnica de sintetizado. B) Es el poliHIPE-pMMA después de ser sintetizado, es color blanquecino y forma cilíndrica gracias al recipiente en que fue creado.



Munive (2018) sintetizó poliHIPEs-pMMA junto a diversos acrilatos, con una porosidad del 68%. El comportamiento térmico del DES era estable entre temperaturas de -60° a 120°C , además de reportar que debido a la alta viscosidad del DES, permitió limitar los procesos de difusión del HIPE y controlar así, la temperatura de polimerización de las emulsiones. Esto da como resultado un andamio con un alta estabilidad *in vitro*, por su baja descomposición.

Pérez-García et, al. (2015) también reportaron la síntesis de un poliHIPE usando un DES. La fase continua consistió en una mezcla de estireno:divilbenceno. Con el fin de obtener diferentes viscosidades, prepararon la fase interna combinando cloruro de urea, glicerol y etilenglicol con una relación molar 1:2. Después de la polimerización, realizaron una extracción Soxhlet con metanol por 12 h. Todos los poliHIPEs tuvieron conversiones entre 91 y 96% y ésta no se vio afectada por el tipo de fase interna. La cantidad de surfactante influyó en el tamaño de gota y la viscosidad de los HIPEs y en el diámetro de los poros. Aunque la morfología del material fue altamente porosa e interconectada de acuerdo a las micrografías, el área superficial fue baja.

La preparación de poliHIPEs utilizando DES provee la ventaja de utilizar un rango de temperaturas altas. La polimerización de los HIPEs se puede conseguir a bajo costo y sin condiciones especiales. Posee estabilidad estructural y química, así que puede ser considerado un candidato óptimo para su uso en ingeniería de tejidos.



IV. JUSTIFICACIÓN

A nivel global son realizadas 234 millones de cirugías por año causadas por lesiones cutáneas, con una mortalidad variando del 10% al 45%, teniendo un impacto negativo en salud, economía, sociedad y psicología del paciente que ha sufrido este tipo de lesión (González et al., 2016). Para ayudar a solucionar este grave problema de salud se desarrollaron sustitutos dérmicos, los cuales se encargan de reproducir la función del tejido cutáneo de forma segura y aceptable fisiológicamente mientras cura el tejido dañado en el menor tiempo posible y minimiza secuelas (Landgford et al., 2017).

Un sustituto ideal deberá ser biocompatible, fácil de manejar, económico y proveer al tejido dañado de componentes que promuevan curación o incluso regeneración del tejido u órgano (Lizarbe, 2007), y la gama de los materiales sintetizados por la técnica HIPE prometen ser un sustituto ideal gracias a su estabilidad estructural, química y bajo costo en producción (Silverstein, 2014). Sin embargo, al ser un campo innovador en la ingeniería de tejidos, son necesarias pruebas *in vitro* preliminares de biocompatibilidad que abrirán las puertas a estos materiales para futuros usos clínicos.



V. HIPÓTESIS

Si el andamio macroporoso de poli metil metacrilato (pMMA) es sintetizado sin el uso de solventes y con emulsiones de alta fase interna (HIPE), entonces se obtendrá un andamio con estructuras porosas que permitirán la viabilidad de los fibroblastos humanos.

VI. OBJETIVO GENERAL

Realizar pruebas de biocompatibilidad *in vitro* de un andamio macroporoso de poli metil metacrilato utilizando fibroblastos humanos.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la viabilidad de los fibroblastos sobre el andamio macroporoso pMMA
2. Estudiar la estructura de los fibroblastos sembrados sobre el andamio macroporoso de pMMA
3. Analizar la actividad metabólica de los fibroblastos humanos sobre el andamio macroporoso de pMMA



VIII. MÉTODO

CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS HUMANOS

Proliferación

Se utilizaron fibroblastos de prepucio infantil, donados por el acervo del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). Las células fueron cultivadas en DMEM (por sus siglas en inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, con 1% de antibiótico/ antimicótico (A.A) bajo condiciones de 5% de CO₂ a 37°C. Los fibroblastos eran utilizados una vez alcanzada la confluencia mínima del 90% en las cajas de cultivo.

Para caracterizar la viabilidad celular de los fibroblastos, se realizó una curva de proliferación con su respectiva curva patrón.

Curva patrón: En una placa de 24 pozos, fueron sembradas las concentraciones celulares de 1000, 2000, 5000, 10,000 y 20,000 por triplicado en 100 µl de medio completo (DMEM/10%SFB/1%A.A.), dejándose incubar 24 horas en 5% de CO₂ a 37°C.

Curva proliferación: En una caja de 24 pozos, fue sembrada la concentración celular de 3000 células en 100 µl de medio completo por triplicado para ser analizada 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

Recolección celular: La recolección de células se realizó por medio de la técnica de tripsinización. Esta técnica enzimática consiste en el uso de tripsina para separar las células adheridas de la caja de cultivo sin dañarlas. Primero se aspiró el medio completo de la caja de cultivo para después hacerle un lavado a los fibroblastos con PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*). Por cada caja confluyente se le agregaron 2 mililitros de tripsina y se dejó incubar en 5% de CO₂ a 37°C durante 5 minutos. Pasado el tiempo, la reacción de la tripsina se detiene utilizando el doble del volumen utilizado de la tripsina con medio completo.



Una vez detenida la reacción, las células se pasaron a un tubo falcón y centrifugadas por 5 minutos a 1500 revoluciones por minuto (rpm). Esto separó las células de la solución de tripsina. Y fueron sembradas de nuevo con medio completo (DMEM/10%SFB/1%A.A.)

La técnica de tripsinización se utilizó cada que era necesario expandir o recolectar muestras para los ensayos de esta tesis.

Técnica de Cristal Violeta (CV): Las placas de cultivo se trabajan en campana estéril. Se extrajo el medio completo y se realizaron dos lavados con PBS 1X. Se colocaron 100 µl de CV al 5% por pozo y se dejó adhiriendo durante 10 minutos en campana. Se retiró el CV por vacío.

Posteriormente, se le agregaron 100 µl de glutaraldehido al 1% por pozo para fijar las células. Se le realizaron dos lavados con PBS 1X para quitar exceso de colorante. Se dejó secar la placa de manera invertida a temperatura ambiente sobre papel absorbente.

En un tubo falcón se preparó una solución de ácido acético al 1.1% y a cada pozo se le colocaron 100 µl. Se dejó en agitación durante 20 minutos. El residuo fue analizado en lector de placas **Xmarck**, marca Bio-rad® utilizando una absorbancia de $\lambda=570$ nm.

Se tomaron fotografía de los distintos días de curva de proliferación en microscopio invertido Leica, marca Bio-optic®.

Actividad metabólica

Para saber la actividad metabólica de los fibroblastos en monocapa se realizó la reacción de formazán utilizando 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-1-il) bromuro de difeniltetrazolio (MTT formazán).

Se realizó una curva metabólica con su respectiva curva patrón.

Curva patrón: En una placa de 24 pozos, fueron sembradas las concentraciones celulares de 1000, 2000, 5000, 20,000 y 50,000 por triplicado en 100 µl de medio



completo (DMEM/10%SFB/1%A.A.), dejándose incubar 24 horas en 5% de CO₂ a 37°C.

Curva de crecimiento: En una placa de 48 pozos fue sembrada la concentración celular de 5000 células en 100 µl de medio completo por triplicado para ser analizada 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas.

Análisis de actividad metabólica: El MTT se preparó en un tubo eppendorf con una concentración de 1:10 MTT/medio completo. Primero se extrajo el medio completo de la placa y se realizó un lavado a las células con PBS 1X. Posteriormente, se colocó el MTT preparado y se dejó en incubación a 37°C con 5% de CO₂ durante 3 horas.

En un tubo Falcón, se preparó solución con concentración 1:1 de isopropanol/DMSO (dimetilsulfóxido). Pasado el tiempo de incubación del MTT, se le colocó la solución de isopropanol/DMSO. La solución restante compuesta por MTT/isopropanol/DMSO se colocó en una placa limpia para ser analizado en el lector de placas utilizando una absorbancia de $\lambda=750$ nm.

CORTE Y ESTERILIZACIÓN DEL POLIHIPE

Los poliHIPEs de PMMA son sintetizados en forma de cilindro alargado, de 3 cm de largo y 1.5 cm de diámetro. Para poder hacer las pruebas pertinentes de biocompatibilidad, se estandarizó el corte y esterilización.

Ocupando guantes, pinzas de reloj y bisturí estériles el andamio se cortó en caja Petri. Fue cortado de manera transversal con precisión, ya que suele romperse con facilidad. Se fueron cortando pequeñas fracciones que, con ayuda de una regla, tuvieran un diámetro de 3x3 mm, procurando obtener una forma homogénea.

Una vez obtenidos los fragmentos, se colocaron en una caja Petri estéril. Se esterilizaron por UV CrossLinker© durante 40 minutos. Cuando se retiraron del UV CrossLinker©, se protegieron en una caja Petri con Parafilm© alrededor de la tapa para mantener la esterilidad (**Figura 9(A)**).



Hidratación del poliHIPE

Se preparó medio de cultivo completo (DMEM/10%SFB/1%A.A.) y se calentó a 37°C. Dentro de la campana de flujo laminar se colocaron los poliHIPEs estériles en una nueva caja Petri con 500 µl de medio completo y se incubaron durante 24 horas en 5% de CO₂ a 37°C (**Figura 9(B)**).

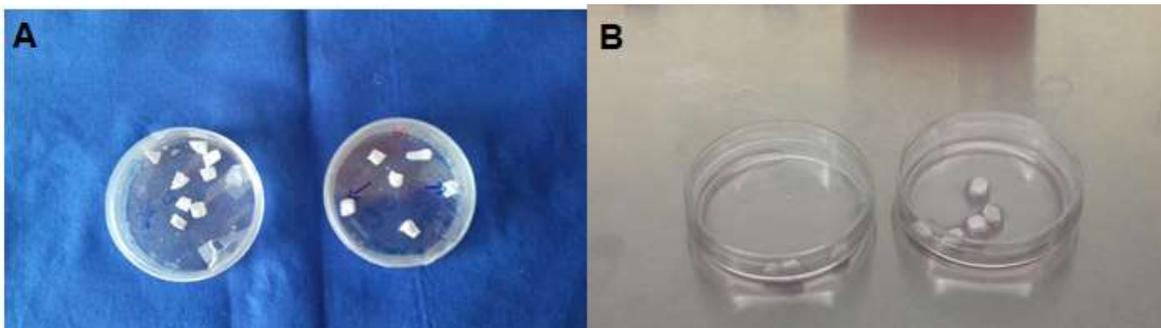


Figura 9. A) PoliHIPE estéril, B) PoliHIPE hidratado

VIABILIDAD DE LOS FIBROBLASTOS EN EL POLIHIPE

El ensayo se realizó en placa de 48 pozos. Se hizo un triplicado por cada día de ensayo; se evaluaron a las 24, 48 y 72 horas de cultivo, y se incluyó un control en monocapa para cada triplicado.

Marcaje de fibroblastos para evaluar viabilidad: Los fibroblastos se marcaron previamente con CellTracker™ Fluorescent Probes Green CMFDA (CT), marca Thermo Fisher Scientific. La dilución del reactivo se realizó en medio DMEM F12, sin suero y sin antibiótico/antimicótico. Por cada mililitro de medio, se le agregó 1 µl de CT. Se ocupó 2ml DMEMF12/2µl CT por el volumen de la caja de cultivo; se incubó por 40 min a 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, las células fueron recolectadas y se realizaron los cálculos pertinentes para el cultivo. Se determinó sembrar 200,000 células por poliHIPE, concentrando esta cantidad celular en 50 µl de medio completo (DMEM/10%SFB/1%A.A.).

El poliHIPE, una vez hidratado se le retiró el exceso de medio colocándolo en papel filtro estéril 3 minutos y utilizando pinzas, se colocaron por triplicado en placa de 48 pozos.



Siembra del control: Fue sembrado un control por cada día de cultivo establecido. Consistió en sembrar 200,000 células en un pozo que no tuviera el poliHIPE.

Siembra del poliHIPE: Los fibroblastos fueron sembrados en el poliHIPE por goteo con una densidad de 200, 000 células por 50 μ l. La gota se dejó ser absorbida por el poliHIPE en condiciones de 5% CO₂ a 37°C de 30 a 40 minutos y una vez absorbida se le colocó medio completo: 500 μ l fueron suficientes para cubrir el polímero. Se hizo cambio de medio cada 24 horas.

Marcaje de fibroblastos para mortandad: Antes de analizar el poliHIPE, fueron marcados con homodímero de etidio (HE). Se les extrajo el medio al pozo donde se encuentra el poliHIPE y este se lavó tres veces con PBS 1X. Aparte en un tubo eppendorf, se preparó la solución de HE. Por cada mililitro de medio completo se ocupó 1 μ l de HE. Se colocó la solución de HE/medio completo al poliHIPE y se incubó 40 minutos a 5% de CO₂ a 37°C. Una vez concluido el tiempo, se extrajo la solución y se lavó tres veces con PBS 1X. Los polímeros se pasaron a caja Petri con PBS y a partir de este punto, fue posible maniobrarlos fuera de la campana.

Observación y toma de fotografía: Se ocupó un microscopio de fluorescencia Carl ZEISS®. Utilizando pinzas, se colocó el poliHIPE en portaobjetos. Se tomaron fotografías a una emisión/excitación de 528/617 nm para visualizar el HE y a 492/517 nm para visualizar el CT.

ACTIVIDAD METABÓLICA DE LOS FIBROBLASTOS EN EL POLIHIPE

El ensayo se realizó en placa de 24 pozos. Se hizo un triplicado por cada día de ensayo evaluando 24, 48 y 72 horas de cultivo. Además, se contemplaron un control de monocapa y un control poliHIPE.

Siembra de control en monocapa: Fue sembrado un control por cada día de cultivo establecido. Consistió en sembrar 200,000 células en un pozo que no tuviera el poliHIPE.



Control poliHIPE: Se colocó un poliHIPE sin células con medio completo (DMEM/10%SFB/1%A.A.) por cada día de cultivo establecido, el cual fue sometido al mismo tratamiento que los poliHIPES con células.

Siembra de poliHIPE: La técnica de sembrado fue la misma utilizada para saber la viabilidad del poliHIPE.

Análisis de actividad metabólica: Se realizó el mismo procedimiento de MTT/formazán anteriormente descrito. El residuo compuesto por MTT/isopropanol/DMSO se colocó en una placa limpia para ser analizado en el lector de placas utilizando una absorbancia de $\lambda=750$ nm.

Toma de fotografía: Una vez tratado el poliHIPE con MTT, se les tomaron fotografías con un estereoscopio convencional.



IX. RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN FIBROBLASTOS HUMANOS

Proliferación

A los fibroblastos se les realizaron pruebas de proliferación y metabolismo celular.

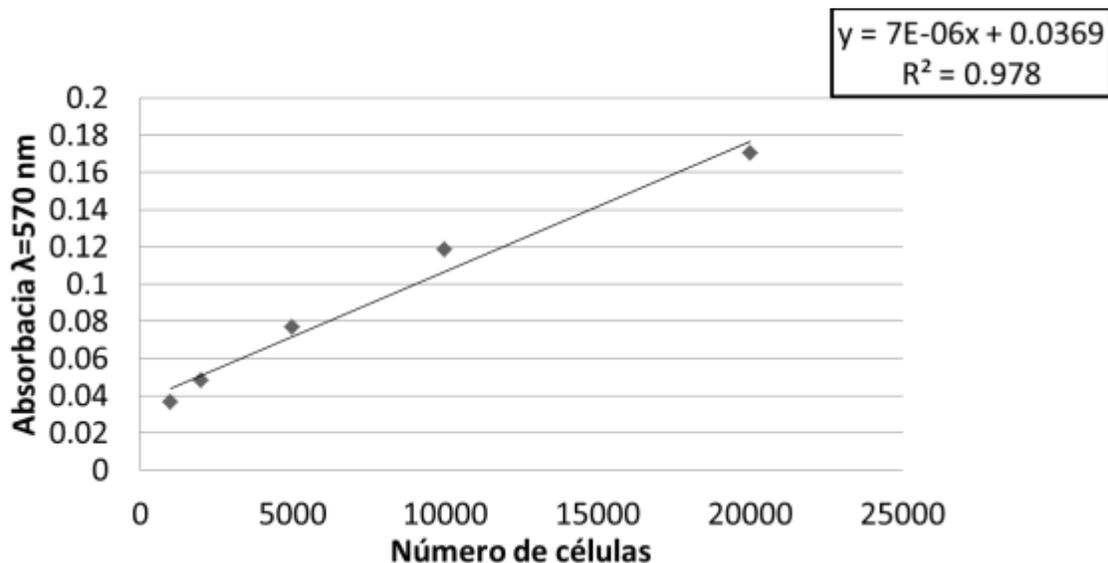
La proliferación de los fibroblastos, se utilizó Cristal Violeta (CV) una técnica sencilla basada en la adherencia celular tiñendo citoplasma y núcleo en una tonalidad violácea medida en espectrofotómetro a 570 nm. Con base a la colorimetría del CV analizada en el espectrofotómetro, se realizó una curva patrón y una curva de proliferación.

La **Gráfica 1** muestra una relación directamente proporcional del número de células respecto a la absorbancia (ABS) obtenida. Se colocaron distintos valores celulares con la finalidad de obtener una lectura en ABS respecto a la densidad celular definida previamente en la placa de cultivo. La grafica cumplió con el objetivo mostrando una tendencia lineal con una R^2 de 0.978 indicando así una buena confiabilidad en los resultados obtenidos.

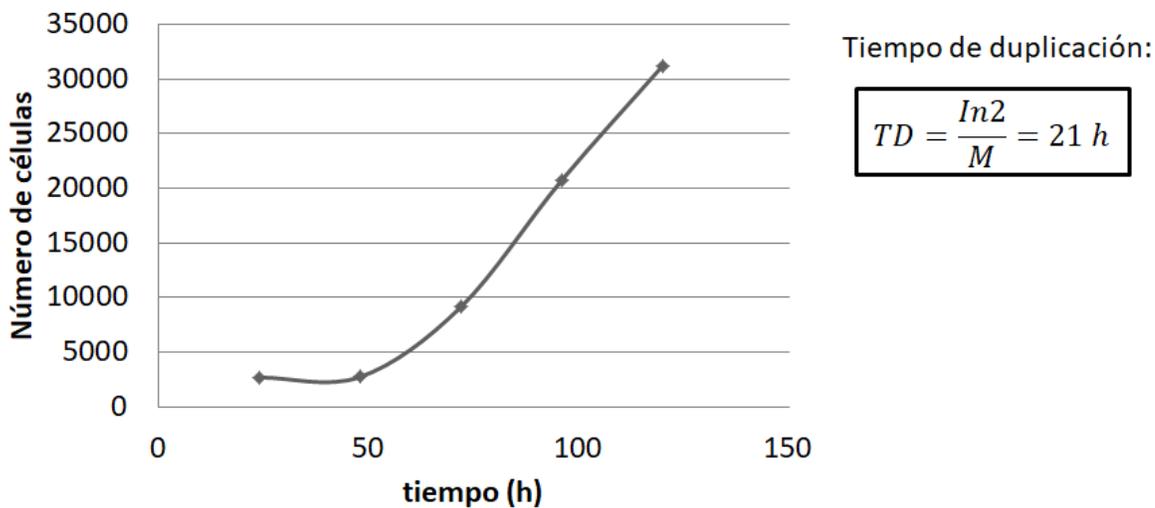
Se analizó proliferación de los fibroblastos de prepucio mediante una curva de crecimiento en cultivo (**Gráfica 2**). Con base en la curva patrón, se estimó el tiempo de duplicación de los fibroblastos, el cual fue de 21 horas.

Durante el tiempo de cultivo de las células, se tomaron fotografías en el microscopio invertido para observar la forma y distribución de los fibroblastos durante las distintas horas de cultivo una vez teñidos con CV (**Figura 10**). A las 24 horas de cultivo, se observaron algunos fibroblastos sin plegar, otros están completamente extendidos y muestran una forma fusiforme típica.

A las 96 y 120 horas de cultivo, se observó el notable incremento de los fibroblastos en el pozo, el fibroblasto crece y se alarga formando lo que parecen colonias alargadas que permiten la interacción celular entre ellas y el medio que las rodea.



Gráfica 1. Curva Patrón obtenida por CV. Muestra una R^2 de 0.978, indicando una tendencia lineal.



Gráfica 2. Capacidad proliferativa de los fibroblastos *in vitro*. Muestra un tiempo de duplicación de 21 horas.



Fibroblastos + CV

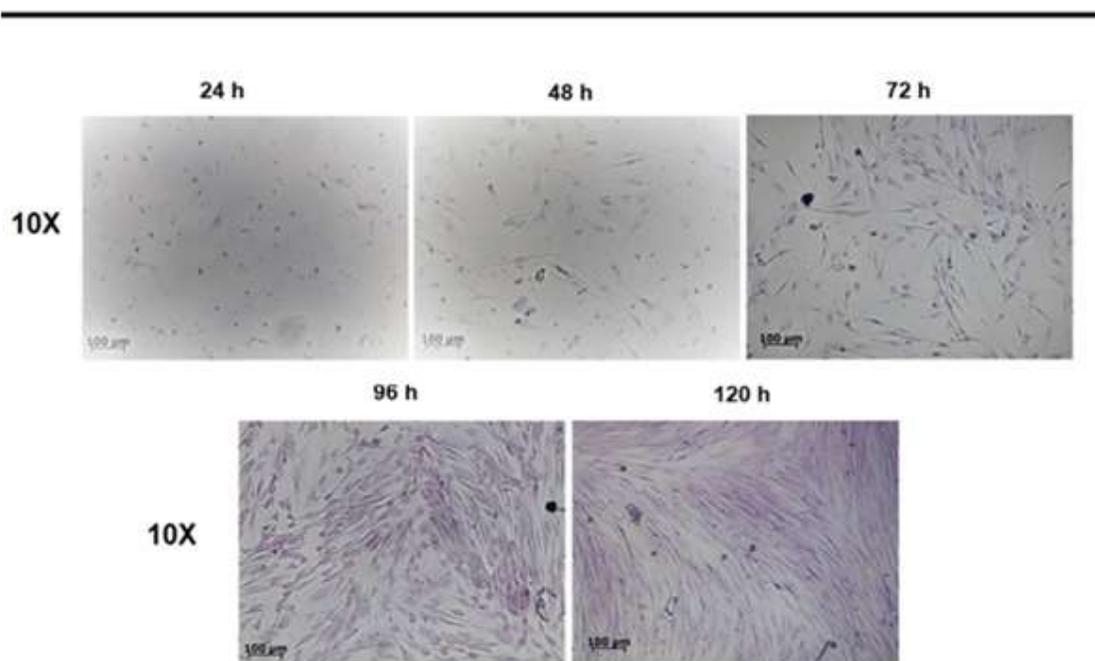


Figura 10. Fibroblastos teñidos con CV durante los días de cultivo de la curva de proliferación. Se observa los cambios morfológicos de los fibroblastos, así como su agrupación a lo largo de 120 horas de cultivo.



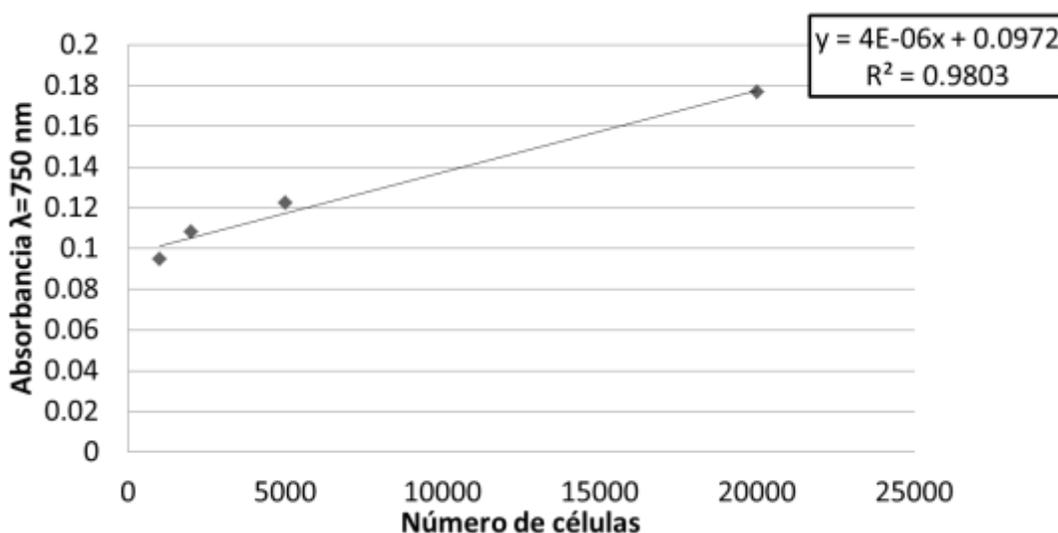
Actividad metabólica de fibroblastos *In vitro*

Para saber el comportamiento metabólico que los fibroblastos desempeñan bajo condiciones normales, se realizó un ensayo utilizando MTT/formazán, reactivo de color amarillo capaz de permear la membrana celular de las células metabólicamente activas, mediante la actividad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Los cristales de formazán, producidos intracelularmente son color violeta e insolubles en agua por lo que se deben solubilizar para cualificarse por densidad óptica a 750 nm.

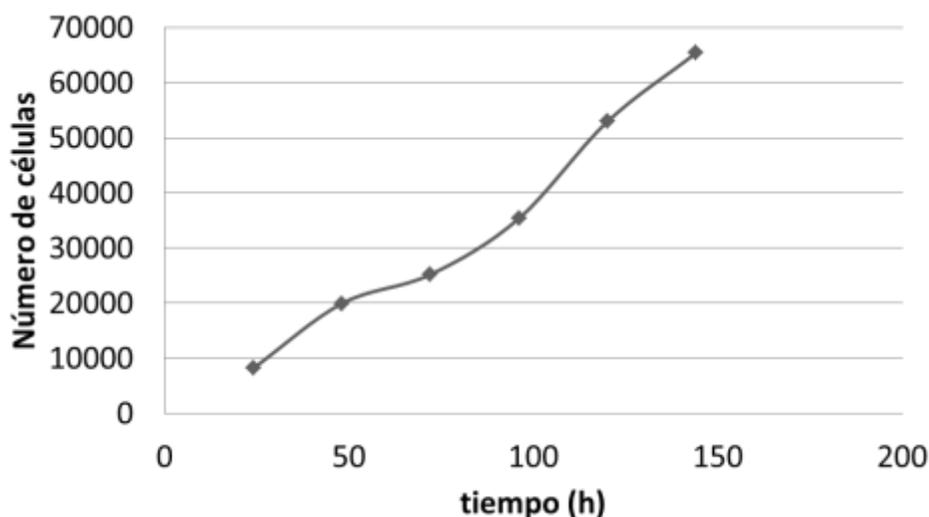
Se realizó una curva patrón y una curva de crecimiento para analizar la actividad metabólica de los fibroblastos.

En la **Gráfica 3** se muestra la curva patrón que presentó una tendencia lineal a una ABS medida en el espectrofotómetro a 750 nm. Es directamente proporcional de acuerdo al número de células sembradas. Se obtuvo una R^2 de 0.9803 corroborando así la fiabilidad del resultado obtenido.

En el **Gráfica 4** se representa la curva de crecimiento de los fibroblastos sembrados en distintos tiempos de cultivo. Con la técnica MTT/formazán se calculó el número celular de acuerdo a los días. Así fue posible observar una tendencia creciente de la actividad metabólica de acuerdo al número celular.



Gráfica 3. Curva patrón MTT/formazán fibroblastos *in vitro*. Muestra una tendencia lineal con una R^2 de 0.9803



Gráfica 4. Curva de crecimiento celular por MTT/Formazan. Se determinó el número de células de acuerdo a la colorimetría obtenida por la técnica de MTT formazán. Es posible observar una relación ascendente entre el número células y la actividad metabólica por día de cultivo.

PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD DEL POLIHIPE

Viabilidad sobre el poliHIPE

La evaluación de la biocompatibilidad de biomateriales es necesaria para identificar si la composición química y/o subproductos que el material pudiera liberar no desencadene una respuesta citotóxica. Para conocer si el poliHIPE es un material biocompatible en ingeniería de tejidos, se le realizaron estas pruebas. La ISO 10993-1:2010 especifica los requerimientos generales para evaluar las interacciones de un material en uso potencial en ingeniería de tejidos, especificando que la viabilidad celular es una de las funciones biológicas necesarias para la supervivencia dentro de un microambiente favorable, por lo tanto es un parámetro importante a evaluar del poliHIPE.

Para saber si el poliHIPE puede brindar un microambiente favorable a nivel celular, se estimó la proliferación de fibroblastos humanos de prepucio sembrándolos sobre el material en distintos días de cultivo mediante un ensayo de fluorescencia utilizando CellTraker™ (CT) y HE.



El colorante fluorescente CT es un reactivo capaz de atravesar la membrana celular libremente; posee un grupo clorometilo o bromometilo que al reaccionar con los grupos “tiol” dentro de las células mediada por la glutarato-S-transferasa, crean una reacción impermeabilizante evitando que el colorante escape. De este modo el CT puede quedarse intra-celular varios ciclos celulares. Sin embargo, el mejor momento de observación es dentro de las primeras 72 horas de cultivo (Invitrogen®, product information sheet).

El CT fluoresce en color verde, mientras que el HE que se une al DNA de células cuya membrana celular ha sido comprometida, emite una fluorescencia color rojo.

Las micrografías (**Figura 11**) fueron tomadas a 10X en microscopio de fluorescencia Carl ZEISS®.

La **Figura 11** muestra el cultivo del poliHIPE observado con CT o HE, y el merge (M) que es la conjunción de ambas fluorescencias. En el apartado de control, están las micrografías del poliHIPE sin fibroblastos (**A**, **B** y **C**). En **A** se aprecia que el poliHIPE absorbe el CT ocasionando que emita cierta fluorescencia, sin embargo en **B** no parece que el HE tenga esta misma interacción, no hay señales de fluorescencia y el M no se ve afectado.

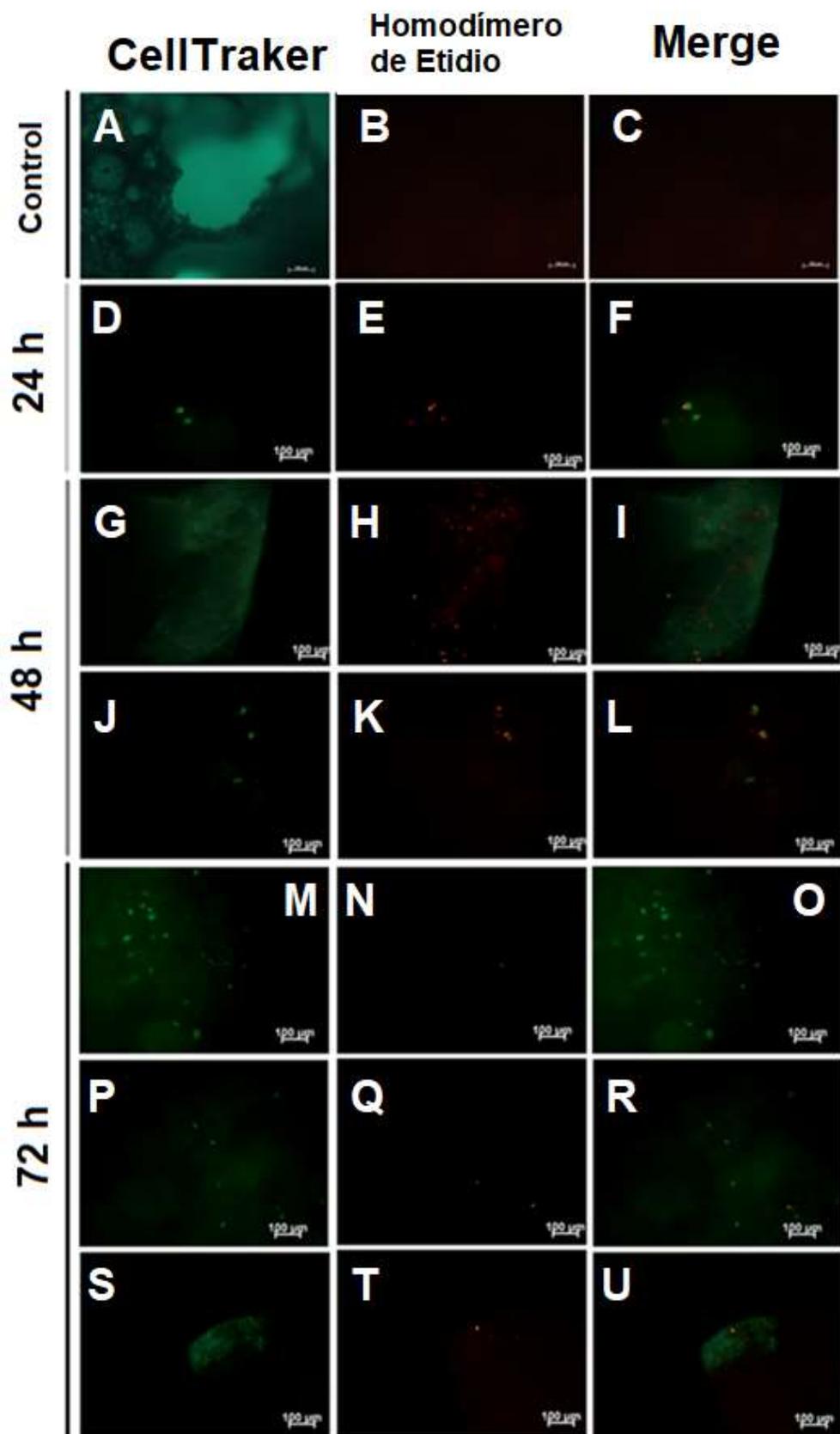
Las micrografías de las primeras 24 horas de cultivo (**D**, **E** y **F**), mostraron muy pocos fibroblastos adheridos sin tomar su forma fusiforme común en el poliHIPE, pues presentan forma redonda y de acuerdo con el HE (**E**), en su mayoría se observaron muertas o en proceso probablemente apoptótico.

A las 48 horas de cultivo (**G-L**), se encontraron varios cúmulos de fibroblastos aparentemente vivos (**G** y **J**), pero al verla en contraste al HE en el M (**I** y **L**), se aprecia que el número de células muertas es similar al de células marcadas como vivas. Mientras que en otros sitios apenas son observables algunas células aparentemente con la membrana comprometida visibles en el HE (**H** y **K**).

A las 72 horas de cultivo (**M-U**), los fibroblastos comenzaron a plegarse. Las micrografías **M** y **P** muestran fibroblastos de forma fusiforme común a



comparación de las primeras 24 y 48 horas de cultivo. La mayoría de las células se encuentran vivas y la distribución de los fibroblastos se observa más uniforme a lo largo del andamio. Además, aun fueron observables los cúmulos presentes desde las 48 horas de cultivo (**S**). La diferencia radica en el número de células vivas de acuerdo al M (**U**), pues en los cúmulos de 48 horas (**I**) se observaron más células muertas que los observables a las 72 horas de cultivo.





Actividad metabólica del poliHIPE

La medición cuantitativa de citocompatibilidad en el poliHIPE se llevó a cabo mediante la reducción MTT/Formazán, el cual tiene la capacidad para analizar la actividad metabólica de los fibroblastos una vez sembrados en el andamio. El MTT/Formazán genera un precipitado de cristales de formazán insoluble en agua de color azul-violeta cuando es metabolizado por la mitocondria.

Los resultados fueron evaluados en distintos tiempos de cultivo (**Gráfica 5**). Se realizó una curva patrón acorde a la cantidad celular que fue sembrada en el poliHIPE (**Gráfica 6**) En cada tiempo se colocó un control de fibroblastos en monocapa. Al momento de colocar el MTT/Formazán al poliHIPE y evaluar espectrofotometría, el material se teñía por el colorante, por ende se colocó un control sin fibroblastos para restar el colorante atrapado por el polímero y así obtener un resultado más aproximado a las células metabólicamente activas presentes en el material.

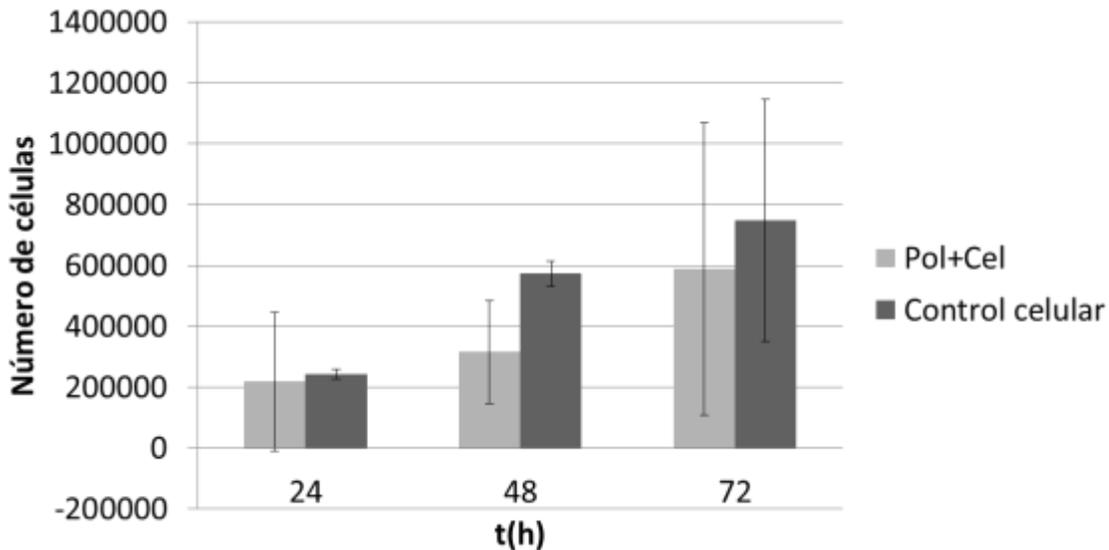
Los resultados mostraron que el andamio no promovía la actividad metabólica de los fibroblastos. Al compararla con el control en monocapa, los fibroblastos en el poliHIPE mostraron una proliferación baja comparada con el número celular en monocapa. Puede verse que las células dentro del andamio sí aumentan en número, pero de una forma mucho más lenta.

Para corroborar la presencia de células en el poliHIPE al momento de tratarlas con MTT se les tomaron fotografías en el estereoscopio AxioVision® en los distintos tiempos de cultivo (**Figura 12**). Tomadas a 10X para mejor apreciación del andamio completo.

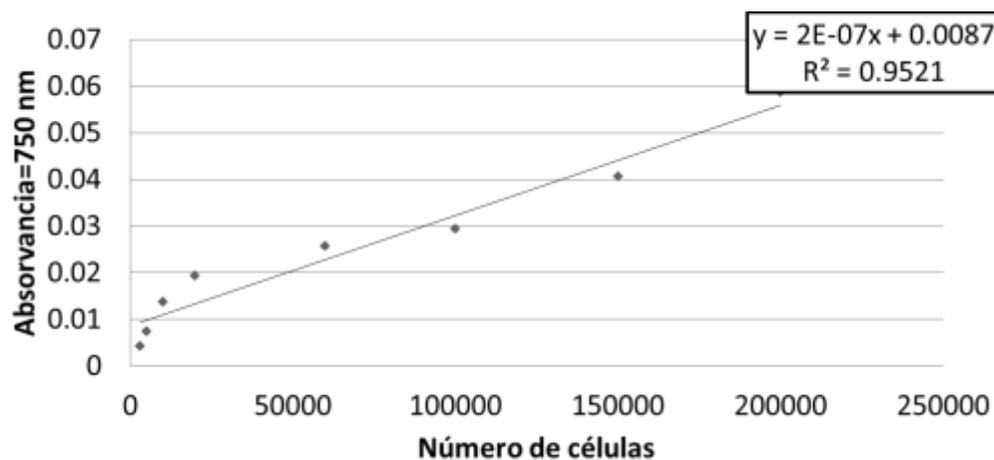
En la **Figura 12** los controles del poliHIPE, se observa la adherencia o absorción del reactivo al andamio, aunque no posea células. En las imágenes del poliHIPE que posee fibroblastos y fue tratado con MTT se aprecian ciertos puntos donde el colorante está más concentrado. Para saber qué eran estos puntos de concentración se tomaron otras micrografías a más aumento del andamio más representativo (**Figura 13**).



En la **Figura 13** se observa el polímero de la imagen **H** con distintos aumentos mostrando en la imagen **C** que estos puntos podrían tratarse de agregados de células donde los cristales de formazán formados por la reducción del MTT no pudieron disgregarse correctamente quizá por la influencia del andamio. En las imágenes **A** y **B** se visualiza varios puntos así, en su mayoría dentro de un poro del andamio.



Gráfica 5. Metabolismo celular de fibroblastos sobre poliHIPE. El poliHIPE no promueve el metabolismo celular de los fibroblastos a comparación de los cultivados en monocapa.



Gráfica 6. Curva patrón típica.

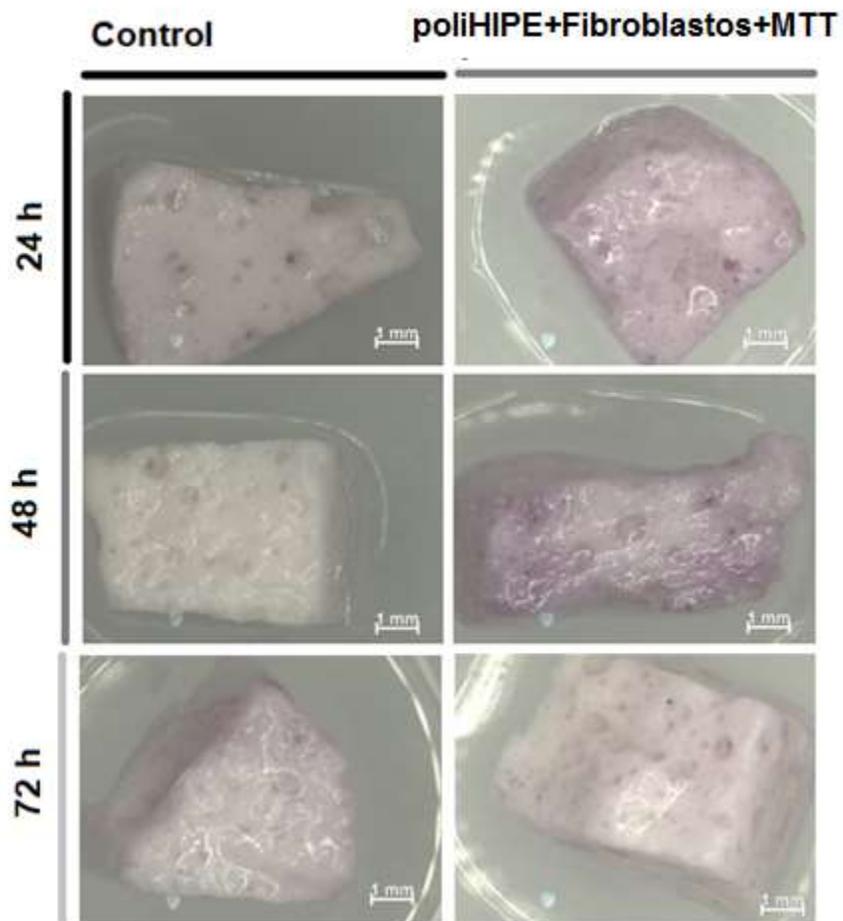


Figura 12. PoliHIPE post-cultivo con MTT. Se aprecia que el poliHIPE tiene la capacidad de absorción de cierta cantidad de reactivo.



Figura 13. Micrografía aumentada para mejor visualización de puntos de concentración de colorante.



X. DISCUSIÓN

Los fibroblastos son el principal tipo de células presentes en la dermis y son las encargadas de producir fibras de colágena, reticulares y elásticas, así como de la síntesis de los glicosaminoglicanos y glucoproteínas (Eynard et al., 2008).

Debido a que los fibroblastos tienen una función crítica en el proceso de reparación del tejido, han sido utilizados como modelos celulares *in vitro* en ingeniería de tejidos (Wong et al., 2007). Contribuyen en la reparación del tejido debido a que producen la mayoría de las proteínas estructurales de las cuales carece el tejido dañado, además favorecen la reorganización de la MEC (Sánchez et al., 2007).

Actualmente los fibroblastos son utilizados mayoritariamente para la evaluación de biomateriales en ingeniería de tejidos gracias a su fácil manejo y manutención. La mayor parte de los experimentos *in vitro* se realizan utilizando líneas celulares de fibroblastos inmortalizadas (Guerrero&Berlanga, 2001)

Por lo anterior es que en este trabajo, se decidió utilizar fibroblastos humanos. El trabajo más reciente que investiga el comportamiento de fibroblastos sobre polimeros semejantes a los utilizados, lo realizó Munive (2018), quien utilizando una línea celular de fibroblastos de prepucio humano (HFF-1). Reportó resultados de viabilidad y proliferación en un polímero de pMMA. Sin embargo, los fibroblastos al ser una línea celular inmortalizada, son capaces de proliferar en condiciones rigurosas. Las células inmortalizadas son aquellas que pueden proliferar indefinidamente (Guerrero&Berlanga, 2001). Por lo tanto su utilización para determinar viabilidad en materiales, no reflejan de manera fehaciente el comportamiento de los fibroblastos normales en los biomateriales obtenidos por síntesis verde.

Los fibroblastos utilizados en este trabajo fueron obtenidos de subcultivos (pase celular) de muestras provenientes del banco de células como se indica en la metodología. Estos subcultivos se pueden obtener a partir de explantes primarios



y/o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos (Davis, 2002).

De acuerdo a Lamme et al. (2002), la viabilidad y proliferación celular se ha reportada ligada a la edad, entre otros factores. No es lo mismo la utilización de fibroblastos obtenidos de biopsias de adultos que las de infantes. Normalmente los fibroblastos de prepucio infantil, suelen tener un metabolismo y una proliferación celular mayor, permitiendo así un desarrollo experimental adecuado que incluya variables no controladas, como puede ser la baja proliferación. Por lo que en este trabajo se utilizaron fibroblastos de prepucio infantil y así tener un punto de comparación con los trabajos reportados en la literatura,

Debido a que es necesario evaluar la capacidad de proliferación de los biomateriales con los fibroblastos humanos, se usó la técnica de Cristal Violeta CV al 5%. El cristal violeta o violeta de metilo, es el ingrediente activo en el colorante Gram, usado para clasificar bacterias. Por sí solo el violeta de metilo tiene la habilidad de adherirse al DNA, por esta razón es una técnica que puede utilizarse para ensayos de viabilidad y proliferación celular (López-Jacome et al., 2015).

Los resultados obtenidos mostraron que las células completan un ciclo celular cada 21 horas en cultivos en monocapa, concordando con el tiempo obtenido por Place et al, (2009), el cual reportó que los cultivos *in vitro* de fibroblastos infantiles de prepucio obtenidos por biopsia, tenían un tiempo de replicación en promedio de entre 17 a 20 horas. Mientras que en el ensayo de MTT/formazán (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-1-il) bromuro de difeniltetrazolio), el cual genera un precipitado de formazán insoluble en agua, de color azul-violeta cuando es metabolizado por la mitocondria (Chimal-Monroy et al., 1998) mostró resultados similares a los reportados con el CV. Ambos tuvieron un incremento celular que va de las 20-21 horas.

Cómo ya se mencionó, los biomateriales son una parte importante en la triada de la implementación en la ingeniería de tejidos y por lo tanto se trabajó el poliHIPE-



pMMA, el cual fue sintetizado por primera vez en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) perteneciente a la UNAM.

Mota-Morales et al. (2011) comenzó a aplicar la polimerización frontal, retomando la metodología descrita por Chechilo en los 70's y por Pojman en los 90's. De esta manera desarrolló un método inicial de polimerización exotérmica utilizando acrilatos. También fue uno de los pioneros en describir el uso de DES's para lograr una estructura interna estable.

Fue hasta el 2013 que Mota-Morales et al., reportó el uso aplicado de los DES's para crear andamios macroporosos. Los primeros en ser sintetizados fueron a base de ácido acrílico y cloruro de colina. Estos materiales tenían como característica principal una estructura macroporosa presumible para ser candidata como un biomaterial.

Sin embargo, el equipo de investigación también se enfrentó a los desechos que la polimerización de materiales generaba. Por ello en el 2017, Mota-Morales et al., reporta el posible uso de la síntesis verde o química verde, con la cual se encargaría de generar polímeros a base de químicos amigables con el medio ambiente. En aquella investigación, integró los monómeros de DES's para la polimerización de biomateriales dando como resultado la primera aparición de los HIPE's sintetizados en México.

En 2018 el equipo de trabajo de Mota-Morales empezó a sintetizar materiales HIPE utilizando monómeros de DES, tales como pMMA, pSMA, pMMA-NHA, pLA y pLA- NHA. Munive (2018) se unió al equipo de trabajo de Mota-Morales y aparte de ayudar a sintetizar los poliHIPEs, quien también reportó pruebas de estabilidad química y física a los poliHIPEs.

De igual manera Munive, fue la primera en realizar pruebas de viabilidad y proliferación celular al poliHIPE-pMMA sintetizado con química verde, utilizando una línea celular de fibroblastos de prepucio humanos y osteoblastos de ratón (esta última línea celular solo para los poliHIPEs que tuvieran NHA). De esta manera Munive reportó al poliHIPE-pMMA como candidato potencial para



biomaterial en ingeniería de tejidos utilizado en piel. Para poder afirmar este hecho, el presente trabajo reporta la ventaja del uso de fibroblastos de prepucio infantil provenientes de subcultivo sobre el poliHIPE-pMMA y así obtener una perspectiva más clara sobre el comportamiento real de las células normales y finitas sobre el material.

Así, se iniciaron las pruebas de biocompatibilidad para el poliHIPE-pMMA. La biocompatibilidad, de acuerdo a la norma ISO 101993-1:2010 estipula los estándares necesarios de evaluación mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Entre los ensayos *in vitro* están: viabilidad, citotoxicidad, actividad metabólica y hemólisis como los más importantes a reportar, obteniendo resultados justificables con pruebas que demuestren la seguridad clínica del material. Al ser un material destinado a ingeniería de tejidos, se escogieron ensayos pertinentes como la viabilidad y proliferación.

Para evaluar el poliHIPE se fragmentó, esterilizó e hidrató antes de ser utilizado. Se siguió el mismo protocolo reportado por Munive (2018). Este protocolo reportaba que un tiempo de hidratación de 10 minutos en el medio completo serían suficientes para su próxima utilización, sin embargo no fue así. Tras varias pruebas, se concluyó un tiempo mínimo de hidratación de 24 horas en medio completa en condiciones de 5% de CO₂ a 37°C, rechazando completamente el anterior tiempo reportado.

De acuerdo a lo anterior se entiende que el poliHIPE.pMMA era altamente hidrofóbico, esto concuerda con lo descrito por Mota-Morales et al. (2018), Munive (2018) y Carranza et al. (2014). Ellos concuerdan en que la propiedad hidrofóbica provenía de la ultra estructura química del pMMA, pues al provenir de resinas líquidas derivadas de petróleo, el agua no es absorbida adecuadamente por las moléculas que lo conforman.

Munive (2018) reportó un protocolo de siembra de fibroblastos de 50, 000 células en 100 µl de medio completo para un solo poliHIPE. Sin embargo, al ser desarrollado este trabajo en un laboratorio de ingeniería de tejidos, la siembra se



hizo de acuerdo al protocolo reportado por Melgarejo-Ramírez et al. (2014), investigador especializado en pruebas de biocompatibilidad de materiales aplicados a ingeniería de tejidos. Melgarejo-Ramírez reporta que 200, 000 células de siembra a un material candidato, son las ideales para observar resultados fiables de viabilidad, citotoxicidad, adherencia, migración, entre otros ensayos *in vitro*.

La prueba de proliferación de fibroblastos en el poliHIPE, fue realizada utilizando la técnica de CT/HE.

El tinte fluorescente CT está diseñado para atravesar libremente la membrana celular, una vez dentro es transformado en un producto impermeabilizante de membrana. El tinte se mantiene dentro de las células vivas durante 72 horas y presenta propiedades idóneas para el seguimiento del experimento: es químicamente estable, no citotóxico en concentraciones de trabajo, posee un pH fisiológico y el tinte es capaz de transferirse a las células hijas hasta 6 generaciones (Invitrogen®, product information sheet).

El HE puede ser utilizado para detectar células muertas o en proceso apoptótico. Es un colorante de membrana impermeable y fluorescente que se une al DNA. Cuando hay un proceso de muerte celular, la membrana plasmática se ve afectada, su deterioro permite que el HE penetre a la célula y se una al material genético. Debido a que las células vivas no tienen una membrana comprometida, el HE no podría penetrar y ensamblarse al DNA haciéndolo un buen indicador en este ensayo (Mendoza et al., 2009).

Combinando ambos tintes se obtiene una fluorescencia de identificación de células vivas y muertas.

El sembrado de los fibroblastos fue por goteo. El cultivo celular normalmente se realiza en monocapa o 2D, esto le permite a las células una interconectividad celular uniforme y una adecuada distribución de nutrientes. Pero un cultivo celular realizado en andamios tiene características distintas y se considera cultivo en 3D (García et al, 2013).



Esta técnica de cultivo es imprescindible en ingeniería de tejidos. Las células cultivadas en ambientes 3D se comportan de manera más parecida a como lo hacen en sus organismos de origen. Sin embargo, se dificulta la correcta distribución celular (García et al, 2013). Por ello el poliHIPE fue cultivado gota a gota, tratando de rodear el material y esperando 40 minutos, tiempo promedio en que los fibroblastos se adhieren a una superficie (Wong et al., 2007), para asegurar una distribución adecuada. Después se le agrego medio completo hasta cubrir el poliHIPE y evitar que las células más superficiales en el poliHIPE perdieran condiciones de cultivo.

En las micrografías de los controles de poliHIPE tratados con CT y HE, se puede observar una tenue fluorescencia. Esta cualidad la reportó Abott (2016), quien trabajó con la fase interna de MMA polimerizada con NHA. Encontró que al analizar el andamio en un microscopio confocal, el láser ocasionaba cierta fluorescencia tenue de manera natural. Sin embargo esta fluorescencia emitida por el polímero al ser tratado, no afectó la identificación de las células vivas y/o muertas. El poliHIPE teñido con CT muestra mayor auto fluorescencia, probablemente se deba a que es más propenso a las emisiones ultravioletas de **400 a 500 nm**.

En las micrografías que reportan las 24 horas de cultivo, se observan secciones donde las células no se han adherido y gran parte del andamio está ausente. Puede deberse a que en los tiempos evaluados se encuentran en un periodo de adaptación. De acuerdo García-Carvajal et al., (2013) las células, una vez sembradas en un material pueden o no adherirse al momento de la siembra. Algunas veces necesitan adaptarse a ciertos factores que, en este caso el polímero les predispone.

Las micrografías obtenidas a las 48 horas de cultivo muestran al poliHIPE cubierto con una tenue capa de fibroblastos en cúmulos, sin embargo están lejos de mostrar su morfología fusiforme característica. Castro-Piedra (2009) quien trabajó con MECs destinadas a piel, reporta que en general muchas veces las células sembradas en un material, al no encontrar condiciones ideales para realizar sus



funciones diarias, suelen anclarse entre ellas para generar una mejor comunicación inter-celular y así subsistir. Esto podría significar que los fibroblastos en el poliHIPE no fueron capaces de encontrar condiciones propicias para realizar funciones normales a las 48 horas de cultivo.

Sin embargo las micrográficas obtenidas a las 72 horas de cultivo, mostraron fibroblastos con su forma típica y una mayor distribución en el área del poliHIPE. Esto concuerda con lo reportado por Carranza et al., (2014), quien realizó pruebas *in vitro* a dos poliHIPEs a base de PLA y PLA-NHA. Trabajó con fibroblastos de piel de rata, los cuales fueron sembrados sobre los poliHIPEs hasta 96 horas. Con ayuda de la técnica de MTT/Formazán, reportó un incremento en la población celular de los poliHIPEs hasta las 96 horas de cultivo, argumentando que el cultivo debía ser extendido aún más en tiempo para que el material pudiera estar totalmente cubierto por células.

Lo anterior concuerda con lo encontrado por Livshin&Silverstain (2007), quienes caracterizaron un poliHIPE a base de DVB/SMO. Ellos experimentaron con distintos tipos de porosidad y aparte de realizarles pruebas mecánicas, también les hicieron pruebas sencillas de biocompatibilidad utilizando osteoblastos de ratón. Reportaron que los poliHIPEs con mayor porosidad ayudaban a las células a tener una mejor inter-conectividad celular y por ende proliferar con más rapidez, sin embargo, una vez las células se internaban en el material, tardaron cierto tiempo en ocupar la superficie del poliHIPE.

Al ser así, se requeriría de más tiempo de cultivo para ver mejores resultados y se necesitaría tomar micrográficas de barrido para poder observar el interior del poliHIPE-pMMA. Pero a pesar de que es un material macroporoso y permitir la interconectividad celular, de acuerdo a las micrografías obtenidas, pareciera que las células no son capaces de penetrar en el poliHIPE-pMMA. Esto también podría explicar el origen de los cúmulos alrededor del poliHIPE.



Esta cualidad fue reportada anteriormente también por Carranza et al. (2014). Cuando cultivo los poliHIPEs a base de PLA y PLA-NHA con fibroblastos de piel de rata, demostró que en alguno poliHIPEs a las células les costaba trabajo proliferar internamente en los poros. De igual manera, Hu et al. (2015) sintetizó y realizó pruebas de biocompatibilidad a un poliHIPE a base de poli- ϵ caprolactona con una porosidad muy parecida al del poliHIPE-pMMA. Reportó que al sembrar células mesenquimales de médula ósea, en algunos ejemplos del poliHIPE la internalización celular era escasa, concluyendo así que el método de siembra por goteo no era el más adecuado, proponiendo incrementar la densidad celular por área de cultivo.

Por otra parte Hu et al. demostró que, aunque las células no se internen en el andamio, esto no impide su viabilidad y proliferación celular, como lo reportado en este trabajo.

Dado lo visualizado en las micrografías obtenidas con el CT/HE, surgió la pregunta si la proliferación celular se veía afectada por el poliHIPE-pMMA. Para resolver esta incógnita, se realizó un ensayo de MTT/formazán al poliHIPE-pMMA una vez sembrado con fibroblasto en los mismo días de cultivo programados para el CT/HE.

El MTT/Formazán determina la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Cuando las células mueren, estas pierden la capacidad de convertir el MTT a formazán, ya que las enzimas mitocondriales encargadas de ello se inactivan por efecto de la muerte celular (Arvelo, 2007).

Los resultados obtenidos en la gráfica de MTT, revelaron que el poliHIPE no provee mayor proliferación celular en comparación con los fibroblastos sembrados en monocapa contradiciendo lo reportado por Munive (2018). Munive realizó varios ensayos de MTT a los distintos poliHIPEs mencionados anteriormente, uno de ellos era el mismo poliHIPE a base de pMMA pero con una línea celular inmortalizada.



Munive reportó que el poliHIPE-pMMA sembrado con la línea de fibroblastos humanos Hff-1, promovía una mayor proliferación a comparación de los sembrados en monocapa, así como también los sembrados con osteoblastos de ratón. Esta contradicción puede deberse a que las células que Munive utilizó eran líneas celulares y como se ha mencionado anteriormente, las células de subcultivos aquí utilizadas pueden mostrar un comportamiento más apegado a la realidad del material.

Una cualidad aquí reportada que Munive (2018) no menciona, es que el poliHIPE tiene la desventaja de absorber el colorante del formazán. Tanto en los poliHIPEs control (poliHIPE sin fibroblastos) como en los poliHIPEs ensayo (poliHIPE con fibroblastos). La adhesión del colorante no afecta gravemente el análisis final de resultados. De hecho, algunos poliHIPEs presentaron ciertos puntos donde el colorante parecía más adherido. Observando estos puntos a más aumento en el estereoscopio, fue posible distinguir cúmulos, probablemente rezagos de fibroblastos aún adheridos al material. Estos cúmulos son similares a los observados en el ensayo de CT/HE, esto podría indicarnos que una vez que las células se adhieren al poliHIPE es difícil que se desprendan de este, quizá sea un indicador indirecto de adherencia celular aún no descrita en poliHIPEs en general.

Cabe resaltar que el poliHIPE-pMMA tiene la capacidad para mantener sus dimensiones y características físico-químicas aun después de ser sometido a pruebas de biocompatibilidad, señalando que es un candidato potencial en ingeniería de tejidos. Esto se debe a su composición interna a base de acrilatos y la manera en que se ejecuta la polimerización interna por medio de las DES's (Munive 2018; Mota-Morales et al., 2017; Mota-Morales et al., 2013), estas propiedades le brindan características que evitan su fácil degradación manteniendo su integridad aun en medios de cultivo fisiológicos, lo que ocasionan un fácil manejo del material.

Se debe retomar la problemática de siembra, el poliHIPE-pMMA permite la viabilidad y proliferación celular, sin embargo el método de siembra puede ser



limitante para su uso futuro. Es necesario investigar y probar distintas técnicas de cultivo en materiales destinados para ingeniería de tejidos.



XI. CONCLUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue demostrar la viabilidad de los fibroblastos humanos de prepucio infantil provenientes de subcultivos en un biomaterial novedoso llamado poliHIPE a base de poli metil metacrilato (pMMA).

Los resultados de biocompatibilidad muestran que el poliHIPE no es tóxico y provee las condiciones suficientes para la proliferación y viabilidad de los fibroblastos humanos, teniendo a las 72 horas de cultivo celular su morfología característica. Los resultados de MTT/formazán muestra que las células siguen metabólicamente activas, pero el poliHIPE no brindó características proliferativas a las células.

El material tiene propiedades mecánicas estables gracias a la composición de acrilatos. Es fácil de manejar fuera y dentro del área de cultivo, así como la esterilización del material. Sin embargo, la hidratación del poliHIPE conlleva tiempo siendo desventajoso en otro tipo de biomateriales sintéticos.

Una ventaja en la futura fabricación de biomateriales con esta técnica, podría reducir desechos difíciles de biodegradar para el ambiente como lo son materiales provenientes de resinas petroquímicas.

Un reto a resolver en la síntesis del poliHIPE-pMMA es la modificación de la estructura de monolitos a un material con flexibilidad y características de biopelículas dificultará para su potencial utilización en piel. Se podría considerar una técnica de sintetizado para hacer biopelículas de pMMA y hacerle pruebas mecánicas que aseguren su rigidez y maleabilidad en piel.



XII. PROSPECTIVAS

- Realizar cultivo de fibroblastos con una mayor tiempo de observación dentro del poliHIPE-pMMA
- Probar su utilidad con otros tipos celulares. Por ejemplo cultivo de osteoblastos humanos en el poliHIPE-pMMA puede evaluar su potencial en otras aplicaciones en la ingeniería de tejidos.



XIII. REFERENCIAS

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, (1), 70-71
- Acasuso, I. G. P., González, M. G. M., Gómez, E. K., Curiel, R. M. S., & Colín, S. C. (2008). Efectos de la mezcla de colágena-PVP sobre el metabolismo y proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos cultivados. *Revista Odontológica Mexicana*, 12(4), 184-191.
- Arvelo, F. (2007). Ingeniería de tejidos y producción de piel humana in vitro. *Investigación Clínica*, 48(3), 367-375.
- Bautista O. C. D. (2018) Análisis histoquímica de una matriz acelular obtenida de piel de cerdo adulto y neonato. Tesis Licenciatura. UNAM
- Busby, W., Cameron, N. R., & Jahoda, C. A. (2001). Emulsion-derived foams (PolyHIPEs) containing poly (ϵ -caprolactone) as matrixes for tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2(1), 154-164.
- Castro-Piedra, S. E. (2009). Modelos experimentales para aislamiento y mantenimiento in vitro de queratinocitos y fibroblastos humanos y su utilización en una matriz con potencial en ingeniería de tejidos.
- Carranza, A., Pojman, J. A., & Mota-Morales, J. D. (2014). Deep-eutectic solvents as a support in the nonaqueous synthesis of macroporous poly (HIPEs). *RSC Advances*, 4(78), 41584-41587.
- Carranza, A., Romero-Perez, D., Almanza-Reyes, H., Bogdanchikova, N., Juarez-Moreno, K., Pojman, J. A., ... & Mota-Morales, J. D. (2017). Nonaqueous Synthesis of Macroporous Nanocomposites Using High Internal Phase Emulsion Stabilized by Nanohydroxyapatite. *Advanced Materials Interfaces*, 4(16), 1700094.
- Chimal-Monroy, J., Bravo-Ruiz, T., Furuzawa-Carballeda, G. J., De la Cruz, J. C., Almazan, A., KRÖTZSCH-GÓMEZ, F. E., ... & Díaz de León, L. (1998). Collagen-PVP Accelerates New Bone Formation of Experimentally Induced Bone Defects in Rat Skull and Promotes the Expression of Osteopontin and SPARC during Bone Repair of Rat Femora Fractures a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 857(1), 232-236.
- Colorado A. C., C. Andres Agudelo, M. E. Moncado A. (2013) Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión. *Revista Ingeniería Biomédica*. 7(14), 11-23



- Davis, J. M. (2001). *Basic cell culture: a practical approach* (No. Sirsi) i9780199634347).
- Enríquez-Collazos M. G., Reinaldo Velasco-Mosquera, A. F. Quintero (2013) Desarrollo de un biomaterial a partir de almidón modificado de yuca, agente antimicrobiano y plastificante. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 11(2). 111-120.
- Eynard R. Aldo, Valentich M A, Roberto A. R. (2008) Histología y embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares. 4ta edición. Panamericana. Buenos Aires. 201-332 pp.
- Federal D. d., Enlled E. S. (2016). *Manual Clínico Para la Estandarización del Cuidado y Tratamiento a Pacientes con Heridas Agudas y Crónicas*. 33(4). 45-73.
- Fitzpatrick T. B. (2009). *Dermatología en medicina general*: Edición Médica Panamericana
- FOX S. (2008). Fisiología Humana. 10ª edición. Aravaca (Madrid): Ed: McGraw-Hill-Interamericana.
- Frantz C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123(24), 4195-4200
- Frazer R. Q., Byron E. T. (2005) PMM: an essential material in medicine and dentistry. *JLong Term. Eff Mind Limpants*, 15:629-39
- García, S. C. (2013). Cultivo de células en 3D: la nueva dimensión de los cultivos celulares. *Cuadernos del Tomás*, (5), 215-232.
- García-Carvajal, Z. Y., Garciadiego-Cázares, D., Parra-Cid, C., Aguilar-Gaytán, R., Velasquillo, C., Ibarra, C., & Carmona, J. S. C. (2013). Cartilage tissue engineering: the role of extracellular matrix (ECM) and novel strategies. In *Regenerative medicine and tissue engineering*. IntechOpen.
- GODT, Obtenida en septiembre de 2018 <http://www.transplant-observatory.org>
- Goldsmith L, Stephen K., BARBARA G. (2014) *Dermatología en medicina general* Edición Médica Panamericana
- Gómez, C. M. A., Soto, G. J. M., & Múnera, L. M. R. (2012). Sustitutos cutáneos desarrollados por ingeniería de tejidos. *latreia*, 25(1), 42-53.
- González-Consuegra, R. V., Pérez-Valderrama, D. C., & Valbuena-Flor, L. F. (2016). Prevención de lesiones de piel: educación en el equipo de salud y



familiares de personas hospitalizadas. *Revista de la Facultad de Medicina*, 64(2), 229-238

- Guerrero, R., & Berlanga, M. (2001). La “inmortalidad” procariótica y la tenacidad de la vida. *Actualidad SEM*, 32, 16-23.
- Hu, Y., Gao, H., Du, Z., Liu, Y., Yang, Y., & Wang, C. (2015). Pickering high internal phase emulsion-based hydroxyapatite–poly (ϵ -caprolactone) nanocomposite scaffolds. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(18), 3848-3857.
- Invitrogen®, product information sheet, revisada en Junio de 2019
- Khavkin, J., & Ellis, D. A. (2011). Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 19(2), 229-234.
- Lamme E N, Van Leeuwen R T, Mekkes J R et al. (2002) Allonetic fibroblasts in dermal substitutes induce inflammation and scar formation. *Wound Repair Regen*; 10:152-60
- Langford R. C., Neil C. (2017) Chapter 14 Materials for tissue engineering and 3D cell culture. *Bio-inspire Polymers*. The royal Society of chemistry 2017. 460-489.
- Le Vay D. (2008). *Anatomía y fisiología humana*: Editorial Paidotribo.
- Livshin, S., & Silverstein, M. S. (2007). Crystallinity in cross-linked porous polymers from high internal phase emulsions. *Macromolecules*, 40(17), 6349-6354.
- Lizarbe M. A. (2007) Sustitutos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *VII Programa de promoción de la cultura científica y tecnológica* 101(1), 227-249
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 485-502.
- López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2015). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología.
- Melgarejo-Ramírez, Y., Sánchez-Sánchez, R., García-Carvajal, Z., García-López, J., Gutiérrez-Gómez, C., Luna-Barcenas, G., ... & Velasquillo, C. (2014). Biocompatibility of Human Auricular Chondrocytes Cultured onto a Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Epichlorohydrin-Based Hydrogel for Tissue Engineering Application. *International Journal of Morphology*, 32(4).
- Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A., & Muiño-Blanco, T. (2009). Puesta a punto de un método de determinación de espermatozoides con caspasas



activas en semen ovino. In *XXXIX Jornadas de Estudio: XIII Jornadas sobre producción animal, Zaragoza, 12 y 13 de Mayo de 2009*(pp. 720-722). Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario.

- Mota-Morales, J. D., Gutiérrez, M. C., Sanchez, I. C., Luna-Bárceñas, G., & Del Monte, F. (2011). Frontal polymerizations carried out in deep-eutectic mixtures providing both the monomers and the polymerization medium. *Chemical Communications*, 47(18), 5328-5330
- Mota-Morales, J. D., Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Jiménez, R., Santiago, P., Sanchez, I. C. & Luna-Bárceñas, G. (2013). Synthesis of macroporous poly (acrylic acid)–carbon nanotube composites by frontal polymerization in deep-eutectic solvents. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(12), 3970-3976.
- Mota-Morales, J. D., Sánchez-Leija, R. J., Carranza, A., Pojman, J. A., del Monte, F., & Luna-Bárceñas, G. (2017). Free-radical polymerizations of and in deep eutectic solvents: Green synthesis of functional materials. *Progress in Polymer Science*, 78, 139-153.
- Munive O. A. (2018) Desarrollo de un nanocomposito mediante la incorporación de nanomateriales en una matriz polimerica; síntesis, caracterización y biocompatibilidad CICESE. Ensenada, Baja california, México.
- Neira-Carrillo A., Diego Y. M., Yazmin A. M., Sonia V. V. (2013) Encapsulacion de biomoléculas Usando polímeros Naturales: “un nuevo enfoque en la entrega de fármacos en Medicina”. *Avances en ciencias veterinarias*. (28)2. 31-40
- Normalización Española. UNE-EN ISO 10993-1:2010 Biological evaluation of medical devices-Part 3. Test for interaction of material *in vitro/in vivo* revisada en Junio del 2019. [https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/?k=\(i:1110020\)](https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/?k=(i:1110020))
- Pérez-García, M. G., Carranza, A., Puig, J. E., Pojman, J. A., del Monte F., Luna-Bárceñas G., Mota-Morales J. D. 2015. Porous monoliths synthesized via polymerization of styrene and divinyl benzene in nonaqueous deep-eutectic solvent-based HIPEs. *RSC Advances*, 5, 23255-23260. doi: 10.1039/C5RA02374B.
- Place, E. S., Evans, N. D., & Stevens, M. M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature materials*, 8(6), 457.
- Portas M., Pomerane, A., Genovese, J., Pérez, M. d. R., & Gisone, P. (2002). Diagnóstico y tratamiento de las quemaduras radioinducidas *Diagnóstico y tratamiento de las quemaduras radioinducidas*: Laboratorio Craveri SAC



- Pujalte, B. F., Llatas, F. P., Fornes, P. D., Mañez, V. M., & Fernández, V. L. (2008). Apósitos en el tratamiento de úlceras y heridas. *Enfermería Dermatológica*, 2(4), 16-19.
- Rodríguez-Sepúlveda, L. J., & Orrego-Alzate, C. E. (2016). Aplicaciones de mezclas de biopolímeros y polímeros sintéticos: Revisión bibliográfica-Applications of blends of biopolymers and synthetic polymers: Bibliographic review. *Revista científica*, 2(25), 252-264.
- Ross M. H., & Pawlina W. (2006). *Histology*: Lippincott Williams & Wilkins. 1era edición, España.
- Sánchez, A., Ballesteros, M. R. S., Vega-Baudrit, J. R., & Rojas, M. (2007). Utilización de soportes de hidrogel de quitosano obtenidos a partir de desechos del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) para el crecimiento 'in vitro' de fibroblastos humanos. *Revista iberoamericana de Polímeros*, 8(5), 347-362.
- Sánchez I. Umaña, Alejandra Q. G. (2010) Lesiones elementales en dermatología. *Revista médica de costa rica y centro américa*. 68(23). 345-348.
- Silverstein, M. S. 2014. Emulsion-templated porous polymers: A retrospective perspective. *Polymer*, 55, 304-320. doi: 10.1016/j.polymer.2013.08.068.
- Seymour B. R., Charles E. JR. (2002) Introducción a la química de los polímeros. 2da edición, Reverte. 22-34 pp.
- Trott, A. T., & Díaz, J. B. (2006). *Heridas y cortes: tratamiento y sutura de urgencia*. Elsevier. 3ª edición, España.
- Velasquillo Martínez Ma. Cristina, Mota J. (2018) Papel de la señalización Wnt en el fenotipo de los fibroblastos mantenidos sobre estructuras numéricas. Protocolo.
- Wang Ai-juan, Thomas P. Robert O. (2016) Protocurable high internal phase emulsions (HIPes) containing hydroxyapatite for additive manufacture of tissue engineering scaffolds with multi-scale porosity. *Materials science and engineering C*. Elsevier. C 67(2016) 51-58.
- Wong T, J.A. McGrath and H. Navsaria (2007) The role of fibroblasts in tissue engineering regeneration. Review article. *British Journal of Dermatology*. 156; 1149-1155.
- Zhao C., Aaron T., Giorgia P., Han Kiat Ho (2013) Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnology Advances*. 31(5). 654-668



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional
de Rehabilitación
Luis Guillermo Ibarra Ibarra

El Instituto Nacional de Rehabilitación
Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

**Estefania Vázquez Suárez, Josué Mota Morales, Joseline Hidalgo
Moyle Karla, Velasquillo Martinez Maria Cristina.**

Por su destacada participación en el XIX Congreso Anual de
Medicina y Discapacidad, Luis Guillermo Ibarra Ibarra
y XIV Jornadas de Médicos Residentes

Con el cartel:

**Biocompatibilidad in vitro de un andamio macroporoso de poli metil
metracrilato (pMMA) utilizando fibroblastos humanos**

Martes 01 de octubre del 2019

Dr. José Clemente Ibarra Ponce de León
Director General