



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS
(POLICAPROLACTONA-GELATINA-QUITOSANO) CON APLICACIÓN
POTENCIAL EN EL TRATAMIENTO DE HERIDAS DÉRMICAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

ANGELICA EYENY PURÓN FERNÁNDEZ DE ALFARO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. ALBERTO TECANTE CORONEL

VOCAL: M. EN C. MA. GUADALUPE LEMUS BARAJAS

SECRETARIO: DRA. PHAEDRA SURIEL SILVA BERMÚDEZ

1ER. SUPLENTE: DR. MIQUEL GIMENO SECO

2° SUPLENTE: Q. EDGAR AXEL DONJUAN GUERRERO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”

ASESOR DEL TEMA: DRA. PHAEDRA SURIEL SILVA BERMÚDEZ

SUSTENTANTE: ANGELICA EYENY PURÓN FERNÁNDEZ DE ALFARO

ÍNDICE

RESUMEN	ix
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONCEPTOS GENERALES	2
1.1.1 La piel humana.....	2
1.1.2 Las heridas en la piel	4
1.1.2.1 El proceso de reparación de las heridas en la piel.....	5
1.1.2.2 Cicatrización vs. Regeneración	7
1.1.3 Quemaduras	9
1.1.3.1 Tipos de quemaduras y tratamientos	10
1.1.4 Sustitutos de piel o coberturas temporales.....	11
1.1.5 Ingeniería de Tejidos.....	13
1.1.6 Biomateriales para andamios para el tratamiento de quemaduras	14
1.1.6.1 Polímeros sintéticos, policaprolactona	15
1.1.6.2 Polímeros de origen natural, gelatina y quitosano	17
1.1.7 Electrohilado	21
1.1.8 Recubrimientos electrostáticos capa a capa.....	25
1.2 OBJETIVO	26
1.2.1 Objetivo general	26
1.2.2 Objetivos particulares.....	26
CAPÍTULO II.....	27
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	27
2.1 FABRICACIÓN DE LOS ANDAMIOS.....	27
2.1.1 Membranas electrohiladas de policaprolactona y gelatina	27
2.1.2 Recubrimiento electrostático capa por capa con quitosano	29
2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE LOS ANDAMIOS.....	31
2.2.1 Microscopía electrónica de barrido	31
2.2.2 Espectroscopia de infrarrojo	31
2.2.3 Ángulo de contacto con agua	32
2.2.4 Liberación de Gel.....	32
2.2.5 Degradación <i>in vitro</i>	33

2.3	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA.....	34
2.3.1	Cultivo celular <i>in vitro</i> de fibroblastos humanos.....	34
2.3.2	Ensayo MTT-Formazán	37
2.3.3	Ensayo de calceína/homodímero de etidio.....	38
2.4	Análisis estadístico	39
CAPÍTULO III.....		40
RESULTADOS Y ANÁLISIS		40
3.1	FABRICACIÓN DE LOS ANDAMIOS.....	40
3.1.1	Membranas fibrilares.....	40
3.2	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS ANDAMIOS.....	40
3.2.1	Microscopía electrónica de barrido	40
3.2.2	Espectroscopia de infrarrojo	43
3.2.3	Ángulo de contacto con agua	46
3.2.4	Ensayo de Biuret, liberación de gelatina de los andamios.....	48
3.2.5	Degradación <i>in vitro</i>	49
3.3	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA.....	52
3.3.1	Ensayo MTT-Formazán	52
3.3.2	Ensayo de Calceína/Homodímero de etidio	53
CAPÍTULO IV		56
DISCUSIÓN.....		56
CAPÍTULO V		61
CONCLUSIONES		61
CAPÍTULO VI.....		63
REFERENCIAS.....		63
ANEXOS		70

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATR: Reflectancia total atenuada

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido dietilenaminotetracético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FTIR: Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

GAG: Glucosaminoglicanos

Gel: Gelatina

INR-LGII: Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

IT: Ingeniería de tejidos

MEC: Matriz extracelular

MTT: Metil-tiazol-tetrazolio

PBS: Phosphate-buffered saline

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI: Punto isoeléctrico

PCL: Policaprolactona

QS: Quitosano

SEM: Microscopia electrónica de barrido

TGF- α : Factor de crecimiento transformante alfa

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la piel (4).....	3
Figura 2. Esquema de la progresión del proceso de cicatrización (21)	6
Figura 3. Síntesis de la policaprolactona (PCL) (39).	16
Figura 4. Estructura de la gelatina (Gel) (51).....	18
Figura 5. a) Estructura de la quitina (61), b) Esquema de producción de los derivados de la quitina y c) Estructura del quitosano (QS) (61).	20
Figura 6. Diagrama del dispositivo de electrohilado.	21
Figura 7. Equipo de electrohilado utilizado.....	27
Figura 8. Proceso de recubrimiento con quitosano de las membranas electrohiladas PCL30Gel.....	29
Figura 9. Esquema de sembrado celular para los ensayos de MTT-Formazán y Calceína/Homodímero de etidio. Los andamios se incubaron con células durante 1 (amarillo), 3 (verde) y 5 (azul) d, se usó un control de cada andamio cultivado sin células (gris) para determinar la absorbancia o fluorescencia basal de los ensayos de MTT o calceína, respectivamente. Se usaron como controles positivos (Ctrl+) células incubadas en pozos de cultivo sin andamios.	35
Figura 10. Micrografías de SEM e histogramas del diámetro de las fibras en las membranas electrohiladas.	41
Figura 11. Espectros FTIR de los andamios de PCL30Gel, PCL30Gel(NaOH), PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS, PCL30Gel-30QS y espectros FTIR de PCL, QS y Gel.....	44
Figura 12. a) Ángulos de contacto promedio \pm DE, observados a diferentes tiempos tras haber depositado las gotas de agua en los andamios.b) Gráfica comparativa de los ángulos de contacto en la superficie de los andamios fibrilares.	47
Figura 13. Porcentaje de gelatina (respecto del contenido esperado de gelatina en el andamio electrohilado), liberada durante la inmersión de las membranas en PBS.....	49
Figura 14. Pérdida de masa de los andamios (en porcentaje respecto de su masa inicial) inmersos en solución tampón de fosfatos (PBS, pH= 7.4) a 37 °C en función del tiempo.....	51
Figura 15. Porcentaje de fibroblastos metabólicamente activos en los andamios a 1, 3 y 5 d de cultivo (respecto del número de fibroblastos metabólicamente activos en PCL a 1 d de cultivo, 100%), estimado a través del ensayo de MTT-Formazán. * Diferencias significativas, $p < 0.05$	53
Figura 16. Microfotografías de fluorescencia de fibroblastos cultivados en los andamios utilizando el ensayo de viabilidad celular de calceína (células vivas; verde) / homodímero de etidio (células muertas; rojo).....	54
Figura 17. Fuerzas que actúan sobre una gota de agua en una superficie. Adaptada de (83).....	71
Figura 18. Ángulo de contacto (θ) de superficies con distinta humectabilidad. a) gota de agua en una superficie hidrofóbica, $\theta > 90^\circ$ y b) en una superficie hidrofílica, $\theta < 90^\circ$. Adaptada de (83)	72
Figura 19. (A) Reacción de Biuret. (B) Coloración generada después de la formación del complejo enlace peptídico-Cu ²⁺ en función de la concentración de proteína en la disolución.	72
Figura 20. Curva de calibración para el ensayo de Biuret.	73
Figura 21.	74

Figura 22. Reducción de MTT a Formazán.....	75
Figura 23. Transformación de calceína AM (no fluorescente) a calceína (fluorescente) por las estereosas endógenas de las células metabólicamente activas (vivas).	76
Figura 24. Estructura molecular del homodímero de etidio.	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Andamios de policaprolactona (PCL) y gelatina (Gel) obtenidos mediante la técnica de electrohilado y recubiertos o no con quitosano (QS) usando la técnica de recubrimiento electrostático capa por capa.....	30
Cuadro 2. Bandas observadas en los espectros FTIR de PCL, Gel y QS y sus correspondientes asignaciones.....	45

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrollaron andamios a base de policaprolactona (PCL), gelatina (Gel) y quitosano (QS) para conjuntar las propiedades biológicas favorables del QS y la Gel con las propiedades mecánicas y la tasa de degradación favorables de la PCL. Para esto, se utilizó una mezcla de PCL y Gel con la cual se fabricaron andamios por medio de la técnica de electrohilado, para obtener membranas de fibras poliméricas orientadas al azar con una morfología similar a la estructura fibrilar de la matriz extracelular en la piel. Debido a la complejidad de electrohilar QS, este compuesto no se añadió a los andamios durante el proceso de electrohilado, los andamios electrohilados de PCL-Gel fueron recubiertos con QS utilizando la técnica de recubrimiento electrostático capa por capa. Las propiedades físicas y químicas de los andamios se caracterizaron utilizando las técnicas de microscopia electrónica de barrido, espectroscopia infrarroja, ángulo de contacto, ensayo de Biuret y degradación *in vitro*. Las propiedades biológicas de los andamios se caracterizaron sembrando fibroblastos; el principal tipo celular en la dermis de la piel, en las membranas y estudiando su viabilidad y proliferación mediante ensayos de Calceína/Homodímero de etidio y MTT-Formazán.

La adición de Gel a los andamios incrementó su hidrofiliidad, así como la viabilidad y proliferación celular en los andamios de PCL-Gel, en comparación con los andamios electrohilados de sólo PCL. Sin embargo, se observó una degradación mayor de los andamios de PCL-Gel, en comparación con los andamios de PCL, y una liberación rápida de más del 50% del contenido de Gel de los andamios de PCL-Gel durante las primeras 48 h de inmersión en Phosphate-buffered saline 1X (PBS 1X). La modificación de las membranas de PCL-Gel con recubrimientos de QS resultó en la obtención de membranas homogéneas que conservaron su estructura micro-fibrilar original y que mostraron una tasa de liberación de Gel menor, en comparación con los andamios de PCL-Gel no recubiertos.

De acuerdo con las propiedades físicas, químicas y biológicas estudiadas de los andamios, las membranas con el mayor potencial para ser consideradas para el posible tratamiento de lesiones por quemadura fueron los andamios PCL-30Gel-5QS y PCL-30Gel-15QS. Estas composiciones de los andamios mostraron disminuir la rápida liberación de Gel y la degradación, aumentar el carácter hidrofílico y favorecer la adhesión y proliferación celular, mostrando un mayor número de células viables, en comparación con los otros andamios.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las quemaduras representan un problema de salud pública a nivel mundial y en su gran mayoría tienen lugar en la población de los países menos desarrollados. En México, de acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, en el año 2013 se reportaron 126,786 casos de quemaduras graves. Este tipo de quemaduras son devastadoras creando daño físico y psicológico en los sobrevivientes; además de los altos costos de los tratamientos. Actualmente existen diversos tratamientos que contribuyen al proceso de curación de quemaduras graves; sin embargo, los tratamientos actuales aún tienen varias limitaciones como, pobre recuperación de la funcionalidad del tejido, poca disponibilidad para tratar o cubrir lesiones de gran extensión o posibilidad de rechazo inmune. Una opción de tratamiento es el uso de andamios o coberturas poliméricas novedosas, donde se ha demostrado que polímeros biocompatibles y biodegradables como la policaprolactona (PCL), el quitosano (QS) o la gelatina (Gel) tienen diversas propiedades físicas, químicas y biológicas que los hacen candidatos potenciales para el desarrollo de dichos sustitutos o coberturas. Con base en los principios de la Ingeniería de Tejidos se han desarrollado numerosos materiales en una búsqueda por mejorar los tratamientos actuales e incentivar la regeneración de diversos órganos y tejidos. Entre ellos, se encuentran varios andamios tisulares prometedores que buscan simular el ambiente fisiológico y estructural en el que se desarrollan naturalmente las células, es decir, la matriz extracelular (MEC). Estos andamios se deben fabricar con materiales biocompatibles que no causen ninguna reacción inmunológica significativa, que sean biodegradables para que se degraden gradualmente mientras dan paso a la formación del tejido *de novo*, y que puedan cumplir con propiedades mecánicas, estructurales y biológicas similares a las de la matriz extracelular.

En este sentido, tres materiales que podrían usarse para la fabricación de andamios para su potencial uso en el tratamiento de lesiones de la piel por quemadura son la PCL, la Gel y el QS. La PCL es un polímero sintético, biocompatible, biodegradable, con tasas de degradación menores que las de los polímeros naturales, propiedades mecánicas adecuadas, y que ha

sido aprobada por la FDA (Food and Drug Administration; USA) para diversas aplicaciones médicas. Sin embargo, no posee grupos químicos funcionales que interactúen con las células, es decir, es biológicamente inerte. Por otro lado, la Gel es un polímero natural derivado de la hidrólisis parcial de la colágena, una proteína altamente abundante en la matriz extracelular de la piel, de gran disponibilidad y que permite la viabilidad y proliferación celular; sin embargo, posee propiedades mecánicas débiles y es altamente soluble en medios acuosos a temperatura fisiológica, 37°C. De igual manera, el QS también es un polímero natural con propiedades mecánicas débiles, pero con propiedades biológicas favorables para la adhesión y proliferación celular, ya que tiene una estructura similar a la de los glucosaminoglicanos que conforman la MEC en la piel. El QS también ha demostrado tener propiedades antibacterianas y hemostáticas, así como promover la angiogénesis. Estos tres polímeros tienen ventajas y desventajas en sí mismos pero su combinación podría dar paso a la formación de andamios novedosos que presenten propiedades adecuadas para su potencial uso en el tratamiento de lesiones por quemadura, como hidrofiliidad, soporte para la adhesión, viabilidad y proliferación celular, propiedades mecánicas favorables para su manipulación quirúrgica, degradación controlada, etc.

1.1 CONCEPTOS GENERALES

1.1.1 La piel humana

La piel constituye el órgano más extenso del cuerpo humano. En un adulto promedio la piel tiene una superficie total de 1.5 a 2.0 m² y representa aproximadamente el 16% de la masa corporal total de un adulto (1). La piel realiza funciones importantes como la regulación de la temperatura corporal y de la cantidad de líquido que el cuerpo absorbe o pierde, la protección contra los rayos ultravioleta y contra traumatismos e infecciones, la síntesis de vitamina D, entre otras (1,2). La piel se compone de tres capas funcionales e interdependientes: la epidermis, la dermis y la hipodermis; Figura 1. Cada una de las capas depende del tejido circundante y su interconexión permite regular la estructura y función normal de la piel en los diferentes niveles de organización molecular, celular y tisular (3).

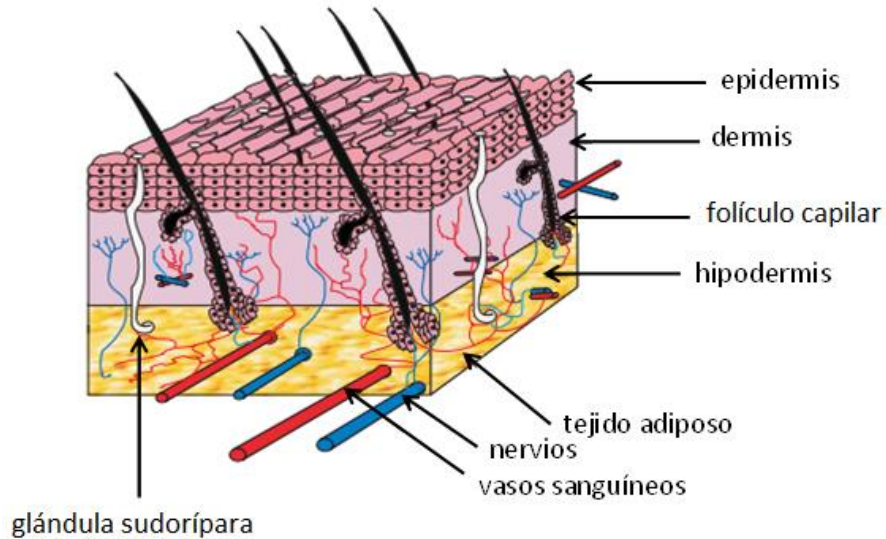


Figura 1. Estructura de la piel (4).

La epidermis forma la capa superficial de la piel, carece de microvasculatura y depende de la difusión de nutrientes y O_2 que le proporciona el tejido conjuntivo subyacente. Su función principal es servir como barrera protectora mientras que ayuda a mantener la integridad estructural del tejido (1,5,6). La epidermis tiene pocas terminaciones nerviosas para el tacto y el dolor y la mayoría de las sensaciones de la piel se perciben en terminaciones de la dermis (1). El principal tipo celular presente en la epidermis son los queratinocitos, los cuales conforman el 90% de la población celular de la epidermis y son los encargados de la síntesis de la queratina (6). La epidermis está compuesta de diferentes capas que representan diferentes etapas de maduración de la queratina y de los queratinocitos: el estrato basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lúcido y el estrato córneo; donde, el estrato lúcido es la capa de transición entre las células vivas del estrato granuloso y las células muertas del estrato córneo (7–9).

La dermis es la capa más gruesa y es el soporte de la piel. Esta capa es mecánicamente resistente, flexible, muy elástica, y varía de grosor en las diferentes regiones del cuerpo, siendo más delgada en los párpados (≈ 0.6 mm) y más gruesa en la parte posterior de las palmas de manos y pies (> 3 mm) (8). La dermis está compuesta por varios tipos celulares, entre ellos los fibroblastos, los macrófagos, las células mastoideas y las células circulantes transitorias del sistema inmunitario (3). La dermis está constituida por dos subcapas: la capa papilar que es la capa más superficial y la capa reticular que es la capa más profunda (10). La

dermis papilar está formada por una fina red de fibras de colágeno y fibras elásticas, y contiene vasos sanguíneos que irrigan la epidermis pero que no se introducen en ella. También contiene prolongaciones nerviosas que terminan en la epidermis o perforan la lámina basal para introducirse en el compartimiento epitelial (11,12). La dermis reticular está formada principalmente de MEC, la cual consiste mayoritariamente en fibras entrelazadas de elastina y colágena, y contiene glucosaminoglicanos (10). Las fibras de colágena constituyen el 70% de la dermis y le brindan dureza y resistencia a la piel, mientras que las fibras de elastina, que se encuentran en toda la dermis, le confieren elasticidad a la piel (8).

Dentro de las dos regiones de la dermis, papilar y reticular, los fibroblastos son el principal tipo celular, pero estos se encuentran en mayor proporción en la dermis papilar. Los fibroblastos son las células de sostén más importantes del tejido conectivo y se encuentran ampliamente distribuidos en muchos tejidos. En la mayor parte de los tejidos, los fibroblastos sintetizan y secretan componentes de la MEC como colágena, glucoproteínas, proteoglicanos y fibronectina (13,14). Además, los fibroblastos son importantes en la reparación de tejidos, ya que son extremadamente fuertes y pueden resistir estímulos dañinos que destruyen a la mayor parte de los otros tipos celulares como nervios y células epiteliales y/o musculares (13). Finalmente, la hipodermis es la capa más profunda de la piel y se encuentra debajo de la dermis. Está formada por tejido adiposo y tejido conjuntivo laxo que une a la piel con los órganos subyacentes (8). La hipodermis actúa como amortiguador, aislante térmico y como almacén de grasa y su principal tipo celular son las células grasas o adipositas (15).

1.1.2 Las heridas en la piel

Siendo la piel la principal barrera de protección contra el medio exterior, esta se encuentra constantemente expuesta a sufrir diversas heridas. Las heridas se definen como la pérdida de integridad de los tejidos, y pueden ser producidas por agentes internos o externos como infecciones, cortes, desgarres, aplastamientos, entre otros. Las heridas también pueden ser consecuencia del calor y del enfriamiento, ya que el calor excesivo desnaturaliza las proteínas de la piel y el enfriamiento por debajo de los 0 °C produce la formación de cristales en el interior de las células. Asimismo, las heridas en la piel también pueden presentarse debido a corrientes eléctricas intensas, agresión química o interrupción del aporte sanguíneo (16).

1.1.2.1 El proceso de reparación de las heridas en la piel

La piel tiene la propiedad intrínseca de regeneración y auto-reparación de las heridas (3); sin embargo, esta capacidad depende del grado de daño originado por la lesión. Los procesos de reparación de las heridas y regeneración de la piel están regulados principalmente por las interacciones entre los componentes de la MEC y las células que conforman la piel.

La MEC de la piel está formada principalmente por cuatro grupos de macromoléculas: a) proteínas estructurales fibrosas como colágena y elastina, que aportan fuerza tensil y capacidad retráctil; b) glucoproteínas adhesivas, que actúan principalmente como receptores transmembranales, pero que en ocasiones se depositan en el citoplasma; c) glucosaminoglicanos (GAG), que corresponden a polímeros largos y repetidos de sacáridos específicos; y d) proteoglicanos, que son moléculas que realizan distintos papeles en la regulación de la estructura y permeabilidad del tejido conjuntivo, y que junto con los GAG organizan la MEC (17). La MEC se remodela constantemente y su síntesis y degradación se asocian a diversos procesos como la morfogénesis, los procesos fibróticos crónicos, y la regeneración y cicatrización de las heridas, entre otros (13).

Durante el reensamblaje de las estructuras con múltiples capas como la piel, la MEC brinda soporte mecánico para el anclaje y migración de las células, mantiene la correcta polaridad celular, regula el crecimiento, la proliferación, el movimiento y la diferenciación de las células que viven dentro de ella, y participa en la formación de neovasos (17,18). Asimismo, la MEC se encarga del establecimiento de un microambiente tisular adecuado y del almacenamiento y presentación de moléculas reguladoras como diversos factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, que son esenciales para la regeneración de la piel y la reparación de las heridas (17,18).

Por otro lado, los fibroblastos unen a los constituyentes de la MEC y facilitan la reparación de las heridas, encargándose de sintetizar los factores de crecimiento involucrados en la señalización celular durante los procesos de reparación, así como de la síntesis, organización y mantenimiento de la MEC (19,20). Cuando la piel sufre una herida, los fibroblastos proliferan y migran hacia la herida para llenar los espacios en el tejido dañado y a medida que la proliferación continúa, secretan grandes cantidades de MEC formando la cicatriz temporal que cierra la herida (14).

Cuando ocurre una lesión en la piel, la reparación del tejido comienza de inmediato con la formación de coágulos de fibrina en el lugar de la lesión, evitando la hemorragia por vasos sanguíneos dañados. Las plaquetas circulantes se agregan en el sitio de la lesión y se liberan varios mediadores inflamatorios como el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Transformante alfa ($TGF-\alpha$), el Factor de Crecimiento Transformante beta ($TGF-\beta$), el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), los cuales desempeñan un papel importante en el proceso de reparación de la herida. En el caso de los tejidos adultos, la respuesta inflamatoria a las heridas se caracteriza por una afluencia temprana de neutrófilos cuyos números aumentan constantemente y alcanzan un máximo en un periodo de tiempo que de 24-48 h después de que ocurre la herida; Figura 2. Cuando los números de neutrófilos comienzan a disminuir, los macrófagos toman el control y proliferan en el sitio de la herida.

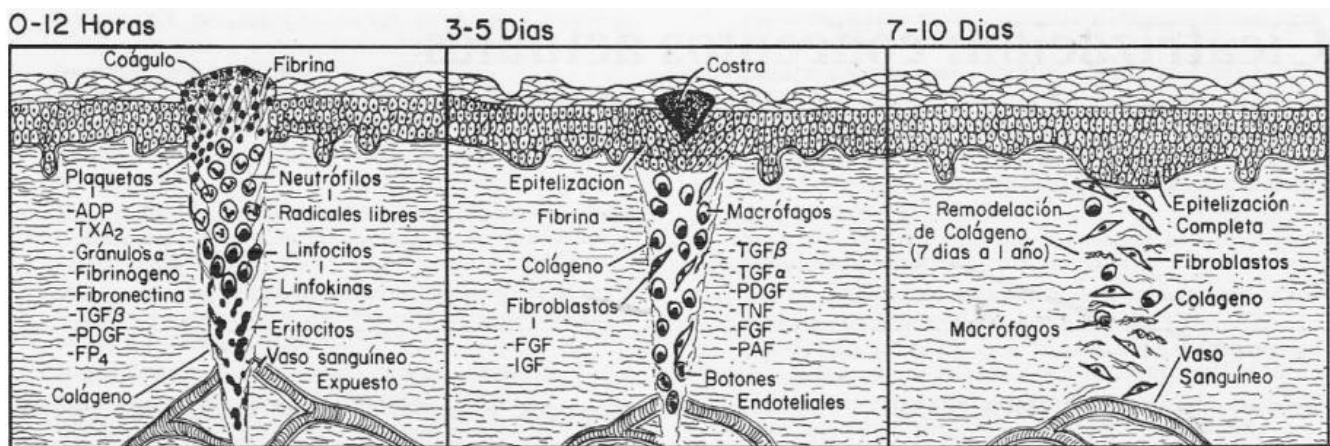


Figura 2. Esquema de la progresión del proceso de cicatrización (21) .

Al mismo tiempo, se produce la reepitelización de la herida con queratinocitos que migran a través del tejido de granulación desde lo profundo de la epidermis y con las células basales del borde de la herida; Figura 2. Tan pronto como los queratinocitos han restablecido la propiedad de barrera de la piel, reepitelización, estos retoman un fenotipo de células basales tras la inhibición por contacto y se diferencian en una epidermis de queratinización escamosa estratificada.

Las fases finales de la respuesta inflamatoria y la reepitelización coinciden con la migración de los fibroblastos y las células endoteliales, y con la formación de tejido de granulación. Posteriormente, se produce angiogénesis y fibroplasia y los fibroblastos se convierten en el tipo de célula dominante, depositando colágena y otros componentes de la MEC. Finalmente, la remodelación de la colágena depositada se produce utilizando metaloproteinasas de matriz que son producidas por los fibroblastos y los macrófagos; Figura 2. Esta última fase de la reparación de la herida puede durar varios meses y en el adulto, generalmente, se caracteriza por la formación de cicatrices que pueden ir de leves a severas dependiendo del balance entre los procesos particulares de reparación-cicatrización y los tratamientos quirúrgicos o médicos aplicados durante el tratamiento de la lesión.

1.1.2.2 Cicatrización vs. Regeneración

La contribución relativa de la cicatrización y la regeneración en la reparación tisular depende principalmente de la capacidad del tejido de regenerarse y de la extensión de la lesión. Además de que existen otros factores como la presencia de procesos de inflamación crónica o de infecciones, los cuales estimulan la formación de cicatrices debido a la producción local de citosinas que exacerban significativamente la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena (17). El equilibrio entre la colágena recién formada y la destrucción de la colágena antigua, durante la fase de remodelación en el proceso de reparación de las heridas, establecerá las características físicas finales de la cicatriz.

Para reparar el daño producido por una lesión, el cuerpo tiene que producir nuevas fibras de colágena; sin embargo, cuando el cuerpo no puede reconstruir el tejido exactamente como estaba, el nuevo tejido tendrá un patrón de colágena distinto y una textura diferente, cicatrización (22). Por lo que, para que exista una regeneración con recuperación del tejido normal, después de una lesión es necesario tener una MEC relativamente intacta (17). Cuando la piel experimenta una herida en donde la lesión llega hasta la dermis se crea principalmente una cicatriz y los procesos de regeneración se ven significativamente disminuidos, ya que al organismo no le es posible sustituir el tejido altamente especializado que se ha destruido y la herida es reparada por la formación y crecimiento de tejido conectivo. Este tejido tiene una circulación sanguínea menos abundante, y en muchas ocasiones no sólo

es irregular, sino también menos elástico y resistente que la piel; además, cabe la posibilidad de variaciones importantes en el color.

Cuando las lesiones son graves y existe: a) un daño en los reservorios de células poco diferenciadas o mesenquimales troncales que pueden contribuir a la regeneración del tejido, b) una ausencia significativa de fibroblastos que puedan migrar al lecho de la herida para su reparación y/o c) un deterioro importante en el soporte estructural de la piel o la MEC de la dermis, entonces no es posible la regeneración del tejido y el principal proceso de reparación tisular es por un medio de un depósito exacerbado de colágena y otros componentes de la MEC, que constituyen principalmente el depósito de un tejido fibroso y la formación de una cicatriz (17).

Las cicatrices se clasifican en tres grandes grupos: atróficas, hipertróficas y queloides. Las cicatrices atróficas están deprimidas y causan un valle o depresión en la piel. Las cicatrices hipertróficas están elevadas y pueden desaparecer con el tiempo gracias a un adecuado proceso de remodelación. Las cicatrices queloides son tejido cicatricial que se comporta como un tumor benigno, siendo estas elevadas y expansivas, continuando su creciendo más allá del margen de la herida original. Además de la apariencia, la ubicación y orientación de las cicatrices también son considerados factores muy importantes. Todos los tipos de cicatrices pueden ocurrir en todas las áreas del cuerpo, pero algunas áreas como el pecho, las rodillas y los codos son más susceptibles a la formación de cicatrices como respuesta a la reparación de una herida. Desafortunadamente, las cicatrices muy ostensibles aparecen a menudo en heridas próximas a las articulaciones o en partes del organismo sujetas a movimientos frecuentes o a fuerzas de tracción, lo que genera importantes restricciones de movimiento y discapacidad (23).

Por lo anterior, cuando la integridad de la piel es destruida se deben tomar medidas, dependiendo de la profundidad de la herida, para incentivar los procesos de regeneración normal y disminuir los procesos de cicatrización exacerbados. Las lesiones en la epidermis y las lesiones que se extienden a la capa superficial de la dermis desarrollarán una nueva epidermis sin intervención quirúrgica, siempre que haya un número suficiente de células basales de queratinocitos presentes en la epidermis restante o en la dermis residual. Si faltan queratinocitos epidérmicos, la regeneración puede lograrse mediante las células basales epiteliales derivadas de los folículos pilosos y/o las glándulas sudoríparas.

Sin embargo, cuando la lesión se extiende a la dermis más profunda o a la hipodermis, entonces es necesario usar tratamientos médicos o quirúrgicos más complejos para incentivar la regeneración y disminuir la cicatrización, ya que la superficie lesionada se queda sin células que puedan iniciar la reparación y sin una matriz de soporte (al haberse dañado la MEC) para la migración celular desde las orillas del tejido sano hacia el centro de la herida. En estos casos, el tratamiento está basado en la aplicación de injertos, sustitutos de piel o coberturas (autólogos, alogénicos o xenogénicos; sintéticas o naturales) y la reconstitución exitosa de la piel depende fundamentalmente de tener un sustituto funcional que contenga los componentes acelulares y/o celulares apropiados para inhibir o limitar la cicatrización de la piel en desarrollo e incentivar la regeneración de la misma (22).

1.1.3 Quemaduras

Dentro de las diferentes lesiones que puede sufrir la piel, las quemaduras constituyen un tipo de particular atención. Las quemaduras son lesiones corporales provocadas por aumentos de la energía térmica por transferencia aguda de energía hacia la piel por conducción directa o por transformación de energía. Las quemaduras pueden ser causadas por radiación, fuego, escaldaduras, sustancias químicas, electricidad o fricción (24). Cuando la temperatura es inferior a 45 °C es poco probable que exista daño celular. Es a partir de ≈ 50 °C que existe una desnaturalización de las proteínas del tejido que genera de forma local zonas de hiperemia, estasis, y necroptosis, así como una respuesta inflamatoria sistemática que busca detener y reparar el daño (25,26).

Las quemaduras representan un problema de salud pública y en su gran mayoría tienen lugar en los países menos desarrollados, lo que se debe en gran medida a la falta de cultura preventiva, la pobreza, la falta de medidas de seguridad adecuadas y el mal control de la violencia social; factores que influyen en el 85-95% de los traumatismos, las intoxicaciones y las quemaduras a nivel mundial (26). Las quemaduras fatales son causantes de una alta mortalidad a nivel mundial, según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se reporta que las quemaduras ocasionan alrededor de 180,000 muertes al año (27).

En particular, en México de acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Secretaría de Salud, en el año 2011 se registraron 129,779 pacientes con quemaduras graves y en el año 2013 se reportaron 126,786 nuevos casos (26). Las

quemaduras graves no fatales también son devastadoras creando daño psicológico y físico en los sobrevivientes, debido a la generación de cicatrices significativas y permanentes que causan desfiguración, disminución o pérdida de funcionalidad del órgano dañado, discapacidad, estigmatización, rechazo social, entre otros.

Además, los altos costos de los tratamientos por quemaduras graves crean secuelas económicas que terminan afectando la calidad de vida de los pacientes y de sus familiares. Se estima que los costos de atención médica integral por paciente varían entre \$30,000 y \$500,000 en casos de quemaduras de severidad moderada sin disfunción orgánica, entre \$500,000 y \$5,000,000 en caso de quemaduras de severidad moderada con disfunción orgánica, y entre \$5,000,000 y \$40,000,000 en casos de quemaduras de severidad grave con o sin falla orgánica múltiple. Los costos no pueden ser solventados de manera exclusiva por los pacientes, por lo que generalmente los gobiernos se encargan de cubrir estos gastos, lo que representa una erogación importante para los sistemas de salud públicos (26).

1.1.3.1 Tipos de quemaduras y tratamientos

Las quemaduras se pueden clasificar según su profundidad, extensión, gravedad o agente etiológico (28). Por su profundidad se clasifican en:

- Primer grado: sólo existe daño en la epidermis, la piel puede repararse por sí sola y no se genera una cicatrización significativa.
- Segundo grado: existe daño en la epidermis y la parte superficial o profunda de la dermis, lesionando terminaciones nerviosas. Los anexos cutáneos pueden proporcionar la fuente de recambio celular para el estrato basal de la epidermis; sin embargo, en los casos donde ocurre daño en la parte profunda de la dermis (capa reticular) se requiere de tratamientos quirúrgicos especializados para el cierre de las heridas y la disminución de los procesos de cicatrización (2,28).
- Tercer grado: Existe daño en todas las capas de la piel y puede llegar a afectar músculo y hueso destruyendo todas las terminales nerviosas. Estas quemaduras requieren de tratamiento especializado y siempre existe una cicatriz significativa (25,28).

En las lesiones por quemaduras de segundo grado profundo y de tercer grado, la piel pierde la capacidad de auto-regeneración y requiere de tratamientos médico-quirúrgicos especializados para la reparación del tejido. Debido a la gravedad de estas lesiones, las quemaduras de segundo grado profundo y de tercer grado generalmente resultan en la pérdida o disminución de funcionalidad del órgano y en los casos más severos pueden conllevar a la muerte.

Existen diversos tratamientos para las quemaduras profundas, donde el estándar de oro es el uso de injertos de piel autólogos (derivados del propio paciente y obtenidos como trasplantes de espesor parcial de zonas de piel sana), seguido por el uso de injertos de piel homólogos o alogénicos (derivados de otro individuo de la misma especie) que por lo general se obtienen de donaciones de órganos, y finalmente por el uso de injertos heterólogos o xenogénicos (derivados de una especie diferente como por ejemplo el cerdo). Sin embargo, estos injertos están limitados, generalmente, por su baja disponibilidad y por la posibilidad de rechazo inmune, respectivamente.

En las quemaduras graves, la disponibilidad de autoinjertos es una limitante importante cuando las lesiones superan el 50% del área total de la superficie corporal, ya que existe una restricción significativa de disponibilidad de sitios donantes sanos. Las técnicas convencionales de injertos autólogos de piel se basan en el trasplante de piel de espesor parcial de sitios donantes sanos del mismo paciente (22). También pueden producirse injertos epidérmicos autólogos *in vitro* por expansión celular a partir de una pequeña biopsia de piel; sin embargo, se requieren de 2 a 3 semanas para cultivar las células del donante/huésped y generalmente los injertos resultantes son frágiles en ausencia de una dermis o andamio subyacente (29). En cualquier circunstancia, el proceso es laborioso, doloroso y costoso. Por lo que para evitar estos problemas se pueden utilizar aloinjertos (piel de cadáveres) y xenoinjertos (piel bovina o porcina) como coberturas temporales que no llegan a incorporarse a la piel del huésped; sin embargo, algunos de estos injertos están asociados con el rechazo inmune y la transferencia de enfermedades.

1.1.4 Sustitutos de piel o coberturas temporales

Actualmente se han desarrollado diversos tratamientos con base en los principios de la Ingeniería de Tejidos (IT) para tratar de evitar los problemas que conllevan el uso de injertos de piel; autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos (30). En estos desarrollos se ha demostrado

que los polímeros biocompatibles y biodegradables son excelentes materiales base para desarrollar andamios que sirvan como plataformas para incentivar la migración celular o como acarreadores celulares al sitio de la herida para promover la reparación de lesiones cutáneas severas, como las quemaduras de segundo grado profundo o de tercer grado (29,30). Uno de los objetivos finales de estos desarrollos es producir sustitutos de piel de reemplazo novedosos que tenga las propiedades estructurales y funcionales del tejido original para promover así su reparación, y que preferentemente puedan incorporarse en el tejido huésped sin dejar cicatrices.

En la actualidad no existen modelos de piel sintética que repliquen completamente la anatomía, fisiología, estabilidad biológica y naturaleza estética de la piel no lesionada. Sin embargo, existen diferentes materiales, desarrollados a partir de los principios de la Ingeniería de Tejidos, que cumplen con algunas características esenciales para ser considerados potenciales sustitutos de piel o coberturas para el tratamiento de lesiones dermo-epidérmicas. Las características que se espera que cumpla un sustituto de piel son principalmente las siguientes: ser de fácil manejo y aplicación en el sitio de la herida, proporcionar una función de barrera vital con un flujo de agua adecuado, tener las propiedades físicas y mecánicas adecuadas para su manejo quirúrgico y para constituir una matriz que permita y promueva la migración celular, sufrir degradación controlada, ser estéril, no tóxico y no antigénico y evocar una reactividad inflamatoria mínima. Otras características deseables son la incorporación en el huésped con un mínimo de cicatrización y dolor, la promoción de la angiogénesis y la rentabilidad de su producción (4).

Algunas de las coberturas o sustitutos de piel (no injertos) que se utilizan actualmente en el tratamiento de lesiones por quemaduras se pueden clasificar de forma general como: A) Láminas y matrices polimérica, por ejemplo, Integra® (bicapa compuesta por una capa desechable de polisiloxano entrelazada a colágena bovina reticulada tipo I y GAG, y otra capa de condroitina-6-sulfato) o TransCyte® (membrana de silicona unida a una malla de nylon recubierta de colágena porcina). B) Matrices acelulares, compuestas generalmente de tejido epitelial tratado química o físicamente para eliminar las células y mantener únicamente la MEC biológicamente activa, por ejemplo, Alloderm® (dermis de cadáver procesada). C) Tejidos o capas celulares cultivadas, que pueden ser producidas a partir de células autólogas o alogénicas, y que generalmente están formadas por fibroblastos humanos cultivados en una

matriz soporte con o sin capa análoga a la epidermis, por ejemplo, Epicel® (autoinjerto epidérmico cultivado a partir de una biopsia de piel del paciente), Epifast® (aloinjerto cultivado a partir de queratinocitos derivados de prepucio de neonato crio-preservados) o Apligraf® (constructo formado por una capa de queratinocitos y fibroblastos alogénicos de humano y una capa de colágena bovina) (4,22,29,31,32).

1.1.5 Ingeniería de Tejidos

La Ingeniería de Tejidos (IT) fue definida por primera vez por los doctores J. Vacanti, C. Vacanti y R. Langer en 1993 como "un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular" (33).

Actualmente, la IT se define como "un campo multidisciplinario de la medicina regenerativa que utiliza células, andamios (biomateriales) y señales bioquímicas y/o mecánicas para generar estructuras que restauren, sustituyan o regeneren un tejido dañado" (34). La IT busca persuadir la regeneración o reparación de los tejidos que no lo hacen espontáneamente, y generalmente involucra la obtención de tejido por medio de una biopsia, el aislamiento de células a partir de este tejido y el cultivo *in vitro* de estas células sembradas sobre un andamio.

El andamio es un biomaterial cuyo propósito es fungir como un sustrato temporal que proporcione un soporte físico y un ambiente local adecuado para promover y guiar la formación del tejido. Esperándose que los andamios de ingeniería tisular sean capaces de funcionar como una MEC sintética y temporal que proporcione un marco poroso y tridimensional para que las células se unan y se desarrollen hasta que se produzca la reparación o regeneración del tejido (33). Los andamios también pueden servir como portadores de células, factores de crecimiento y/u otras señales biomoleculares (35), y así, las construcciones célula/andamio desarrolladas *in vitro* pueden implantarse en un sitio defectuoso con la intención de mejorar aún más la reparación y regeneración del tejido. El andamio debe permitir la adhesión, proliferación y, de ser el caso, la diferenciación celular, así como la síntesis de MEC, procurando la integridad estructural del tejido en formación.

El andamio es un soporte temporal, por lo que generalmente se emplean para su desarrollo polímeros biocompatibles y biodegradables, que tienen la ventaja de degradarse *in vivo* en subproductos no tóxicos (36). Entre los diferentes polímeros que se han empleado para el desarrollo de andamios dirigidos al tratamiento de lesiones dermoepidérmicas por quemaduras, se encuentran diversos polímeros biocompatibles y biodegradables de origen sintético y natural como la policaprolactona (PCL), y la gelatina (Gel) o el quitosano (QS), respectivamente, los cuales han demostrado tener propiedades adecuadas para incentivar la reparación del tejido dermoepidérmico.

1.1.6 Biomateriales para andamios para el tratamiento de quemaduras

Para seleccionar los materiales adecuados para el diseño y fabricación de un andamio para ingeniería de tejidos se requiere que estos cumplan con diferentes propiedades en términos de biocompatibilidad, resistencia mecánica, velocidad de degradación, propiedades de superficie específicas, presencia de grupos funcionales para modificación, funcionalización o marcado, entre otras, ya que la intención es imitar la MEC y proporcionar la información o señalización necesaria para la unión, proliferación y diferenciación celular. Por lo anterior, se ha empleado una amplia variedad de materiales naturales y sintéticos, solos o en combinación, para tratar de cumplir con todos o la mayoría de los diversos requerimientos de un andamio (4). Además, los requisitos específicos del biomaterial varían dependiendo del uso específico del andamio y no son los mismos para todos los tejidos o aplicaciones. Por lo que los biomateriales deben tener propiedades que se puedan adaptar para satisfacer la necesidad del uso específico que se le dará al andamio.

En general, los requisitos de los andamios, y por tanto de los biomateriales usados para su construcción, se pueden resumir como:

1. Biocompatibilidad; el material no debe inducir una respuesta inmune significativa. Se espera un estallido inicial de la respuesta inflamatoria que a veces se considera esencial en el proceso de curación; sin embargo, la inflamación prologada no es deseable ya que puede inducir necrosis tisular o incompatibilidad (36).
2. Esterilizabilidad; el material debe poder esterilizarse sin presentar cambios significativos o detrimento de su estructura; las técnicas de esterilización incluyen radiación gamma, exposición a gases con radicales libres y el uso de autoclave.

3. Funcionalidad biológica; el andamio debe promover activamente la regeneración del tejido.
4. Porosidad interconectada; debe existir en el andamio una alta relación superficie-volumen, ya que esto influye en la regeneración del tejido permitiendo la migración, adhesión y proliferación celular, así como el intercambio de nutrientes. Además, se espera que la naturaleza porosa e interconectada del andamio permita el flujo de nutrientes y desechos fisiológicos para promover la funcionalidad de las células y la angiogénesis (en tejidos vascularizados) tras la implantación en el sitio de la lesión.
5. Similitud arquitectónica y funcional con la MEC; se espera que el andamio actúe como un soporte temporal para que las células se adhieran y proliferen promoviendo la reparación de las heridas, por lo que es deseable que tenga una estructura topográfica similar a la del tejido *novo*, buscándose que la tasa de degradación coincida con (o al menos sea controlable para imitar a) la tasa de formación del neo-tejido o tejido de *novo* (33).
6. Posibilidad de fabricación; a menudo se dice que hay muchos materiales candidatos que son biocompatibles; sin embargo, siempre debe evaluarse la capacidad y factibilidad de fabricación de un andamio con las propiedades deseables a partir de estos materiales.

1.1.6.1 Polímeros sintéticos, policaprolactona

Los andamios fabricados a partir de polímeros sintéticos tienen diversas ventajas, por ejemplo, son mecánicamente estables permitiendo su fácil manipulación médica o quirúrgica, poseen velocidades de degradación controlables y no transfieren patógenos de origen. Además, permiten un control más preciso, en comparación con los polímeros naturales, sobre propiedades como la masa molar, la resistencia mecánica y la hidrofobicidad. Sin embargo, usualmente necesitan moléculas o compuestos de superficie que ayuden a incentivar o promover las interacciones entre las células y el material. Además de que pueden presentar productos de degradación con posibles efectos inmunológicos. Algunos de los polímeros sintéticos más usados para la fabricación de andamios para Ingeniería de Tejidos, principalmente de tejidos blandos como la piel, son los poliésteres alifáticos (37).

Entre los poliésteres alifáticos ampliamente usados en el desarrollo de andamios para Ingeniería de Tejidos se encuentra la policaprolactona (PCL), la cual se hizo disponible comercialmente a partir de los esfuerzos de Union Carbide para identificar polímeros

sintéticos que pudieran degradarse por microorganismos (38). La PCL es un poliéster alifático, lineal, semi-cristalino, sintetizado a partir de la conversión química del petróleo mediante la polimerización por apertura del anillo de la ϵ -caprolactona; Figura 3, (37,39).

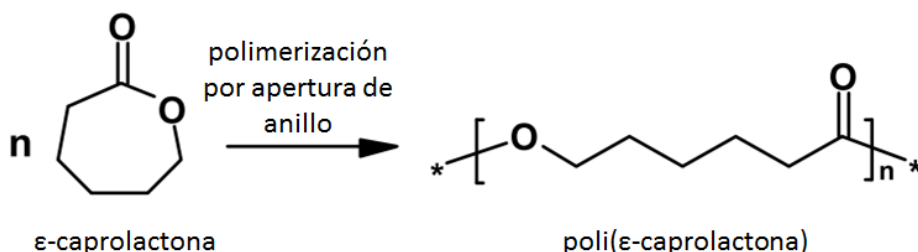


Figura 3. Síntesis de la policaprolactona (PCL) (39).

La PCL es un polímero sintético con alta solubilidad en disolventes orgánicos, posee buena estabilidad térmica y estructural, presenta bajo punto de fusión (59-64 °C), es biocompatible y tiene excepcional capacidad para formar mezclas, lo cual ha estimulado la investigación sobre su uso como biomaterial para aplicaciones biomédicas y de Ingeniería de Tejidos (37,38). La PCL se degrada completamente por hidrólisis y por biodegradación enzimática; además, los fragmentos de baja masa molar de la PCL que se producen durante su degradación hidrolítica son tomados por los macrófagos y degradados intracelularmente, demostrando su completa biocompatibilidad (40). Por ejemplo, las células Vero (células epiteliales renales de mono verde africano) sembradas en andamios electrohilados de PCL (disuelto en ácido acético glacial) mostraron buena adherencia y proliferación (41). Las películas ultrafinas de PCL aplicadas sobre heridas de espesor total y parcial en modelos de ratas y cerdos no indujeron reacciones inflamatorias y apoyaron la cicatrización normal de la herida(42).

A pesar de las ventajas que presenta la PCL para constituir un biomaterial adecuado para el desarrollo de andamios para Ingeniería de Tejidos blandos como la piel, su falta de grupos funcionales bioactivos y su tasa lenta de degradación (comparada con la tasa de degradación de los polímeros naturales) limitan su aplicación como material único en Ingeniería de Tejidos. Sin embargo, es posible reducir estas desventajas combinando la PCL con otros materiales que tengan las características de biofuncionalidad deseadas, por ejemplo las características biológicas que poseen polímeros naturales como la Gel o el QS (43,44). Es importante enfatizar que combinando diferentes compuestos se tiene la posibilidad de obtener un material

con características y propiedades específicas y/o complementarias diferentes a las de los compuestos individuales aislados (45).

1.1.6.2 Polímeros de origen natural, gelatina y quitosano

Los polímeros de origen natural son obtenidos del ser humano, los animales o las plantas, y por su procedencia se caracterizan por tener sitios de reconocimiento biomolecular; grupos funcionales bioactivos. Entre los polímeros naturales más usados para el desarrollo de andamios para Ingeniería de Tejidos se encuentran las proteínas (colágena, gelatina, fibrina, seda fibroína o elastina) y los polisacáridos (glucosaminoglicanos, ácido hialurónico-AH, quitina, quitosano o alginato) (37).

Los polímeros naturales están disponibles en mayor cantidad que los polímeros sintéticos; sin embargo, presentan algunas limitaciones para su uso en el desarrollo de andamios, como inmunogenicidad, dificultad de procesamiento, variabilidad de lote a lote y riesgo potencial de transmisión de patógenos relacionados con su origen. Además, muchos polímeros naturales son solubles en medios acuosos a condiciones fisiológicas (37 °C y pH \approx 7.0), por lo que no son apropiados como andamios y deben ser modificados para ser convertidos en materiales insolubles en agua.

Los polímeros naturales pueden compartir propiedades similares a las de los tejidos blandos que están reemplazando, como la fuerza mecánica y las propiedades físicas; pero a pesar de esto, sus aplicaciones como andamios para IT son limitadas, debido a que su resistencia mecánica no es lo suficientemente fuerte al ser hidratados. Una ventaja de los polímeros naturales es que, por lo general, permiten fácilmente la inclusión de factores de crecimiento o de diferentes moléculas benéficas para la regeneración tisular (37). Así, los polímeros naturales son deseables para el desarrollo de andamios para Ingeniería de Tejidos debido a su mayor biocompatibilidad y biofuncionalidad, pero, generalmente se busca usarlos en combinación con otros polímeros de origen sintético para incrementar su resistencia mecánica y disminuir su velocidad de degradación.

La gelatina (Figura 4) es un polímero natural proteínico obtenido a partir de la hidrólisis parcial de la colágena y presenta diversas propiedades ventajosas para el desarrollo de andamios para IT, como buena procesabilidad (por ejemplo para formar fibras por electrohilado),

transparencia, biodegradabilidad, bioabsorción, baja inmunogenicidad, hidrofiliidad y biocompatibilidad (37). Al ser la gelatina obtenida de la hidrolisis parcial de la colágena, esta conserva diversos grupos funcionales, como los grupos amino y carboxilo (46), presentes en la colágena y mantiene así muchos sitios de unión de la integrina para la adhesión celular y la diferenciación (37,47). Además, se ha demostrado que la gelatina puede ser menos inmunogénica que la colágena (48–50).

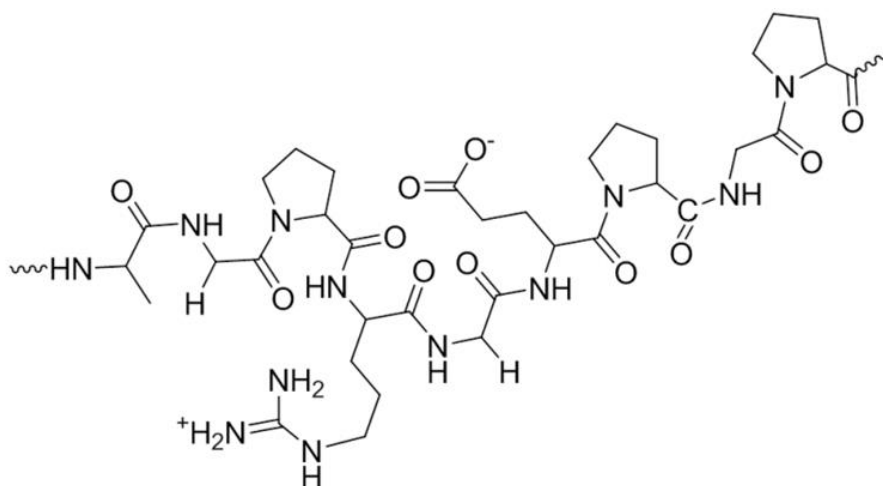


Figura 4. Estructura de la gelatina (Gel) (51).

La Gel se ha estudiado ampliamente como material en apósitos para curación de heridas y como andamio dérmico (52–54) debido a sus diferentes propiedades físicas y a que puede mimetizar la composición de la MEC; la cual está parcialmente compuesta de proteínas de la familia de la colágena (52,54,55). Por ejemplo, la Gel es comúnmente usada para revestir superficies de materiales poliméricos hidrofóbicos para aumentar su hidrofiliidad y mejorar las interacciones material-célula (52). Andamios de Gel desarrollados por electrohilado y estudiados *in vitro* han revelado inducir una alta viabilidad y organización celular en fibroblastos fetales (52). A pesar de sus propiedades biológicas favorables, las propiedades mecánicas de la Gel son muy débiles presentando baja resistencia a la tracción y rápida deformación, lo que limita su aplicación como andamio celular (47). Para ser utilizada de forma satisfactoria en IT, la Gel requiere reticularse, entrecruzarse o combinarse con otros materiales para mejorar sus propiedades mecánicas y extender su tiempo de biodegradación, principalmente. La mayoría de los entrecruzantes empleados para modificar químicamente la

Gel tales como glutaraldehído, genipina y carbodiimida tienen asociados riesgos de residuos citotóxicos si estos no son eliminados perfectamente del material después del proceso de entrecruzamiento (56–58). Por lo que muchas veces se prefiere su combinación con otros materiales biocompatibles para reducir sus desventajas y potenciar sus ventajas (52,55,56).

Otro polímero de origen natural ampliamente usado en la Ingeniería de Tejidos es el QS, un polisacárido catiónico que se obtiene por la N-desacetilación parcial de la quitina (Figura 5), la cual se obtiene de diversos orígenes naturales como los exoesqueletos de los crustáceos, las paredes celulares de algunos hongos, entre otros. El QS es un polímero biocompatible y enzimáticamente biodegradable que posee una estructura cristalina rígida con enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares (59). El QS puede presentar diferentes grados de desacetilación (40-98%) y masas molares dependiendo del tratamiento químico o biológico al que fue sometida la quitina para la obtención de QS (37).

El QS y sus derivados poseen diversas propiedades favorables para regenerar diversos tejidos como los huesos, el hígado, el cartílago, los nervios o la piel (37). Además, la naturaleza catiónica del QS lo hace tener una alta afinidad hacia los aniones de la pared celular bacteriana, lo que impide el transporte de masa a través de la pared celular bacteriana y eventualmente mata a estos microorganismos (37).

Asimismo, la identidad catiónica del QS le otorga propiedades antimicóticas ya que suprime la esporulación, evitando la reproducción de los hongos (60). La acción microbicida y antifúngica del QS es un factor importante para el proceso de curación de las heridas epidérmicas o dermoepidérmicas como las úlceras diabéticas y las quemaduras (60). Evitar las infecciones bacterianas en úlceras y en lesiones por quemadura es de vital importancia, ya que las infecciones bacterianas son uno de los problemas colaterales más comunes de estas lesiones y uno de los principales obstáculos para su reparación.

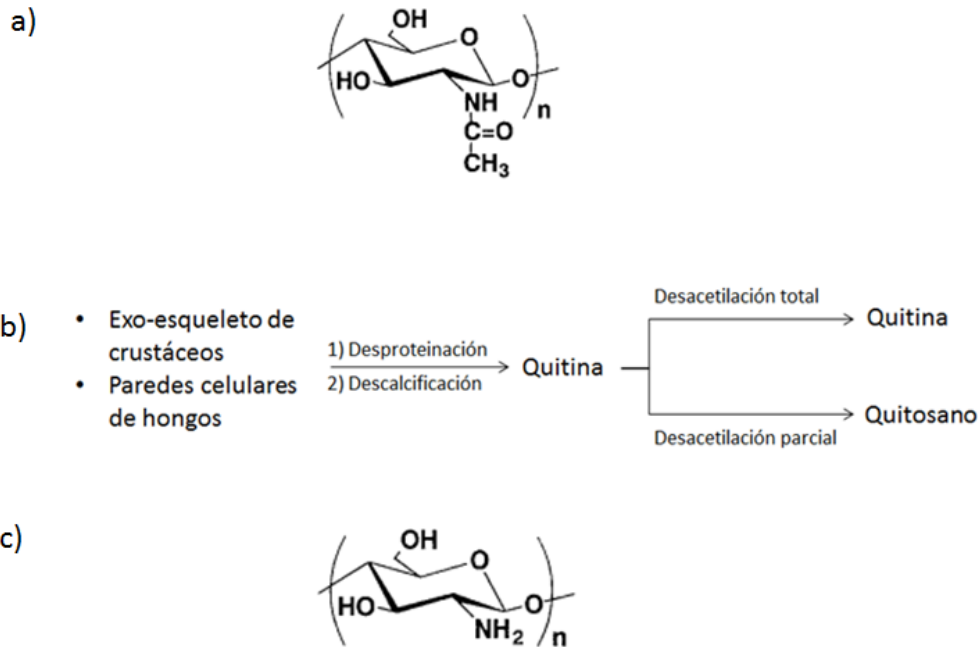


Figura 5. a) Estructura de la quitina (61), b) Esquema de producción de los derivados de la quitina y c) Estructura del quitosano (QS) (61).

La carga positiva del QS y su similitud estructural con los glucosaminoglicanos y proteoglicanos presentes en la MEC, mejora la adhesión y la proliferación celular en andamios de quitosano (37). Además, el QS tiene propiedades adhesivas, trombogénicas y plaquetarias que mejoran el proceso de curación de las heridas, y en disoluciones viscosas favorece la unión dermo-epidérmica y la re-epitelización (30,37).

Por otro lado, el QS es un material que se procesa fácilmente al diluirlo en disoluciones con pH menor a 6 (60), pero que en disoluciones con $\text{pH} \approx 7$ (pH fisiológico) se vuelve insoluble. Lo cual es muy conveniente, ya que se puede prefabricar un andamio de QS con cierta estructura a condiciones de $\text{pH} < 6$ y lograr que dicha estructura se mantenga una vez colocada en un sistema en condiciones fisiológicas ($\text{pH} = 7$). Otra ventaja del QS es que sus residuos de degradación no son citotóxicos, debido a que su unidad monomérica, la N-glucosamina, es una molécula que se encuentra naturalmente en matrices extracelulares humanas (37).

Finalmente, cabe mencionar que la estructura, propiedades mecánicas y velocidad de degradación del QS se pueden controlar al modificar su masa molar, porcentaje de

desacetilación y concentración en disolución. Así, la versatilidad química del QS y la posibilidad de generar estructuras base QS con tamaño de poro y tasa de degradación predecibles, hacen del QS un material prometedor para aplicaciones de ingeniería de diferentes tejidos, entre ellos la piel (37).

1.1.7 Electrohilado

Al momento de fabricar andamios tisulares, la selección de materiales y la técnica de fabricación son de suma importancia, ya que las características del andamio resultante dependerán de las propiedades de sus materiales constituyentes y de la técnica de fabricación utilizada. La técnica de electrohilado es muy conveniente para combinar diferentes polímeros en un andamio para el potencial tratamiento de quemaduras, ya que permite mezclar diferentes disoluciones de polímeros en membranas (andamios) microfibrilares que presentan una estructura similar a la que se encuentra en la MEC de la dermis.

El dispositivo típico de electrohilado consiste en una bomba de inyección, una fuente de alto voltaje, una jeringa para dispensar la disolución polimérica a través de un capilar metálico (generalmente una aguja) y un colector metálico; Figura 6.

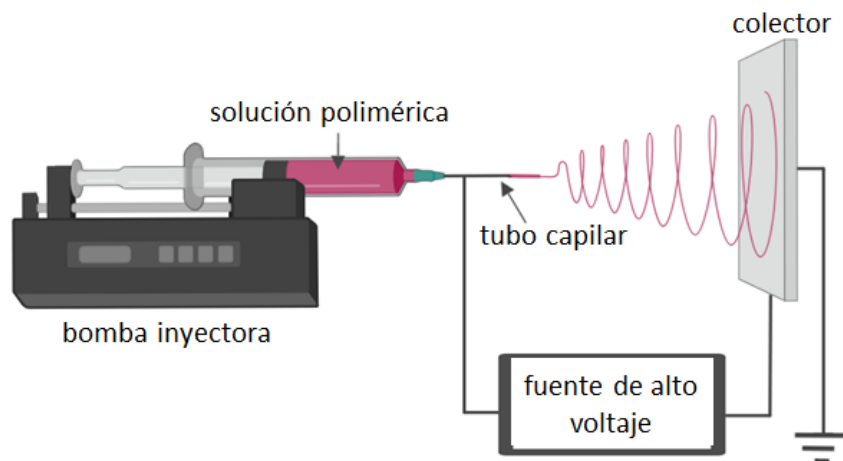


Figura 6. Diagrama del dispositivo de electrohilado.

Durante el proceso de electrohilado, la disolución polimérica es inyectada lentamente a través de la jeringa, manteniéndose en forma de gota en la punta de la aguja por tensión superficial. La aplicación de un campo eléctrico, generado por la fuente de alto voltaje, induce una carga eléctrica dentro del polímero, lo que a su vez, provoca la repulsión de la carga dentro de la disolución, generando una fuerza electrostática que se opone a la tensión superficial. Al aumentar la diferencia de potencial del campo eléctrico, se alcanza un estado en el que la repulsión de carga supera la tensión superficial, por lo que la gota comienza a estirarse y obtiene una forma cónica denominada cono de Taylor. Seguido del cono de Taylor se genera el inicio de un chorro o jet que se dirige hacia el colector impulsado por las fuerzas eléctricas sobre las cargas libres en la superficie o dentro del líquido polimérico. A medida que el jet se desplaza hacia el colector, el disolvente se evapora y las fibras poliméricas sólidas son recolectadas en el colector metálico (33). Debido a la aleatoriedad del chorro generado por la repulsión entre las cargas en su superficie, en el colector se forma una membrana altamente porosa con fibras orientadas al azar; se pueden implementar modificaciones como el uso de un colector rotatorio para obtener fibras orientadas (33).

Las propiedades de la disolución polimérica (polaridad, viscosidad, conductividad, tensión superficial, momento dipolar, constante dieléctrica y solubilidad y masa molar del polímero), las condiciones del proceso (voltaje, distancia colector-aguja, diseño de la aguja y del colector y velocidad de inyección) y las condiciones ambientales (humedad relativa y temperatura) tienen una influencia significativa sobre el proceso de electrohilado y la morfología de las fibras resultantes (62).

Los efectos individuales de las propiedades de la disolución pueden ser difíciles de aislar ya que variar un parámetro, generalmente, afecta otras propiedades de la disolución (33). Algunos de los efectos conocidos de las propiedades de la disolución polimérica son: A) La tensión superficial influye en la formación de defectos a lo largo de la longitud de la fibra; B) La viscosidad y las propiedades eléctricas determinan la fuerza de elongación de la disolución, lo que a su vez, afecta el diámetro de las fibras resultantes (63); y C) El estiramiento del chorro afecta la evaporación del disolvente, lo que tienen un efecto sobre la viscoelasticidad del polímero líquido (64). No obstante, existen variables que pueden ser controladas de manera independiente durante el proceso, como la velocidad de flujo de la disolución polimérica, la

intensidad del campo eléctrico, la distancia entre la punta de la aguja y el colector, el diseño de la aguja y la composición y geometría del colector (33).

En los últimos años, el electrohilado ha ganado gran popularidad como técnica para sintetizar andamios para Ingeniería de Tejidos, debido en gran parte a un interés creciente en las propiedades y tecnologías a nanoescala y a su capacidad para producir andamios con una estructura porosa interconectada con diámetros de fibra en el rango submicrométrico que imitan la topografía de la MEC. El electrohilado permite producir fibras de polímeros con una estructura larga y tridimensional de manera continua y a gran escala, y el diámetro de las fibras puede ser controlado en un rango de nanómetros a micrómetros mediante la selección adecuada de los parámetros de procesamiento (65,66). Además, en comparación con las técnicas de autoensamblaje y separación de fases, el electrohilado proporciona un medio más simple para producir andamios con una estructura de poros interconectados y diámetros de fibra en el rango submicrométrico (33).

En un sistema *in vivo*, la gran mayoría de las células están en contacto con la MEC, que generalmente está compuesta por una red de fibras de proteínas de tamaño nanométrico y glucosaminoglicanos. La intrincada complejidad de este entorno espacial y temporal influye dinámicamente en el comportamiento celular. Por ejemplo, en el hueso, se requiere de una MEC de colágena tipo I organizada para el desarrollo de células osteoprogenitoras que deriven en osteoblastos maduros y por tanto en una mejor regeneración del tejido (33). Este tipo de interacciones entre células y MEC puede modular actividades celulares tales como la migración, proliferación, diferenciación, expresión génica y secreción de diversas hormonas y factores de crecimiento. Por lo tanto, cuanto más se pueda recrear en un andamio el entorno *in vivo*, es decir, la composición química y la estructura morfológica de la MEC, mayor será la posibilidad de éxito del andamio (33).

Se ha demostrado que las propiedades similares a la MEC de las fibras electrohiladas afectan el comportamiento fenotípico de una variedad de células (33). Por ejemplo, fibroblastos NIH3T3 y células normales de riñón de rata sembradas sobre nanofibras electrohiladas de poliamida reorganizaron su citoesqueleto de actina a una morfología más similar a la morfología observada *in vivo* (33). Condrocitos bovinos fetales sembrados en andamios electrohilados de PCL fueron capaces de mantener el fenotipo condral durante tres semanas de cultivo, específicamente regulando positivamente la expresión de colágena tipo IIB, que es

indicativo de un fenotipo de condrocito maduro (33). Fibroblastos fetales humanos, HFFF2, sembrados sobre andamios electrohilados de PCL, gelatina de piel de pescado de agua fría (las nanofibras de gelatina se entrecruzaron con vapor de glutaraldehído) y QS se usaron *in vivo* como sustitutos de la piel en un modelo de herida de rata con eliminación total de la piel. Las pruebas *in vitro* revelaron que las células se adhirieron y proliferaron en todos los andamios. Sin embargo, las células profundas en el andamio solo se observaron en los andamios PCL y QS. En las pruebas *in vivo*, los andamios de QS tuvieron el mayor impacto en el proceso de curación al disminuir la extensión de la contracción de la herida y mejorar la producción de una neodermis y la reepitelización de la herida (52).

Estos y otros estudios demuestran que los andamios fibrilares no solo son citocompatibles sino que también pueden estimular la proliferación celular y el comportamiento fenotípico. Hasta la fecha, el uso de tales andamios se ha investigado principalmente para la ingeniería de cartílago, ligamento/tendón, tejidos vasculares y piel (33); sin embargo, en los últimos años los diseños innovadores de inyectores y recolectores para electrohilado han ampliado la biblioteca de compuestos poliméricos a usar y la estructura morfológica de los andamios fibrilares obtenidos, aumentando la probabilidad de su uso exitoso en la regeneración de diferentes tipos de tejidos.

El electrohilado también posee otras características ventajosas, como la simplicidad y la naturaleza económica del dispositivo (33), ya que es un proceso relativamente fácil y rápido para producir micro y nanofibras (65), además de las propiedades únicas de las membranas fibrilares producidas, como un área de superficie por unidad de masa muy alta, propiedades de superficie sintonizables, delgadez de capa, alta permeabilidad, bajo peso base, capacidad de retener cargas electrostáticas y rentabilidad, entre otras (62).

Una de las principales desventajas de las estructuras desarrolladas por electrohilado es su tamaño de poro, que puede representar una limitación para la infiltración celular (33). Sin embargo, al combinar durante el electrohilado, disoluciones de polímeros con diferentes velocidades de biodegradación, como es el caso de la PCL y la Gel, se pueden lograr mayores tamaños de poro en los andamios tras la degradación temprana del polímero que posee la velocidad de biodegradación más alta (33).

En comparación con el electrohilado de polímeros sintéticos como la PCL, el electrohilado de polímeros naturales es, por lo general, menos versátil porque se deben usar disolventes

adecuados que no comprometan su integridad y que además, cumplan con las propiedades necesarias para llevar a cabo el proceso de electrohilado; los polímeros naturales son por lo general más sensibles a la degradación química que los polímeros sintéticos. Además de que algunos polímeros naturales como el QS no tienen las propiedades (eléctricas/viscosidad/entramado) adecuadas para su fácil electrohilado (33) .

1.1.8 Recubrimientos electrostáticos capa a capa

Algunas veces los polímeros y los componentes biofuncionales adecuados, pueden no ser integrados en las fibras del andamio durante su electrohilado, sino que pueden ser colocados posteriormente como un recubrimiento superficial, cuando como en el caso del QS su procesamiento por electrohilado es complicado. Para integrar el QS como un recubrimiento a los andamios electrohilados en un procesamiento post-electrohilado, puede emplearse la técnica de recubrimiento electrostático capa por capa. Esta técnica aprovecha la interacción carga-carga entre un sustrato con carga eléctrica superficial y monocapas de polielectrolitos para crear recubrimientos delgados de múltiples capas del polielectrolito unidas por fuerzas electrostáticas al sustrato.

La formación de estos sistemas se atribuye a interacciones electrostáticas como enlaces de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals. Las películas capa por capa se ensamblan mediante adsorción directa repetitiva de componentes de funcionalidad (carga eléctrica) opuesta (67).

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Objetivo general

Desarrollar andamios fibrilares a base de PCL, Gel y QS para conjuntar las propiedades biológicas del QS y la Gel con las propiedades mecánicas y la tasa de degradación favorables de la PCL, en membranas fibrilares con propiedades adecuadas para su potencial uso en el tratamiento de quemaduras.

1.2.2 Objetivos particulares

- Fabricar andamios de PCL y Gel por medio de la técnica de electrohilado y usando una mezcla de PCL y Gel, para obtener membranas con una estructura microfibrilar, y que conjunten las propiedades físicas y químicas de la PCL y la Gel, como la resistencia mecánica y la baja disolución en medios acuosos de la PCL y los grupos químicos funcionales, como los grupos amino y carboxilo, de la Gel.
- Recubrir con QS las membranas micro-fibrilares de PCL-Gel mediante la técnica de recubrimiento electrostático capa por capa, para conservar la estructura microfibrilar de las membranas e incorporar a los andamios las características químicas del QS para disminuir la rapidez de disolución de la Gel contenida en el andamio y mejorar la adhesión y viabilidad celular en los andamios.
- Caracterizar las propiedades físicas y químicas de los andamios obtenidos para determinar su composición química, estructura microscópica, mojabilidad y rapidez de degradación y liberación de gelatina en medios acuosos, entre otros, para identificar el andamio con las mejores propiedades físicas y químicas, de entre los andamios desarrollados, para su uso potencial en el tratamiento de lesiones por quemaduras.
- Caracterizar la biocompatibilidad de los andamios obtenidos utilizando fibroblastos humanos, el principal tipo celular en la dermis en la piel humana, y estudiando su viabilidad y proliferación al ser sembrados en los andamios, para identificar el andamio con el mejor potencial biológico *in vitro*, de entre los andamios desarrollados, para su uso potencial en el tratamiento de lesiones por quemaduras.

CAPÍTULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 FABRICACIÓN DE LOS ANDAMIOS

2.1.1 Membranas electrohiladas de policaprolactona y gelatina

Para fabricar los andamios en forma de membranas fibrilares se empleó un equipo de electrohilado de configuración horizontal ensamblado en el Laboratorio de Biomateriales de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR-LGII); Figura 7. Este dispositivo consiste en una bomba inyectora de doble canal (Modelo NE-4000 2-channel, Pump Systems Inc.) con un intervalo de trabajo de 0.001 - 7630 $\mu\text{L/h}$, una fuente de alto voltaje con un voltaje variable de salida de 0 a 50 kV (serie EH60P1.5 de la marca Glassman High Voltage Inc.) y una placa de aluminio usada como colector estático.



Figura 7. Equipo de electrohilado utilizado.

Para la fabricación de los andamios fibrilares por electrohilado se preparó una disolución polimérica disolviendo simultáneamente PCL (masa molar $M_n = 80,000$; Sigma-Aldrich) y Gel

tipo B (derivada de piel de bovino, J.T Baker) en ácido acético glacial al 0.98 mL/mL (J.T Baker). La disolución polimérica se preparó a una concentración de 0.19 g/g de PCL respecto de ácido acético y simultáneamente se agregó la cantidad necesaria de Gel para llevar la disolución a una concentración de 0.30 g/g de Gel respecto de la masa total de polímero en la disolución; es decir, respecto de la masa total de PCL + Gel en la disolución, obteniéndose una relación másica final PCL:Gel de 70:30. De la misma manera, se preparó una disolución de únicamente PCL al 0.19 g/g en ácido acético para obtener andamios fibrilares compuestos únicamente de PCL, los cuales fueron empleados como control comparativo durante los experimentos *in vitro*. Posteriormente, las disoluciones poliméricas de PCL-Gel y de PCL se agitaron a ≈ 90 rpm durante 72 h a temperatura ambiente antes de ser electrohiladas. En el caso de las membranas de PCL-Gel, se decidió usar solamente una única concentración de Gel (0.30 g/g de Gel) debido a que en trabajos previos, tanto del laboratorio como de otros grupos de investigación, se han estudiado diferentes porcentajes de Gel en membranas de PCL-Gel electrohiladas, observándose que una buena combinación de las propiedades mecánicas vs la respuesta biológica se encuentra alrededor de una relación másica de PCL:Gel de 70:30 (68); las propiedades mecánicas de las membranas fibrilares electrohiladas de PCL-Gel disminuyen a medida que aumenta la concentración de Gel en las membranas, mientras que la viabilidad y proliferación celular aumentan a medida que aumenta la concentración de Gel en las membranas.

Para llevar a cabo el proceso de electrohilado, la disolución polimérica (PCL o PCL-Gel) fue trasladada a una jeringa con pivote tipo luer-lock con escala graduada de 5 mL y con una aguja de calibre 21G (BD Bioplastipak TM). La jeringa se colocó en la bomba inyectora para dispensar la disolución a un flujo volumétrico constante. El electrohilado de la disolución de PCL-Gel se llevó a cabo a 14 kV, a una distancia aguja-colector de 14 cm y con un flujo volumétrico dispensado de 1 mL/h. Para electrohilar la disolución de PCL, se utilizó una distancia aguja-colector de 15 cm, una diferencia de potencial de 15 kV y un flujo volumétrico de 1 mL/h. Los andamios así obtenidos fueron nombrados como PCL30Gel y PCL de acuerdo con la composición de la disolución polimérica usada, PCL-Gel (0.30 g/g de Gel) o PCL, respectivamente.

2.1.2 Recubrimiento electrostático capa por capa con quitosano

Las membranas electrohiladas PCL30Gel se recubrieron con QS mediante la técnica de recubrimiento electrostático capa por capa. Para la Gel, cuando el valor de pH de la disolución es inferior a su punto isoeléctrico (PI = 6.14) (69), las moléculas de Gel se cargan positivamente mediante la protonación de los grupos amino. Contrariamente, cuando el pH es mayor que el PI de la Gel, los grupos amino se desprotonan y se cargan negativamente. Por lo anterior, las membranas PCL30Gel fueron inmersas en una disolución de NaOH 1 mol/L (pH = 14) por 5 min, para que adquirieran una carga negativa en su superficie; Figura 8.

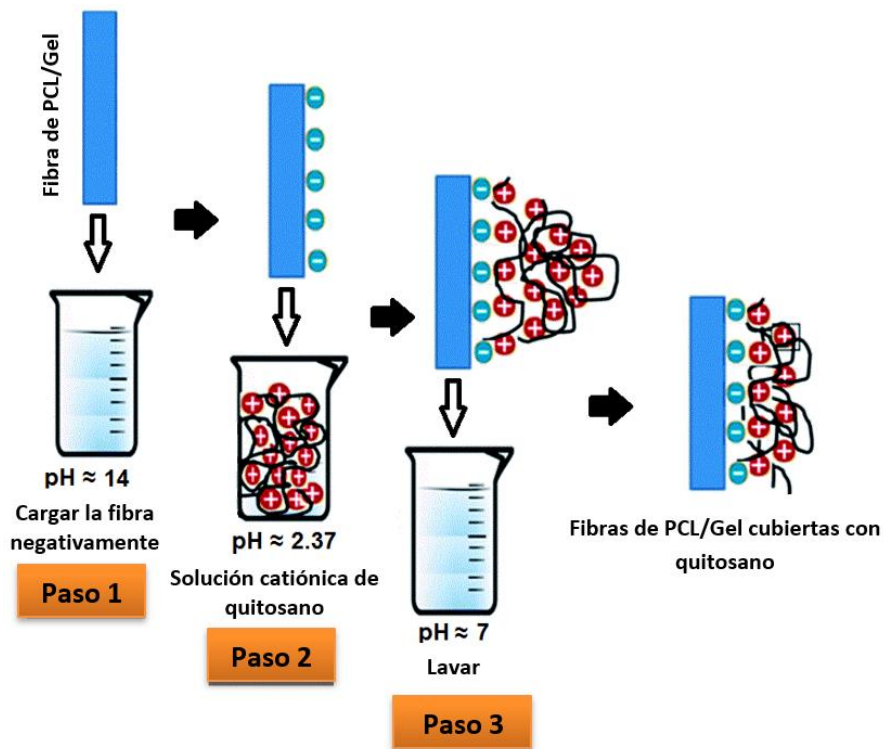


Figura 8. Proceso de recubrimiento con quitosano de las membranas electrohiladas PCL30Gel.

Inmediatamente después, los andamios fueron individualmente sumergidos en una disolución de QS en una disolución acuosa de ácido acético con una concentración de QS de 0.66 g/L, la disolución de ácido acético utilizada para obtener la disolución de QS fue una disolución con una concentración de ácido acético de 0.5 mol/L. Los andamios fueron sumergidos de forma independiente en la disolución de QS durante tres tiempos diferentes, 5, 15 o 30 min; en esta disolución de QS (pH = 2.37) la carga eléctrica del QS es positiva. Posteriormente, los

andamios fueron lavadas con agua destilada (pH = 7) para remover el exceso de QS; Figura 8. Finalmente, las membranas fueron secadas durante 48 h sobre una gasa a temperatura ambiente.

Los andamios recubiertos con QS fueron nombrados usando como base de la nomenclatura las siglas PCL30Gel (definidas para nombrar las membranas de PCL-Gel electrohiladas) y de acuerdo con el tiempo de inmersión en minutos de las membranas en la disolución de QS para su recubrimiento, usando los números “5”, “15” y “30” antes de las letras “QS”. En el Cuadro 1 se muestran los diferentes andamios estudiados en la presente investigación.

Cuadro 1. Andamios de policaprolactona (PCL) y gelatina (Gel) obtenidos mediante la técnica de electrohilado y recubiertos o no con quitosano (QS) usando la técnica de recubrimiento electrostático capa por capa.

Andamio	Composición del andamio electrohilado.		Tiempo de inmersión del andamio en la disolución de quitosano (min)
	PCL (g/g)	Gel (g/g)	
PCL	1.00	0	0
PCL30Gel	0.70	0.30	0
PCL30Gel-5QS	0.70	0.30	5
PCL30Gel-15QS	0.70	0.30	15
PCL30Gel-30QS	0.70	0.30	30

2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE LOS ANDAMIOS

Los principios de funcionamiento de las diferentes técnicas de caracterización de propiedades físicas y químicas utilizadas en el presente proyecto se describen brevemente en el Anexo 1.

2.2.1 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) fue utilizada en el presente estudio para observar la morfología de los andamios de PCL y PCL30Gel sin recubrimiento y de PCL30Gel con los diferentes recubrimientos de QS. Para su observación por SEM, las muestras de los andamios fueron previamente recubiertas con carbono mediante la técnica “sputtering-coated”. Para obtener las micrografías, se utilizó un voltaje de aceleración de 3-10 kV y amplificaciones de 1000X y 5000X. A partir de las micrografías obtenidas se calculó el diámetro promedio de las fibras midiendo el diámetro de al menos 80 fibras aleatoriamente en diferentes áreas de las micrografías usando el software AxioVision 4.8. Se reporta el diámetro promedio de las fibras en las membranas y la desviación estándar.

2.2.2 Espectroscopia de infrarrojo

La presencia de grupos funcionales en cada uno de los andamios desarrollados en este estudio, PCL, PCL30Gel, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS, se determinó empleando la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) acoplada a un módulo de Reflectancia Total Atenuada (ATR). Para ello, primero se identificaron los modos vibracionales presentes en los espectros FTIR de cada uno de los compuestos individuales contenidos en los andamios, esto es PCL, Gel y QS. Posteriormente, se identificaron los modos vibracionales presentes en los espectros FTIR correspondientes a cada uno de los andamios estudiados. Para obtener los espectros FTIR de cada andamio, cada una de las muestras fue colocada en el aditamento ATR del equipo de espectroscopia infrarroja y sujeta bajo presión durante la medición. Los espectros FTIR de cada una de las muestras se obtuvieron a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Nicolet 6706/Smart

Orbit ATR Optics en un intervalo de número de onda de 4000-400 cm^{-1} con 32 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} .

2.2.3 Ángulo de contacto con agua

Para determinar la mojabilidad o carácter hidrofóbico/hidrofílico de la superficie de los diferentes andamios estudiados (PCL, PCL30Gel, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS) se determinó el ángulo de contacto en modo de gota sésil empleando un goniómetro de la marca Rame-Hart Instrument Co, equipado con un dispensador de líquidos automático (Automated Dispensing System®; Rame-Hart Instrument Co). En la superficie de los andamios se colocó una gota de 4 μL de agua bidestilada y el ángulo de contacto de la gota se determinó después de 1, 3 y 5 s de haber depositado la gota usando el software Drop Snake (Image J® software). Tres diferentes gotas de agua fueron colocadas en tres diferentes zonas de la superficie de muestras de cada uno de los diferentes andamios estudiados. Los experimentos se hicieron por triplicado y se reporta el promedio del ángulo de contacto y la desviación estándar.

2.2.4 Liberación de Gel

La liberación de Gel de los andamios de PCL30Gel, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS en agua bidestilada, a temperatura fisiológica (37 °C) y bajo agitación orbital (\approx 120 rpm) después de 1, 3 y 5 d de incubación se determinó mediante el ensayo de Biuret.

Para obtener el reactivo Biuret, se preparó una primera disolución disolviendo 0.25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre (II) pentahidratado, Sigma-Aldrich) y 1.126 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartrato de potasio y sodio tetrahidratado, Sigma-Aldrich) en 66.6 mL de agua bidestilada. Se preparó una segunda disolución, diluyendo 7 g de NaOH (hidroxido de sodio, Sigma-Aldrich) en 66.6 mL de agua bidestilada. Finalmente, se mezclaron ambas disoluciones en un nuevo recipiente y se agregaron 34.6 mL de agua bidestilada y el recipiente se mantuvo en oscuridad a \approx 4 °C hasta su uso.

Para estimar la concentración de Gel liberada por los diferentes andamios después de 1, 3 y 5 d de incubación de las muestras de los andamios en agua bidestilada a 37°C en agitación orbital (\approx 120 rpm), primero se construyó una curva de calibración que permitió correlacionar

la absorbancia ($\lambda = 570$ nm) de la disolución en la que se lleva a cabo la reacción de Biuret con la concentración de proteína presente en esta disolución. La curva de calibración obtenida y los métodos utilizados para su obtención se describen en la sección 1.4 del Anexo 1.

Para llevar a cabo el ensayo de Biuret en los sobrenadantes de los andamios incubados en agua bidestilada, se utilizaron 3 especímenes de los andamios, cada uno de 20 ± 0.4 mg. Cada uno de los especímenes se pesaron y colocaron individualmente, en frascos de vidrio con 1 mL de agua bidestilada en un incubador orbital a 37 °C y 80 rpm. Después de 1, 3 y 5 d de incubación se tomó una alícuota de 500 μ L de los sobrenadantes de las diferentes disoluciones de agua bidestilada después de remover los andamios, y cada alícuota se mezcló individualmente con 2.0 mL del reactivo de Biuret. Después de 10 min de llevarse a cabo la reacción de Biuret a temperatura ambiente y en agitación se tomaron 3 alícuotas de 100 μ L de cada una de las disoluciones y se midió su absorbancia a $\lambda = 570$ nm. La concentración de Gel en cada disolución se estimó a partir de la absorbancia medida y la curva de calibración absorbancia vs concentración de gelatina.

2.2.5 Degradación *in vitro*

La tasa de degradación de los andamios, PCL, PCL30Gel, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS fue evaluada midiendo el porcentaje de pérdida de masa de los diferentes andamios después de ser incubados en PBS (pH = 7.4) a 37 °C y 80 rpm. Para determinar el porcentaje de pérdida de masa, primero se cortaron muestras circulares (2 cm de diámetro) de cada uno de los diferentes andamios y se midió la masa en seco (masa inicial, W_0) de cada una de las muestras. Posteriormente, cada una de las muestras fue sumergida individualmente en 1 mL de una solución tampón de fosfatos (Phosphate-buffered saline 1X, PBS 1X) e incubada a 37 °C y 80 rpm; el PBS fue sustituido cada tercer día por 1 mL de PBS fresco. Después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 17 d de incubación, las muestras se lavaron con agua Milli-Q, se dejaron secando para remover el agua residual en los andamios y nuevamente se midió su masa en seco (W_x) en cada tiempo de incubación. Los experimentos fueron llevados a cabo de manera individual para cada diferente andamio por triplicado. El porcentaje de pérdida de masa fue calculado empleando la ecuación 1:

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \frac{(W_0 - W_x)}{W_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

El cambio del porcentaje de masa, respecto de la masa inicial de los andamios (100%), en el tiempo de degradación (inmersión) se ajustó matemáticamente de acuerdo al modelo de Gompertz, el cual transforma las series que muestran una tendencia susceptible de aplicación del modelo exponencial modificado, mediante la aplicación de logaritmos naturales (70).

Esta ley proponía que la población de muchas comunidades está dada por:

$$N(t) = ke^{ae^{-bt}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde t denota el tiempo, $N(t)$ es la población total y k , a y b son constantes reales (k y b siendo positivas).

2.3 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

La respuesta biológica de los andamios fue estudiada de manera *in vitro* a través del sembrado celular de fibroblastos humanos sobre los andamios. Todos los ensayos biológicos se realizaron en campana de flujo laminar (1300 Series A2, Thermo Scientific) bajo condiciones de esterilidad. Para la caracterización de la respuesta biológica de los andamios se realizaron todos los ensayos por duplicado y en cada ensayo se usaron muestras por triplicado de cada diferente tipo de andamio o control. Los principios de funcionamiento de los diferentes ensayos utilizados se describen brevemente en el Anexo 2.

2.3.1 Cultivo celular *in vitro* de fibroblastos humanos

Para los ensayos *in vitro*, muestras circulares (8 mm de diámetro) de los diferentes andamios fueron esterilizadas con radiación UV ($\lambda = 254$ nm) en un equipo UV CrossLinker Hoefer UVC500 durante 15 min por cada lado del andamio. Posteriormente, las muestras fueron colocadas individualmente, por duplicado, en pozos de cajas nuevas de cultivo de 48 pozos (Corning) para ser cultivadas con fibroblastos por 1, 3 y 7 d. En la Figura 9 se muestra el arreglo en el que se colocaron las muestras y sus controles para los ensayos celulares *in vitro*. Se utilizó un control de cada andamio cultivado sin células para determinar la absorbancia

basal de realizar una prueba de MTT en un andamio sin células o la fluorescencia de fondo de realizar una prueba de calceína en un andamio sin células. También se colocaron controles positivos de células sembradas directamente en los pozos de cultivo sin andamios (control positivo; Ctrl+).

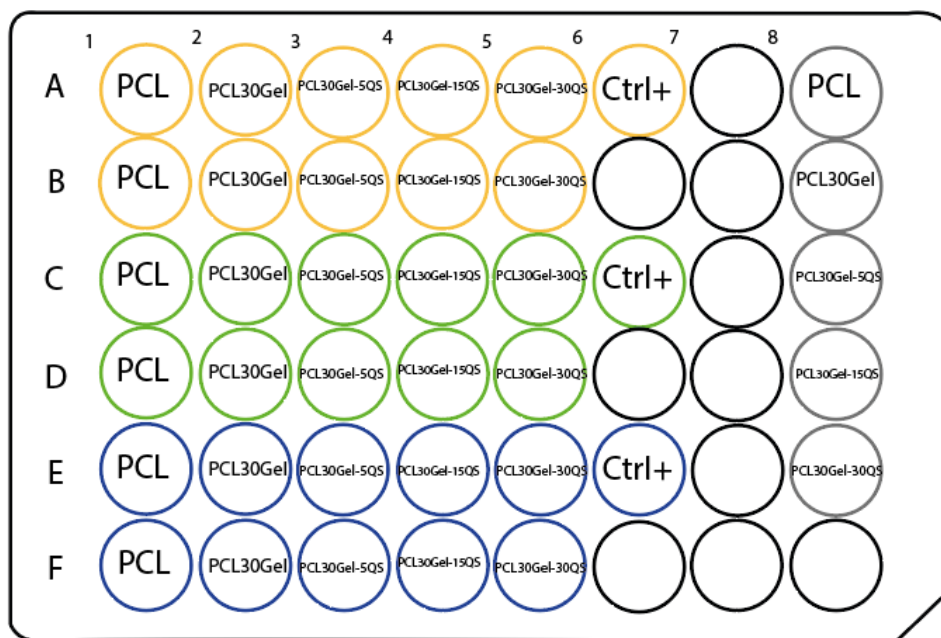


Figura 9. Esquema de sembrado celular para los ensayos de MTT-Formazán y Calceína/Homodímero de etídio. Los andamios se incubaron con células durante 1 (amarillo), 3 (verde) y 5 (azul) d, se usó un control de cada andamio cultivado sin células (gris) para determinar la absorbancia o fluorescencia basal de los ensayos de MTT o calceína, respectivamente. Se usaron como controles positivos (Ctrl+) células incubadas en pozos de cultivo sin andamios.

Para el cultivo celular, se utilizaron fibroblastos aislados a partir de remanentes de piel de prepucio de neonato, obtenidas bajo consentimiento informado. Los fibroblastos se mantuvieron hasta su uso en criopreservación en nitrógeno líquido, en una disolución de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich) en Suero Fetal Bovino 1X (SFB, Gibco) con una concentración de 0.1 mL/mL de DMSO. Los fibroblastos fueron descongelados para su expansión en cajas de cultivo T25 (Corning), cambiando el medio de cultivo cada tercer día. El medio de cultivo celular estándar para la expansión celular y todos los experimentos que involucraron el cultivo de células correspondió a Dulbecco-Modified Eagle Medium (DMEM-F12, Gibco) complementado con SFB y antibiótico-antimicótico (anti-anti, Gibco) en una concentración de 0.1 mL/mL y 0.01 mL/mL de SFB y antibiótico-antimicótico, respectivamente.

El cultivo celular en expansión se mantuvo en condiciones estériles dentro de una incubadora (Thermo Scientific) en condiciones de cultivo celular estándar, es decir, a 37 °C, en una atmósfera con 0.05 cm³/cm³ de CO₂ en aire y con un 95% de humedad relativa. Las condiciones de cultivo para todos los experimentos que involucraron el cultivo o incubación de células siempre fueron las mismas; condiciones de cultivo estándar. El medio de cultivo se cambió cada tercer día hasta obtener una confluencia celular de ≈ 90% (≈ 0.9 cm²/cm² de cobertura celular, respecto de la superficie disponible para cultivo celular en una caja de cultivo).

Para la subsecuente expansión de las células, se retiró el medio de cultivo de las cajas y estas se lavaron dos veces con PBS estéril a 37 °C. Después se agregó una disolución de tripsina en EDTA (ácido dietilenaminotetracético) con una concentración de 0.05 mL/mL de tripsina (Gibco) y la caja de cultivo se incubó durante 6 min en condiciones de cultivo celular estándar. Posteriormente, se añadió medio de cultivo celular y la disolución células-Tripsina-EDTA-medio de cultivo se trasladó a un tubo estéril de 15 mL y se centrifugó por 10 min a 1500 rpm a 25 °C. Terminando el proceso de centrifugado se retiró el sobrenadante dejando el precipitado formado por las células (pellet celular). El pellet celular se disgregó mecánicamente y fue resuspendido en 1 mL de medio de cultivo. Para contar el número de células en la disolución se realizó un conteo usando una cámara de Neubauer de doble cuadrícula. Para esto, se mezclaron 10 µL de la disolución celular obtenida y 10 µL de azul tripano. Posteriormente se colocaron 10 µL de la mezcla en cada una de las cuadrículas de la cámara de Neubauer. El número total de células por cuadrante fue observado a través de un microscopio óptico invertido (Axiovert 40CFL, Zeiss) y el número total de células por mililitro en la disolución celular se calculó empleando la Ecuación 3.

$$\frac{\# \text{ células}}{\text{mL}} = \left(\frac{\# \text{ total de células vivas}}{\# \text{ cuadrantes contados}} \times 2 \right) (10,000) \quad (\text{Ecuación 3})$$

A partir del conteo celular, se sembraron las células a expandir en cajas de cultivo T25 con medio de cultivo celular y se incubaron en condiciones de cultivo celular estándar; se realizó el cambio del medio de cultivo cada tercer día.

Para la siembra de células en los andamios (estudios de biocompatibilidad *in vitro*), las células en expansión se desprendieron de las cajas de cultivo al alcanzar 80% de confluencia celular ($\approx 0.8 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ de cobertura celular, respecto de la superficie disponible para cultivo celular en una caja de cultivo); las células se recolectaron y contaron de acuerdo con el método descrito para la expansión celular. De las células obtenidas, se sembraron 40,000 células, usando una gota de 40 μL de disolución celular en medio de cultivo, sobre cada uno de los andamios estériles colocados en pozos de una placa de 48 pozos (Corning); Figura 9. Las muestras se incubaron en condiciones de cultivo celular estándar por 40 min y finalmente, se agregaron 200 μL de medio de cultivo celular a cada pozo. Las cajas de pozos de cultivo se regresaron a condiciones de cultivo estándar y se incubaron hasta por 5 d, realizando el cambio del medio de cultivo después de 1, 3 y 5 d de la siembra celular.

2.3.2 Ensayo MTT-Formazán

El efecto de los diferentes andamios en la viabilidad y proliferación celular, fue determinado de forma indirecta por medio del ensayo de MTT-Formazán. Para realizar el ensayo de MTT-Formazán en los cultivos celulares en los andamios, después de 1, 3 y 5 d de incubación el medio de cultivo fue removido de los pozos que contenían los andamios sembrados y cultivados con células. Cada pozo fue lavado dos veces con PBS para posteriormente añadir 150 μL de medio de cultivo celular y 15 μL de MTT en cada pozo. Las muestras se incubaron por 3 h en condiciones de cultivo estándar. Después del periodo de incubación, se retiró el medio de cada uno de los pozos y cada muestra, andamio-células, fue lavada una vez con PBS. Cada una de las muestras andamio-células se trasladó individualmente a una nueva caja de cultivo para disolver los cristales de Formazán formados únicamente por las células adheridas sobre los andamios, ya que algunas células llegan a caerse a los pozos durante el proceso de sembrado celular en los andamios y por lo tanto se adhieren y crecen en los pozos, no en los andamios. A los nuevos pozos donde se trasladaron las muestras andamio-células se les agregaron 150 μL de una disolución isopropanol:DMSO (ISO:DMSO) en una proporción de 1 mL:1 mL. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 μL de los sobrenadantes Formazan-ISO:DMSO de cada uno de los pozos y se midió la absorbancia de cada alícuota de forma independiente a una longitud de onda de $\lambda = 570 \text{ nm}$.

El porcentaje de viabilidad celular (VC%; determinado de forma indirecta a partir del porcentaje de células metabólicamente activas) fue calculado de acuerdo con la Ecuación 4:

$$VC (\%) = \left(\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ control}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 4});$$

dónde *A muestra* corresponde a la absorbancia de las alícuotas de las disoluciones de Formazán:ISO:DMSO de las muestras correspondientes a las células incubadas en los diferentes andamios y *A control* corresponde a la absorbancia de las disoluciones de Formazán:ISO:DMSO de las células incubadas en las membranas de PCL.

2.3.3 Ensayo de calceína/homodímero de etidio

La viabilidad celular a los 3 d de cultivo sobre los andamios, también se estudió de forma directa utilizando el ensayo de calceína/homodímero de etidio. Después de 3 d de incubación celular en los andamios, sembrados de acuerdo con lo previamente descrito en la sección 2.3.1, Figura 9, se removió el medio de cultivo de cada pozo y los andamios fueron lavados dos veces con 150 μ L de PBS. Posteriormente, se agregaron a cada uno de los pozos 150 μ L de disolución salina de Hanks (HBSS, Gibco) complementada con homodímero de etidio (HE, 42 Invitrogen™) y calceína AM (Cal, Invitrogen™) en una concentración de 0.01 mL/mL y 0.05 mL/mL de HE y Cal AM, respectivamente, y se incubaron durante 40 min en condiciones de cultivo estándar. Después de la incubación, se removió la disolución HBSS:HE:Cal AM de cada uno de los pozos y los andamios fueron lavados con 150 μ L de PBS. Finalmente, las muestras fueron mantenidas en oscuridad y observadas inmediatamente en un microscopio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss) en su modalidad de fluorescencia de luz reflejada empleando un filtro a 495-515 nm (verde) para detectar la señal de calceína y un filtro a 495-635 nm (rojo) para detectar la señal del homodímero de etidio. Las imágenes fueron analizadas con el software Axiovision (Carl Zeiss).

2.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las diferentes caracterizaciones físicas, químicas y biológicas se analizaron, donde corresponde, con el software GraphPad Prism 5.1 utilizando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de comparaciones múltiples de Tukey, considerando valores estadísticamente significativos para $p < 0.05$.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 FABRICACIÓN DE LOS ANDAMIOS

3.1.1 Membranas fibrilares

Para la obtención de las membranas fibrilares de PCL y Gel se electrohilieron fibras a partir de una disolución con una concentración de 0.70 g/g PCL y 0.30 g/g Gel, respecto de la masa total de polímero (PCL + Gel) en la disolución. Posteriormente, algunos de los andamios se recubrieron con QS empleando la técnica de recubrimiento electrostático capa por capa, y usando distintos tiempos de inmersión, 5, 15 y 30 min, de las membranas en la disolución de QS. También se electrohilieron membranas compuestas únicamente de PCL como muestras control. Los andamios estudiados en la presente investigación fueron nombrados en base a su composición másica de PCL y Gel y al tiempo de inmersión en la disolución de QS durante el recubrimiento, como se muestran en el Cuadro 1, página 30.

3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS ANDAMIOS

3.2.1 Microscopía electrónica de barrido

La estructura fibrilar en los andamios fue analizada por SEM a un aumento de 1,000X para observar su morfología y medir el diámetro promedio de las fibras. Mediante las micrografías de SEM obtenidas, Figura 17, se puede observar que los andamios de PCL y PCL30Gel presentaron una morfología microfibrilar con porosidad interconectada, y que en general las fibras estaban libres de defectos (beads). También, se puede observar claramente que después de que los andamios de PCL30Gel fueron recubiertos con QS, mantuvieron su microestructura, fibras orientadas al azar y porosidad interconectada.

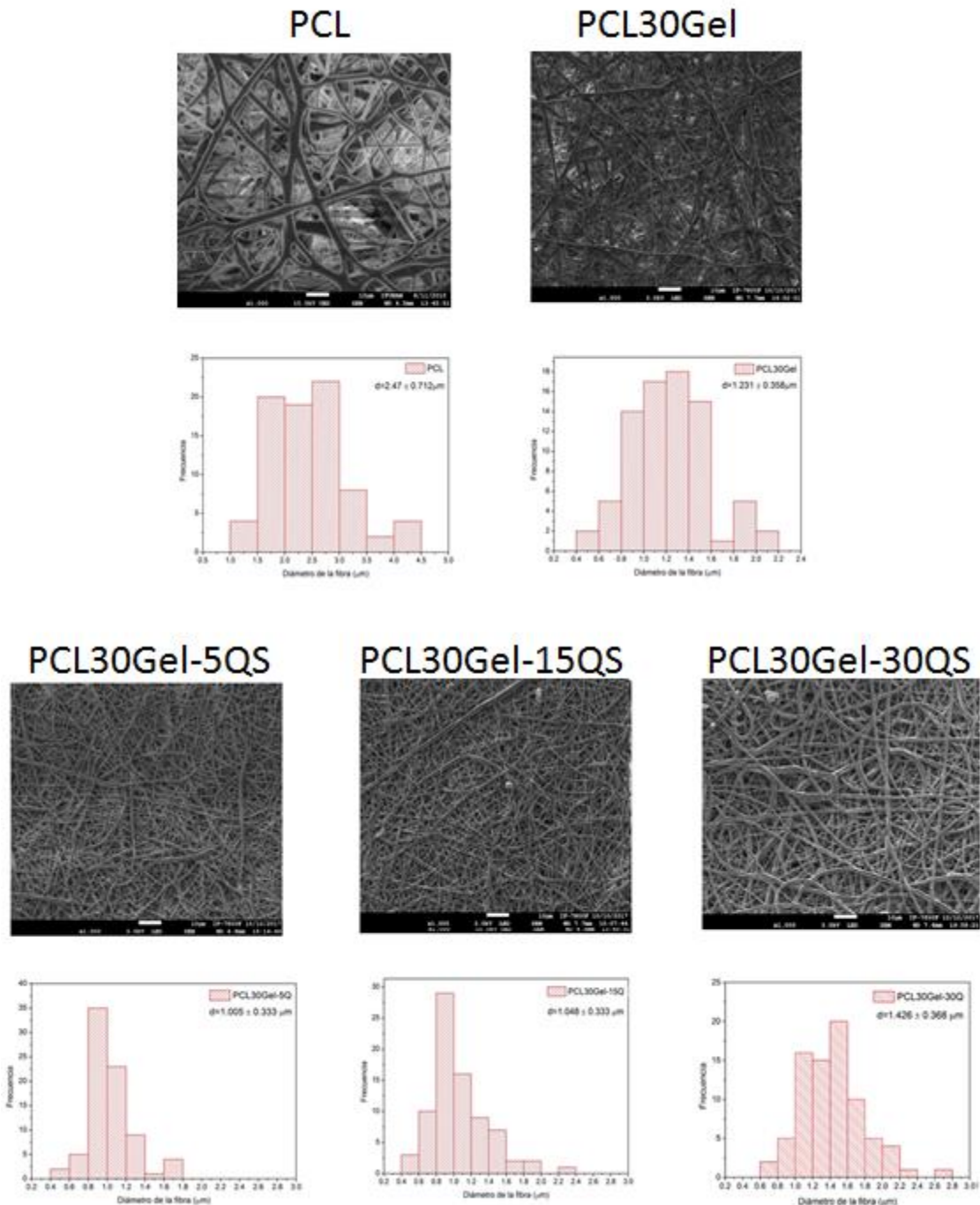


Figura 10. Micrografías de SEM e histogramas del diámetro de las fibras en las membranas electrohiladas.

A partir de la estimación del diámetro promedio de las fibras que componen cada uno de los andamios estudiados se realizaron histogramas de frecuencias. Los histogramas en la Figura 17 muestran que el diámetro promedio de fibra en el andamio compuesto únicamente con PCL fue de $2.47 \pm 0.712 \mu\text{m}$, mientras que el diámetro promedio de fibra del andamio

PCL30Gel se redujo en $\approx 50\%$ (con un valor de diámetro de fibra promedio de $1.231 \pm 0.358 \mu\text{m}$) en comparación con el diámetro de fibra promedio del andamio de PCL. Por otro lado, el diámetro promedio de fibra de los andamios de PCL30Gel que fueron recubiertos con QS, fue de $1.005 \pm 0.333 \mu\text{m}$ para el andamio de PCL30Gel-5QS, $1.048 \pm 0.333 \mu\text{m}$ para el andamio de PCL30Gel-15QS y $1.426 \pm 0.368 \mu\text{m}$ para el andamio de PCL30Gel-30QS. Con base en lo obtenido, se puede decir que entre más tiempo estuvieron sumergidos los andamios de PCL30Gel en la disolución de QS durante el proceso de recubrimiento electrostático capa por capa, las fibras tendieron a incrementar su diámetro, es decir, tendieron a engrosarse. Sin embargo, el aumento en el diámetro de fibra promedio observado para los andamios PCL-30Gel-15QS y PCL-30Gel-30QS, respecto del andamio PCL30Gel no fue estadísticamente significativo. Para la membrana PCL30G-5QS se observó una ligera reducción en el diámetro de fibra promedio, respecto de la membrana PCL30Gel. Esto podría atribuirse a una ligera degradación de la membrana (posiblemente debido a una ligera disolución de la Gel contenida en el andamio PCL30Gel) durante el proceso de recubrimiento con QS; principalmente durante el primer paso del proceso de recubrimiento en el que las membranas PCL30Gel son sumergidas en una disolución de NaOH. Después de este primer paso, el diámetro promedio de fibra podría haber aumentado nuevamente durante el recubrimiento con QS, en una tendencia similar a lo observado para los andamios de PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS, pero al ser el tiempo de recubrimiento con QS el menor (5 min) en el andamio PCL30GelQS, es posible que el diámetro promedio de fibra haya aumentado pero sin llegar a igualar nuevamente el diámetro de fibra promedio inicial de las membranas PCL30Gel antes del proceso de recubrimiento. En general, es posible decir que el engrosamiento de las fibras se debe a su recubrimiento con QS. No se espera que el ligero engrosamiento observado en las fibras afecte el desempeño biológico de los andamios, siempre que dicho fenómeno no sea significativamente alto, de manera que llegase a disminuir significativamente la porosidad de las membranas o eliminar la estructura micro fibrilar de las mismas. En este estudio, el aumento del diámetro de fibra promedio de los andamios PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS, respecto del andamio PCL30Gel, no es estadísticamente significativo y la estructura micro-porosa fibrilar de las membranas se mantiene aun después del periodo de recubrimiento con QS más largo estudiado, 30 min.

3.2.2 Espectroscopia de infrarrojo

Para estudiar la presencia de grupos funcionales en los andamios se adquirieron sus espectros FTIR y se analizaron; Figura 11. Estos espectros se identificaron y compararon con los espectros FTIR de los compuestos puros correspondientes a los componentes de los andamios, esto es PCL, Gel y QS. La Figura 11 muestra los espectros FTIR de los andamios de PCL30Gel, PCL30Gel(NaOH) (que corresponde al andamio de PCL30Gel después de haber sido tratado en la disolución de NaOH y antes de ser sumergida en la disolución con QS durante el proceso de recubrimiento electrostático capa por capa), PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS, PCL30Gel-30QS, y los espectros FTIR de PCL, Gel y QS puros. Las asignaciones de las bandas presentes en los espectros FTIR de PCL, Gel y QS puros se muestran en el Cuadro 2.

La PCL mostró bandas correspondientes a los modos vibracionales de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo CH₂ (2949 cm⁻¹ y 2861 cm⁻¹, respectivamente), estiramiento del grupo COO⁻ (1728 cm⁻¹), estiramiento del grupo C-C (1298 cm⁻¹), estiramiento asimétrico y simétrico del grupo C-O-C (1247 cm⁻¹ y 1162 cm⁻¹, respectivamente) y estiramiento del grupo C-O (1044 cm⁻¹). Como se puede observar en la Figura 11, estas bandas propias de la PCL permanecieron intactas en los andamios de PCL30Gel y PCL30Gel-QS lo que corrobora la presencia de PCL en los diferentes andamios.

Los espectros FTIR de la Gel (Figura 11) presentan las bandas correspondientes a la vibración de estiramiento N-H (3297 cm⁻¹), la amida I (1633 cm⁻¹), la amida II (1540 cm⁻¹) y la amida III (1241 cm⁻¹), y las curvas de las vibraciones asimétricas y simétricas de CH₂ (1447 cm⁻¹) y CH₃ (1396 cm⁻¹), respectivamente; Cuadro 2. Estas mismas bandas fueron claramente identificadas en el espectro correspondiente al andamio de PCL30Gel y al andamio PCL30G(NaOH) lo que indica la presencia de la Gel en ambos andamios. Es importante recordar que las membranas de PCL30Gel que fueron recubiertas con QS fueron tratadas, previamente al recubrimiento con QS, en una disolución 0.5 mol/L de NaOH para obtener una carga positiva en la superficie de las membranas y lograr una interacción electrostática de la membrana con el QS cargado negativamente en la disolución de recubrimiento. En la Figura 11 se puede ver que como consecuencia de la inmersión de las membranas PCL30Gel en una disolución 0.5 mol/L de NaOH, las bandas IR correspondientes a las vibraciones de estiramiento para la amida I (1652 cm⁻¹) y para la amida II (1530 cm⁻¹) de la Gel redujeron su

intensidad relativa, respecto de la intensidad de las mismas bandas observadas en las membranas de PCL30Gel antes de ser tratadas con la disolución de NaOH. Esto podría estar indicando una reducción de la cantidad de Gel presente en la membrana PCL30Gel después de haber sido esta tratada en la disolución de NaOH.

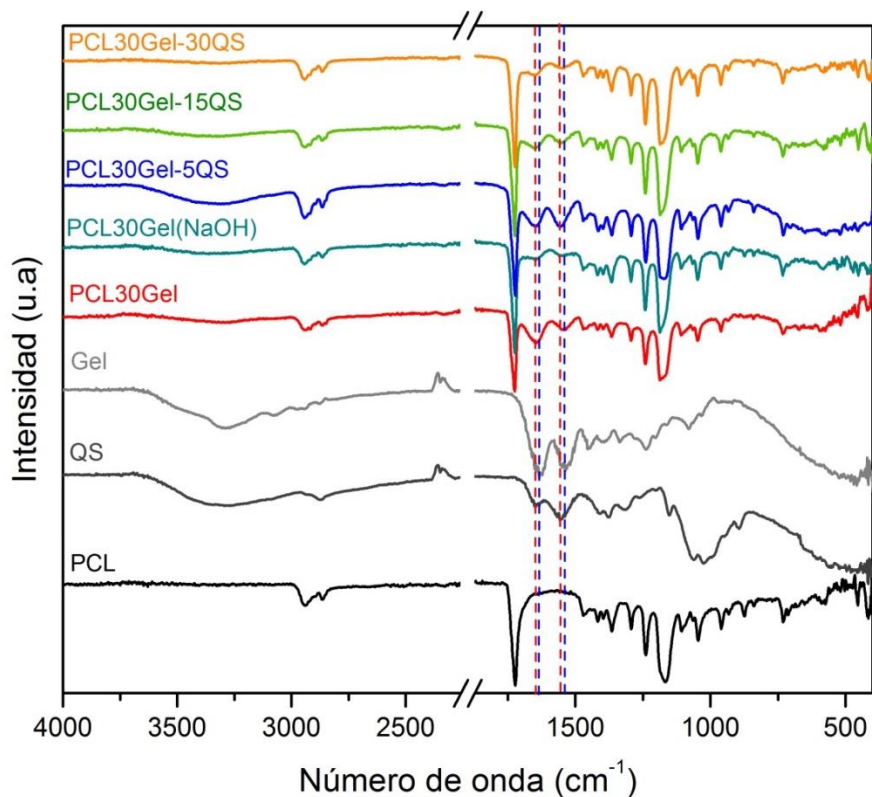


Figura 11. Espectros FTIR de los andamios de PCL30Gel, PCL30Gel(NaOH), PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS, PCL30Gel-30QS y espectros FTIR de PCL, QS y Gel.

Cuadro 2. Bandas observadas en los espectros FTIR de PCL, Gel y QS y sus correspondientes asignaciones.

Número de onda (cm⁻¹)			
PCL	GEL	QS	Asignación
	3297	3354	estiramientos O-H
2949			estiramiento asimétrico CH ₂
2861			estiramiento simétrico CH ₂
		2914	C-H
1728			estiramiento carbonilo (-COO)
	1633	1650	estiramiento C=O, amida I
	1540	1557	flexión del N-H, amida primaria y amida II
	1447	1422	curva asimétrica CH ₂
	1396		curva simétrica CH ₃
		1377	flexión O-H
		1314	estiramiento simétrico CH ₃ , amida III
1298			estiramiento C-C
		1262	estiramiento C-O-H
1246		1022	estiramiento asimétrico C-O-C
	1241		flexión N-H y estiramiento C-N, amida III
1162		1065	estiramiento simétrico C-O-C
		1153	flexión C-O-C
1043			estiramiento C-O

En el espectro FTIR de QS mostrado en la Figura 11 se identificaron las bandas típicas del QS, es decir, la vibración que involucra los grupos CH₂ (2914 cm⁻¹); la amida I (1650 cm⁻¹), la vibración de flexión entre la amina primaria y la amida II (1557 cm⁻¹) y la amida III (1314 cm⁻¹);

Cuadro 2. En las membranas recubiertas con QS, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS, PCL30Gel-30QS, se pueden observar claramente estas bandas, aunque no es posible distinguirlas inequívocamente como una indicación de la presencia de QS en las membranas recubiertas, ya que la mayoría de las bandas coinciden con bandas IR correspondientes a Gel. Sin embargo, la proporción de las intensidades de las bandas observadas a 1652 cm^{-1} y 1557 cm^{-1} en las membranas recubiertas con QS corresponde más a la proporción de las intensidades de estas bandas observada en el espectro IR del QS, que a la proporción de las intensidades de estas bandas observada en el espectro IR de Gel. Por otro lado, se observa que las bandas correspondientes a la amida I y II del QS puro se encuentran a números de onda ligeramente mayores que las bandas correspondientes a la amida I y II de la Gel pura; y estas mismas bandas se observan en números de onda ligeramente mayores en los andamios de PCL30Gel recubiertos con QS que en los andamios de PCL30Gel sin recubrir. Por lo anterior, se puede decir que esto sugiere el recubrimiento exitoso con QS de, o la presencia de QS en, las membranas PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS.

3.2.3 Ángulo de contacto con agua

La Figura 12 muestra los resultados numéricos, y su representación gráfica, correspondientes a las mediciones del ángulo de contacto después de 1, 3 y 5 s de haber depositado la gota de agua en la superficie de las membranas estudiadas. En la Figura 12 se puede observar que los andamios de PCL mostraron un carácter hidrofóbico, exhibiendo un ángulo de contacto mayor a 90° durante los tres tiempos de medición observados; durante todo el periodo de medición, 0-5 s, el ángulo de contacto se mantuvo sin variaciones significativas. En las membranas de PCL30Gel se observó un carácter hidrofílico con un ángulo de contacto promedio inicial (1 s) de 66.57° , el cual disminuyó a $\approx 32^\circ$ después de 5 s de haber sido depositada la gota de agua en la superficie de la membrana. El ángulo de contacto promedio para el andamio de PCL30Gel(NaOH) fue significativamente menor, a los tres diferentes tiempos observados, que el ángulo de contacto observado para el andamio PCL30Gel (Figura 12), lo que podría indicar un incremento en la energía superficial del andamio PCL30Gel(NaOH) en comparación con el andamio PCL30Gel. Posiblemente, el aumento de la hidrofiliidad (menor ángulo de contacto) del andamio PCL30Gel(NaOH), respecto del

andamio PCL30Gel, se debió a cargas positivas generadas en la superficie del andamio PCL30Gel(NaOH) por la protonación de los grupos funcionales amino de la Gel, como consecuencia de la interacción del andamio PCL30Gel con la disolución de NaOH en la que este andamio fue sumergido durante el primer paso del proceso de recubrimiento electrostático capa por capa, andamio PCL30Gel(NaOH).

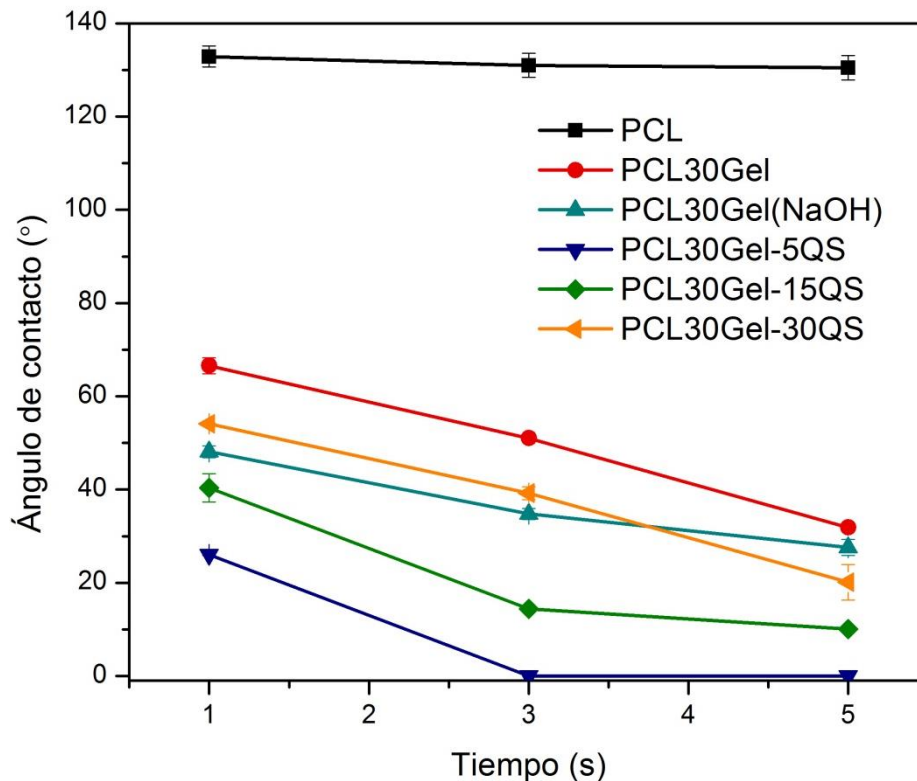


Figura 12. Gráfica comparativa de los ángulos de contacto en la superficie de los andamios fibrilares.

En la Figura 12 también se puede observar que el recubrimiento de los andamios con QS durante 5 min, andamio PCL30Gel-5QS, causó nuevamente una disminución del ángulo de contacto respecto del andamio PCL30Gel(NaOH) y del andamio PCL30Gel; es decir, un aumento de la hidrofiliidad de las membranas respecto de las membranas de PCL30Gel no recubiertas. El ángulo de contacto para los andamios PCL30Gel-5QS fue de 26.04° inmediatamente después del depósito de la gota de agua sobre las membranas (1 s) y de 0° después de 3 s. Sin embargo, el ángulo de contacto volvió a aumentar de manera proporcional con el aumento del tiempo de recubrimiento de los andamios con QS. Los

andamios PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS mostraron un ángulo de contacto de 40.36° y 50.9° , respectivamente, después de 1 s de haber depositado la gota de agua sobre la superficie de dichos andamios, y un ángulo de contacto de 10.07° y 20.11° , respectivamente para los andamios PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS, después de 5 s de haber depositado la gota de agua en la superficie de estos andamios. Siendo así, el andamio de PCL30Gel-5QS el que permitió una mayor hidratación (Figura 12).

3.2.4 Ensayo de Biuret, liberación de gelatina de los andamios

La liberación de Gel de los andamios se determinó usando el método de Biuret. El porcentaje, (en función de la cantidad esperada de Gel contenida en los andamios, estimada a partir de la cantidad de Gel agregada a las disoluciones de electrohilado, 0.3 g/g) de Gel liberada por los andamios a diferentes tiempos de incubación en agua bidestilada se muestra en la Figura 13. La cantidad de gelatina liberada por los andamios en agua bidestilada a 37°C en agitación orbital a ≈ 120 rpm después de 1, 3 y 5 d de incubación fue mayor para el andamio de PCL30Gel, el cual liberó el $\approx 100\%$ de su contenido de Gel después de 5 d de incubación en agua bidestilada. En el andamio de PCL30Gel(NaOH) se observó que el porcentaje de Gel liberada después de 1, 3 y 5 d de incubación fue menor, en comparación con el porcentaje de Gel liberada en los mismos días de incubación, respectivamente 1, 3 y 5 d, por el andamio de PCL30Gel. Esto podría indicar, más que una menor tasa de liberación de Gel en el andamio PCL30Gel(NaOH) respecto del andamio PCL30Gel, que el contenido de Gel en el andamio PCL30Gel(NaOH) ya era inicialmente menor que el estimado para los andamios PCL30Gel recién electrohilados, dado que no existe ninguna razón de porque podría esperarse una menor tasa de liberación de Gel debido al tratamiento de las membranas de PCL30Gel en una disolución de NaOH, andamio PCL30Gel(NaOH). Por otro lado, en los andamios recubiertos con QS, es decir PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS se observó que el porcentaje de Gel liberada de la membrana fue menor en comparación con las membranas no recubiertas de QS (i.e, las membranas de PCL30Gel y de PCL30Gel(NaOH)), por lo que en este caso si se puede decir que el recubrimiento de las membranas con QS disminuyó la tasa de liberación de Gel de las membranas. No se observó una diferencia significativa entre el porcentaje de Gel liberada por los diferentes andamios recubiertos con QS.

Una liberación de Gel controlada en el tiempo es preferible a una liberación abrupta e incontrolada de la Gel contenida en el andamio, puesto que la Gel es un componente que se espera facilite los procesos de adhesión, viabilidad y proliferación de los fibroblastos, el principal fenotipo en la dermis de la piel humana, y que por lo tanto podría contribuir a un mejor funcionamiento de los andamios durante su potencial uso para el tratamiento de lesiones por quemadura. Una liberación abrupta de este componente, Gel, de los andamios, podría implicar que estos perderán su efecto biológico positivo para el potencial tratamiento de lesiones por quemadura durante las primeras horas de su aplicación en las lesiones, lo cual no es deseable. Un efecto biológico positivo duradero y controlado en el tiempo es lo que se buscaría lograr como objetivo final en el desarrollo de andamios para ingeniería de tejidos.

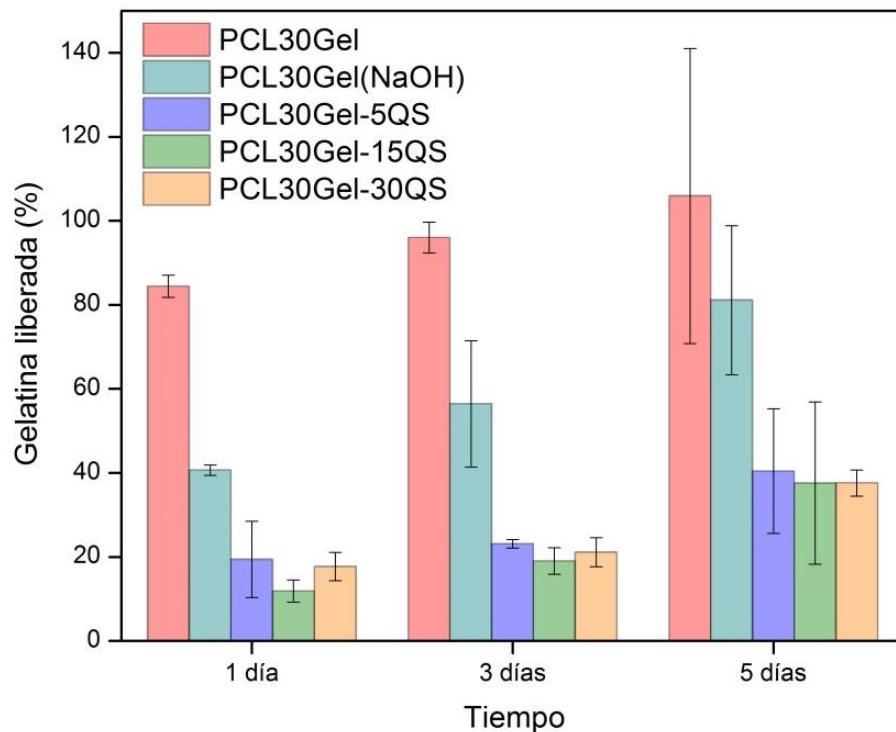


Figura 13. Porcentaje de gelatina (respecto del contenido esperado de gelatina en el andamio electrohilado), liberada durante la inmersión de las membranas en agua bidestilada.

3.2.5 Degradación *in vitro*

La pérdida de masa en los andamios de PCL, PCL30Gel, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS en PBS (pH = 7.4) a 37 °C y en agitación orbital a 80 rpm se observó durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 17 d como una medida de la degradación de las membranas, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. Durante los primeros 3 d de inmersión, todos los andamios mostraron la mayor rapidez de pérdida de masa, comparados consigo mismo en el tiempo; sin embargo, la rapidez de pérdida de masa y por tanto el porcentaje de pérdida de masa de cada uno de los diferentes andamios estudiados, respecto de su masa inicial, fue diferente. El menor porcentaje de pérdida de masa se observó en la membrana PCL y el mayor porcentaje en la membrana PCL30Gel, indicando que la incorporación de Gel en las membranas aumentó significativamente su degradación, probablemente debido a que la Gel, al ser un compuesto soluble en agua a 37°C, se disolvió rápidamente durante los primeros días del ensayo de degradación (las pruebas de degradación se llevaron a cabo en PBS a 37 °C), incrementando el porcentaje de pérdida de masa de los andamios a base de PCL30Gel, en comparación con el andamio PCL. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de Biuret donde la liberación de casi todo el contenido de Gel en los andamios sucedió durante los primeros 5 d de incubación PBS.

Las membranas de PCL-Gel recubiertas con QS, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS, exhibieron un menor porcentaje de pérdida de masa (respecto de su respectiva masa inicial) en comparación con la membrana PCL30Gel, es decir, una menor degradación respecto de la membrana de PCL30Gel, indicando que probablemente los recubrimientos de QS disminuyeron la tasa de liberación de la Gel contenida en los andamios, en concordancia con el ensayo de Biuret, y por lo tanto disminuyeron su rapidez de degradación.

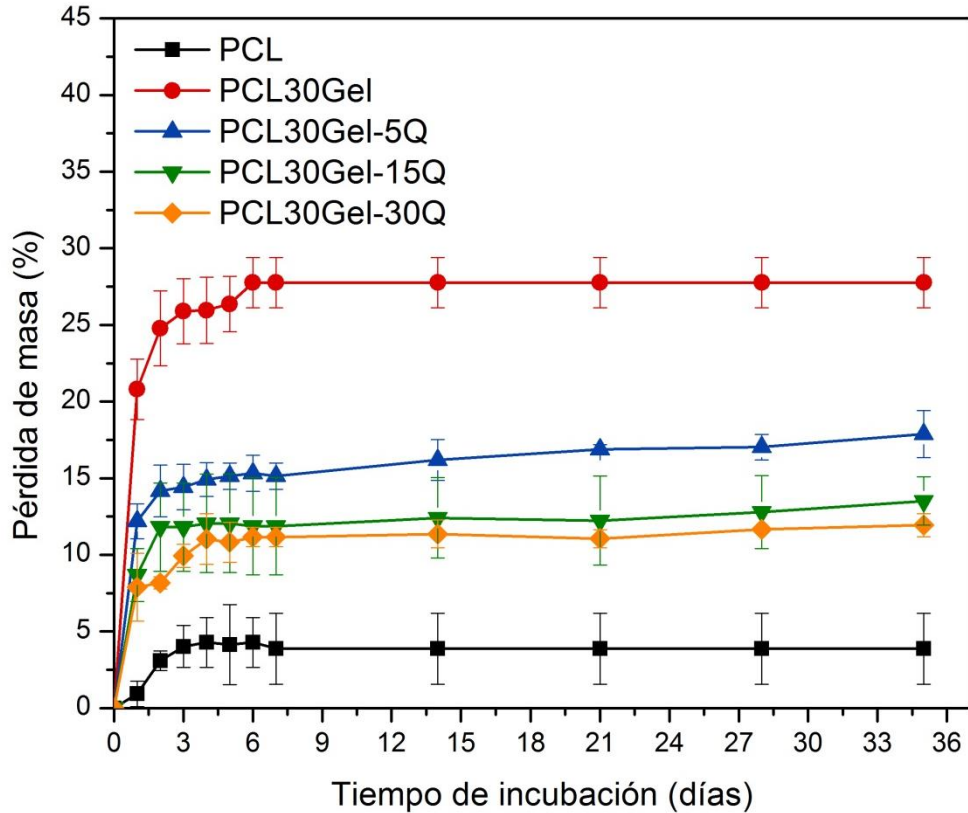


Figura 14. Pérdida de masa de los andamios (en porcentaje respecto de su masa inicial) inmersos en solución tampón de fosfatos (PBS, pH= 7.4) a 37 °C en función del tiempo.

A partir del tercer día de incubación la rapidez de degradación, pérdida de masa, de los andamios disminuyó, haciéndose casi cero para la membrana de PCL. El andamio de PCL30Gel siguió degradándose hasta el séptimo día, y a partir de este tiempo de inmersión su masa se mantuvo casi constante hasta el final del periodo de observación. Al final del tiempo de experimentación (35 d), se observó que los andamios de PCL perdieron menos del 5% de su masa respecto de su masa inicial, mientras que los andamios de PCL30Gel perdieron aproximadamente el 30% de su masa respecto de su masa inicial, coincidiendo la pérdida de masa del andamio PCL30Gel con el contenido másico inicial estimado de Gel en este andamio, es decir 0.3 g/g de Gel. Las membranas recubiertas con QS perdieron un menor porcentaje de masa (respecto de su masa inicial) en comparación con el andamio de PCL30Gel. El porcentaje de pérdida de masa, respecto de la masa inicial de cada andamio, para los andamios recubiertos con QS, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS, estuvo inversamente correlacionada con el tiempo de recubrimiento en QS; es decir, a mayor

tiempo de recubrimiento en QS menor fue el porcentaje de pérdida de masa del andamio. Esto sugiere que el recubrimiento de QS cumplió con una de las funciones esperadas, disminuir la liberación incontrolada de la Gel contenida en los andamios durante los primeros días de inmersión, disminuyendo así la rapidez de degradación de los andamios recubiertos con QS en comparación con el andamio de PCL30Gel sin recubrimiento de QS, Figura 14.

3.3 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

3.3.1 Ensayo MTT-Formazán

Se realizó el ensayo de MTT a diferentes tiempos de incubación (1, 3 y 5 d) celular en los andamios para estudiar su potencial para permitir la viabilidad y proliferación celular. Se usaron como control las membranas de PCL para identificar los posibles efectos en la respuesta biológica debidos a la incorporación de Gel y/o QS en las membranas; PCL30Gel, PCL30GEL-5QS, PCL30GEL-15QS y PCL30GEL-30QS. En la Figura 15 se observa que, en general, hubo una mayor proliferación celular en los andamios de PCL30GEL-5QS y PCL30GEL-15QS, en comparación con los otros andamios estudiados, PCL, PCL-30Gel y PCL30GEL-30QS. Podemos observar que un tiempo de recubrimiento con QS mayor a 15 min, es decir la membrana de PCL30GEL-30QS, pareció disminuir la proliferación celular en comparación con las membranas de PCL30Gel-5QS y PCL-30Gel-15QS.

Las células cultivadas en las membranas de PCL mostraron una menor proliferación en todos los tiempos de cultivo observados, en comparación con los otros andamios estudiados, con excepción del andamio PCL30Gel-30QS a 3 días de cultivo celular. Después de 1 d de cultivo, se observó que en comparación con el andamio de PCL, los andamios de PCL30Gel, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS mantuvieron un metabolismo celular adecuado con una tendencia a incrementar el número de células en los andamios con la adición de Gel en los andamios de PCL vs. PCL30Gel y con el recubrimiento de 5 y 15 min de QS (PCL30Gel vs. PCL30Gel-5QS y PCL30Gel-15QS). Sin embargo, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas. Después de 3 d de cultivo, la tendencia a incrementar la viabilidad celular con la incorporación de Gel en los andamios y con el tiempo de recubrimiento de QS hasta 15 min siguió observándose.

A los 5 d de incubación celular, se observó que todos los andamios fueron biocompatibles permitiendo la proliferación celular con respecto al primer día de incubación celular en el mismo andamio. La misma tendencia de un incremento de la viabilidad celular con la incorporación de Gel en el andamio y el recubrimiento con QS hasta 15 min siguió observándose, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre los andamios que contenían Gel, es decir, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular a 5 d de cultivo entre PCL30Gel, PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS, aunque la viabilidad celular en todos estos andamios si fue significativamente mayor a la viabilidad celular observada en el andamio de PCL.

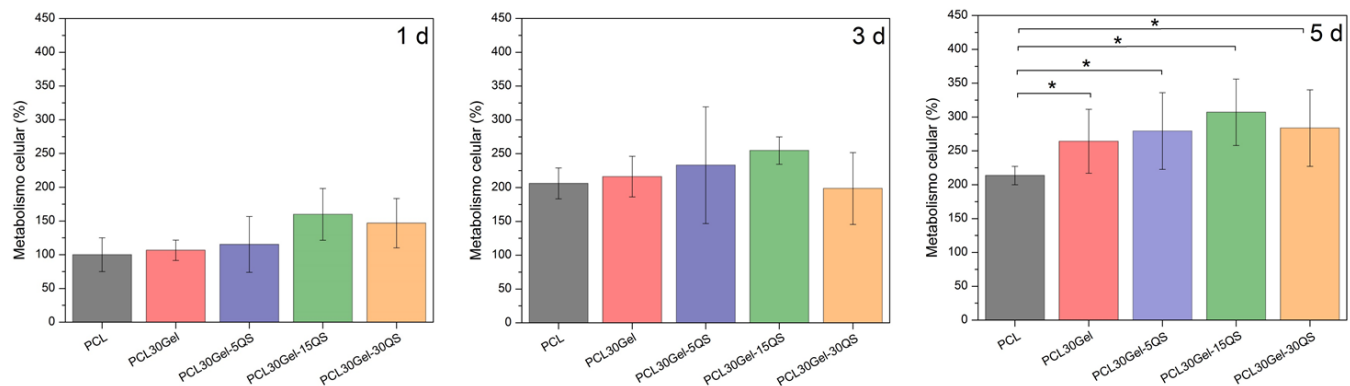


Figura 15. Porcentaje de fibroblastos metabólicamente activos en los andamios a 1, 3 y 5 d de cultivo (respecto del número de fibroblastos metabólicamente activos en PCL a 1 d de cultivo, 100%), estimado a través del ensayo de MTT-Formazán. * Diferencias significativas, $p < 0.05$.

3.3.2 Ensayo de Calceína/Homodímero de etidio

La viabilidad celular en los andamios se estudió forma directa empleando el ensayo de calceína AM/homodímero de etidio como marcadores de viabilidad celular; las células viables se observan en verde mientras que las células no viables se observan en rojo; Figura 16. Es importante recordar que en el ensayo de calceína/homodímero de etidio la viabilidad celular se estudia de forma directa, a diferencia del ensayo de MTT donde la viabilidad se estudia indirectamente a través de la actividad metabólica mitocondrial de las células.

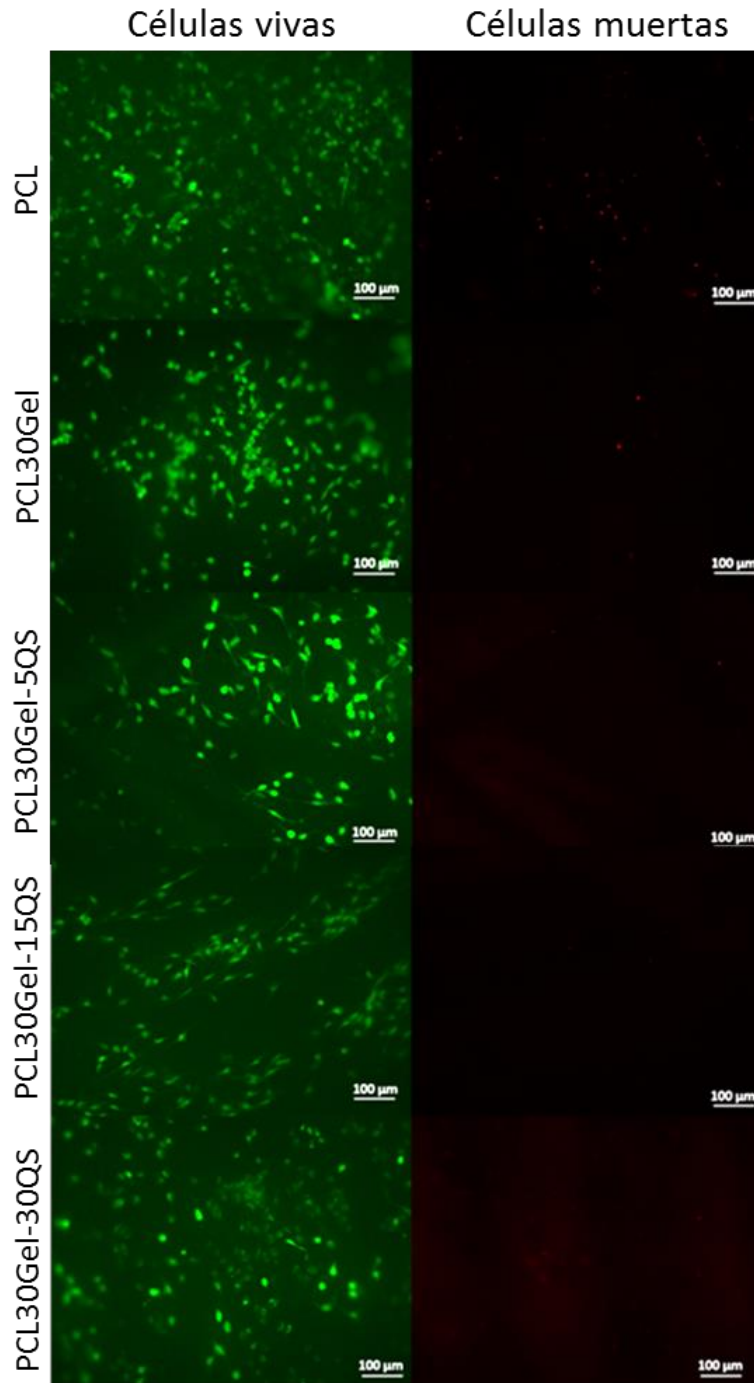


Figura 16. Microfotografías de fluorescencia de fibroblastos cultivados en los andamios utilizando el ensayo de viabilidad celular de calceína (células vivas; verde) / homodímero de etidio (células muertas; rojo).

El ensayo de calceína/homodímero de etidio mostró que los andamios no fueron citotóxicos exhibiendo un gran número de células viables (verde) en los andamios, en una tendencia donde el número de células muertas o no viables (núcleos celulares en rojo) observadas fue

muy pequeño y disminuyó con la incorporación de Gel al andamio (PCL vs PCL30 Gel) y con la incorporación de QS en los andamios (PCL30Gel vs PC30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS). La viabilidad celular se mantuvo elevada hasta el punto final del estudio, observándose únicamente algunas células muertas o no viables (núcleos celulares en rojo) en los andamios. En la membrana de PCL se observó el mayor número de células no viables con respecto a los otros andamios estudiados. El número de células no viables (núcleos en rojo) observadas en los andamios decreció para el andamio de PCL30Gel, en comparación con el andamio de PCL. En los andamios recubiertos con QS se observó una disminución del número de células no viables con respecto a los andamios no recubiertos (PCL y PCL30Gel), observándose casi el 100% de viabilidad en los andamios de PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Las lesiones por quemaduras son un problema grave que afecta a una parte importante de la población en México y en el mundo. Los tratamientos estándares (uso de injertos de piel autólogos, heterólogos o xenogénicos) para quemaduras profundas tienen diversas limitaciones como la no total recuperación de la funcionalidad, poca disponibilidad y posible rechazo por el organismo, independientemente de los altos costos que conllevan. Por tal motivo, en este trabajo se desarrollaron y caracterizaron las propiedades físicas, químicas y biológicas de andamios microfibrilares de policaprolactona, gelatina y quitosano (a distintas concentraciones), con la finalidad de evaluar *in vitro* su potencial para funcionar como posibles coberturas temporales o acarreadores celulares para el potencial tratamiento de lesiones por quemadura.

Se desarrollaron y evaluaron andamios de PCL, PCL y Gel (PCL30Gel; 0.30 g/g de Gel) y PCL30Gel recubiertos con QS a tres diferentes tiempos de recubrimiento (PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS). Los andamios de PCL y PCL30Gel se obtuvieron por electrohilado y los andamios de PCL30Gel recubiertos con QS se obtuvieron con la inmersión de las membranas electrohiladas de PCL30Gel en una disolución de QS durante 5, 15 y 30 min, respectivamente para PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS. Se usó la concentración de 0.30 g/g de Gel para producir las membranas de PCL y Gel, debido a que en estudios anteriores del grupo de trabajo se sintetizaron andamios de PCL y Gel con diferentes concentraciones de Gel (0.5, 0.10, 0.15, 0.30 y 0.45 g/g de Gel), observándose que la mejor respuesta en términos de adhesión celular vs resistencia de las membranas a la manipulación se obtenía en las membranas de PCL-Gel con 0.30 g/g de Gel, respecto de la cantidad total de polímero (PCL + Gel) en los andamios (68).

En el presente estudio, los resultados de microscopia electrónica de barrido corroboraron que se logró obtener membranas microfibrilares de PCL30Gel con fibras homogéneas y casi libres de defectos, al usar la técnica de electrohilado para la producción de dichas membranas a partir de una única mezcla de PCL y Gel. A pesar de que la mezcla de PCL y Gel en un único

paso es complicada, debido a la naturaleza hidrofóbica e hidrofílica de la PCL y la Gel respectivamente, se consiguió realizar una mezcla homogénea de PCL y Gel en un solo paso al usar ácido acético como disolvente para la disolución polimérica de electrohilado.

Los resultados de microscopia electrónica de barrido también mostraron que la estructura fibrilar de las membranas se mantuvo después de su recubrimiento con QS, para todos los tiempos de recubrimiento estudiados. Para las membranas de PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS se observó un incremento en el diámetro de las fibras, respecto de las membranas PCL30Gel, donde el diámetro de las fibras en las membranas aumentó conforme aumentó el tiempo de recubrimiento de QS. Esto se puede interpretar como la obtención de un recubrimiento de quitosano más grueso conforme aumentó el tiempo de inmersión de las membranas de PCL30Gel en la disolución de quitosano.

Los resultados de la espectroscopia infrarroja corroboraron la presencia de quitosano en las membranas que se sumergieron en la disolución de quitosano. Esto se puede deducir del aumento de la intensidad relativa (en comparación con la intensidad de las otras bandas en el mismo espectro) de las bandas observadas a 1654 cm^{-1} y 1577 cm^{-1} con la inmersión de las membranas en la disolución de quitosano. Estas bandas son características de los espectros FTIR de gelatina y de quitosano puros y fueron asignadas a la vibración correspondiente a la amida I (1654 cm^{-1}) y la vibración de flexión entre la amina primaria y la amida II (1577 cm^{-1}). Estas bandas también se observaron en las membranas PCL30Gel debido a la presencia de la gelatina en las membranas; sin embargo, después del tratamiento de las membranas de PCL30Gel en la disolución de NaOH, antes de ser sumergidas en la disolución de quitosano, estas bandas casi desaparecieron del espectro FTIR. Por lo anterior, la clara observación nuevamente de las bandas a 1654 y 1577 cm^{-1} después del recubrimiento de las membranas de PCL30Gel con quitosano, se puede entender como una indicación de la presencia del quitosano en las membranas recubiertas, PCL-30Gel-5QS, PCL-30Gel-15QS y PCL-30Gel-30QS.

Es importante recordar que las membranas de PCL30Gel fueron sumergidas en una disolución de NaOH (membranas denominadas como PCL30Gel(NaOH)) antes de ser sumergidas en la disolución de quitosano, con el objetivo de otorgarles una carga superficial negativa. Esta carga permitió una adecuada interacción de las membranas de PCL30Gel con el quitosano en disolución (pH = 2.37). En una disolución ácida de quitosano, los grupos

amino (cuyo número depende del grado de desacetilación y masa molar del quitosano usado) se encuentran protonados exhibiendo una carga positiva que le permite al quitosano convertirse en un catión soluble y a su vez interactuar fácilmente con la carga negativa de las membranas de PCL30Gel tratadas en la disolución de NaOH (60,71).

Por otra parte, el ensayo de Biuret mostró que al recubrir los andamios de PCL30Gel con QS, la velocidad de liberación de Gel de los andamios disminuyó significativamente. En el andamio de PCL30Gel a los 5 d de inmersión en agua bidestilada se observó una liberación de aproximadamente el 100 % de la cantidad de gelatina originalmente contenida en el andamio. En el andamio de PCL30Gel(NaOH) a los 5 d de inmersión en agua bidestilada se observó una liberación del ≈ 80 % de la cantidad de gelatina originalmente contenida en el andamio, mientras que para los andamios recubiertos con quitosano, PCL-30Gel-5QS, PCL-30Gel-15QS y PCL-30Gel-30QS, la liberación de gelatina a los 5 d de inmersión en agua bidestilada correspondió al ≈ 40 % de la gelatina contenida originalmente en el andamio. Dado que la cantidad de gelatina liberada de los andamios recubiertos con QS siempre fue significativamente menor en comparación con la membrana PCL30Gel(NaOH), se infiere que el QS que recubrió las fibras retardo la liberación de la gelatina, esto puede ser debido a que el QS no es fácilmente soluble en disoluciones con pH no ácidos. La gelatina es uno de los componentes biológicamente activos de los andamios desarrollados en el presente estudio, esperándose que su presencia en el andamio y en el medio circundante (tras su liberación del andamio) favorezca la adhesión y proliferación celular. Por lo que es preferible tener una liberación controlada de la gelatina en el tiempo, y no una liberación repentina de la gelatina contenida en los andamios, haciendo así que el efecto favorable sobre los cultivos celulares pueda extenderse más en el tiempo.

En cuanto al ensayo de degradación *in vitro*, uno de los principales objetivos de colocar un recubrimiento de quitosano en los andamios fue controlar la liberación de Gel para evitar una pérdida significativa ($> 50\%$) e inmediata (como se observó en el andamio PCL30Gel) de la gelatina contenida en los andamios, además de contar con las propiedades biológicamente favorables para la adhesión y proliferación de fibroblastos que posee el quitosano. Se espera que esto pueda ayudar a conseguir una respuesta biológica favorable sostenida en el tiempo y a obtener una degradación controlada y más lenta de los andamios. El QS no es altamente soluble en agua a pH neutro (PBS, pH = 7.4), y además es favorable a la adhesión y cultivo de

fibroblastos, propiedades que convienen al objetivo último del diseño de los andamios en el presente estudio. La mayoría de las propiedades bioactivas del quitosano, como su biocompatibilidad, biodegradabilidad o microbicidad dependen exclusivamente de su propiedad catiónica. El QS está cargado positivamente e interacciona electrostáticamente con los gluosaminoglicanos y proteoglicanos presentes en la MEC sintetizada por las células, los cuales están cargados negativamente. Esta interacción mejora la adhesión celular y la propiedad de proliferación celular en andamios basados en quitosano (37).

En los ensayos para evaluar el comportamiento celular en el presente estudio, se observó una mejoría significativa en cuanto a la proliferación, la adhesión y la viabilidad celular con la adición de Gel a los andamios, respuesta celular en PCL vs PCL30Gel. En acuerdo con esta observación, varios autores han demostrado que la gelatina es un compuesto favorable para la adhesión y la proliferación celular (47,72–75). En los andamios recubiertos con quitosano, PCL-30Gel-5QS y PCL-30Gel-15QS, también se observó un ligero aumento de la proliferación y viabilidad celular, en comparación con el andamio de PCL30Gel; sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. El incremento en la respuesta celular favorable con la adición de Gel en los andamios, respecto de las membranas de PCL, puede atribuirse parcialmente a que la hidrofobicidad de los andamios disminuyó con la adición de Gel. Los andamios de PCL30Gel presentaron un carácter hidrofílico mientras que los andamios de PCL presentaron un comportamiento hidrofóbico. Esto se debe principalmente a los grupos amino y carboxilo presentes en la Gel, que además de favorecer la interacción de los andamios con el agua (hidrofilicidad), favorecen la interacción de las membranas con las células. Cuando se recubrieron con QS los andamios de PCL30Gel, estos presentaron un carácter aún más hidrofílico y una clara tendencia a mostrar una respuesta celular positiva, al menos hasta un tiempo máximo de recubrimiento de las membranas con quitosano de 15 min, PCL30Gel-15QS. Los ensayos de MTT-Formazán evidenciaron una tendencia de la proliferación y viabilidad celular a mejorar conforme aumento el tiempo de recubrimiento con quitosano para los andamios de PCL30Gel-5QS y PCL30Gel-15QS, en comparación con los andamios de PCL30Gel. 30 min de recubrimiento con quitosano, PCL30Gel-30QS, pareció disminuir la proliferación celular en comparación con 5 y 15 min de recubrimiento con quitosano, PCL-30Gel-5QS y PCL-30Gel-15QS; sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa. Si bien el ensayo MTT-Formazán es una forma indirecta de estudiar la viabilidad

y proliferación celular (ensayos a diferentes tiempos de cultivo), el ensayo de calceína/homodímero de etidio es un ensayo que nos permite observar directamente las células viables y las células no viables. El ensayo de calceína/Homodímero de etidio evidenció un mayor número de células viables en los andamios de PCL30Gel y PCL30Gel-5QS, PCL30Gel-15QS y PCL30Gel-30QS, en comparación con los andamios de PCL. Estos mismos ensayos también evidenciaron un mayor número de células viables en los andamios de PLC30Gel-5QS y PLC30Gel-15QS, respecto de los andamios de PCL30Gel.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Se fabricaron exitosamente por electrohilado andamios homogéneos, microfibrilares de policaprolactona, un polímero sintético con propiedades mecánicas y de degradación adecuadas para la fabricación de andamios intencionados para reparación tisular. También se obtuvieron exitosamente por electrohilado andamios microfibrilares y homogéneos de PCL-Gel, donde la gelatina (Gel) se añadió como un polímero natural para mejorar la respuesta biológica *in vitro* (viabilidad y proliferación celular) de los andamios. Finalmente se logró recubrir exitosamente con quitosano los andamios de PCL30Gel usando tres diferentes tiempos de recubrimiento y una técnica de recubrimiento electrostático que permitió conservar la estructura microfibrilar y porosa que poseían originalmente los andamios de PCL30Gel electrohilados. Todos los andamios fueron caracterizados en sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

Uno de los objetivos principales de este estudio fue realizar una comparación entre los andamios con y sin recubrimiento de quitosano, estudiando *in vitro* la adhesión, viabilidad y proliferación de fibroblastos para evaluar el potencial de los andamios para ser usados como posibles coberturas temporales o acarreadores celulares para el potencial tratamiento de lesiones por quemaduras. Los andamios de PCL tuvieron resultados satisfactorios en su degradación, pero resultados deficientes en cuanto a su hidrofiliidad y viabilidad y proliferación celular, mostrando que los andamios de sólo PCL no cuentan con las propiedades biológicas necesarias para conformar potenciales andamios para el posible tratamiento de lesiones por quemadura.

Por otro lado, la adición de gelatina a los andamios base PCL para desarrollar por electrohilado andamios de PCL-30Gel, incremento de manera favorable la hidrofiliidad de los andamios, así como la viabilidad y proliferación celular, en comparación con los andamios de PCL. Sin embargo, se observó una degradación mayor de estos andamios, en comparación con los andamios de PCL, y una liberación repentina de más del 50% del contenido original de

gelatina de los andamios durante las primeras 48 h de inmersión en agua bidestilada. El recubrimiento de quitosano en las membranas de PCL-Gel aumentó la hidrofiliidad y cumplió con el objetivo de disminuir la degradación y la liberación de gelatina de los andamios de PCL-30Gel-5QS, PCL-30Gel-15QS y PCL-30Gel-30QS, en comparación con PCL-30Gel. Asimismo, se observó una tendencia de la proliferación celular a aumentar con el tiempo de recubrimiento de quitosano de los andamios hasta 15 min de recubrimiento, en comparación con los andamios de PCL-30Gel. El recubrimiento de quitosano de 30 min (PCL-30Gel-30QS) pareció disminuir, aunque no significativamente, la proliferación celular en comparación con PCL-30Gel, PCL-30Gel-5QS o PCL-30Gel-15QS.

La combinación de policaprolactona y gelatina y la posterior modificación de las membranas de PCL30Gel con recubrimientos de quitosano de 5 y 15 min resultaron en la obtención de membranas homogéneas con una estructura micro-fibrilar, un carácter altamente hidrofílico, una degradación menor y una liberación de gelatina más controlada, en comparación con las membranas de PCL30Gel. Así mismo, las membranas recubiertas de quitosano, PCL-30Gel-5QS y PCL-30Gel-15QS, exhibieron una mayor proliferación celular y un mayor número de células viables en su superficie, en comparación con los otros andamios.

Por lo que los andamios con el mayor potencial para ser considerados como coberturas temporales o acarreadores celulares para el posible tratamiento de lesiones por quemaduras son los andamios a base de policaprolactona con 0.30 g/g gelatina y recubrimientos de 5 o 15 min con quitosano, PCL-30Gel-5QS y PCL-30Gel-15QS. Esta composición de los andamios mostró controlar la rápida liberación de gelatina, disminuir la degradación, aumentar el carácter hidrofílico y una tendencia a favorecer la adhesión y proliferación celular. Sin embargo, aún deben evaluarse otras propiedades importantes para la obtención de andamios intencionados para el tratamiento de lesiones por quemadura, como la permeabilidad al vapor de agua, la resistencia mecánica, propiedades antibacterianas, entre otras.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS

1. Saladin KS. Anatomía y fisiología: la unidad entre forma y función. 6a. ed. McGraw Hill Mexico; 2013.
2. Moore KL, Dalley AF. Anatomía con orientación clínica. 5a. ed. editorial medica panamericana; 2009. 12 p.
3. Fitzpatrick TB. Dermatología En Medicina General. 7a. ed. Ed. Médica Panamericana; 2009.
4. Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Tissue engineering of replacement skin: The crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. J R Soc Interface. 2007;4(14):413–7.
5. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. 2013. 343-363 p.
6. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. Surgery. 2010;28(10):469–72.
7. Welsch U, Sobotta J. Histología. Médica Panamericana; 2008.
8. J. Gawkrödger D. Dermatology - An Illustrated Colour Text. 3a. ed. Vol. 69, Postgraduate Medical Journal. CHURCHILL LIVINGSTONE; 2002. 965-965 p.
9. Cui D. Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2011. 1-5 p.
10. Krause WJ. Krause's Essential Human Histology for Medical Students. Universal-Publishers; 2005.
11. Kelley WN. Medicina interna, Volumen1. Médica Panamericana; 1993. 1008 p.
12. Ross MH, Pawlina W. Histologia: Texto Y Atlas. 5 ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A.; 2007. 484 p.
13. Stevens A, Lowe J. Histologia Humana. 2da Edició. Harcourt Brace de España; 1999.
14. Johnson KE. Histology and Cell Biology. 2a. ed. Harwal Pub Co; 1991.
15. Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. Wheater's Functional Histology: A Text and

- Colour Atlas. Churchill Livingstone. 2006. 448 p.
16. Bosch Á. Las heridas y su tratamiento. *Offarm*. 2001;20(7):89–92.
 17. Vinay K. Patología estructural y funcional. 8a. ed. Elsevier; 2010. 79-81, 94, 96, 97 p.
 18. Wolfgang Kuehnel MD. Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy. 4a. ed. Thieme. 2003.
 19. Velásquez Puerta DA, Pineda Molina C, Cardona Cano ME, Gómez Suarez NE, Gartz Moises GJ, Úsuga Gómez IC, et al. Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño. *Ing Biomédica*. 2008;2(3):77–83.
 20. Gómez de Ferraris ME, Antonio CM. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. Editorial Médica Panamericana. 2019.
 21. Porras B, Mustoe T. Cicatrización : conceptos actuales. 1992;17:31–45.
 22. Bottcher-Haberzeth S, Biedermann T, Reichmann E. Tissue Engineering of Skin. *Burns*. 2011;36(4).
 23. Arenas J. Las heridas y su cicatrización. *Offarm*. 2003;22(5):126–32.
 24. U.S National Library of Medicine.
 25. Arias J, Aller MÁ, Arias JI, Lorente L. Fisiopatología quirúrgica: traumatismos, infecciones, tumores. Tebar; 1999.
 26. Moctezuma Paz LE, Páez Franco I, Jiménez González S, Miguel Jaimes KD, Foncerrada Ortega G, Sánchez Flores AY, et al. Epidemiología de las quemaduras en México. *Rev Esp Méd Quir*. 2015;20:78–82.
 27. Burns. World Health Organization. 2018.
 28. Tapia FL. TCAE en la unidad de quemados. Editorial Vértice; 2007.
 29. Macri L, Clark RAF. Tissue engineering for cutaneous wounds: Selecting the proper time and space for growth factors, cells and the extracellular matrix. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009;22(2):83–93.
 30. Colorado AC, Agudelo CA, Moncada A. ME. Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión. *Rev Ing Biomédica*. 2013;7:11–23.
 31. Albanna MZ, Holmes IV JH, Allen-Hoffmann BL, Rooney PJ. Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier; 2016. 265-287 p.

32. Yildirimer L, Thanh NTK, Seifalian AM. Skin regeneration scaffolds : a multimodal bottom-up approach. *Trends Biotechnol.* 2012;30(12):3.
33. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Eng.* 2006;12(5).
34. Lanza R, Langer R, Vacanti JP. *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition.* Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition. 2013. 1-1887 p.
35. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2001;55(2):459.
36. Hin TS. *Engineering Materials for Biomedical Applications.* 2004. 257-305 p.
37. Roldán Vasco S, Vargas Isaza CA, Mejía Suaza ML, Zapata Giraldo J, Moncada Acevedo ME. *Ingeniería de Tejidos y Aplicaciones.* 2016. 96 p.
38. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.* Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine. 1996. 66-67 p.
39. Báez JE. Poli (ϵ -caprolactona), un polímero degradable : síntesis por triisopropóxido de aluminio Al (OiPr) 3 como iniciador. *Educ Química.* 2006;17:459.
40. Azevedo H, Reis R. Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate. *Biodegrad Syst Tissue Eng Regen Med.* 2010;177–202.
41. Ferreira JL, Gomes S, Henriques C, Borges JP, Silva JC. Electrospinning polycaprolactone dissolved in glacial acetic acid: Fiber production, nonwoven characterization, and in vitro evaluation. *J Appl Polym Sci.* 2014;131(22):37–9.
42. Ng KW, Achuth HN, Mochhala S, Lim TC, Huttmacher DW. In vivo evaluation of an ultra-thin polycaprolactone film as a wound dressing. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2007;18(7):925–38.
43. Prasad T, Shabeena EA, Vinod D, Kumary T V., Anil Kumar PR. Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(1):1–13.
44. Zhang Q, Lv S, Lu J, Jiang S, Lin L. Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity. *Int J Biol Macromol.* 2015;76:94–101.

45. Schulz JT, Tompkins RG, Burke JF. Artificial Skin. *Annu Rev Med.* 2000;51(1):231–244.
46. Voet D, Voet JG. *Bioquímica.* Ed. Médica Panamericana; 2006. 1399 p.
47. Qian Y, Zhang Z, Zheng L, Song R, Zhao Y. Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone blended with chitosan-gelatin complex nanofibrous mats. *J Nanomater.* 2014;2014:1–7.
48. Feng B, Duan H, Fu W, Cao Y, Zhang WJ, Zhang Y. Effect of inhomogeneity of the electrospun fibrous scaffolds of gelatin/polycaprolactone hybrid on cell proliferation. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2015;103(2):431–438.
49. Van Vlierberghe S, Vanderleyden E, Boterberg V, Dubruel P. Gelatin functionalization of biomaterial surfaces: Strategies for immobilization and visualization. *Polymers (Basel).* 2011;3(1):114–130.
50. Başaran İ, Oral A. Grafting of poly(ϵ -caprolactone) on electrospun gelatin nanofiber through surface-initiated ring-opening polymerization. *Int J Polym Mater Polym Biomater.* 2018;67(18):1051–1058.
51. Reyes Ortega F, Rodríguez G, Rosa Aguilar M, García-Sanmartín J, Martínez A, San Román J. Comportamiento relógico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa. *Biomecánica [Internet].* 2012;20:7–19. Available from: <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/13722/07-19.pdf>
52. Gomes SR, Rodrigues G, Martins GG, Roberto MA, Mafra M, Henriques CMR, et al. In vitro and in vivo evaluation of electrospun nano fibers of PCL , chitosan and gelatin : A comparative study. *Mater Sci Eng C.* 2015;46:348–358.
53. Pezeshki-Modaress M, Mirzadeh H, Zandi M. Gelatin-GAG electrospun nanofibrous scaffold for skin tissue engineering: Fabrication and modeling of process parameters. *Mater Sci Eng C.* 2015;48:704–712.
54. Powell HM, Boyce ST. Fiber density of electrospun gelatin scaffolds regulates morphogenesis of dermal – epidermal skin substitutes. *J Biomed Mater Res Part A.* 2007;84.
55. Franco RA, Nguyen TH, Lee B-T. Preparation and characterization of electrospun PCL/PLGA membranes and chitosan/gelatin hydrogels for skin bioengineering applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22(10):2207–2218.
56. Yao R, He J, Meng G, Jiang B, Wu F. Electrospun PCL/Gelatin composite fibrous

- scaffolds: mechanical properties and cellular responses. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2016;
57. Guarino V, Altobelli R, Cirillo V, Cummaro, Annunziata; Ambrosio L. Additive electrospinning: a route to process electrospun scaffolds for controlled molecular release. *Polym Adv Technol.* 2015;26(12).
 58. Natu M V., C. de Sousa H, Gil MH. Effects of drug solubility, state and loading on controlled release in bicomponent electrospun fibers. *Int J Pharm.* 2010;397(1–2):50–58.
 59. Chasin M, Langer R. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems.pdf.*
 60. Giraldo JD. Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. 2015;1–22.
 61. Hirano S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polym Int.* 1999;48(8):732–4.
 62. Eftekhari A. *Nanostructured Conductive Polymers by Electrospinning.* John Wiley & Sons; 2010. 165 p.
 63. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Lim T-C, Ma Z. *An Introduction to Electrospinning And Nanofibers.* World Scientific; 2005.
 64. Reneker DH, Chun L. Nanometre diameters of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology.* 1996;7:216–223.
 65. Fang J, Niu HT, Lin T, Wang XG. Applications of electrospun nanofibers. *Chinese Sci Bull.* 2008;53(15):2265–2286.
 66. Bognitzki M, Czado W, Frese T, Schaper A, Hellwig M, Steinhart M, et al. *Nanostructured Fibers via Electrospinning.* 2001;13(1):70–72.
 67. Deshmukh PK, Ramani KP, Singh SS, Tekade AR, Chatap VK, Patil GB, et al. Stimuli-sensitive layer-by-layer (LbL) self-assembly systems: Targeting and biosensory applications. *J Control Release.* 2013;166(3):294–306.
 68. Prado-prone G. *Desarrollo y caracterización de materiales compuestos basados en polímeros biocompatibles y nanopartículas de óxido de Zinc (ZnO) fabricados mediante la técnica de electrohilado, para potenciales aplicaciones en el tratamiento de quemaduras [Doctorado].* Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.
 69. Feng B, Tu H, Yuan H, Peng H, Zhang Y. Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL. *Biomacromolecules.* 2012;13(12):3917–3925.

70. Jara Jiménez P, Rosel Remírez J. Análisis de Series Temporales: Un Ejemplo de Aplicación en ámbitos Psicológicos. Publicacions de la Universitat Jaume I; 2002. 28 p.
71. Lárez Velásquez C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Rev Iberoam Polímeros*. 2003;4(2):91–109.
72. Van Vlierberghe S, Dubruel P, Lippens E, Masschaele B, Van Hoorebeke L, Cornelissen M, et al. Toward modulating the architecture of hydrogel scaffolds: Curtains versus channels. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(4):1459–1466.
73. Dubruel P, Unger R, Van Vlierberghe S, Cnudde V, Jacobs PJS, Schacht E, et al. Porous gelatin hydrogels: 2. In vitro cell interaction study. *Biomacromolecules*. 2007;8(2):338–344.
74. Gautam S, Chou CF, Dinda AK, Potdar PD, Mishra NC. Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications. *J Mater Sci*. 2014;49(3):1076–1089.
75. Chen YS, Chang JY, Cheng CY, Tsai FJ, Yao CH, Liu BS. An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials*. 2005;26(18):3911–3918.
76. Suga M, Asahina S, Sakuda Y, Kazumori H, Nishiyama H, Nokuo T, et al. Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. *Prog Solid State Chem*. 2014;1–21.
77. Abdullah SZ, Bérubé PR, Horne DJ. SEM Imaging of Membranes: Importance of Sample Preparation and Imaging Parameters. *J Memb Sci*. 2014;
78. Synytsya A. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydr Polym*. 2003;54(1):97–106.
79. Spencer J, Bonder G, Rickard L. *Química: Estructura y dinámica*. CECSA; 2000.
80. Fox MA, Whitesell JK. *Química Orgánica*. 2a ed. Pearson Educación;
81. Wade LG. *Química Orgánica*. 2a ed. Pearson Educación
82. Gnanasambandam R, Proctor A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. 2000;68:327–332.
83. Li FM, Nathan A, Wu Y, Ong BS. *Organic Thin Film Transistor Integration: A Hybrid Approach*. Wiley & Sons; 2011.
84. Calcein AM [Internet]. Available from: <https://biotium.com>

85. Gustavo P. Biotecnología de la reproducción. 1a. ed. Gustavo Palma; 2001. 536 p.

ANEXOS

Anexo 1. Técnicas y métodos de caracterización de propiedades físicas y químicas

1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Un microscopio electrónico de barrido es un equipo que emite un haz de electrones producido por una fuente en una sonda que escanea a la superficie de una muestra. La interacción entre la muestra y la sonda de electrones produce varios tipos de emisiones que son capturadas por diferentes detectores colocados en posiciones apropiadas (76). La señal detectada puede ser entonces amplificada y analizada. Las muestras deben ser conductoras, por lo que aquellas muestras aislantes o que se cargan fácilmente se preparan con un recubrimiento metálico antes de su estudio (77).

1.2. Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo es un método que se usa para análisis cuantitativos, cualitativos, y determinación de estructuras químicas por medio de la identificación de los diferentes grupos funcionales presentes en un compuesto (78,79). Es un método rápido, no destructivo y que no necesita procedimientos complejos para la preparación de las muestras (78). Este método se basa en la absorción de energía en la región infrarroja por las moléculas (80). Las moléculas absorben la radiación infrarroja cuya frecuencia coincide con la frecuencia de vibración de la molécula (80). Los picos observados en la región dactilar del espectro FTIR de absorción de la molécula dependen de las vibraciones fundamentales de los átomos que componen toda la molécula, por lo que se observan las vibraciones en los diferentes enlaces en la molécula proporcionando evidencia de los grupos funcionales presentes en esta (81).

Actualmente se utilizan espectrofotómetros de Fourier, los cuales aumentan la relación señal/ruido. La respuesta de la muestra en todas las longitudes de onda se mide de en un solo escaneo, lo que hace que la técnica sea muy rápida con una relación señal/ruido adecuada. Además, la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) también se puede utilizar para muestras líquidas o sólidas directas sin implicar procedimientos

de preparación de muestras laboriosos, y se puede usar para identificar una muestra al examinar y comparar los espectros con los de un estándar conocido (82).

1.3. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto mide la atracción entre sí de las moléculas situadas en el interior de una gota y la atracción o repulsión que experimentan las moléculas de la gota con las moléculas adyacentes, es decir, con las moléculas en la superficie del sólido y en el gas que rodea a la gota (83). Se denomina ángulo de contacto al ángulo entre la tangente a la superficie de la gota y la tangente a la superficie en la intersección de las tres fases, sólido-liquido-gas, Figura 17.

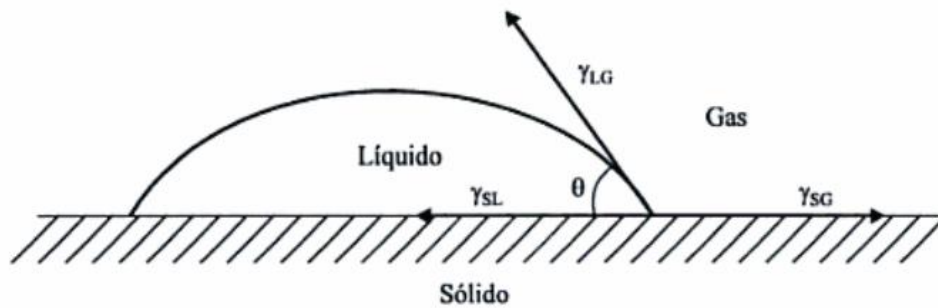


Figura 17. Fuerzas que actúan sobre una gota de agua en una superficie. Adaptada de (83).

Cuando un ángulo de contacto es mayor de 90° y menor de 180° significa que la superficie es hidrofóbica y tiene baja energía superficial (Figura 18a) lo que indica que la mojabilidad es baja. Así mismo, cuando el ángulo formado es de 180° su mojabilidad es nula, ya que solo existe un punto de contacto entre la gota y la superficie del sólido. Por otro lado, un ángulo de contacto menor de 90° entre la superficie sólida y la gota indica que la superficie es hidrofílica y tiene una alta energía superficial (Figura 18b) con una mojabilidad alta, siendo un ángulo de 0° la superficie más humectable (83).

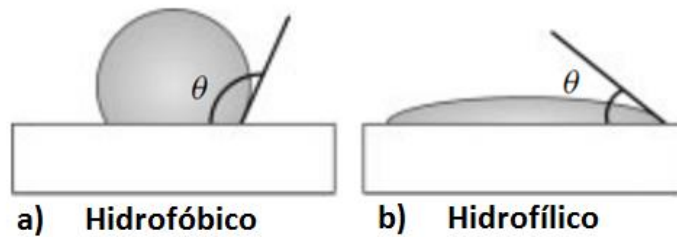


Figura 18. Ángulo de contacto (θ) de superficies con distinta humectabilidad. a) gota de agua en una superficie hidrofóbica, $\theta > 90^\circ$ y b) en una superficie hidrofílica, $\theta < 90^\circ$. Adaptada de (83)

1.4. Ensayo de Biuret

El ensayo de Biuret se emplea, principalmente, para medir la concentración de proteína en una muestra líquida, detectando la presencia de enlaces peptídicos. Este método se basa en la reacción de Biuret, que es la formación en condiciones alcalinas de un complejo entre el ion Cu^{2+} (presente en el reactivo de Biuret) y los enlaces peptídicos de la cadena de aminoácidos que conforman las proteínas (Figura 19A).

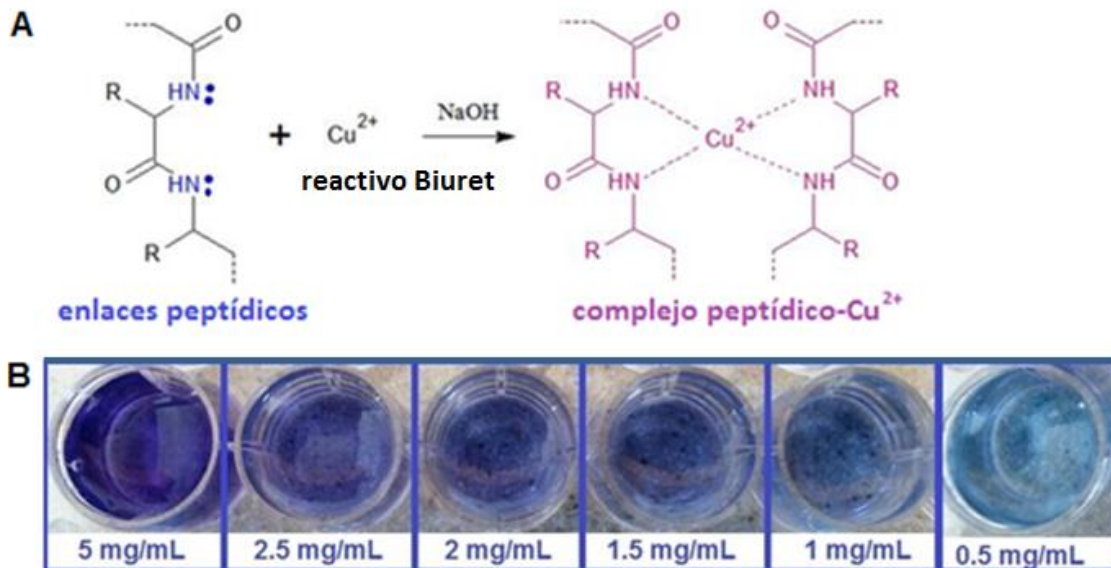


Figura 19. (A) Reacción de Biuret. (B) Coloración generada después de la formación del complejo enlace peptídico- Cu^{2+} en función de la concentración de proteína en la disolución.

La reacción entre el enlace peptídico de una proteína y el reactivo de Biuret forma el complejo enlace peptídico-Cu²⁺ que es un compuesto de coloración púrpura, donde la intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos en la muestra (Figura 19B). Por lo tanto, al medir la absorbancia de la muestra en una longitud de onda $\lambda \approx 540-570$ nm (máximo pico de absorción del complejo), después de la formación del complejo enlace peptídico-Cu²⁺, se puede estimar la cantidad de proteína presente en la muestra a partir de una curva de calibración.

En el presente proyecto, para obtener la curva de calibración que relaciona la concentración de Gel en la muestra con la absorbancia de la disolución obtenida después de realizar el ensayo de Biuret, se preparó una disolución de referencia de Gel disolviendo 200 g de Gel en 20 mL de agua bidestilada. A partir de la disolución de referencia se prepararon siete disoluciones en agua bidestilada con diferentes concentraciones de Gel conocidas (5, 2.5, 1.5, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL). Posteriormente, se tomaron 0.5 mL de cada disolución y se mezclaron individualmente con 2.0 mL del reactivo de Biuret, manteniéndose a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se trasladaron, individualmente, alícuotas de 100 μ L de estas disoluciones a pozos de una placa de 96 pozos y su absorbancia se midió a 570 nm en un espectrofotómetro (BioTek, SYNERGY HTX) para construir la curva de calibración (Figura 20).

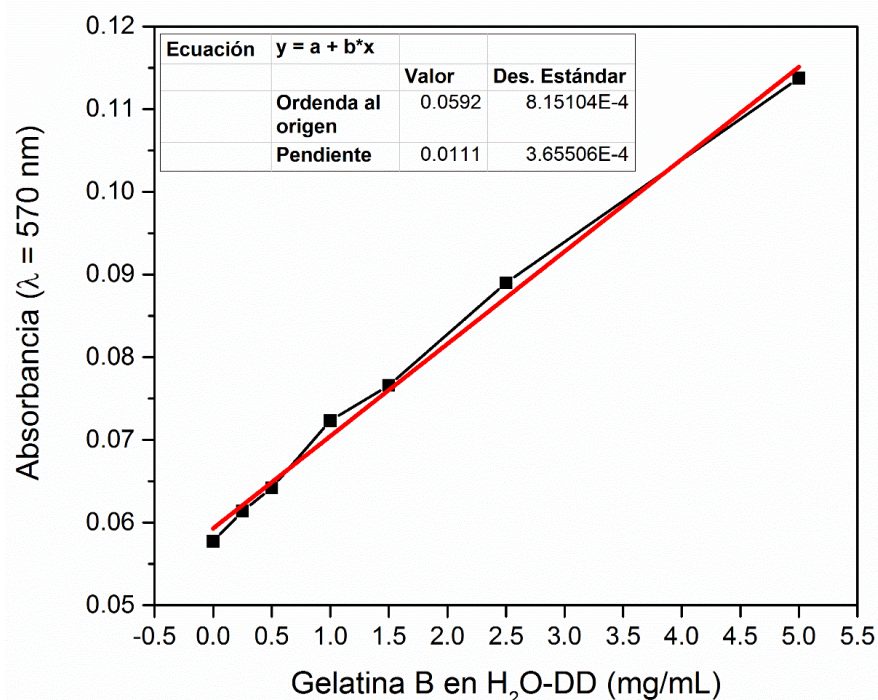


Figura 20. Curva de calibración para el ensayo de Biuret.

1.5. Degradación *in vitro*

El ajuste de los resultados de porcentaje de masa, respecto de la masa inicial de los andamios (100%), en el tiempo para el ensayo de degradación, resulto en los siguientes parámetros para la ecuación de Gompertz (Figura 21).

a)

Andamio	Constantes		
	a	b	c
PCL	-0.019115	1.967876	0.065554
PCL30Gel	-0.137263	1.328961	0.101665
PCL30Gel-5QS	-0.074107	1.253016	0.099643
PCL30Gel-15QS	-0.055651	1.492457	0.103349
PCL30Gel-30QS	-0.051415	0.809713	0.052781

b)

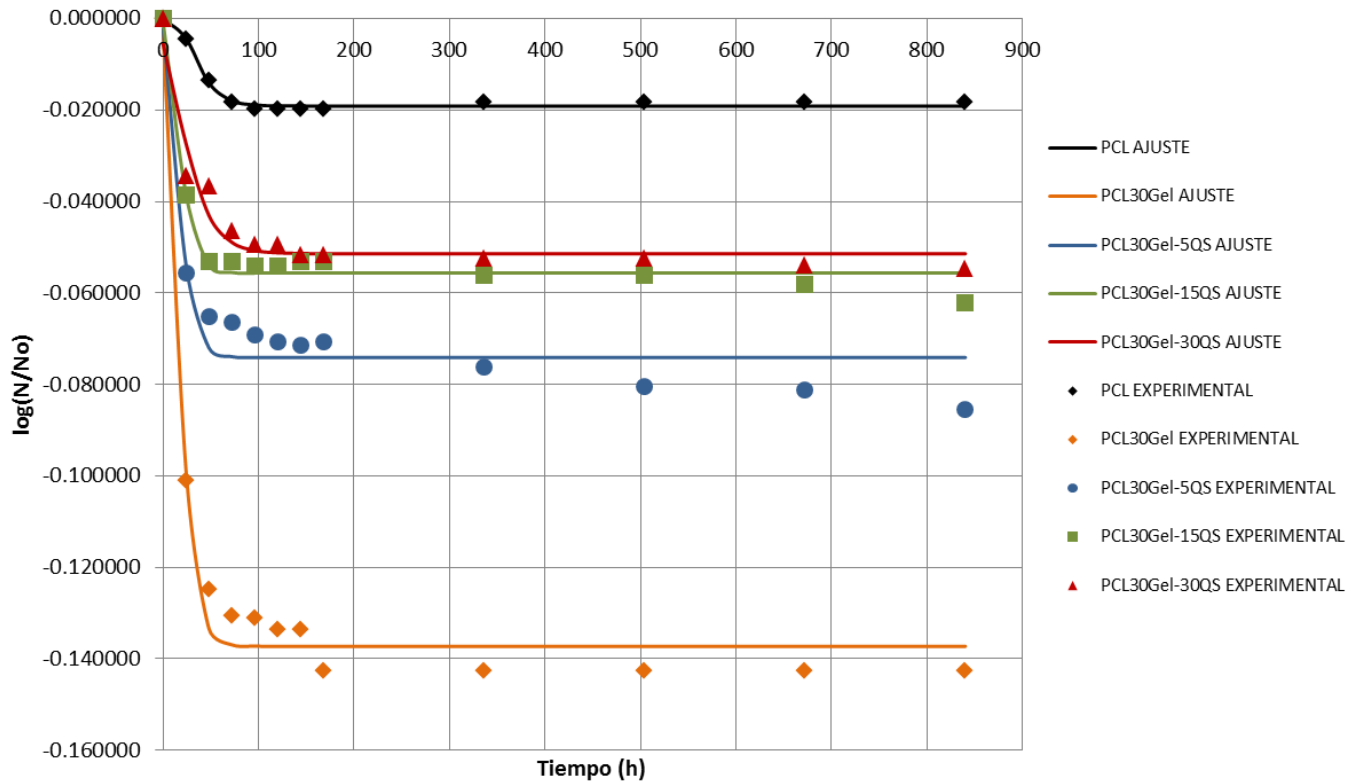


Figura 21. a) Valores de las constantes de la ecuación de Gompertz, para cada ajuste. b) Ajustes de los resultados de porcentaje de masa vs masa inicial de los andamios.

Anexo 2. Técnicas y métodos de caracterización de propiedades biológicas

2.1. Ensayo de MTT-Formazan

El método de reducción del metil-tiazol-tetrazolio (MTT) es una medida del metabolismo celular basada en la reducción de esta sal por acción de las succinato-deshidrogenasas mitocondriales, con la consecuente formación del colorante azul-violeta Formazán (Figura 22). La cantidad de Formazán reducido por las células es proporcional al número de células metabólicamente activas en los cultivos y por tanto puede ser considerado como una medida indirecta de la viabilidad, o proliferación, celular, dependiendo de la configuración del experimento. Los cristales de Formazán metabolizados por las células, a partir del MTT en el medio, quedan retenidos en las células ya que son insolubles en medios acuosos. Por lo que posteriormente, una vez terminado el periodo de incubación del MTT, los cristales de Formazán son disueltos lavando los cultivos celulares con una disolución de isopropanol:dimetilsulfóxido (ISO:DMSO, 1:1; Sigma-Aldrich). Finalmente, la absorbancia de esta disolución es cuantificada midiendo la absorción de una alícuota de 100 μ L de disolución en un espectrofotómetro-lector de placas a una longitud de onda de $\lambda = 570$ nm.

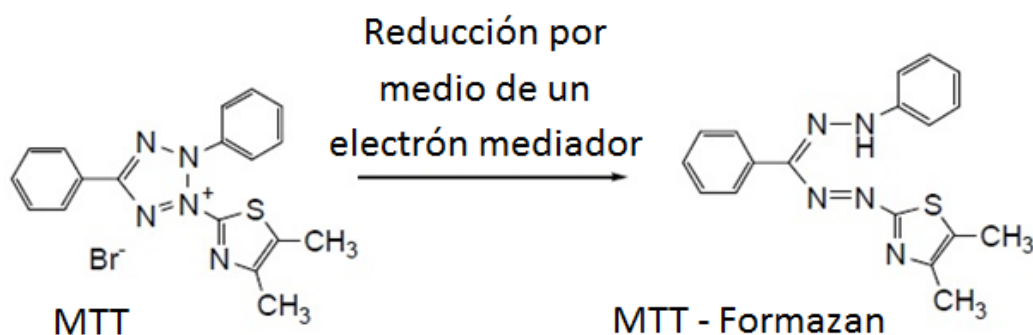


Figura 22. Reducción de MTT a Formazán.

2.2. Ensayo de Calceína/Homodímero de Etidio

El ensayo de calceína/homodímero de etidio es usado principalmente para la distinción entre células vivas y muertas por medio de las tinciones verdes y rojas fluorescentes, respectivamente. La calceína AM no fluorescente, es permeable y puede atravesar la membrana celular e introducirse en las células. Una vez dentro de las células, la calceína AM

se hidroliza por la esterasa endógena de las células formando calceína cargada negativamente, la cual es verde fluorescente; Figura 23. Esta calceína fluorescente se retiene en el citoplasma de las células con membranas intactas. Así, la calceína se usa para medir la actividad enzimática, que se requiere para activar su fluorescencia y en estudios de integridad de la membrana celular marcando directamente las células viables (84).

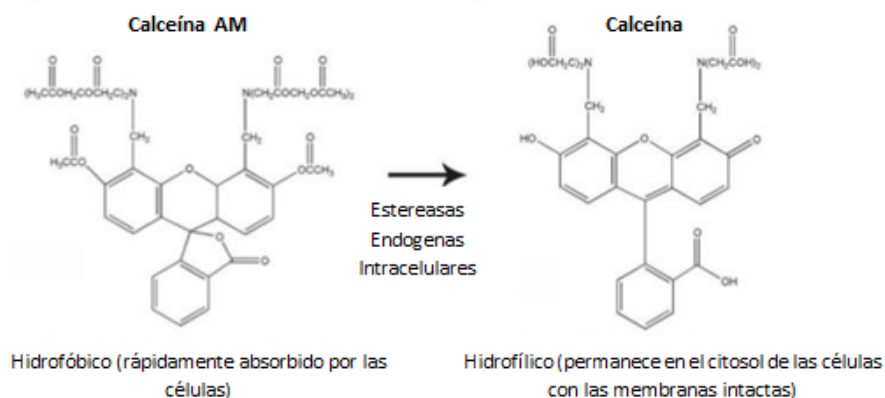


Figura 23. Transformación de calceína AM (no fluorescente) a calceína (fluorescente) por las estereasas endógenas de las células metabólicamente activas (vivas).

Por otro lado, el homodímero de etidio (Figura 24) es impermeable en la membrana celular y únicamente se filtra rápidamente en las células muertas o dañadas con membranas comprometidas. Una vez habiendo penetrado la membrana celular, el homodímero de etidio ingresa al núcleo de las células para unirse al ADN e incrementar significativamente la intensidad de su emisión fluorescente, indicando la pérdida de integridad de la membrana plasmática (85), es decir, marcando las células no viables o cuya viabilidad está comprometida.

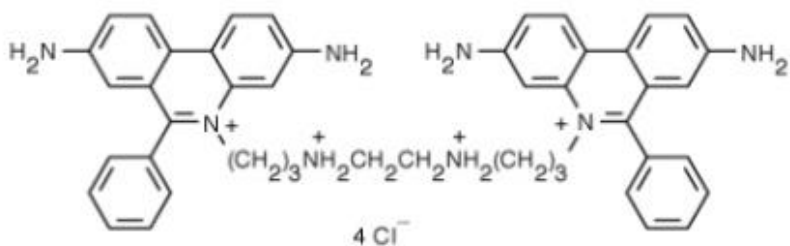


Figura 24. Estructura molecular del homodímero de etidio.