



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

"Obtención y caracterización de un andamio a base de poli (caprolactona) y gelatina tipo A como posible material en regeneración de miocardio"

Tesis de maestría que presenta

Gaspar Eduardo Martín Pat

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS MATERIALES POLIMÉRICOS

Mérida, Yucatán, Mayo 2015

DECLARACION DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asigno para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la ley federal del derecho de autor y la ley de la propiedad industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho centro de investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de los correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida Yucatán, México; a 07 de Mayo de 2015

Gaspar Éduardo Martín Pat



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado

"Obtención y caracterización de un andamio a base de poli (caprolactona) y gelatina tipo A como posible material en regeneración de miocardio"

Perteneciente al programa de maestría en Ciencias (Materiales Poliméricos) del centro de investigación científica de Yucatán, A.C. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Materiales bajo la dirección del Dr. Fernando Hernández Sánchez.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada Núm. de CVU 510474, para cubrir los gastos de manutención.

Al proyecto FOMIX YUC-C19-170132

A mi asesor el Dr. Fernando Hernández Sánchez, al M.C. Hugo Joel Carillo Escalante y a mis compañeros de trabajo Julio Cesar Sánchez Pech y América Chi Uluac, por sus enseñanzas, apoyo, dedicación y compañerismo a lo largo de la elaboración de la presente tesis.

A mi tutor interno, el Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez por todas las observaciones hechas para mejorar la calidad de este trabajo.

A la M.C Silvia Andrade, por las fotografías SEM y por sus recomendaciones para la realización de esta tesis.

A mi madre y hermanos que siempre estuvieron presente demostrando su apoyo incondicional, cariño y atenciones conmigo durante esta etapa.

A la mujer que me ha enseñado lo importante y maravilloso que puede ser la vida, por apoyarme en los momentos más difíciles, pero sobre todo por su amor incondicional.

Gracias Andrea Pool

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURASiv
ÍNDICE DE TABLASvi
RESUMEN1
ABSTRACT
INTRODUCCION
1. CAPÍTULO 1
MARCO TEORICO
1.1 La ingeniería tisular y el musculo cardiaco5
1.2 Aspectos importantes en el diseño de andamios10
1.2.1 Biodegrabilidad 10
1.2.2 Porosidad y tamaño de poro11
1.2.3 Superficie
• Hidrofilicidad
Carga eléctrica
1.2.4 Propiedades mecánicas13
1.3 Técnica de electrohilamiento 14
1.3.1 Generalidades
1.3.2 Descripción del proceso14
1.3.3 Tipos de colectores 16
1.3.4 Parámetros de la técnica de electrohilamiento 18
1.3.5 Concentración del polímero en la disolución 19
1.3.6 Efecto del disolvente

	1.4 Materiales en ingeniería tisular para regeneración de miocardio	. 22
	1.4.1 gelatina	. 23
	ANTECEDENTES	. 26
	JUSTIFICACIÓN	. 29
	Hipótesis	. 30
	Objetivos	. 30
2.	CAPÍTULO 2	. 31
	PARTE EXPERIMENTAL	31
	2.1 Materiales	. 31
	2.2 Caracterización de los polímeros	31
	2.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	31
	2.2.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)	.33
	2.3. Preparación de los andamios mediante la técnica de electrohilamiento	
	(electrospining).	33
	2.3.1 Optimización del proceso de electrohilamiento	33
	2.4 Caracterización fisicoquímica y mecánica de los andamios obtenidos	36
	2.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	36
	2.4.2 Espectroscopia de Infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)	36
	2.4.3 Prueba de pérdida de masa	37
	2.4.4 Calorimetría diferencial de barrido	38
	2.4.5 Pruebas de tensión	38
	2.4.6 Técnica de la gota sésil estática (ángulos de contacto)	39
	2.4.7 Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (SEM-EDS) para detección de disolvente remante.	40
3.	CAPÍTULO 3	41
ŀ	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41

3.1 Caracterización de los polímeros4	11
3.1.1Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)4	11
3.1.2 Calorimetría diferencial de Barrido (DSC)4	13
3.2 Preparación de las disoluciones para la fabricación de andamios PCL-	
gelatina por el método de electrohilamiento 4	16
3.2.1 Disoluciones de gelatina y PCL en Trifluoroetanol (TFE) 4	16
3.2.2 Disoluciones PCL-gelatina 65:35 y 50:50 en TFE y 0.2% de ácido acétic	:0
(AAc)	17
3.3 Andamios PCL-gelatina 50:50 y 65:35 elaborados con Trifluoroetanol	
(TFE) y 0.2 % de ácido acético (HAc) electrohiladas en el cilindro giratorio 5	51
3.3.1 Efecto en la morfología de la rapidez de giro del cilindro giratorio 5	51
3.4 Caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados 5	53
3.4.1 Microscopia electrónica de barrido5	3
3.5 Técnica de la gota sésil estática (ángulos de contacto)5	57
3.6 Espectroscopia FTIR de los andamios PCL-gelatina	8
3.7 Pruebas mecánicas a tensión	9
3.8 Calorimetría diferencial de barrido de los andamios PCL-gelatina 6	2
3.9 Pruebas de pérdida de masa6	5
3.10 Espectro infrarrojo FTIR de los andamios degradados7	0
3.1 1 Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (SEM-EDS) para	ı
detección de disolvente remante7	3
CONCLUSIONES	'5
RECOMENDACIONES	6
REFERENCIAS	7

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.Esquema del daño cardiaco durante un infarto al miocardio	5
Figura 1.2. La triada de la ingeniería tisular, formada por los andamios, las célul	las
y los factores de crecimiento.	7
Figura 1.3. Diagrama anatómico de la pared del corazón	8
Figura 1.4. Estructura orientada de los cardiomiocitos en el miocardio. La	
alineación es uniforme en cada capa con una transición gradual de la	
alineación entre las capas desde el endocardio al epicardio [11]	. 10
Figura 1.5. Ensamble del sistema de electrohilamiento.	. 15
figura 1.6. Fases geométricas del fluido de polímero en el proceso de	
electrohilamiento: cono de taylor, de chorro continuo, región de inestabilidad	d.
	. 16
Figura 1.7. Ilustración esquemática de diversas configuraciones de	
electrohilamiento para el control de la alineación de las nanofibras: a) pares	de
electrodos como colector b) electrohilado asistida por el campo magnético y	(c)
la rotación de un cilindro como colector	. 17
Figura 1.8. Representación típica de un fragmento de la gelatina.	. 23
Figura 1.9. Unidad repetitiva de la poli(caprolactona).	. 25
Figura 2.1. Calorímetro diferencial de barrido perkin elmer	. 32
Figura 2.2. Espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	
nicolet 8700.	. 33
Figura 2.3. Equipo de electrohilamiento NaBond (a) cilindro giratorio (b)	. 35
Figura 2.4. Microscopio electrónico de barrido Jeol modelo LV6360	36
Figura 2.5. Metodología para las pruebas de pérdida de masa; a) envases de	
polietileno, b) incubadora y c) horno con vacío	37
Figura 2.6. Andamios (a), maquina Shimadzu AGS-X (b)	39
Figura 2.7. Medidor de ángulo de contacto Tantec's cam plus micro	40
Figura 3.1. Espectros FTIR de la PCL pura	41
Figura 3.2. Espectro de FTIR de la gelatina pura	42

Figura 3.3. Termograma DSC de la PCL pura; verde-calentamiento y azul-
enfriamiento
Figura 3.4. Termograma DSC de la gelatina pura
Figura 3.5. Fotografías a 40X de las estructuras formadas a partir de las
disoluciones de gelatina en TFE al a) 5%, b) 7.5% c) 10%, d) 12.5% e) PCL
10% f) PCL 12 %
Figura 3.6. Separación de fases después de 8 horas en reposo de la disolución
PCL-gelatina 65:35 48
Figura 3.7. Disolución PCL-gelatina 65 35 sin AAc; electrohilada
a) 0 horas b) 4 horas c) 8 horas50
Figura 3.8. Disolución de PCL-gelatina con 0.2% AAc 65:35; electrohilada
a) 0 horas b) 4 horas c) 8 horas50
Figura 3.9. Disolución de PCL-gelatina 50:50 sin AAc; electrohilada
a) 0 horas b) 4 horas c) 8 horas 50
figura 3.10. Disolución de pcl-gelatina 50:50 con 0.2% de aac; electrohilada
a) 0 horas b) 4 horas c) 8 horas51
Figura 3.11. Disolucion de PCL-gelatina 50:50 en a) TFE (opaca) b) TFE y 0.2 %
de aac (transparente)
Figura 3.12. Morfología obtenida en un microscopio óptico a 40X para cada
rapidez de giro del cilindro giratorio 1000 rpm a) 1500 rpm b) 2000 rpm c) 52
Figura 3.13. Micrografías de SEM de las nanofibras obtenidas al azar a partir de la
disolución de PCL-gelatina 50:50 con 0.2% AAc; a) 5000X b) 2000X y
alineadas; c) 5000X d) 2000X53
Figura 3.14. Distribución de los diámetros de las nanofibras de PCL-gelatina
50:50; rojo-azar; azul-alineadas54
Figura 3.15. Micrografías sem de las nanofibras obtenidas a partir de la disolución
de PCL-gelatina 65:35 y 0.2% AAc al azar; a) 5000X b) 2000X y alineadas; c)
5000X d) 2000X
Figura 3.16. Distribución de los diámetros de las nanofibras de PCL-gelatina
65:35; rojo-azar; azul-alineadas
Figura 3.17. Ángulo de contacto para el andamio de PCL

Figura 3.18. Ángulos de contacto para el andamio PCL-gelatina 65:35;
a) 0 segundos b) 5 segundos c) 10 segundos58
Figura 3.19. Ángulos de contacto para el andamio PCL-gelatina 50:50;
a) 0 segundos a) b) 5 segundos c) 10 segundos58
Figura 3.20. Espectros infrarrojos FTIR de los andamios; PCL-gelatina 65:35-rojo,
PCL-gelatina 50:50-azul. Las líneas representan los picos característicos de la
amida I y amida II de la gelatina a 1640 cm ⁻¹ y 1530 cm ⁻¹
Figura 3.21. Curvas esfuerzo y deformación de los andamios
Figura 3.22. Curva esfuerzo-deformación para el andamio PCL-gelatina 65:35 en
condiciones húmedas62
Figura 3.23. Termogramas de las fibras electrohiladas de PCL y gelatina
Figura 3.24. Termogramas de fibras electrohiladas de PCL-gelatina 50:50; sin
AAc-negro; con AAc-azul; las líneas discontinuas representan las segundas
corridas
Figura 3.25. Pérdidas de masa de los andamios PCL-gelatina; 65:35-rojo y 50:50-
azul
Figura 3.26. Micrografías sem de los andamios sometidos a procesos de
degradación, PCL-gelatina 65:35 con AAc; a-1) 4 días a-2) 12 días a-3)17
días. PCL-gelatina 50:50; b-1) 4 días b-2) 12 días b-3) 17 días
Figura 3.27. Material remanente del andamio PCL-gelatina 65:35 con AAc a 4 días
en PBS a) 4000X b) 15000X
Figura 3.28. Normalización de gráficas, PCL-gelatina 65:35 con AAc; 0 días-rojo, 4
días-verde, 8 días-azul, 12 días-morado, 17 días negro
Figura 3.29. Espectros sometidos a degradación, PCL-gelatina 65:35 con AAc; 0
días-rojo, 4 días-verde, 8 días-azul, 12 días-morado, 17 días negro

* ** **

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Parámetros de electrohilamiento con sus respectivas características 1	8
Tabla 1.2 Propiedades de algunos disolventes mas utilizados en electrohilado 2	!1
Tabla 1.3 composición de aminoácidos por cada 1000 residuos de aminoácidos. 2	24
Tabla 1.4 Materiales experimentales sugeridos para la elaboración de andamios	
para ingeniería tisular cardiaca2	6
Tabla 2.1 Condiciones de disoluciones utilizadas 3	4
Tabla 2.2 Parámetros considerados como óptimos para los andamios PCL-	
gelatina en TFE y 0.2% AAc 3	5
Tabla 3.1 Valores de entalpia de fusión, cristalización y porcentaje de cristalinidad	١,
calculados de la Figura 3.3 anterior4	4
Tabla 3.2 Propiedades térmicas de la gelatina pura	6
Tabla 3.3 Valores arrojados de la caracterización mecánica de los andamios 6	0
Tabla 3.4 Valores de entalpia de fusión, cristalización y porcentaje de cristalinidad	,
calculados de la figura 3.23 y 3.246	4
Tabla 3.5 EDS para el andamio PCL-gelatina 65:35 con AAc	3
Tabla 3.6 EDS para el andamio PCL-gelatina 65:35 con AAc después del	
tratamiento realizado con carbonato de sodio7	4

RESUMEN

La Ingeniería tisular cardíaca, es una de las estrategias más prometedoras para la regeneración de miocardio después de un infarto. El gran reto de la ingeniería tisular es producir un andamio bioactivo con propiedades anisótropas, que guíen a las células para formar un tejido ordenado. En este trabajo, un andamio hecho a base de poli(caprolactona) y gelatina tipo A fue desarrollado mediante la técnica de electrohilamiento. Los andamios fabricados, fueron preparados disolviendo los biopolímeros en una mezcla de disolventes trifluoroetanol (TFE) y ácido acético. Se encontró que las condiciones ideales para obtener andamios de PCL-gelatina 65:35 con estructuras nanofibrosas uniformes libres de glóbulos y otros defectos, fueron una concentración de polímero de 10% m/m, un flujo de alimentación de 0.8 ml/h, un potencial eléctrico de 11 kV y una distancia al colector de 10 cm. Los resultados indicaron que el andamio PCL-gelatina 65:35 poseía fibras con diámetros de 436 nm ± 31 nm cuando éstas eran colectadas al azar y de 377 nm ± 119 nm para las fibras alineadas. Los valores arrojados para el ángulo de contacto y del módulo elástico fueron 32° y 2.20 kPa respectivamente. Las pruebas de pérdida de masa y de espectroscopia infrarroja muestran una perdida en casi su totalidad de la gelatina a los 17 días.

ABSTRACT

Cardiac tissue engineering is one of the most promising strategies to reconstruct the infarcted myocardium and the major challenge involves producing a bioactive scaffold with anisotropic properties that assist in cell guidance to mimic the heart tissue. In this work, a scaffold made of poly (caprolactone) and gelatin type A was developed by electrospinning. Scaffolds were prepared by dissolving the biopolymers in a solvents mixture of trifluoroethanol (TFE) and acetic acid.

It was found that solutions of PCL-gelatina at 10 wt% in trifluoroethanol /acetic acid, 0.8 ml/h feed stream, 11 kV of electrical potential and a distance from the needle to the collector of 10 cm were the optimun conditions for manufacturing of PCL-gelatin scaffolds. The results indicated that gelatin-PCL 65:35 scaffold had diameters of 436 nm \pm 31 nm, when these were randomly collected and 377 nm \pm 119 nm for the aligned fibers. The contact angle and the elastic modulus were 32 ° and 20.2 kPa respectively. Evidence of mass loss and infrared spectroscopy show a loss almost entirely of gelatin at 17 days.

INTRODUCCION

Es un hecho conocido que la capacidad de regeneración del músculo cardiaco es limitada, como resultado de esto, los pacientes que experimentan y sobreviven a un infarto de miocardio sufren una reducción significativa en su calidad de vida. El problema de cómo tratar a los miles de pacientes por año en todo el mundo, que sobreviven a un fuerte infarto al miocardio (IM) y, por lo tanto el desarrollo de insuficiencia cardíaca avanzada, no se ha resuelto a pesar de un tratamiento médico óptimo. El trasplante de corazón es la mejor solución para los pacientes con insuficiencia cardíaca en etapa terminal [1]. Sin embargo, esto no es una solución viable, ya que el número de donantes es muy bajo en comparación de los que lo requieren. Además, una vez trasplantado, el paciente el resto de su vida tendrá que tomar fármacos para evitar el rechazo (inmunosupresores como basiliximab) y la transmisión de patógenos [2, 3].

Una alternativa prometedora para tratar este problema es el uso de andamios, los cuales permiten la regeneración del tejido cardiaco perdido o lesionado. El empleo de la técnica de electrohilamiento en la elaboración de andamios, ha cobrado un gran auge debido a que este método ha demostrado ser simple y eficaz. Los polímeros elegidos fueron seleccionados con la idea de combinar las virtudes de la gelatina, el cual es un material biodegradable, biocompatible y es de bajo costo, con las de un polímero sintético como la poli(caprolactona), el cual puede contribuir a incrementar la ductilidad del andamio elaborado, además que es biocompatible, y su uso clínico está aprobado por la FDA.

El presente trabajo consta de tres capítulos; en el primero se encuentra el marco teórico y los antecedentes referentes al trabajo el cual presenta información sobre la ingeniería tisular, la técnica de electrohilamiento, características de los polímeros a utilizar y los aspectos importantes para la fabricación de andamios.

En el capítulo 2 se presenta la metodología a partir de las cuales se fabricaron los andamios y, en el capítulo 3, se presenta los resultados obtenidos durante el

desarrollo de este trabajo, de igual manera se proporciona el análisis y discusión de estos. Posteriormente, se presenta las conclusiones y recomendaciones del trabajo y, finalmente las referencias bibliográficas.

1. CAPÍTULO 1 MARCO TEORICO

1.1 La ingeniería tisular y el musculo cardiaco

Como se muestra en la Figura 1.1 el infarto de miocardio (IM) se produce cuando una arteria coronaria que suministra sangre al corazón se bloquea, haciendo incapaz la adecuada perfusión de la sangre por el miocardio. Sin el oxígeno necesario para sobrevivir, los miocitos entran en un estado conocido como isquemia, y pronto comienzan a morir. La muerte de los miocitos crea una región, llamada infartada, esto es, dentro del miocardio se forma un tejido cicatricial improductivo, que bloquea las vías de conducción eléctrica normales del corazón, impidiendo su correcto funcionamiento. Con el tiempo la zona infartada se adelgaza y alarga, haciendo que el corazón asuma una forma más esférica; Esto conduce a una disminución en el gasto cardíaco, que a su vez conduce a una disminución general de la salud y la calidad de vida del paciente [4].



Infarto al miocardio

Figura 1.1.Esquema del daño cardiaco durante un infarto al miocardio [5].

Como una opción al problema se recurre a una nueva corriente, la ingeniería tisular (o de los tejidos). Este campo se ha desarrollado como herramienta principal para regenerar tejidos dañados, combinando células con capacidad regenerativa provenientes del mismo cuerpo al que se le va a implantar, con materiales biológicos y/o sintéticos altamente porosos, los cuales actúan como soporte para el crecimiento de nuevos tejidos [6].

Los sustratos o soportes que se utilizan en la ingeniería tisular, se apoya en gran medida en el uso de andamios (*scaffolds* en inglés), ya que estos recrean, el ambiente apropiado para la regeneración de tejidos: en algunos casos especiales, hasta órganos. Estos andamios van a actuar como soporte para las células, que al encontrarse en un ambiente adecuado podrán formar el tejido.

La metodología consiste en sembrar células en el andamio, obtenidas de una biopsia del ser humano al que se le implantará el tejido nuevo (al andamio con las células se le llama constructo). Posteriormente, se hacen pasar nutrientes en un bioreactor y finalmente se añaden moléculas de señalización y se empiece a formar tejido. El objetivo de este constructo, es conseguir una estructura homogénea y continua con el tejido natural que se encuentra alrededor del implante.

La combinación de células, andamios y señales se denomina comúnmente como la triada de la ingeniería tisular (Ver figura 1.2) [6]. Estos constructos, se pueden cultivar *in vitro* para preparar un tejido que posteriormente se implantará en la zona dañada y producir así la regeneración *In vivo* del tejido.

6



Figura 1.2. La triada de la ingeniería tisular, formada por los andamios, las células y los factores de crecimiento.

La morfología, tamaño de poro, porcentaje de porosidad, orientación de las nanofibras (el caso del método de electrohilamiento) influyen en la adhesión, proliferación, y diferenciación de las células. El biopolímero que constituye al andamio, debe cumplir por lo menos que sea hidrofílico y que sea biodegradable.

Hoy en día existen muchos materiales biocompatibles que pueden ser utilizados para fabricar andamios, generalmente se usan los biopolímeros [7], ya que estos son degradados por el huésped en un período de tiempo adecuado. Estos polímeros biodegradables proporcionan un soporte a las células hasta que sean capaces de secretar su propia matriz extracelular (ECM).

En la Figura 1.3 se puede observar que las paredes del corazón se componen de tres capas que incluyen el epicardio, miocardio y endocardio. El epicardio es la capa inmediatamente exterior del miocardio, compuesta de células mesoteliales que recubren el tejido conectivo y tejido adiposo, imparte suavidad y textura lisa a la superficie. El endocardio es la capa interna de la pared del corazón, se compone de tejido conectivo laxo y endotelial, tiene una superficie lisa, reduciendo

así la fricción superficial de la sangre cuando ésta pasa a través del corazón y vasos sanguíneos [8].



Figura 1.3. Diagrama anatómico de la pared del corazón.

El miocardio es la capa intermedia, se compone de un tipo de músculo contráctil, controlando la contracción y relajación de las cavidades cardiacas. Los principales componentes celulares del miocardio son los cardiomiocitos y fibroblastos que están estrechamente empaquetados en direcciones longitudinal y transversal al musculo [9].

El miocardio humano tiene de dos a tres billones de cardiomiocitos, a pesar de que ocupan entre 70% y 75% del volumen del corazón, representan sólo del 25% y 30% de la población de células en términos numéricos. Tienen forma cilíndrica con diámetros en el intervalo de 20 µm y 30 µm, [9]. Otros componentes del miocardio son las células endoteliales y del musculo liso vasculares, que componen a los vasos sanguíneos que constantemente suministran oxígeno y nutrientes a las células del miocardio [9].

La matriz extracelular (ECM), es una estructura tridimensional que sirve como soporte para todas las células contenidas en el miocardio, sus funciones son las causantes de la mayoría de los procesos cardiacos. Al actuar como base de anclaje para los componentes celulares del miocardio y vehículo de comunicación entre éstos, la ECM integra en cada excitación el aporte de cada célula individual, permitiendo la contracción coordinada y conjunta del tejido a nivel macroscópico.

La ECM se compone principalmente de miofibrillas de colágeno tipo I y tipo III, que son sintetizados por los fibroblastos cardíacos, específicamente, el colágeno de tipo III proporciona la elasticidad de la matriz mientras el colágeno de tipo I, contribuye a la rigidez general del tejido del miocardio [10].

Una peculiaridad del miocardio se puede observar en la Figura 1.4; donde se muestra que este tiene una estructura única en el que múltiples capas hechas de matriz extracelular y células altamente orientadas se embalan juntas [11]. Esta estructura le da al miocardio sus propiedades físicas y eléctricas únicas.

Bhana, *et al.*, reportaron que a una mayor alineación de las nanofibras de polietilenglicol (PEG), los cardiomiocitos mostraban una fuerza de contracción más grande que en las nanofibras obtenidas al azar. Estos resultados se basan en cultivo bidimensional (2-D). Sin embargo, el logro de la alineación de los cardiomiocitos en un andamio 3-D es todavía un reto[11].



Figura 1.4. Estructura orientada de los cardiomiocitos en el miocardio. La alineación es uniforme en cada capa con una transición gradual de la alineación entre las capas desde el endocardio al epicardio [11].

1.2 Aspectos importantes en el diseño de andamios

1.2.1 Biodegrabilidad

La biodegradabilidad es esencial ya que los andamios necesitan ser absorbidos por los tejidos que los rodean sin necesidad de ser retirados quirúrgicamente. La cinética de degradación debe coincidir, lo mejor posible, con la cinética de formación de tejido [12]. Esto significa que mientras hay células fabricando su propia matriz alrededor de ellas mismas, el andamio puede proveer integridad estructural dentro del cuerpo, y finalmente se eliminará dejando el tejido recientemente formado, que se encargará de soportar la carga mecánica.

1.2.2 Porosidad y tamaño de poro

Los andamios deben tener una alta porosidad para permitir la difusión de nutrientes a las células dentro del constructo y para la correcta invasión celular, también deben tener una interconectividad suficiente para eliminar los productos de desecho fuera del andamiaje, al igual que los productos derivados de la degradación del material, siendo eliminados del cuerpo sin interferencia con otros órganos o tejidos. Este tema de eliminación de residuos es muy importante para la correcta integración del biomaterial [13, 14].

Los poros de los andamios deben ser lo suficientemente grandes como para que las células puedan migrar dentro de la estructura [6]. El diámetro de las células del miocardio mide aproximadamente entre 20 µm y 30 µm. Sin embargo el tamaño adecuado de las oquedades de los andamios para el crecimiento y proliferación celular es un tema aún muy debatido; algunos estudios indican que el tamaño de poro medio de un andamio debe ser al menos 50 µm para permitir el transporte de nutrientes durante el cultivo *in vitro* así como la vascularización tras el implante[9]. Existen otros estudios donde indican que el tamaño adecuado de las oquedades debe estar en intervalos entre 100 µm y 500 µm. La mayoría ha concluido que un tamaño de poro pequeño es difícil para el crecimiento interno y la migración de las células [15].

1.2.3 Superficie

En la interacción de las células y la superficie del andamio existen dos parámetros importantes que caracterizan la superficie, estas son la hidrofilicidad y la carga eléctrica.

Hidrofilicidad.

La hidrofilicidad de la superficie es bien conocida como un factor clave que afecta en gran medida al comportamiento de las células en un biomaterial. Esta propiedad se puede evaluar midiendo el ángulo de contacto de una gotita de agua sobre una superficie. Cuanto menor sea el ángulo de contacto, más hidrofílica será la superficie. Estudios previos muestran que superficies con moderada hidrofilicidad mejoran la adhesión celular. Por ejemplo, en el caso de los fibroblastos, estas células poseen una mayor adhesión sobre una estructura nanofibrosa cuando los ángulos de contacto fueron entre 60 ° y 80 ° [16].

Carga eléctrica

Además de la hidrofilicidad superficial, otro punto importante para la adhesión celular es la carga positiva de la superficie. Los polímeros que poseen cargas positivas en la superficie a pH fisiológico, aproximadamente 7.4, aumenta la adhesión de las células y el crecimiento en presencia de proteínas [17]. Las células prefieren superficies hidrofílicas y cargadas positivamente que unas superficies neutras o negativas [18].

1.2.4 Propiedades mecánicas

Con respecto a las propiedades mecánicas del andamio, este debe ser capaz de soportar el movimiento de estiramiento y relajación continua del miocardio que se produce en cada latido del corazón. Es deseable que los andamios para aplicaciones cardiacas estén lo más cerca posible a las propiedades mecánicas del miocardio.

La elasticidad de la superficie utilizada para el cultivo de cardiomiocitos juega un papel crítico en el desarrollo de la fuerza contráctil. Las matrices que imitan del microambiente del miocardio humano con un módulo elástico similar al principio de la diástole de 10 kPa a 20 kPa, son óptimas para los cardiomiocitos para producir la fuerza transmisible, promover una estructura miofibrilar estriada, y mantener contracciones rítmicas a largo plazo [19, 20].

Parag *et al*, sugiere que la comprensión de las propiedades mecánicas del miocardio nativo puede ayudar a establecer los parámetros adecuados para el desarrollo de biomateriales para ser utilizados en el corazón. Hacia este objetivo, la resistencia ultima a la tracción del miocardio humano (σ), bajo carga estática es de aproximadamente 115 kPa en la dirección paralela a la contracción y unos 38 kPa en la dirección transversal. El máximo porcentaje de elongación (ϵ) del tejido miocárdico es 66% en la dirección paralela y 86% en la dirección transversal, en su conjunto, estos son criterios de diseño importantes en el desarrollo de biomateriales para la ingeniería tisular cardiaca [20].

1.3 Técnica de electrohilamiento

1.3.1 Generalidades

La técnica de electrohilamiento es utilizada para la formación de nanofibras poliméricas, donde se hace uso de fuerzas eléctricas para producir fibras con diámetros con intervalo de dos nanómetros hasta varios micrómetros a partir de disoluciones poliméricas. Estas nanofibras también ofrecen muchas ventajas como, un cociente entre la superficie y el volumen muy alto, porosidad controlable, posibilidad de controlar la composición química de las nanofibras, así como su ordenamiento [21].

1.3.2 Descripción del proceso

La técnica consiste en arrojar chorros finos de disoluciones de polímero a través de altos campos eléctricos, aplicando fuerzas eléctricas que superen las fuerzas de la tensión superficial de la disolución del polímero cargado eléctricamente, donde el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, elongándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas y experimentando inestabilidad [22].

El montaje típico de un sistema para electrohilamiento se muestra en la Figura 1.5 y consta de un capilar, una fuente de alto voltaje, un par de electrodos, donde uno debe conectarse a la salida de la disolución y el otro directamente al plato colector (lámina de metal conductor, cilindro giratorio, etc) donde se depositarán las nanofibras, posterior a la evaporación del disolvente [22].



Figura 1.5. Ensamble del sistema de electrohilamiento.

Cuando la fuerza del campo eléctrico inducido supera las fuerzas de la tensión superficial de la disolución, la gota colgante en el extremo de la punta del capilar se deforma y toma una forma cónica, conocida como el cono de Taylor. Este fenómeno fue descubierto en 1969 por Sir Geoffrey Taylor y muestra que un fluido conductor puede existir en equilibrio en forma de un cono bajo la acción de un campo eléctrico, donde un chorro puede formarse en el vértice del cono, si se proporciona un continuo suministro de líquido. Debido a la fuerza eléctrica, el chorro se acelera, y durante la aceleración, sin embargo, la resistencia viscosa impide que el chorro se mueva hacia adelante, dando como resultado su desaceleración. En este momento, cualquier pequeña perturbación impedirá su movimiento recto, y la inestabilidad se produce. Las tres fases geométricas diferentes del fluido del polímero durante el proceso de electrohilamiento se ilustran en la Figura 1.6. A medida que el chorro se desplaza a través del aire, el disolvente se evapora, con el consiguiente secado y estiramiento del chorro de polímero hasta la deposición de una malla de fibra de polímero en el colector [23].

Bomba de invección



Figura 1.6. Fases geométricas del fluido de polímero en el proceso de electrohilamiento: cono de Taylor, de chorro continuo, región de inestabilidad.

1.3.3 Tipos de colectores

La orientación de las nanofibras es una de las características importantes de un andamio para producir un tejido ordenado, debido a que la orientación de las nanofibras influye en gran medida en el crecimiento celular y las funciones relacionadas con las células tales como nervios, células del músculo liso, células cardiacas etc. [24].

La inestabilidad del chorro en el electrohilamiento da como resultado una orientación aleatoria de las fibras depositadas sobre el colector. Para muchas aplicaciones, puede ser necesario el control de la orientación espacial. La alineación de las nanofibras electrohiladas se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de un cilindro giratorio o un par de electrodos divididos, o mediante la introducción de un campo eléctrico externo (Ver figura 1.7) [23].



Figura 1.7. Ilustración esquemática de diversas configuraciones de electrohilamiento para el control de la alineación de las nanofibras: a) pares de electrodos como colector b) electrohilamiento asistida por el campo magnético y c) la rotación de un cilindro como colector.

En el caso del cilindro giratorio, el grado de alineación de las nanofibras está en función del tipo del colector y de la rapidez de rotación. El mecanismo detrás de la técnica no ha sido plenamente explicado en detalle, sin embargo, algunas conjeturas intuitivas en la literatura se dan de la siguiente manera: cuando la velocidad lineal de la superficie del cilindro giratorio coincide con la de la velocidad del chorro, las nanofibras se enrollan en la superficie del cilindro, lo que resulta en una cierta alineación, a esta velocidad se le denomina "velocidad de alineación". Si la velocidad de la superficie del cilindro es más lenta que la velocidad de la alineación de la siguiente con la de la velocidad de la superficie del cilindro es más lenta que la velocidad de la alineación de la siguiente con la de la superficie del cilindro es más lenta que la velocidad de la alineación de la superficie del cilindro es más lenta que la velocidad de la alineación las fibras se recogerán de manera al azar.

1.3.4 Parámetros de la técnica de electrohilamiento

El proceso de electrohilamiento depende de una serie de parámetros, que pueden ser clasificados de una manera general en[22]:

- 1. Parámetros de la Solución.
- 2. Parámetros del Proceso.
- 3. Parámetros Ambientales.

Los parámetros que se consideran de la disolución son la viscosidad, la conductividad eléctrica, la masa molecular y la tensión superficial. Estos parámetros de disolución son dependientes del tipo de polímero, así como de la concentración de polímero y del disolvente a utilizar. Los parámetros a considerar en el proceso son el campo eléctrico aplicado, la distancia del capilar al colector y la rapidez del flujo de alimentación. En la tabla 1.1 se muestra un resumen del efecto de la modificación de los parámetros en el electrohilamiento. Cada uno de estos parámetros afecta significativamente la morfología de las fibras obtenidas por electrohilamiento. Mediante una manipulación apropiada de estos parámetros [23].

En adición a estas variables, los parámetros del medio ambiente son principalmente la humedad y la temperatura, que también juega un papel importante en la morfología y diámetros de las nanofibras [22].

PARÁMETRO		CARACTERÍSTICA QUE APORTA		
Concentración del polímero	+ -	Dificulta el paso de la disolución a través del capilar. Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector.		
Tensión superficial	+	Aparición de glóbulos (beads en inglés) en las fibras.		

Tabla 1.1 Parámetros de electrohilamiento con sus respectivas características[22].

	-	Obtención de fibras lisas, para disminuir la tensión superficial se pueden adicionar disolventes con baja tensión superficial.		
Conductividad de la Solución	+ -	Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento d la disolución, fibras más delgadas. Menor transporte de cargas, menor estiramiento d la disolución, fibras más gruesas.		
Voltaje	++	Fibras más delgadas, distorsión del chorro, aparición de glóbulos. Poco impulso del chorro hacia al plato colector.		
Flujo de salida	+ -	Fibras más gruesas, glóbulos con mayores tamaños. Mayor tiempo para evaporación del disolvente, fibras sin defectos.		
Distancia de la aguja al colector	+ ++ -	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, obtención de fibras delgadas. Aparición de glóbulos en las fibras al trabajar con muy altas o muy bajas distancias. Poco tiempo para la evaporación del disolvente por tanto, las fibras llegan húmedas al plato colector.		
Humedad relativa	+	Aparición de poros en las nanofibras.		

1.3.5 Concentración del polímero en la disolución

Entre los parámetros de disolución, la concentración de polímero es una de las variables más críticas. Para que pueda ocurrir la formación de nanofibras por electrohilamiento, dependiendo del polímero se requiere una determinada concentración en la disolución. Diversos Investigadores aseguran que a bajas concentraciones, se ha observado que se obtiene un conjunto de glóbulos (*beads* en inglés) y, al ir aumentando el valor de la concentración, la forma de estos glóbulos cambia de esférico ha alargado hasta llegar a formarse una fibra completamente uniforme con diámetros cada vez mayores. Sin embargo, a muy altas concentraciones, aumenta significativamente la viscosidad, por lo tanto las

nanofibras depositadas no son continuas debido a la incapacidad que se presenta para mantener el flujo de la disolución en la punta del capilar impidiendo la formación de nanofibras largas [22, 23]. Binulal *et al* [25], reportaron valores de viscosidad, en las cuales se forman nanofibras continuas sin presencia de alóbulos. Estos deben estar entre 30 cP y 40 cP.

1.3.6 Efecto del disolvente

El disolvente utilizado para preparar las soluciones poliméricas ejerce una influencia significativa en la capacidad del proceso de la formación de las nanofibras. El primer paso preliminar en el proceso, es la disolución del polímero en un buen disolvente. Es recomendable que los disolventes empleados tengan propiedades como buena volatilidad, presión de vapor y punto de ebullición promedio. Por lo tanto, para lograr un proceso de electrohilamiento exitoso la selección acertada del disolvente es indispensable [22].

La tensión superficial de la disolución polimérica con otra superficie depende de la composición del disolvente. Entre menor sea la tensión superficial de la disolución, las nanofibras presentaran ausencia de glóbulos. Cada tipo de disolvente contribuye a diferentes valores de tensión superficial. Una tensión superficial muy elevada inhibe el proceso de electrohilamiento ya que se presenta mucha inestabilidad en la nanofibra expulsada y por lo consiguiente formación de gotas en la punta del capilar [22].

Para obtener nanofibras libres de imperfecciones, se debe encontrar la mejor correlación entre la tensión superficial del disolvente y la intensidad correcta del campo eléctrico.

La conductividad de la disolución está determinada por el tipo de disolvente, el polímero empleado y la disponibilidad de sales que se pueden ionizar. Se ha encontrado que al aumentarse la conductividad eléctrica de la disolución, se presenta una disminución significativa en el diámetro de la nanofibras mientras

que a bajas conductividades de la disolución, resulta una elongación deficiente del hilo expulsado, formando fibras no uniformes que incluso pueden llegar a tener glóbulos [23]. En la tabla 1.2 se muestra valores de las diversas propiedades de algunos de los disolventes más utilizados.

Disolventes	Tensión	Constante	Punto de	Densidad
	Superficial (mN/m)	Dieléctrica	ebullición (°C)	(g/ml)
Cloroformo	26.5	4.8	61.6	1.498
Hexafluoro Isopropanol	16.1	16.7	58.2	1.596
Agua	72.8	80	100	1.000
Metanol	22.4	33	64.6	.791
Ácido acético	26.9	6.2	118.1	1.049
Dicloro Metano	27.2	9.1	40	1.326
Acetato de Etilo	23.9	6	77	.894
Dimetilformamida	37.1	38.3	153	.994
Trifluoro Etanol	21.1	27	78	1.393

-11

Tabla 1.2 Propiedades de algunos disolventes utilizados en electrohilamiento [26].
1.4 Materiales en ingeniería tisular para regeneración de miocardio

Hasta el momento, diferentes tipos de biomateriales e hidrogeles poliméricos naturales y sintéticos se han usado para generar andamios fisiológicamente relevantes para aplicaciones de ingeniería tisular cardiaca.

Entre los principales componentes que se han sugerido como análogos de la ECM para su uso en la ingeniería tisular cardiaca, se incluyen el colágeno [27, 28], fibrina [29, 30], gelatina [31, 32] y alginato [33, 34]. Estas incluso poseen estructuras idénticas o similares a las moléculas en los organismos biológicos, reduciendo así la posibilidad de una respuesta inmune cuando se implantan *in vivo* [11]. Estos intentos por regenerar el músculo cardiaco han sido exitosos en términos de adhesión, migración y proliferación celular. Sin embargo, dado que éstas son injertadas principalmente como geles, proporcionan un apoyo mecánico limitado. Por otro lado, la inmunogenicidad y las dificultades para la obtención de estos polímeros naturales de diversas fuentes animal en grandes cantidades limitan el uso de biomateriales naturales [8].

Dado que la mayoría de hidrogeles se degradan relativamente rápido y proporcionan pobres propiedades mecánicas, el uso de otros tipos de polímeros sintéticos tales como el poli(ácido glicólico) (PGA), poli(caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico) (PLA) poli(uretano) (PU) y poli(glicerol sebacato) (PGS) con más lentas cinética de degradación, han sido investigados para fabricar andamios para aplicaciones cardiacas [35-38]. Sin embargo, la exposición de estos polímeros a la tensión cíclica a largo plazo, por lo general ha dado lugar a la deformación plástica y fallo estructural de los constructos [10].

Las propiedades físicas y químicas de los polímeros sintéticos, tales como el módulo elástico, hidrofilicidad y rapidez de degradación son fáciles de adaptar para cumplir los requisitos de la ingeniería tisular. Por lo tanto, se considera que son buenos candidatos para la ingeniería tisular cardiaca. Sin embargo, la citotoxicidad es una preocupación importante para los polímeros sintéticos. Hasta ahora, sólo el PEG, el PLA y el PLGA han sido aprobados por la FDA (*Food and*

22

Drug Administration) para aplicaciones clínicas en ingeniería tisular cardiaca. Un método alternativo es usar hidrogeles híbridos que combinen las ventajas de ambos polímeros naturales y sintéticos [11].

1.4.1 gelatina

La gelatina es un polipéptido producido por la hidrólisis parcial de colágeno derivado de la piel de animales, tejido conjuntivo y huesos [39]. La gelatina contiene un gran número de aminoácidos, tales como: la alanina, glicina, prolina, 4-hidroxiprolina, etc. En la Figura 1.8 se puede apreciar una representación típica de un fragmento de la gelatina.



Figura 1.8. Representación típica de un fragmento de la gelatina.

Dependiendo del tratamiento al que se someten, dos tipos de gelatina se pueden obtener, y se conocen comercialmente como gelatina tipo A (tratamiento acido, punto isoeléctrico a pH ~ 8-9) y gelatina tipo B (tratamiento alcalino, punto isoeléctrico a pH ~ 4-5) [40]. La composición de aminoácidos afecta a las propiedades físicas y químicas de la gelatina. Un análisis de aminoácidos realizado por Mohd *et al*, mostró que la estructura molecular era diferente para las

gelatinas tipo A y tipo B de acuerdo con la composición de aminoácidos. La diferencia era especialmente por la glicina, prolina y arginina [41]. En la tabla 1.3 se muestra la composición de aminoácidos por cada 1000 residuos de aminoácidos.

Aminoácido	Gelatina tipo B (residuos totales por 1000 residuos de aminoácidos)	Gelatina tipo A (residuos totales por 1000 residuos de aminoácidos)
Hidrófobico no polar		
Alanina	33	80
Valina	10	26
Leucina	12	29
Isoleucina	7	12
Fenilamina	10	27
Metionina	4	10
Prolina	63	151
Total	139	335
Polar sin carga		
Glicina	108	239
Serina	15	35
Treonina	10	26
Tirosina	2	7
Total	135	307
Polar ácida		
Ácido aspártico	17	41
Acido glutámico	34	83
Total	51	124
Polar básico		
Lisina	11	27
Arginina	47	111
Total	58	138

Tabla 1.3 Composición de aminoácidos por cada 1000 residuos de aminoácidos

1.4.2 Poli(caprolactona)

La policaprolactona (PCL) es un poliéster semicristalino, alifático lineal, que tiene una temperatura de fusión (Tm) alrededor de 60°C y una temperatura de transición vítrea (Tg) alrededor de -60°C, es biocompatible, presenta alta resistencia a la tracción y se ha utilizado para la fabricación de andamios para tejidos. Su bajo punto de fusión permite el procesamiento por una variedad de técnicas. Sin embargo, la superficie de la PCL es hidrófobica, lo cual impide la adsorción de proteínas causando una reducción en la capacidad de adhesión, migración, y proliferación celular. [15]. En la figura 1.9 se puede observar la unidad repetitiva después de la apertura de anillo de la ɛ-caprolactona.



Figura 1.9. Unidad repetitiva de la poli(caprolactona).

Una de las cualidades más atractivas de la PCL para su uso en aplicaciones biomédicas es su lenta rapidez de degradación. En un estudio utilizando un ensayo *in vitro* de degradación, esta pierde alrededor del 50% de su resistencia en 8 semanas. La PCL se degrada por hidrólisis y los productos hidrolizados son reabsorbidas por el cuerpo con una reacción mínima de los tejidos [42].

ANTECEDENTES

Estudios recientes confirman que la fabricación de andamios compuestos o hibridos, que combinen las características de polímeros sintéticos con polímeros naturales mediante la técnica de electrohilamiento, pueden ser adecuados para la ingeniería tisular cardiaca. Esto se debe a que el polímero sintético incrementa la resistencia mecánica mientras que el natural mejora el carácter hidrofílico del biomaterial; este tipo de andamios ha demostrado ser una prometedora alternativa para este tipo de aplicaciones.

La tabla 1.4 se enlistan algunos trabajos donde se combinan los dos tipos de materiales, así como otros donde se regenera tejido miocárdico. La mayoría coincide en que el método de electrohilamiento es una técnica prometedora en el campo de la ingeniería tisular, ya que esta es sumamente versátil porque permite manipular la arquitectura y morfología de los andamios, los cuales han sido probados tanto en *in vitro* como *in vivo*, para así demostrar su eficacia en la regeneración del tejido deseado.

Material	Referencias
Poli (glicerol-sebacato)/gelatina	lfkovits et al [43]; Kharaziha et al [10]
Poli(L–láctico- <i>co</i> –ε-caprolactone)/colágeno	Mukherjee et al [19]; Park et al [44]
Poli (láctico-co-glicólico)/gelatina	Prabhakaran <i>et al</i> [45]
Poli (E-Caprolactona)/gelatina	Kai <i>et al</i> [46]
Fibrinogeno/gelatina	Balasubramanian <i>et al</i> [47]
Poli (E-Caprolactona)	Nam <i>et al</i> [48]
Poliuretano (PU)	Rockwood et al [49]

Tabla 1.4 Materiales experimentales sugeridos para la elaboración de andamios para ingeniería tisular cardiaca Park [44] *et al*, desarrollaron un andamio elastomerico, elaborado a base de PLGA y colágeno tipo I, es estas sembraron células cardiacas neonatales. El constructo mejoro la expresión de marcadores cardiacos así como su función contráctil comparado con los ensayos de control del colágeno y PLGA por si solos. Los autores atribuyen esta mejora de la función contráctil a la propiedad elastomerica del andamio.

Nam [48] *et al*, combino las técnicas de electrohilamiento y salt leaching para elaborar andamios con poros de diámetro entre 100 µm y 200 µm, con el fin de mejorar la migración celular. Estos autores demostraron que después de 3 semanas del cultivo, las células se infiltraron hasta 4 mm dentro del andamio con una densidad celular del 70% dentro de las capas.

Rockwood [49] *et al*, demostraron que las fibras alineadas de PU por electrohilamiento influyeron en la organización y expresión fenotípica de las células cardiacas. Específicamente, las células cardiacas estaban conectadas eléctricamente y tenían un fenotipo ventricular más maduro en comparación a las mismas células cultivadas en las fibras ordenadas al azar.

En este trabajo se utilizó la poli(caprolactona) y la gelatina en la manufactura de los andamios. En este sentido, conviene señalar que aunque ambos polímeros ya han sido utilizados en la fabricación de andamios, los reportes en donde se utilizan para la regeneración de miocardio así como su estructura alineada son escasos.

Se optó por utilizar la gelatina, ya que ésta tiene varias ventajas sobre otras proteínas naturales, entre ellas su biodegradabilidad y la disponibilidad comercial a bajo costo [42]. Es completamente bioabsorbible, se degrada por digestión enzimática, es biocompatible y puede mantener la viabilidad de las células cardíacas. A pesar de estas ventajas, los estudios han encontrado que los andamios compuestos de gelatina, por sí sola no son factibles para su uso como andamios para regeneración de miocardio, debido a su baja resistencia a la tracción, deformación y degradación rápidas [10]. La gelatina puede ser electrohilada en combinación con otros polímeros en disolución con una variedad de diámetros. Las células se adhieren y proliferan mejor en nanofibras sintéticas

cuando se mezclan con gelatina. Se ha demostrado que estos aumentos en la unión celular y la proliferación están en función de la composición de gelatina en las mezclas de las nanofibras [50].

Entre los disolventes que han sido reportados en la literatura para la fabricación de andamios de poli(caprolactona)/gelatina por electrohilamiento se encuentran una mezcla de disolventes acetato de etilo/ácido acético/agua [51] 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) [52] 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) [53], estos son buenos disolventes para los polipéptidos, sin embargo teniendo en cuenta que HFIP es un reactivo químico costoso [42], TFE fue seleccionado como disolvente para este estudio, ya que además su alto punto de ebullición alrededor de 70° C [26] ofrece la ventaja adicional de menos posibilidad de obstrucción del capilar durante el proceso de electrohilamiento.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares, como el infarto al miocardio y los accidente cerebrovasculares, cobran 17.5 millones de vidas al año en el mundo [54]. Solo en Estados Unidos surgen anualmente cerca de 565,000 nuevos casos y 300,000 casos recurrentes de infarto al miocardio, y las complicaciones después de este puede conducir a la insuficiencia cardíaca progresiva y aneurisma ventricular [4].

Durante 2012, en México se registró la muerte de 283 mil 732 mexicanos por enfermedades cardiovasculares, de las cuales 74 mil 57 fueron por cardiopatías isquémicas [55]. El miocardio carece de la habilidad de regenerarse significativamente por sí solo después de la necrosis [36], por lo que surge la necesidad de la implementación de técnicas de ingeniería tisular que sustituyan el tejido muerto por un tejido funcional.

Hipótesis

La incorporación de la gelatina tipo A en la PCL, permitirá obtener un andamio con características morfológicas, mecánicas e hidrofílicas adecuadas para alguna futura aplicación en regeneración del miocardio.

Objetivos

General

Obtener un andamio compuesto de policaprolactona (PCL) y gelatina tipo A con morfología y composición adecuada para una futura aplicación en regeneración de miocardio.

Específicos

- Obtener andamios con diferentes concentraciones de PCL y gelatina tipo A, mediante la técnica de electrohilamiento sobre un substrato que permita una adecuada alineación de las nanofibras.
- Caracterizar la morfología (diámetro medio de las nanofibras) del andamio.
- Evaluar las propiedades mecánicas (tensión) de los andamios.
- Evaluar las propiedades físico-químicas de los andamios (FTIR, temperatura de fusión (Tm), temperatura de transición vítrea (Tg), hidrofilicidad y degrabilidad *in vitro*.

2. CAPÍTULO 2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiales

Los materiales poliméricos empleados durante el desarrollo experimental del presente trabajo fueron gelatina tipo A de piel de porcino marca Aldrich, y, poli (caprolactona) (PCL) masa molecular de Mw=66000, marca Perstorp CAPA 6800. Los disolventes utilizados fueron ácido acético (AAc) con 99.9% de pureza, marca Baker, trifluoroetanol (TFE) con 99.9% de pureza marca Aldrich.

2.2 Caracterización de los polímeros

Para conocer los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los andamios con referencia a los materiales puros, se realizó espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) tanto a la poli(caprolactona) como a la gelatina tipo A.

2.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para conocer las temperaturas de fusión (Tm), de cristalización (Tc), y el porcentaje de cristalinidad de la PCL utilizado, se llevó a cabo con un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Perkin Elmer, modelo Diamond (Ver figura 2.1). Las muestras pesadas entre 3 mg y 4 mg fueron colocadas en charolas de aluminio para su análisis, con una rampa de calentamiento de 10° C/min de -20° C hasta 90° C en atmosfera de nitrógeno. A partir de los picos obtenidos se calculó la entalpia de fusión Δ H_f (Tm) y con estos datos se determinó el porcentaje de cristalinidad de la PCL, siguiendo la ecuación reportada por otros autores [56].

$$X = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{f1}} x \ 100 \qquad (E \qquad \text{ón 1})$$

Donde:

- ΔH_f: entalpia de fusión del polímero
- ΔH_{f1} :entalpia de fusión del polímero 100% cristalino

ΔH_{f1} (PCL)=139.5 J/g [56].



Figura 2.1. Calorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer

Para la gelatina pura se utilizó la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para conocer la temperatura de desnaturalización (TD). Las muestras, entre 12 mg y 15 mg, fueron calentadas con una rampa de calentamiento desde 10°C/min de -0°C hasta 180°C en atmosfera de nitrógeno.



2.2.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)

La caracterización de los polímeros puros utilizados se llevó a cabo mediante un análisis por espectroscopia infrarroja (FTIR) en un equipo marca Nicolet 8700. Este ensayo se llevó a cabo mediante la técnica de Reflectancia total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflection), en modo de transmitancia, con un espejo de Zinc-Selenio en un intervalo de número de onda entre 4000 cm⁻¹ y 500 cm⁻¹.



Figura 2.2. Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) Nicolet 8700.

2.3. Preparación de los andamios mediante la técnica de electrohilamiento (electrospining).

2.3.1 Optimización del proceso de electrohilamiento

Para determinar las condiciones bajo las cuales se podrían llegar a obtener andamios formados por nanofibras mediante la técnica de electrohilamiento, se llevaron a cabo varios ensayos a diferentes concentraciones de PCL y gelatina tipo A. La disolución de poli(caprolactona) se obtuvo disolviendo este polímero en TFE a una concentración del 10 % m/m. Por su parte, las disoluciones de gelatina fueron preparadas a concentraciones de 5.0 %, 7.5 % 10.0 % y 12.5 % m/m en TFE. A partir de éstas se realizaron las mezclas correspondientes descritas en la tabla 2.1, a éstas se les adicionó un 0.2% de AAc, para mejorar la compatibilidad de los polímeros en los andamios.

Las características morfológicas de los andamios formados bajo las condiciones detalladas en el párrafo anterior, fueron monitoreadas a través de microscopia óptica utilizando un microscopio óptico Nikon E400 con una cámara integrada para observar las estructuras generadas así como capturar las imágenes.

PCL-gelatina	Relación en masa	Volumen de	Condiciones de la
	(g)	disolventes	disolución
50:50	0.5/0.5	10 ml TFE/ 20 µL AAc	12 horas, agitado a 500 rpm, a temperatura ambiente
65:35	0.65/0.35	10 ml TFE/ 20 µL AAc	12 horas, agitado a 500 rpm, a temperatura ambiente

Tabla 2.1 Condiciones de disoluciones utilizadas

Para el proceso de electrohilamiento se usó el equipo modelo NaBond (Ver figura 2.3 A), con una jeringa de 10 ml conectada a un tubo de polietileno de 6 mm de diámetro exterior y un cople de acero inoxidable para unir la aguja capilar con el tubo. Las mezclas obtenidas descritas en la tabla 2.1 fueron electrohiladas en un plato colector envuelto en papel aluminio para obtener nanofibras al azar.

Los parámetros de procesamiento considerados como óptimos (es decir nanofibras electrohiladas sin presencia de glóbulos y otras imperfecciones) se enlistan en la tabla 2.2

Tabla 2.2 Parámetros	considerados	s como	óptimos	para l	os andamios	PCL-
	gelatina en	TFE y	0.2% AA	C		

Potencial eléctrico (kV)	Flujo de alimentación (ml/h)	Distancia de la aguja al colector (cm)	Diámetro interno de la aguja (mm)	Temperatura (°C)	Humedad (%)
11	.5	10	. 5	20-25	40-60

Una vez comprobado que la formación de las nanofibras se llevaban a cabo sin problemas aún en períodos largos de prueba, se procedió a la alineación de las nanofibras, utilizándose para esto un cilindro giratorio de 7.5 cm de diámetro (Ver figura 2.3 B). En este caso se probaron rapideces de giro de 1000 rpm, 1500 rpm y 2000 rpm hasta obtener nanofibras con la mayor alineación posible.



Figura 2.3. Equipo de electrohilamiento NaBond (A) cilindro giratorio (B).

2.4 Caracterización fisicoquímica y mecánica de los andamios obtenidos. 2.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los andamios fue analizada mediante un microscopio electrónico de barrido Jeol modelo LV6360 (Ver figura 2.4). La superficie de los andamios fue cubierta con oro para mejorar el contraste. La distribución de tamaños de las nanofibras se determinó a partir de 100 mediciones para cada micrografía, utilizando un software comercial denominado ImageJ.



Figura 2.4. Microscopio electrónico de barrido Jeol modelo LV6360.

2.4.2 Espectroscopia de Infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)

Para confirmar la presencia de ambos polímeros en los andamios, así como el monitoreo de los grupos que desaparecen tras la degradación se realizó la caracterización química mediante un espectrofotómetro Nicolet 8700. Este ensayo se realizó como se señala en el punto 2.2.2

2.4.3 Prueba de pérdida de masa

Diez muestras para cada composición de los andamios obtenidos fueron puestos en envases de polietileno con 10 ml de solución de fosfatos (PBS; pH 7.4) e incubados *in vitro* a 37 °C durante 4, 8, 12 y 17 días. La disolución fue cambiada cada 7 días para mantener el pH, las muestras subsecuentemente fueron enjuagadas con agua destilada y secadas en un horno al vacío a temperatura ambiente por 48 horas. La morfología obtenida después de los periodos escogidos fueron analizados mediante microscopia electrónica de barrido SEM, de igual manera se calculó la pérdida de masa con le ecuación 2.

$$P\acute{e}r \quad d \quad m \quad (\%) = \frac{(M_v - M_t) x \, 100}{M_o} \quad (E \qquad \acute{o}n \, 2)$$

Donde:

- M_o = Masa inicial del andamio antes de someterse al proceso de degradación.
- *M_t* = Masa residual del andamio después del proceso de degradación.



Figura 2.5. Metodología para las pruebas de pérdida de masa; A) envases de polietileno, B) Incubadora y C) Horno con vacío.

2.4.4 Calorimetría diferencial de barrido

Para determinar la compatibilidad de los andamios se llevó a cabo un análisis por calorimetría diferencial de barrido correspondiente a las fibras de gelatina, PCL, PCL-gelatina 50:50 con AAc y sin AAc; Esta prueba se realizó de manera similar al punto 2.2.1

2.4.5 Pruebas de tensión

La determinación de las propiedades mecánicas a tensión de los andamios, se llevó a cabo tomando como referencia la norma ASTMD882-10 para membranas electrohiladas de espesores menores a 1 mm. Los andamios fueron pegados con cinta doble cara en un marco hecho de cartón de 40 mm x 40 mm (Ver Figura 2.7A), y posteriormente fueron ensayados en una máquina de pruebas universales Shimadzu Autograph AGS-X (Ver figura 2.7B) a una rapidez de cabezal de 5 mm/min. El esfuerzo máximo y el modulo elástico fue calculado con base a la curva esfuerzo-deformación generada, y se utilizaron diez muestras para cada andamio, donde la fuerza fue dirigida en dirección paralela a las fibras. Para simular el ambiente acuoso fisiológico del cuerpo humano, se realizó la prueba en condiciones húmedas, para esto se remojaron los andamios PCL-gelatina 65:35 en (PBS; pH 7.4) durante media hora para su posterior ensayo.



Figura 2.6. Andamios (A), Maquina Shimadzu AGS-X (B).

2.4.6 Técnica de la gota sésil estática (ángulos de contacto)

Las propiedades hidrofilicas de los andamios se evaluaron por medición del ángulo de contacto del agua. Los andamios fueron medidos mediante el método de la gota sésil estática a temperatura ambiente en un medidor de ángulo de contacto Tantec's Cam Plus Micro (Ver Figura 2.8) que utiliza la técnica del semiangulo. Este dispositivo permite medir el ángulo de contacto de las gotas a partir de una vista lateral de las mismas. Para cada andamio diez mediciones fueron realizadas, donde una gota de 5 µL de agua destilada fue aplicada mediante una microjeringa a muestras de 2 cm x 3 cm sin desprender de la base de aluminio. Las fotografías tomadas fueron a 0, 5 s y 10 s a partir de que se deposita la gota.



Figura 2.7. Medidor de ángulo de contacto Tantec's Cam Plus Micro.

2.4.7 Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (SEM-EDS) para detección de disolvente remante.

Sobre las nanofibras se evaluó la cantidad de disolvente remanente con Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (SEM-EDS), identificando los elementos y el porcentaje de éstos presentes en los andamios PCL-gelatina 65:35 con AAc. Se realizaron 3 barridos y se promediaron los porcentajes de cada elemento.

Para la eliminación completa del disolvente remante se realizó un tratamiento con carbonato de sodio; lo anterior se hizo remojando los andamios a 5 M en agua destilada durante 3 horas, subsecuentemente se remojaron solo en agua destilada para eliminar el residuo del carbonato de sodio.

3. CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de los polímeros

3.1.1Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 3.1 muestra el espectro de FTIR de la poli (caprolactona) pura. Como se puede apreciar, el espectro muestra una banda intensa a 1727 cm⁻¹ correspondiente a la vibración en tensión del enlace carbonilo –C=O del grupo éster de la unidad repetitiva. Las bandas a 2944 y 2865 cm⁻¹ están relacionados con la vibración en tensión de enlaces –C-H. Las bandas a 1106 cm⁻¹ y 1240 cm⁻¹ corresponden a los enlaces C-O y C-O-C respectivamente. De igual manera, vale la pena resaltar que aunque la estructura de la poli (caprolactona) carece de enlaces hidroxilos, se logra apreciar una pequeña señal a 3435 cm⁻¹, que se le puede atribuir al estiramiento en tensión de grupos hidroxilos –OH, debida a la presencia de humedad en el material [46, 57].



Figura 3.1. Espectros FTIR de la PCL pura.

El espectro de la gelatina tipo A pura empleado en este trabajo se presenta en la Figura 3.2; como se puede apreciar, el espectro muestra las bandas a 1627 cm⁻¹ de la amida I, la cual es asociada principalmente con la vibración de tensión del grupo C=O; la banda 1520 cm⁻¹ de la amida II, debida al estiramiento C-N y a la deformación N-H; amida III (alrededor 1238 cm⁻¹); una banda ancha entre 3300 cm⁻¹ - 3400 cm⁻¹, correspondiente a la vibración del enlace N-H superpuesta con la vibración de los enlaces O-H [58]; también se observan las bandas a 2940 cm⁻¹ y 1444 cm⁻¹ correspondientes al estiramiento C-H, y a la vibración en flexión C-H respectivamente [59]. Para ambos polímeros las bandas reportadas son similares a la literatura, por lo que se puede establecer que son lo suficientemente puros para trabajar con ellos.



Figura 3.2. Espectro de FTIR de la gelatina pura.

Hermanto *et al* [59] reportaron, que a diferencia de la gelatina tipo A, en el espectro de la gelatina tipo B no aparece la banda entre 2800 cm⁻¹ y 3000 cm⁻¹ correspondiente al C-H alifático en tensión. La segunda diferencia es una menor intensidad en la banda 1520 cm⁻¹ correspondiente al enlace peptídico CO-NH a flexión. La tercera diferencia radica en una menor intensidad en la banda 1444 cm⁻¹ correspondiente al enlace C-H a flexión. Esto indica que la composición de aminoácidos alifáticos en gelatina tipo A porcina es mucho más grande que la gelatina tipo B bovina.

3.1.2 Calorimetría diferencial de Barrido (DSC)

El termograma que se muestra en la Figura 3.3 permite observar el comportamiento térmico de la PCL pura. La primera (color verde) corresponde al enfriamiento y la segunda al calentamiento, donde es claro que dos tipos diferentes de transiciones pueden ser detectadas, un pico endotérmico (asociado con el fenómeno de fusión, Tm) a 61°C y un pico exotérmico (pico de cristalización, Tc) a 29°C aproximadamente. Coincidiendo con el bajo punto de fusión entre 59 y 64°C reportado en la bibliografía [60]. En la tabla 3.1 se resumen los valores de cambio de entalpia de fusión (ΔH_f), cristalizacion (ΔH_c) y el porcentaje de cristalinidad (% Xc); verificándose de esta manera que el poliéster hidrófobo de la PCL es de carácter cristalino.



Figura 3.3. Termograma DSC de la PCL pura; verde-calentamiento y azulenfriamiento.

Tabla 3.1 Valores de entalpia de fusión, cristalización y porcentaje de cristalinidad, calculados de la figura 3.3 anterior.

Δ _f (J/	g)	Δ _c (J/g)	% Xc
67.84	and the second second	-55.6	48.8

Para la gelatina pura el termograma correspondiente se muestra en la Figura 3.4, donde se puede observar que la desnaturalización comienza a los 40°C, con un pico endotérmico en 84°C similar al valor reportado por Correia *et al* [44].

Mindru *et al* reporta que este pico endotérmico es debido a la vaporización de la humedad [61]. A pesar de que la gelatina es una sustancia obtenida a partir del colágeno desnaturalizado, o sea que su estructura de triple hélice desaparece debido al rompimiento de los puentes de hidrógeno, dando una configuración del

tipo de ovillo estadístico; en condiciones adecuadas, por ejemplo, en un proceso de gelificación, las cadenas son capaces de someterse a una transición de desorden a orden conformacional, recuperando parte de su estructura de triple hélice. A este proceso se le denomina renaturalización. Esto es muy común para la gelatina en estado sólido, en el cual siempre contiene humedad, normalmente entre 10-15% y puede ser considerado como un sólido o un gel de muy alta concentración. Por lo tanto, el pico endotérmico de la Figura 3.4 ha sido a menudo asociado con la temperatura de desnaturalización [5, 62, 63], y su correspondiente calor de fusión refleja el contenido de triple hélice y es llamado entalpia de desnaturalización, ΔH .

Los valores de *T* y ΔH obtenidos de la gelatina pura se muestran en la tabla 3.2.



Figura 3.4. Termograma DSC de la gelatina pura.

	gelatina pura
TD, °C	84
ΔHD, J/g	131.83

Tabla 3.2 Propiedades térmicas de la gelatina pura.

<u>3.2 Preparación de las disoluciones para la fabricación de andamios PCL-gelatina</u> por el método de electrohilamiento

3.2.1 Disoluciones de gelatina y PCL en Trifluoroetanol (TFE)

Durante la preparación de las disoluciones se observó una relativa facilidad para disolver la PCL en TFE, sin embargo para la gelatina se apreció que se necesitaba más tiempo en agitación para obtener una mejor solubilidad. Por lo que se estableció que la preparación de las disoluciones de la gelatina tenía que hacerse con 12 horas de anticipación previo al proceso de electrohilamiento.

La Figura 3.5 muestra las fotografías de las fibras obtenidas a partir de las disoluciones de gelatina al 5.0 % m/m, 7.5 % m/m, 10.0 % m/m y 12.5% m/m en TFE y de la PCL al 10 % m/m y 12.5 % m/m en TFE. En el caso de la gelatina se puede observar que aunque se logró obtener fibras con todas las concentraciones probadas, solo en la de 10.0 % m/m y 12.5 % m/m se obtuvieron fibras libres de glóbulos y otras imperfecciones. Sin embargo para la de 12.5% m/m, el proceso de electrohilamiento presentaba dificultad, ya que la punta del capilar se obstruía constantemente sin importar que tan alto era el potencial eléctrico, esto es debido posiblemente, a un valor de viscosidad alto de la disolución. Por lo que se decidió utilizar en el caso de la gelatina la concentración de 10% m/m para mezclarla con la PCL a diferentes relaciones en masa.

Para los andamios de PCL al 10% y 12% m/m se utilizó una rapidez de flujo de 0.7 ml/h y un potencial eléctrico de 20 kV, aunque no se muestran las fotografías

en este trabajo, a voltajes menores de 20 kV se inicia la formación de glóbulos en las nanofibras.



Figura 3.5. Fotografías a 40X de las estructuras formadas a partir de las disoluciones de gelatina en TFE al A) 5%, B) 7.5% C) 10%, D) 12.5% E) PCL 10% F) PCL 12 %.

<u>3.2.2 Disoluciones PCL-gelatina 65:35 y 50:50 en TFE y 0.2% de ácido acético</u> (AAc)

La mezcla con la PCL se hizo en relaciones de masa PCL-gelatina 65:35 y 50:50. Estas mezclas son inestables, al dejarlas en reposo durante ocho horas, se hace notable la precipitación de la gelatina (ver figura 3.6). Esto, posiblemente se debe a que los grupos hidrofílicos de la gelatina son, envueltos por sus grupos hidrofóbicos, después de ocurrido esto, los grupos hidrofóbicos de la gelatina interactúan con los grupos hidrofóbicos de la PCL, así las moléculas de la gelatina se compactan y pueden adherirse entre sí formando agregados de mayores tamaños hasta ser lo suficientemente grandes y pesados como para depositarse en el fondo del vial [64].



Figura 3.6. Separación de fases después de 8 horas en reposo de la disolución PCL-gelatina 65:35.

En la figura 3.7 y 3.9 se observa el deterioro de las nanofibras electrohiladas debido a la separación de fases (esta separación también ocurre en la jeringa) que ocurre a 4 y 8 horas. En ambos casos, es decir para el andamio PCL-gelatina 65:35 y 50:50, a partir de la cuarta hora se observa un deterioro gradual de la morfología (por ejemplo, formación de glóbulos, salpicaduras y unión de fibras). Esta separación de fases que ocurre con el tiempo toma gran importancia, debido principalmente, a que la técnica de electrohilamiento requiere en ocasiones muchas horas de operación para la obtención de andamios de espesor considerable.

Para mejorar la compatibilidad de las nanofibras y similar a lo reportado por Feng et al [64], se optó por agregar 0.2 % de AAc a la disolución y agitar durante 2 horas más. Esto producía un cambio de coloración en la disolución (se tornaba transparente). Existen estudios donde se demuestra que el sistema PCL-gelatina disueltas en HFIP, un disolvente similar al TFE, pertenece a un tipo de sistema compatible, siendo intermedio entre un sistema miscible e inmiscible [65]. Para estudiar las ventajas de combinar estos dos disolventes TFE/AAc, Choktaweesap *et al* [66] realizaron un estudio a varias relaciones en volumen para la obtención de andamios de gelatina, en general describen que el ácido acético contribuye a incrementar la solubilidad, la conductividad eléctrica y disminuir tanto la tensión superficial como la viscosidad.

Las fotografías de la figura 3.11 muestran el cambio de coloración, casi inmediatamente desde que el AAc es agregado y agitado. Para ambas disoluciones de PCL-gelatina (50:50 y 65:35) elaboradas con 0.2 % de AAc, ninguna produjo precipitación alguna en más de una 2 semanas en reposo. En la figura 3.8 y 3.10 se observan las fotografías de las fibras generadas a partir de la disolución con AAc: estas resultan ser más delgadas, lisas y homogéneas, además su morfología se conserva aún con el transcurso de las 4 y 8 horas. Esto es deseable cuando se considera la producción a escala de andamios para regeneración de tejido.

A pesar de que el ácido acético es considerado un buen disolvente para la gelatina, se ha reportado que el fenómeno de protonación dificulta la procesabilidad de las disoluciones de PCL-gelatina. Este fenómeno de protonación produce glóbulos, tal como reportan Gautam *et al* [67]. Se le atribuye esto al carácter polielectrolítico de la gelatina, el cual posee grupos ionizables tales como aminas y carboxílicos, que son ionizados generalmente bajo condiciones ácidas o a pH neutro [42]. Por lo tanto, las disoluciones con altos porcentajes de gelatina crearán una mayor densidad de carga en la superficie del chorro del polímero expulsado desde la punta del capilar durante el proceso de electrohilamiento. En una muy alta densidad de carga, habrá un tremendo aumento en la repulsión de carga a carga, lo que obliga al chorro estallar en pequeñas gotas y por lo tanto la formación de glóbulos y otras imperfecciones [68]. Sin embargo en este trabajo al utilizar pequeñas cantidades de ácido acético se puede estar evitando dicho fenómeno.



Figura 3.7. Disolución PCL-gelatina 65 35 sin AAc; electrohilada A) 0 horas B) 4 horas C) 8 horas.



Figura 3.8. Disolución de PCL-gelatina con 0.2% AAc 65:35; electrohilada A) 0 horas B) 4 horas C) 8 horas.



Figura 3.9. Disolución de PCL-gelatina 50:50 sin AAc; electrohilada A) 0 horas B) 4 horas C) 8 horas



Figura 3.10. Disolución de PCL-gelatina 50:50 con 0.2% de AAc; electrohilada A) 0 horas B) 4 horas C) 8 horas



Figura 3.11. Disolucion de PCL-gelatina 50:50 en A) TFE (opaca) B) TFE y 0.2 % de AAc (transparente).

<u>3.3 Andamios PCL-gelatina 50:50 y 65:35 elaborados con Trifluoroetanol (TFE) y</u> <u>0.2 % de ácido acético (HAc) electrohiladas en el cilindro giratorio</u>

3.3.1 Efecto en la morfología de la rapidez de giro del cilindro giratorio

En la Figura 3.12 se muestra la morfología de los andamios como una función de la rapidez de rotación del cilindro. Al aumentar la rapidez se observa que el grado de alineación de las nanofibras, que forman el andamio, se van alineando, obteniendo una mayor alineación a 2000 rpm. A estas revoluciones, se observó que hay una pobre adherencia entre las nanofibras y el cilindro, esto es debido probablemente, al movimiento rotatorio del cilindro, que a altas frecuencias repele la deposición de las fibras, disminuyendo las cantidades depositadas así como su orientación. Una alta frecuencia puede causar también el rompimiento de las nanofibras colectadas [69]. Existen reportes donde indican que estructuras nanofibrosas perfectamente alineadas con este método es todavía difícil de obtener, debido a una acumulación de carga residual sobre las fibras depositadas las cuales interfiere con las fibras entrantes [70].

También es posible que el grado de alineación pueda disminuir con el aumento en la concentración de la gelatina, debido a su carácter polielectrolito, ya que la gelatina produce un aumento de carga en la disolución, incrementado así la inestabilidad del chorro formando nanofibras cada vez menos alineados [24].



Figura 3.12. Morfología obtenida en un microscopio óptico a 40X para cada rapidez de giro del cilindro giratorio 1000 rpm A) 1500 rpm B) 2000 rpm C)

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió utilizar una frecuencia de 2000 rpm que corresponde a una velocidad lineal sobre el perímetro del cilindro de 7.85 m/s.

3.4 Caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados

3.4.1 Microscopia electrónica de barrido

Las micrografías de SEM de las nanofibras al azar y alineadas obtenidas durante el proceso de electrohilamiento a partir de las condiciones óptimas descritas en la tabla 2.2 (PCL-gelatina 50:50 y 65:35) se muestran en la Figura 3.13 y 3.15 respectivamente. Las distribuciones de los diámetros de las nanofibras generadas a partir de estas micrografías se muestran en la Figura 3.14 y 3.16 respectivamente.



Figura 3.13. Micrografías de SEM de las nanofibras obtenidas al azar a partir de la disolución de PCL-gelatina 50:50 con 0.2% AAc; A) 5000X B) 2000X y alineadas; C) 5000X D) 2000X.

La figura 3.13 muestra que las nanofibras poseen un aspecto uniforme, liso y homogéneo. En ambos casos (al azar y alineado), las pruebas se llevaron a cabo con un flujo de alimentación de 0.5 ml/h y un voltaje de 11 kV. Cuando el voltaje disminuía debajo de los 9 kV se formaban gotas de polímero en la punta del capilar y para voltajes mayores a 15 kV se producían perturbaciones en el chorro expulsado, lo cual era indicativo de formación de imperfecciones

Las nanofibras del andamio PCL-gelatina 50:50 colectadas al azar presentaron diámetros variados, con un intervalo que va desde los 200 nm hasta los 600 nm, y con un diámetro de fibra promedio de 407 nm \pm 68 nm. Para las nanofibras alineadas, el diámetro promedio disminuyó en 42 nm con respecto a las colectadas al azar, alcanzando un valor de 365 nm \pm 73 nm. Esta disminución en el diámetro es debido posiblemente, al efecto de estiramiento de las nanofibras provocado por la rapidez de giro del cilindro. En general, se puede observar que las estructuras nanofibrosas obtenidas son muy similares a las reportadas en otros trabajos con esta misma relación en masa de PCL-gelatina 50:50 y éstas se encuentran prácticamente libres de glóbulos y otros defectos [71].



Figura 3.14. Distribución de los diámetros de las nanofibras de PCL-gelatina 50:50; rojo-azar; azul-alineadas.



Figura 3.15. Micrografías SEM de las nanofibras obtenidas a partir de la disolución de PCL-gelatina 65:35 y 0.2% AAc al azar; A) 5000X B) 2000X y alineadas; C) 5000X D) 2000X.

Para el andamio PCL-gelatina 65:35 el diámetro promedio fue de 436 nm \pm 131 nm, se encontraron fibras de hasta 800 nm, y para el andamio con las nanofibras alineadas el diámetro promedio fue de 377 nm \pm 119 nm. Similar a lo reportado por Borhani *et al*, cuando la frecuencia de rotación del cilindro incrementa, existe un incremento en la densidad por unidad de longitud de las nanofibras, resultando en una disminución de la porosidad de los andamios [72].



Figura 3.16. Distribución de los diámetros de las nanofibras de PCL-gelatina 65:35; rojo-azar; azul-alineadas.

Varios estudios han demostrado que el diámetro de las fibras electrohiladas pueden influir en las propiedades físicas, mecánicas y de degradación de los andamios, además de que estas juegan un rol en la influencia del comportamiento celular [73, 74].La producción de nanofibras como alternativa para imitar el tamaño de las proteínas formadoras de fibrillas que se encuentran en la ECM nativa del orden de los 300 nm, ha tenido una influencia positiva en la adhesión y proliferación celular para diversas aplicaciones en ingeniería tisular [47, 75]. En este sentido, diversos autores sugieren que tamaños de fibra del orden nanométrico son adecuados para una buena proliferación y diferenciación de las celulas cardiacas [28, 45, 76].

3.5 Técnica de la gota sésil estática (ángulos de contacto)

Los ángulos de contacto, que dependen de la composición química y del patrón topográfico de la superficie, reflejan la hidrofilicidad de los andamios, propiedad relacionada con la absorción de proteínas y con la adhesión celular [77]. En la Figura 3.17 se observa un ángulo de contacto de 120° ± 1° para el andamio de PCL, considerado por autores como hidrofóbico [25], mientras que en las Figuras 3.18 y 3.19 se muestran los ángulos obtenidos de los andamios alineados PCLgelatina 65:35 y 50:50 respectivamente a los 0, 5 s y 10 s, donde se puede apreciar que conforme se incrementa la composición de la gelatina en la superficie del andamio, el ángulo disminuye, encontrándose una mayor hidrofilicidad para el andamio PCL-gelatina 50:50 a los 10 s con un ángulo de 0°. El andamio PCLgelatina 65:35 muestra un ángulo de contacto de 32° ± 2°, similar a lo reportado por Balasubramanian et al [47]. Estos autores demuestran que en los andamios electrohilados con un ángulo de contacto de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}$, la proliferación celular de los cardiomiocitos humanos es mayor que en los andamios donde el ángulo presenta un valor de 38° ± 1° y 99° ± 6°. Lo anterior parece inferir que los andamio PCLgelatina 65:35 con un ángulo de 32° ± 2° obtenidas en este trabajo serán adecuadas para el crecimiento de cardiomiocitos humanos

Esta mejora en la hidrofilicidad es debida a la presencia de grupos funcionales amina y carboxílicos de la gelatina [25]. Los grupos amina de la gelatina son capaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, así la gelatina tiene la capacidad de incrementar la hidrofilicidad de las nanofibras.



Figura 3.17. Ángulo de contacto para el andamio de PCL.


Figura 3.18. Ángulos de contacto para el andamio PCL-gelatina 65:35; A) 0 segundos B) 5 segundos C) 10 segundos.



Figura 3.19. Ángulos de contacto para el andamio PCL-gelatina 50:50; A) 0 segundos A) B) 5 segundos C) 10 segundos.

3.6 Espectroscopia FTIR de los andamios PCL-gelatina

En la Figura 3.20 se muestran los espectros de infrarrojo de los andamios PCLgelatina 65:35 y 50:50, donde se observa en ambos casos la presencia de las bandas amida I a 1640 cm⁻¹ y amida II a 1530 cm⁻¹ de la gelatina presentes en el andamio en adición a los picos característicos de la PCL: esto confirma que la gelatina está presente en el andamio. De igual manera se pueden apreciar las bandas de los grupos hidroxilos de la gelatina.



Figura 3.20. Espectros infrarrojos FTIR de los andamios; PCL-gelatina 65:35-rojo, PCL-gelatina 50:50-azul. Las líneas representan los picos característicos de la amida I y amida II de la gelatina a 1640 cm⁻¹ y 1530 cm⁻¹

3.7 Pruebas mecánicas a tensión

En la tabla 3.3 se muestran los valores obtenidos para el módulo elástico y la resistencia a la tensión, ambas en condiciones secas para los andamios obtenidos. En la Figura 3.21 se observa la curva esfuerzo y deformación, donde se hace notar que los valores del módulo elástico se incrementan con el aumento en la concentración de la gelatina, esto era de esperarse, debido al carácter rígido de la gelatina [42].

Andamio	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tensión	Elongación (%)
<u>.</u>		(MPa)	
PCL	5.64	1.04	27.82
PCL-gelatina 65:35 Con 0.2 % AAc	32.96	2.92	10.20
PCL-gelatina 65:35 Con 0.2% AAc Hidratado	2.20	1.04	298.00
PCL-gelatina 50:50 con AAc	50.29	1.35	2.32
gelatina 10 % en TFE	105	2.50	3.00
(Valor teórico) [42]			

Tabla 3.3 Valores arrojados de la caracterización mecánica de los andamios.





Similar a lo reportado por Croisier *et a*l [78], para el andamio de PCL se obtuvo un valor de 5.64 MPa de módulo elástico. Con respecto al porcentaje de elongación de los andamios PCL-gelatina 65:35 y 50:50 fueron menores en comparación con el andamio de PCL, indicando una pérdida en la capacidad para deformarse [24]. A una mayor cantidad de gelatina en el andamio el porcentaje de elongación disminuye, esto es debido posiblemente que una pobre compatibilidad entre estos dos polímeros, exhibiendo el comportamiento frágil de la gelatina.

El andamio con mayor factibilidad para su uso en alguna aplicación en regeneración de miocardio considerando las propiedades mecánicas obtenidas, es el andamio compuesto por un 35% de su masa de gelatina, debido a que este presentó mayor ductilidad y menor módulo, por lo que se escogió este último para el ensayo en condiciones hidratadas. Es importante señalar que dado que los andamios han sido diseñados para su aplicación en un entorno hidratado que existe *in vivo*, es esencial entender también sus propiedades mecánicas en este estado [43]. De este modo los valores obtenidos después de la incubación en solución de fosfato (PBS) durante una hora fueron 2.20 MPa y 1.04 MPa para el módulo elástico y la resistencia respectivamente, ambos valores presentan una reducción significativa en comparación con los valores obtenidos en condiciones secas.

La Figura 3.22 muestra la curva esfuerzo deformación del andamio hidratado, donde se observa un incremento en la deformación, elongándose hasta 298% de su longitud original. Esto es debido, posiblemente, al efecto de plastificación que provoca la hidratación, por lo que una reducción en la temperatura de transición vítrea (Tg) puede estar ocurriendo y, en consecuencia, esto conduce a una disminución de las propiedades mecánicas [79].

El modulo elástico del miocardio humano está entre el intervalo de 0.02 MPa y 0.01 MPa y el máximo porcentaje de elongación es de 66% en dirección paralela al músculo [20]. Entonces los valores arrojados de 2.20 MPa para el andamio PCL-gelatina 65:35 hidratado puede llegar a ser más factible para su uso en la ingeniería tisular cardiaca que el andamio en condiciones secas.



Figura 3.22. Curva esfuerzo-deformación para el andamio PCL-gelatina 65:35 en condiciones húmedas.

3.8 Calorimetría diferencial de barrido de los andamios PCL-gelatina

En la Figura 3.23 se muestran los termogramas correspondientes a las fibras electrohiladas de PCL donde se observa un pico endotérmico (asociando con el fenómeno de fusión, Tm) a 63°C [60]. Para el temograma de fibras electrohiladas de gelatina se observa un pico endotérmico (asociado a la entalpia de desnaturalización) a 80°C [80, 81]. Comparando con el termograma de la gelatina pura observada en la sección 3.2, la TD de las fibras electrohiladas es 4 °C menor, sin embargo la ΔHD se incrementó hasta 302.6 J/g. Este fenómeno se le atribuye posiblemente al proceso de electrohilamiento. Se especula que el TFE utilizado juega un papel importante en la recuperación de su configuración helicoidal. Buck

*et a*l [48] reportó que el TFE es capaz de estabilizar las estructuras de las proteínas como el colágeno y la gelatina.



Figura 3.23. Termogramas de las fibras electrohiladas de PCL y gelatina

El poliéster PCL y la proteína gelatina son polímeros termodinámicamente inmiscibles, aunque el uso de TFE como disolvente, es capaz de disolver a ambos polímeros por separado en una disolución transparente. Sin embargo, cuando estos son mezclados juntos, la mezcla se torna opaca, encontrándose que al dejarla en reposo, alrededor de 8 horas, se separan en diferentes fases. Los polímeros miscibles implican una mezcla de una sola fase de modo que en el DSC se debe observa una sola transición vítrea, una única cristalización, y una única entalpia endotérmica de fusión. En una mezcla inmiscible se observa un cambio en la capacidad calorífica debido a la transición vítrea y/o una entalpia de fusión, a pesar de que se espera que cambien de las de los componentes puros [82]. Esta

coexistencia de fases se puede observar en los termogramas del andamio PCLgelatina 50:50 de la Figura 3.24 con la presencia de las entalpias (TD, de la gelatina y Tm, de la PCL). La TD de la gelatina del andamio elaborado sin AAc tiene mayor entalpia que en el andamio elaborado con AAc, esto es debido posiblemente, a una mayor separación de fases.

Para el andamio elaborado a partir de la disolución con AAc, se observa que la entalpia endotérmica de fusión correspondiente a la PCL disminuye. Esto es debido posiblemente, a que en condiciones ácidas la gelatina se carga positivamente debido a la protonación de los grupos amina, convirtiendo a las cadenas de gelatina en macromoléculas mutuamente excluyente [64]. Esto hace posible que sus cadenas moleculares puedan enredarse con mayor facilidad con las cadenas de la PCL, afectando su movilidad, y evitando que las cadenas de la PCL cristalicen en un mayor porcentaje, y por lo tanto existirá una mayor compatibilidad entre estos dos polímeros.

En la tabla 3.4 se resumen los valores del cambio de entalpia de fusión (ΔH_f) , y el porcentaje de cristalinidad (% Xc), donde se observa que existe una disminución en la cristalinidad del andamio elaborado con los 20 µL de AAc, verificándose de esta manera una mayor compatibilidad entre la PCL y la gelatina.

Andamio	Δ _f (J/g)	% Xc
PCL	56	41.6
PCL-gelatina 50:50	50	36.1
Sin AAc		
PCL-gelatina 50:50	24	17.7
Con 0.2 % AAc		

Tabla 3.4 Valores de entalpia de fusión, cristalización y porcentaje de cristalinidad, calculados de la figura 3.23 y 3.24



Figura 3.24. Termogramas de fibras electrohiladas de PCL-gelatina 50:50; sin AAc-negro; con (AAc)-azul; las líneas discontinuas representan las segundas corridas.

3.9 Pruebas de pérdida de masa

Los resultados de la pérdida de masa para los andamios PCL-gelatina 65:35 y 50:50 con AAc se muestran en la gráfica de la figura 3.26. Como se puede observar, hay pérdidas rápidas de masa alrededor del 20 % para 65:35 y 35 % 50:50, en los primeros 4 días. Conforme transcurre el tiempo, estas pérdidas tienden a estabilizarse a los 17 días, para 65:35 alcanza un 40 % y para 50:50 alcanza un 50 %. En ambos casos y, debido a que los andamios a base de PCL no se degradan significativamente durante este periodo de tiempo [83], estas

pérdidas de masa se les atribuyen en su totalidad a la gelatina presente en el andamio.



Figura 3.25. Pérdidas de masa de los andamios PCL-gelatina; 65:35-rojo y 50:50azul

La morfología de los andamios sometidos a degradación después de los periodos escogidos, a 4, 8, 12 y 17 días se muestra en la Figura 3.26. En estas se observan que las arquitecturas nanofibrosas del andamio PCL-gelatina 50:50 con AAc se pierden con mayor rapidez.

En ambos andamios, surgen cambios topográficos que se observan a partir del cuarto día. Se observa que la superficie de las nanofibras ya no son homogéneas, pues se ve una especie de opacidad y protuberancias que corresponde a la pérdida de masa de la gelatina. Estas opacidades se incrementan con el transcurso de los días, encontrándose que para el día 17 se ha perdido casi en su totalidad.

Binulal *et al* [25] y colaboradores reportaron que los andamios PCL-gelatina constituidos por gelatina en un 50% de su masa, perdían su integridad estructural antes de las primeras 4 semanas sometidas a degradación *in vitro*. Sin embargo los andamios con un contenido entre los intervalos de 30% y 40% de gelatina mantenían su integridad estructural y sus dimensiones nanofibrosas por un periodo de hasta 4 semanas sin ningún tipo de entrecruzamiento, y mostraron una pérdida de su masa dependiente de la gelatina hasta los 3 meses.





Figura 3.26. Micrografías SEM de los andamios sometidos a procesos de degradación, PCL-gelatina 65:35 con AAc; A-1) 4 días A-2) 12 días A-3)17 días. PCL-gelatina 50:50; B-1) 4 días B-2) 12 días B-3) 17 días.

A pesar que el estudio fue realizado en condiciones *in vitro*, resulta interesante que la rápida degradación de la gelatina por metaloproteinasas de la matriz *in vivo* puede dar lugar a la desintegración de la estructura del andamio que podría ser perjudicial para la proliferación y diferenciación celular [25]. Sin embargo es posible que esta degradación rápida permita crear tamaños mayores de poro que a su vez, las células puedan migrar entre las fibras de PCL restantes con mayor facilidad.

La PCL no se degrada significativamente a los 17 días en condiciones *in vitro*. Sin embargo en condiciones *in vivo* en las cuales se implanta el andamio, la degradación es considerablemente más rápida. Esto es debido a muchos factores, entre éstos se incluyen: la respuesta del organismo hacia el cuerpo extraño, formación de radicales libres, productos ácidos y/o enzimas (esterasas) producidas por las células durante la respuesta al cuerpo extraño. Esto puede acelerar la degradación [84, 85]. En el caso de la PCL, las enzimas desempeñan un papel en cierta medida. La degradación enzimática de la PCL por diversas lipasas fue documentado por Li et al [85], estos autores llegaron a la conclusión que, en general las enzimas adquieren un papel en las etapas posteriores de la

degradación cuando las cadenas están fragmentadas, donde los fragmentos más pequeños pueden ser fagocitadas y degradadas intracelularmente.

En la Figura 3.27 A se muestra una Microfotografía SEM de las fibras compuestas de PCL-gelatina 65:35 con AAc a 4 días de haberse sometido a degradación. En la fotografía aparentemente no se observa diferencias significativas entre las fibras vecinas. Sin embargo, en la figura 3.27 B se realizó una ampliación superior a 15000X donde se observan fibras con diferentes características topográficas: la superficie de las nanofibras se tornó rugosa e irregular debido a la existencia de muchas protuberancias, ranuras interconectadas y poros en forma elipsoidal con el eje largo orientado en la dirección del eje de la fibra.

La cinética del material remanente de la gelatina en el andamio puede ser gobernada por una progresiva disolución y por transferencia de masa difusiva, similar a la de un proceso de erosión. Fibras porosas continuas se obtuvieron después de que la gelatina soluble en agua se lixivia gradualmente hacia afuera de las fibras compuestas de PCL-gelatina.



Figura 3.27. Material remanente del andamio PCL-gelatina 65:35 con AAc a 4 días en PBS A) 4000X B) 15000X.

Dado que las nanofibras resultantes son continuas, en lugar de formar fibrillas o segmentos separados, se puede concluir que hay presencia de las dos fases dentro de las fibras compuestas. Esto es debido posiblemente, a los puentes de hidrogeno que se establecen entre el grupo éster de la policaprolactona y los grupos amidas de la gelatina.

3.10 Espectro infrarrojo FTIR de los andamios degradados

Para visualizar qué grupos de la gelatina se degradan en el andamio PCL-gelatina 65:35 con AAc, se realizó una normalización de los espectros obtenidos a 4, 8, 12 y 17 días después del proceso de degradación. Así, la Figura 3.28 muestra dichos espectros normalizados. Se parte del hecho que la degradación de la PCL es despreciable a los 17 días, por lo tanto, el pico de la PCL del enlace –C-H en tensión a 2944 cm⁻¹, no varía durante ese tiempo. Esto quiere decir que se puede tomar este pico como referencia para monitorear la degradación de la gelatina.



Figura 3.28. Normalización de gráficas, PCL-gelatina 65:35 con AAc; 0 días-rojo, 4 días-verde, 8 días-azul, 12 días-morado, 17 días Negro.

En la Figura 3.29 se muestra una ampliación de los espectros normalizados entre los número de onda en el intervalo de 1500 cm⁻¹ y 1700 cm⁻¹, donde se observa una disminución gradual de las intensidades de número de onda de los grupos característicos de la gelatina, amida I en 1647 cm⁻¹ y de amida II en 1537 cm⁻¹. Esto ocurre conforme transcurre los días sometidos a degradación, una rápida degradación se observa a partir del cuarto día, donde se infiere claramente que la gelatina se hidroliza y se degrada en sus respectivos aminoácidos correspondientes.

El principal mecanismo de degradación hidrolitica de la gelatina es a través de una escisión del enlace peptídico [86], El enlace peptídico es un enlace covalente entre el grupo amino (–NH₂) de un aminoácido y el grupo carboxilo (–COOH) de otro

aminoácido. Los péptidos y las proteínas están formados por la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

La gelatina no es estable en sistemas acuosos, ya que se inicia una degradación hidrolítica progresiva con la reducción de su masa molecular y por consiguiente la disminución de las propiedades físicas útiles. Muchos estudios se han llevado a cabo para determinar la cinética de reacción de la degradación hidrolítica y la influencia de diferentes variables. La hidrólisis de la gelatina depende de la temperatura, del pH del sistema y, en menor medida, de la naturaleza de los otros solutos que pueden estar presentes [86].

Kim *et al* [77] reportaron que los materiales electrohilados son estructuras fibrosas, donde la dimensión de la nanofibra es pequeña y la longitud de difusión de los productos degradados es corta. Así, los oligómeros hidrófilicos pueden escapar rápidamente de la superficie y, por lo tanto, ocurre una reducción de su masa.



Figura 3.29. Espectros sometidos a degradación, PCL-gelatina 65:35 con AAc; 0 días-rojo, 4 días-verde, 8 días-azul, 12 días-morado, 17 días Negro.

<u>3.1 1 Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (SEM-EDS) para</u> detección de disolvente remante.

El método de electrohilamiento requiere del uso de disolventes tóxicos, algunos de los cuales pueden retenerse en las nanofibras, lo cual puede afectar a las células, incluso matarlas. En la tabla 3.5 se muestra el SEM-EDS para el andamio PCL-gelatina 65:35 con AAc secado en un horno con vacío a temperatura ambiente durante 48 horas. Como se observa en la tabla, el elemento flúor característico del TFE está presente con un 0.74 % en peso, indicando que el secado con vacío no fue suficiente para eliminar el disolvente remanente.

Elemento	Peso %	Peso %	Atómico %
		Sigma	
СК	60.79	0.73	67.06
NK	4.79	1.00	4.53
ОК	33.69	0.49	27.90
FΚ	0.74	0.25	0.51
Total	100		

Tabla 3.5 EDS para el andamio PCL-gelatina 65:35 con AAc.

Dado que el flúor puede ser tóxico para las células, se le dio un tratamiento. En la tabla 3.6 se puede observar el análisis elemental de SEM-EDS para la muestra después de este tratamiento, donde se observa que el porcentaje del elemento flúor desciende hasta un valor de 0.00 %, indicando que el disolvente remanente desaparece por completo.

Elemento	Peso %	Peso %	Atómico %
		Sigma	
СК	59.56	0.79	65.81
NK	5.41	1.12	5.13
ОК	35.03	0.56	29.06
FΚ	0.00	0.00	0.00
Total	100		

Tabla 3.6 EDS para el andamio PCL-gelatina 65:35 con AAc después del tratamiento realizado con carbonato de sodio.

CONCLUSIONES

- Las condiciones que generaron las mejores estructuras nanofibrosas durante el proceso de electrohilamiento del andamio PCL-gelatina 50:50 y 65:35 fueron soluciones poliméricas al 10% m/m en trifluoroetanol (TFE) y 0.2% de ácido acético AAc, un flujo de alimentación de .5 ml/h y un potencial eléctrico de 11 kV.
- La pequeña cantidad de 0.2% de ácido acético introducido a la disolución mejoró la compatibilidad de los andamios obtenidos, esto fue verificado mediante un análisis por calorimetría diferencial de barrido.
- Aunque el andamio PCL-gelatina 50:50 proporcionó una hidrofilicidad de 0°, no es un andamio favorable para el tejido cardiaco debido a su alta tasa de pérdida de masa y débiles propiedades mecánicas. Por lo tanto, se ha seleccionado el andamio PCL-gelatina 65:35 hidratado con un valor del módulo elástico de 2.2 MPa y una hidrofilicidad de 32°, como el andamio más prometedor para una futura aplicación en regeneración de miocardio.
- El proceso de electrohilamiento de la gelatina tipo A produce cambios, en algunas de sus propiedades fisicoquímicas respecto del material puro. El cambio más significativo fue una disminución de la temperatura de desnaturalización y un incremento en la entalpia de fusión.
- Las pruebas de pérdida de masa de los andamios después de los procesos de degradación permitió concluir que la pérdida de masa a los 17 días es proporcional al contenido de gelatina.
- Con la disminución gradual de las intensidades de número de onda de los grupos característicos de la gelatina amida I en 1647 cm⁻¹ y amida II en 1537 cm⁻¹ en los espectros degradados, se puede determinar que la

gelatina se degrada en condiciones *in vitro* casi en su totalidad a los 17 días.

 Se eliminó por completo el disolvente remanente con el tratamiento a base de carbonato de sodio.

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos se pueden considerar exitosos, ya que se alcanzaron los objetivos planteados originalmente. Sin embargo, se aconseja realizar pruebas adicionales para los andamios obtenidos para potencializar su posible uso en alguna aplicación de ingeniería tisular del corazón.

Entre las pruebas que se aconseja realizar se encuentran:

- Establecer las diferencias mecánicas entre los andamios alineados y al azar.
- Realizar pruebas de biocompatibilidad con los cardiomiocitos.
- Medir la resistencia a la sutura.
- Realizar pruebas de biocompatibilidad con los cardiomiocitos.
- Medir la porosidad y el tamaño de poro.

 Medir las masas moleculares por cromatografía de permeación de gel de los andamios elaborados con y sin AAc, y establecer como en qué medida afecta el AAc en la degradación.

REFERENCIAS

- Leor, J., Y. Amsalem, and S. Cohen, *Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering.* Pharmacology & therapeutics, 2005. 105(2): p. 151-163.
- 2. Fuchs, J.R., B.A. Nasseri, and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction.* The Annals of thoracic surgery, 2001. **72**(2): p. 577-591.
- 3. Saltzman, W.M., *Tissue engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissues.* 2004: Oxford University Press, USA.
- 4. Filipe, D.V., et al. *Design of a composite scaffold for myocardial regeneration following infarction*. in *Bioengineering Conference, 2007. NEBC'07. IEEE 33rd Annual Northeast*. 2007. IEEE.
- 5. Calix, H.A.C. *Infarto Agudo De Miocardio. Parte I.* 2013; Available from: <u>http://blogs.elheraldo.hn/cardiologia/2013/09/18/infarto-agudo-de-miocardio-parte-i/</u>.
- 6. Tom, D.H., Estructura composición y superficie como vectores directores en el diseño de biomateriales. Aplicación al desarrollo de scaffolds poliméricos y a superficies bioactivas. Universidad ramón llull 2011. **Barcelona**(tesis doctoral): p. pag 3-5.
- 7. Amoabediny, G., B. Heli, and N. Salehi-Nik, *The Role of Biodegradable Engineered Scaffold in Tissue Engineering*. 2011: INTECH Open Access Publisher.
- 8. Şenel Ayaz, H.G., *Textile-templated anisotropic electrospun scaffolds for cardiac tissue engineering*. 2012.
- 9. Ruvinov, E., Y. Sapir, and S. Cohen, *Cardiac Tissue Engineering: Principles, Materials, and Applications.* Synthesis Lectures on Tissue Engineering, 2012. **4**(1): p. 1-200.

- Kharaziha, M., et al., PGS: Gelatin nanofibrous scaffolds with tunable mechanical and structural properties for engineering cardiac tissues. Biomaterials, 2013. 34(27): p. 6355-6366.
- 11. Li, Z. and J. Guan, *Hydrogels for cardiac tissue engineering*. Polymers, 2011. **3**(2): p. 740-761.
- 12. Wu, L. and J. Ding, *In vitro degradation of three-dimensional porous poly (d, l-lactide-< i> co</i>-glycolide) scaffolds for tissue engineering.* Biomaterials, 2004. **25**(27): p. 5821-5830.
- 13. Schraufstatter, I.U., et al., *C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation.* The Journal of Immunology, 2009. **182**(6): p. 3827-3836.
- 14. Kleinman, H.K. and G.R. Martin. *Matrigel: basement membrane matrix with biological activity.* in *Seminars in cancer biology.* 2005. Elsevier.
- 15. Pok, S., et al., *A multilayered scaffold of a chitosan and gelatin hydrogel supported by a PCL core for cardiac tissue engineering.* Acta biomaterialia, 2013. **9**(3): p. 5630-5642.
- Chang, H.-I. and Y. Wang, *Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds.* Regenerative Medicine and Tissue Engineering—Cells and Biomaterials, InTech: Rijeka, Croatia, 2011: p. 569-588.
- 17. Radisic, M., et al., *Biomimetic approach to cardiac tissue engineering.* Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007. **362**(1484): p. 1357-1368.
- Radisic, M., et al., *Biomimetic approach to cardiac tissue engineering:* oxygen carriers and channeled scaffolds. Tissue engineering, 2006. 12(8): p. 2077-2091.
- 19. Mukherjee, S., et al., *Evaluation of the biocompatibility of PLACL/collagen nanostructured matrices with cardiomyocytes as a model for the regeneration of infarcted myocardium.* Advanced Functional Materials, 2011. **21**(12): p. 2291-2300.
- 20. Parrag, I.C., The development of elastomeric biodegradable polyurethane scaffolds for cardiac tissue engineering. 2010, University of Toronto.
- 21. Casado, U., et al., *Caracterización de sistemas de quitosano para electrohilado.*

- Sánchez, L.M.D., L. Rodriguez, and M. López, *Electrospinning: la era de las nanofibras.* Revista Iberoamericana de Polímeros, 2013. 14(1): p. 10-27.
- 23. Valente, T.A.M., *Electrospun poly* (ε-caprolactone) nanofibers for bone regeneration and other biomedical applications. 2011.
- 24. Ghasemi-Mobarakeh, L., et al., *Electrospun poly* (εcaprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Biomaterials, 2008. **29**(34): p. 4532-4539.
- 25. Binulal, N., et al., *PCL-gelatin composite nanofibers electrospun using diluted acetic acid-ethyl acetate solvent system for stem cell-based bone tissue engineering.* Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2014. **25**(4): p. 325-340.
- Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology advances, 2010. 28(3): p. 325-347.
- 27. Yost, M.J., et al., *A novel tubular scaffold for cardiovascular tissue engineering.* Tissue engineering, 2004. **10**(1-2): p. 273-284.
- 28. Kofidis, T., et al., *Clinically established hemostatic scaffold (tissue fleece) as biomatrix in tissue-and organ-engineering research.* Tissue engineering, 2003. **9**(3): p. 517-523.
- 29. Christman, K.L., et al., Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. Journal of the American College of Cardiology, 2004. **44**(3): p. 654-660.
- 30. Ye, Q., et al., *Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering.* European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2000. **17**(5): p. 587-591.
- 31. Ozawa, T., et al., *Optimal biomaterial for creation of autologous cardiac grafts.* Circulation, 2002. **106**(12 suppl 1): p. I-176-I-182.
- 32. Akhyari, P., et al., *Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts.* Circulation, 2002. **106**(12 suppl 1): p. I-137-I-142.
- 33. Dar, A., et al., *Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds.* Biotechnology and bioengineering, 2002. **80**(3): p. 305-312.
- 34. Leor, J., et al., *Bioengineered cardiac grafts a new approach to repair the infarcted myocardium?* Circulation, 2000. **102**(suppl 3): p. Iii-56-Iii-61.

- 35. Chen, Q.-Z., et al., *Characterisation of a soft elastomer poly (glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue.* Biomaterials, 2008. **29**(1): p. 47-57.
- 36. Shin, M., et al., *Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh*. Biomaterials, 2004. **25**(17): p. 3717-3723.
- 37. Wang, F., et al., Fabrication and characterization of prosurvival growth factor releasing, anisotropic scaffolds for enhanced mesenchymal stem cell survival/growth and orientation. Biomacromolecules, 2009. **10**(9): p. 2609-2618.
- Ishii, O., et al., In vitro tissue engineering of a cardiac graft using a degradable scaffold with an extracellular matrix-like topography. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2005. 130(5): p. 1358-1363.
- 39. Morrison, N., et al., *Gelatin alternatives for the food industry*, in *Physical chemistry and industrial application of gellan gum*. 1999, Springer. p. 127-131.
- 40. Gómez-Guillén, M., et al., *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review.* Food Hydrocolloids, 2011. **25**(8): p. 1813-1827.
- 41. Hafidz, R., et al., *Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin.* International Food Research Journal, 2011. **18**: p. 813-817.
- 42. Zhang, Y., et al., *Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds.* Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2005. **72**(1): p. 156-165.
- 43. Ifkovits, J.L., et al., *The influence of fibrous elastomer structure and porosity on matrix organization.* PloS one, 2010. **5**(12): p. e15717.
- 44. Park, H., et al., *A novel composite scaffold for cardiac tissue engineering.* In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2005. **41**(7): p. 188-196.
- 45. Prabhakaran, M.P., et al., *Electrospun biocomposite nanofibrous patch for cardiac tissue engineering*. Biomedical Materials, 2011.
 6(5): p. 055001.
- 46. Kai, D., et al., Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2011.
 98(2): p. 379-386.
- 47. Balasubramanian, P., et al., *Human cardiomyocyte interaction with electrospun fibrinogen/gelatin nanofibers for myocardial*

regeneration. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2013. **24**(14): p. 1660-1675.

- 48. Nam, J., et al., *Improved cellular infiltration in electrospun fiber via engineered porosity.* Tissue engineering, 2007. **13**(9): p. 2249-2257.
- 49. Rockwood, D.N., et al., *Culture on electrospun polyurethane scaffolds decreases atrial natriuretic peptide expression by cardiomyocytes in vitro.* Biomaterials, 2008. **29**(36): p. 4783-4791.
- 50. Beachley, V. and X. Wen, *Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions.* Progress in polymer science, 2010. **35**(7): p. 868-892.
- 51. Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos, *Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review.* Tissue engineering, 2006. **12**(5): p. 1197-1211.
- 52. Heydarkhan-Hagvall, S., et al., *Three-dimensional electrospun ECM*based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. Biomaterials, 2008. **29**(19): p. 2907-2914.
- 53. Chong, E., et al., *Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution.* Acta biomaterialia, 2007. **3**(3): p. 321-330.
- 54. Salud, O.M.d.l., *El día mundial del corazón.* http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world heart day /es/index.html., Documento revisado el 5 de agosto de 2009.
- 55. sola, b., Entorno al día mundial del Corazón, en México se registra como la principal causa de muerte -<u>http://www.oem.com.mx/eloccidental/notas/n3550825.htm</u>. 2014.
- 56. Jenkins, M. and K. Harrison, *The effect of molecular weight on the crystallization kinetics of polycaprolactone.* Polymers for advanced technologies, 2006. **17**(6): p. 474-478.
- 57. Hernandez, J.H.M., et al., *PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y TÉRMICA DE MEZCLAS BINARIAS DE RESINA MOPA-MOPA (ELAEGIA PASTOENSIS MORA) Y POLICAPROLACTONA (PCL)(PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL AND THERMAL CHARACTERIZATION OF MOPA-MOPA RESIN AND POLYCAPROLACTONE BINARY BLENDS).* Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 2011: p. 176-184.
- 58. Martinelli, M. and S.D.G. Schejtman, *Films de gelatina dendronizados selectivamente sobre una cara.* Bitácora Digital, 2013. **1**(2).

- 59. Hermanto, S. and W. Fatimah, *Differentiation of bovine and porcine gelatin based on spectroscopic and electrophoretic analysis.* Journal of Food and Pharmaceutical Sciences, 2013. **1**(3).
- Elzubair, A., et al., *The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation.* Journal of dentistry, 2006. 34(10): p. 784-789.
- Mindru, T.B., et al., *Electrospinning of high concentration gelatin solutions.* Journal of optoelectronics and advanced materials, 2007. 9(11): p. 3633.
- 62. Zhang, Y., et al., *Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers.* Polymer, 2006. **47**(8): p. 2911-2917.
- 63. Bhana, B., et al., *Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells.* Biotechnology and bioengineering, 2010. **105**(6): p. 1148-1160.
- 64. Feng, B., et al., *Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL.* Biomacromolecules, 2012. **13**(12): p. 3917-3925.
- 65. Kolbuk, D., et al., *Investigations of polycaprolactone/gelatin blends in terms of their miscibility.* Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences, 2013. **61**(3): p. 629-632.
- 66. Choktaweesap, N., et al., *Electrospun gelatin fibers: effect of solvent system on morphology and fiber diameters.* Polymer journal, 2007. 39(6): p. 622-631.
- 67. Gautam, S., A.K. Dinda, and N.C. Mishra, *Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method.* Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(3): p. 1228-1235.
- 68. Song, J.-H., H.-E. Kim, and H.-W. Kim, *Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008. **19**(1): p. 95-102.
- 69. Lee, Y.-S. and T. Livingston Arinzeh, *Electrospun nanofibrous materials for neural tissue engineering.* Polymers, 2011. **3**(1): p. 413-426.
- 70. Ali, U., et al., *Electrospinning of Continuous Nanofiber Bundles and Twisted Nanofiber Yarns.* Nanofibers-production, properties and functional applications, 2011: p. 153-174.
- 71. Duan, H., et al., Engineering of epidermis skin grafts using electrospun nanofibrous gelatin/polycaprolactone membranes. International journal of nanomedicine, 2013. **8**: p. 2077.

- 72. Borhani, S., S.G. Etemad, and S.A.H. Ravandi, *Dynamic heat and moisture transfer in bulky PAN nanofiber mats.* Heat and mass transfer, 2011. **47**(7): p. 807-811.
- Bashur, C.A., L.A. Dahlgren, and A.S. Goldstein, *Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly (d, l-lactic-< i> co</i>-glycolic acid) meshes.* Biomaterials, 2006. 27(33): p. 5681-5688.
- 74. Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos, *Electrospun poly* (εcaprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. Biomacromolecules, 2006. **7**(10): p. 2796-2805.
- 75. Venugopal, J., et al., *Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering.* Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2008. **84**(1): p. 34-48.
- 76. Meng, Z., et al., *Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering.* Materials Science and Engineering: C, 2010. **30**(8): p. 1204-1210.
- 77. Kim, D.-H., et al., *Guided three-dimensional growth of functional cardiomyocytes on polyethylene glycol nanostructures.* Langmuir, 2006. **22**(12): p. 5419-5426.
- 78. Croisier, F., et al., *Mechanical testing of electrospun PCL fibers.* Acta biomaterialia, 2012. **8**(1): p. 218-224.
- 79. Wu, L., et al., *"Wet-state" mechanical properties of three-dimensional polyester porous scaffolds.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **76**(2): p. 264-271.
- 80. Bigi, A., et al., *Drawn gelatin films with improved mechanical properties.* Biomaterials, 1998. **19**(24): p. 2335-2340.
- Bigi, A., et al., Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials, 2001.
 22(8): p. 763-768.
- 82. Simon, G.P., *Polymer characterization techniques and their application to blends*. 2003: Amer Chemical Society.
- 83. Lam, C.X., et al., *Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo.* Journal of biomedical materials research part A, 2009. **90**(3): p. 906-919.
- 84. Tracy, M., et al., Factors affecting the degradation rate of poly (lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. Biomaterials, 1999. **20**(11): p. 1057-1062.

- 85. Bölgen, N., et al., *In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly (ε-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions.* Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2005. **16**(12): p. 1537-1555.
- 86. Abrusci, C., et al., *A chemiluminescence study on degradation of gelatine: Biodegradation by bacteria and fungi isolated from cinematographic films.* Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2007. **185**(2): p. 188-197.