



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

## Posgrado en Materiales Poliméricos

OBTENCIÓN DE ANDAMIO BI-CAPA, PLLA-GELATINA, CON  
GEOMETRÍA HEXAGONAL DE PORO PARA POSIBLE USO EN  
QUEMADURAS PROFUNDAS

Tesis que presenta

IRMA MERARY PECH POOL

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS  
MATERIALES POLIMÉRICOS

Mérida, Yucatán, México,

Diciembre 2018

## **DECLARACIÓN 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 período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a 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 lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán 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.



Irma Merary Pech Pool

---

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS MATERIALES POLIMÉRICOS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Irma Merary Pech Pool titulado OBTENCIÓN DE ANDAMIO BI-CAPA, PLLA-GELATINA, CON GEOMETRÍA HEXAGONAL DE PORO PARA POSIBLE USO EN QUEMADURAS PROFUNDAS, fue realizado en la Unidad de Materiales poliméricos del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Fernando Hernández Sánchez, perteneciente al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Clelia de la Peña Seaman  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 4 de diciembre de 2018

# AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada 775080/612400

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos.

Al Dr. Fernando Hernández Sánchez, por darme la oportunidad de estar en su grupo de trabajo, por su confianza y apoyo durante la elaboración de la tesis. .

Al M.C. Hugo Joel Carrillo Escalante, por su importante participación en las pruebas de caracterización realizadas, su apoyo en el trabajo de laboratorio, por haberme brindado sus conocimientos, además de su invaluable amistad y consejos.

Al Dr. Cuauhtémoc Sánchez Rodríguez por compartir sus conocimientos para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Alex Valadéz González y al Dr. Luis May por sus observaciones y aportaciones para mejorar este trabajo.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, por su importante contribución en las caracterizaciones biológicas realizadas, además de no dudar en compartir sus conocimientos y consejos para la correcta realización de dichas caracterizaciones.

A la I.Q. Silvia Beatriz Andrade Canto, por las imágenes del microscopio electrónico de barrido que son parte importante de ésta tesis.

Al M.C. Javier Iván Cauich Cupul, por su apoyo durante la realización de las pruebas mecánicas.

A Alejandro Viera y Carlos Belman por su apoyo, amistad y consejos durante esta etapa, al igual que a mis compañeros de posgrado

# Contenido

<b>RESÚMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO</b> .....	4
<b>1.1 Fisiología de la piel</b> .....	4
1.1.1 Epidermis.....	5
1.1.2 Dermis .....	8
<b>1.2 Quemaduras</b> .....	10
1.2.1 Tratamiento de las quemaduras .....	11
1.2.2 Secuelas.....	13
<b>1.3 Ingeniería de tejidos</b> .....	14
1.3.1 Matriz extracelular (MEC) .....	15
1.3.2 Andamios.....	18
<b>1.4 Electrohilado</b> .....	22
1.4.1 Parámetros del proceso de electrohilado .....	23
1.4.2 Viscosidad .....	23
1.4.3 Masa molecular .....	24
1.4.4 Campo eléctrico aplicado .....	25
1.4.5 Distancia del capilar al colector .....	25
1.4.6 Flujo de la disolución .....	25
<b>1.5 Impresión 3D</b> .....	26
<b>1.6 Sustitutos de piel</b> .....	27
<b>1.7 Cianoacrilatos</b> .....	29

<b>1.8</b>	<b>Ácido poliláctico (PLLA)</b> .....	33
1.8.1	Modificaciones superficiales .....	33
<b>1.9</b>	<b>Gelatina</b> .....	34
1.9.1	Insolubilización de las fibras de gelatina.....	36
<b>1.10</b>	<b>Objetivo general</b> .....	38
<b>1.11</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	38
<b>CAPÍTULO 2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> .....		39
<b>2.1</b>	<b>Materiales</b> .....	39
<b>2.2</b>	<b>Metodología</b> .....	41
<b>2.3</b>	<b>Diseño del andamio para la impresión 3D</b> .....	41
2.3.1	Impresión 3D .....	42
2.3.2	Tratamiento alcalino .....	43
<b>2.4</b>	<b>Electrohilado de las fibras de gelatina</b> .....	43
<b>2.5</b>	<b>Insolubilización de las fibras de gelatina</b> .....	44
<b>2.6</b>	<b>Elaboración de la interfaz</b> .....	45
2.6.1	Deposición de fibras sobre el diseño de poro hexagonal .....	45
<b>2.7</b>	<b>Caracterizaciones</b> .....	46
2.7.1	Caracterización morfológica .....	46
2.7.2	Espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR) .....	47
2.7.3	Ángulo de contacto .....	48
2.7.4	Pruebas de pérdida de masa.....	48
2.7.5	Pruebas mecánicas de adhesión.....	50
2.7.6	Caracterización biológica.....	51
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> .....		59
<b>3.1</b>	<b>Diseño e impresión de los andamios</b> .....	59

<b>3.2 Electrohilado de las fibras de gelatina .....</b>	<b>63</b>
<b>3.3 Insolubilización de las fibras de gelatina .....</b>	<b>65</b>
<b>3.4 Elaboración de la interfaz .....</b>	<b>67</b>
3.4.1 Ensayos mediante el electrohilado .....	67
<b>3.5 Caracterizaciones.....</b>	<b>70</b>
3.5.1 Espectroscopía de infrarrojo por reflexión total atenuada (FTIR-ATR).....	70
3.5.2 Ángulo de contacto .....	79
3.5.3 Pérdida de masa.....	80
3.5.4 Adhesión entre los andamios .....	81
3.5.5 Caracterización biológica.....	83
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>96</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>98</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estratos que componen la piel .....	4
Figura 1.2. Estratos que componen la epidermis .....	5
Figura 1.3 Mictofotografía en la que se ven las capas de la piel fina .....	9
Figura 1.4 Representación de los tipos de quemaduras .....	11
Figura 1.5 injerto de piel autólogo.. .....	12
Figura 1.6 Ejemplo de cicatriz hipertrófica .....	13
Figura 1.7 Ejemplo de cicatriz queiloide.....	14
Figura 1.8 Triada de la ingeniería de tejidos .....	15
Figura 1.9 Matriz extracelular. ....	16
Figura 1.10 Integrina .....	18
Figura 1.11 Andamio con macroporos de quitosano y gelatina.....	20
Figura 1.12 Comparación de morfología celular entre andamios.....	20
Figura 1.13 Osteoblastos cultivados en polimetilmetacrilato (PMMA).....	21
Figura 1.14 Esquema de un equipo de electrohilado .....	22
Figura 1.15 Fibras electrohiladas de PCL .....	24
Figura 1.16 Esquema de impresión 3D por FMD. ....	27
Figura 1.17 Estructura general de un cianoacrilato. ....	30
Figura 1.18 Mecanismo de polimerización de los cianoacrilatos.....	31
Figura 1.19 Mecanismo de degradación de los cianoacrilatos vía reacción inversa de Knoevenagel. ....	32
Figura 1.20 Degradación de cianoacrilatos por medio de hidrólisis. ....	32
Figura 1.21 Ácido poli L-láctico (PLLA) .....	33
Figura 1.22 La hidrólisis del enlace éster en la cadena principal forma grupos hidroxilo y carboxilo.....	34
Figura 1.23 Diagrama que ilustra una fibra de colágena.....	35
Figura 1.24 Desnaturalización del colágeno para producir gelatina .....	35

Figura 1.25 Reacción de entrecruzado de la gelatina con el glutaraldehído para formar iminas.....	37
Figura 2.1 Representación gráfica del procedimiento para realizar las probetas para las pruebas mecánicas.....	51
Figura 2.2 Estructura del compuesto WST-8 y su reducción a formazan.....	54
Figura 3.1 Proceso paso a paso mediante el cual se elaboró el diseño.....	60
Figura 3.2 Vistas del diseño con poro hexagonal.....	61
Figura 3.3 Tapete de PLLA obtenido.....	62
Figura 3.4 Microfotografía SEM del andamio de poro hexagonal a diferentes aumentos, obtenido con la boquilla de 200µm. ....	63
Figura 3.5 Fibras de gelatina obtenidas observadas en el microscopio invertido con el objetivo de 4x. ....	64
Figura 3.6 A) Microfotografía de las nanofibras de gelatina.. ....	65
Figura 3.7 A) Tapetes de gelatina .....	66
Figura 3.8 Microfotografía obtenida mediante el Microscopio Electrónico de Barrido, en donde podemos observar la morfología del tapete de gelatina entrecruzado durante 6 horas. ....	67
Figura 3.9 Fotografía del equipo de electrohilado. ....	67
Figura 3.10 Fotografía de la placa colectora cubierta con parafilm y un tapete de PLLA en el centro.....	68
Figura 3.11 Fotografía de la prueba realizada con filamentos de cobre.....	69
Figura 3.12. Microfotografías de la sección transversal del andamio bicapa, en ambas se aprecian ambos tapetes.....	70
Figura 3.13 Espectro IR del tapete de PLLA .....	71
Figura 3.14 Espectro IR del tapete de PLLA después del tratamiento alcalino .....	72
Figura 3.15 Espectro aumentado del FTIR del PLLA con tratamiento de 2400cm <sup>-1</sup> a 3600cm <sup>-1</sup> .....	75
Figura 3.16 Espectro FTIR del PLLA con tratamiento ampliado de 1300cm <sup>-1</sup> a 1500cm <sup>-1</sup> .....	76
Figura 3.17 Mecanismo de reacción de la hidrólisis alcalina con NaOH del PLLA. ....	78

Figura 3.18 Porcentaje de pérdida de masa de los andamios bicapa sin tratamiento alcalino .....	80
Figura 3.19 Elaboración de probetas para el ensayo de adhesión .....	82
Figura 3.20 Gráfica en la cual se representa el punto de falla del adhesivo .....	83
Figura 3.21 Resultados del ensayo de proliferación.....	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Comparación de ventajas y desventajas entre algunos sustitutos de piel comerciales [50], [51] .....	28
Tabla 1.2 Propiedades de la gelatina tipo A[65] .....	36
Tabla 2.1 Parámetros para la impresión .....	43
Tabla 2.2 Parámetros de referencia para el equipo de electrohilado[71] .....	44
Tabla 3.1 Parámetros propuestos y utilizados en el electrohilado.....	64
Tabla 3.2 Principales longitudes de onda para el PLLA .....	72
Tabla 3.3 Longitudes de onda del PLLA después del tratamiento alcalino .....	77
Tabla 3.4 Tinciones de las muestras realizadas con cristal violeta, fotografías tomadas con el objetivo de 4x .....	87
Tabla 3.5 Tabla comparativa entre las muestras sin células y con células cultivadas .....	90

## RESUMEN

La piel es un órgano que sirve de barrera ante las agresiones del medio ambiente, por esto puede ser fácilmente dañada. Entre los daños que la piel puede sufrir, se encuentran las quemaduras. Cuando la agresión daña la capa profunda de la piel (dermis), esta no puede regenerarse por sí misma, por lo que se requiere un injerto. Sin embargo, debido a las limitaciones que éstos presentan, mediante la ingeniería de tejidos, se han desarrollado diversos sustitutos para poder solucionar el problema. A pesar de los numerosos sustitutos desarrollados a través de los años, estos aún distan de ser ideales. Un problema que estos sustitutos no han logrado resolver, es la cicatrización queloide, atribuyendo este problema a la estructura del andamio. En este trabajo se elaboró un andamio bicapa de ácido poliláctico (PLA) y gelatina utilizando dos técnicas: impresión 3D y electrohilado. Los andamios de PLA con poro hexagonal, fueron diseñados en el software *Creo parametric* de la compañía PTC®. Posteriormente fueron impresos a 205°C en una impresora Makerbot®. Se obtuvieron estructuras fibrosas a partir de disoluciones de gelatina fueron hechas en trifluoroetanol al 10%*m/v*, a un flujo de alimentación de 0.6ml/h, una distancia del colector a la aguja de 15 cm y un voltaje de 12.26 kV. Estas fibras fueron estabilizadas con glutaraldehído durante 6 horas. La morfología de las fibras fue verificada por medio de microscopía electrónica de barrido, al igual que la morfología hexagonal de las membranas de PLA. Para crear la interfaz entre ambas membranas, se utilizó un adhesivo comercial de cianoacrilato, el cual es utilizado en el campo médico. Finalmente, se realizó un ensayo de proliferación celular, en donde concluimos que no hubo un efecto citotóxico del andamio

# INTRODUCCIÓN

La piel es considerada el órgano más grande del cuerpo humano, el cual es frecuentemente dañado debido a que está expuesto al medio ambiente. Entre los daños que puede sufrir están las quemaduras. Cuando la lesión es pequeña, ésta puede curar por sí misma, sin embargo, cuando el daño abarca la dermis, requiere otra clase de intervención. Una manera de ayudar a la cicatrización de heridas es el uso de apósitos, cuya función es cubrir y proteger la herida. Los apósitos para heridas juegan un papel importante en la gestión de la cicatrización, en particular, los apósitos elaborados con polímeros se utilizan ampliamente para heridas exudativas, heridas que liberan exudado; líquido compuesto por restos celulares y alta concentración de proteínas [1], [2].

Estos apósitos han ido evolucionando con el tiempo, desde una simple gasa a materiales más complejos, los cuales están hechos con biomateriales que usualmente se encuentran en la matriz extracelular, tales como la colágena y el ácido hialurónico. Una innovación en el uso de apósitos, es la adición de un andamio [3]. De manera que el apósito tenga la función de una epidermis artificial y el andamio provea el soporte a las células para que éstas puedan proliferar y promover la curación de la herida.

Entre los biomateriales más utilizados para la elaboración de los andamios, están los biopolímeros (polímeros presentes en los seres vivos), como la colágena, el ácido hialurónico, entre otros [4]. La gelatina es un biopolímero derivado de la hidrólisis parcial de la colágena, la cual es el compuesto principal en la matriz extracelular de la piel (dermis). Además, la gelatina presenta propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad [5]. Sin embargo, su resistencia mecánica no es suficiente para soportar el crecimiento de un nuevo tejido. Por este motivo, la gelatina debe ser entrecruzada [6] o mezclada con un polímero biodegradable como el ácido poliláctico [7]. El ácido poli L-láctico (PLLA) es un polímero sintético perteneciente a los poliésteres alifáticos, se ha utilizado ampliamente para la

elaboración de andamios debido a sus propiedades mecánicas [8].

Para la obtención de estos andamios, las técnicas mayormente utilizadas son: El electrohilado y la impresión 3D. La impresión 3D, nos permite crear un modelo del andamio mediante un *software* asistido por computadora (CAD). Las características tridimensionales complejas, tales como poros internos, cortes inferiores y trayectorias tortuosas estrechas, se reducen simplemente a una pila de características bidimensionales comunes, tales como círculos, líneas, y puntos, las cuales son fácilmente impresas por CAD[9]. Por otro lado, el electrohilado es una técnica en la cual se obtienen nanofibras que son capaces de imitar morfológicamente a la fibras naturales que conforman la matriz extracelular presente en la piel [10].

A pesar de los avances realizados en el diseño y elaboración de andamios, éstos aún presentan ciertos retos, uno de ellos es la cicatrización queloide [11]. Sin embargo se desconocen los motivos por los cuáles los andamios no han podido resolver este problema. Aun así, existen estudios en los cuales se recalca la importancia de la morfología del andamio sobre el comportamiento celular [12, 13].

En este trabajo se propone la elaboración un apósito bicapa elaborado de ácido poliláctico y gelatina conjuntando las técnicas de electrohilado e impresión 3-D. Por medio de la impresión 3-D, se propone obtener tapetes de (PLLA) con poros hexagonales, esto debido a que se ha reportado que esta geometría de poro promueve la proliferación celular [14]. Se espera que los resultados obtenidos en este trabajo puedan dar pauta a estudios posteriores, en los cuales se pueda establecer la efectividad de este andamio para la reparación de la dermis.

# CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 Fisiología de la piel

La piel o tegumento y sus derivados constituyen el sistema tegumentario. Éste protege al cuerpo, ayuda a mantener la temperatura corporal y provee información sensorial del medio que nos rodea. Es el órgano más grande tanto en superficie como en peso. En adultos abarca una superficie alrededor de 2 m<sup>2</sup> y pesa entre 4.5 kg y 5 kg ; aproximadamente el 16% del peso corporal total [15]. La piel está compuesta por tres estratos principales: Epidermis, dermis e hipodermis (Figura 1.1).

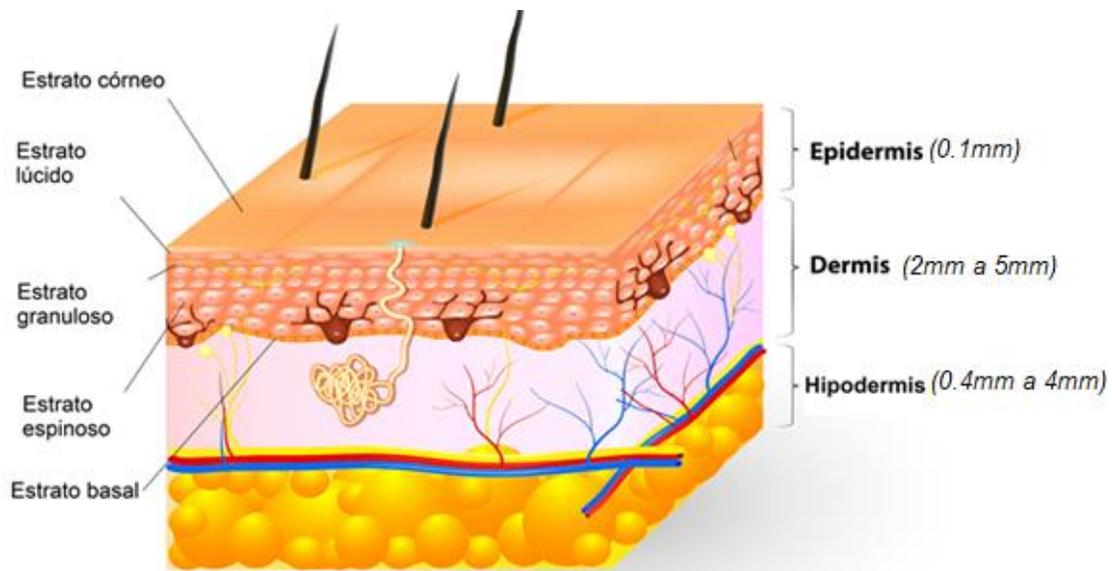


Figura 1.1 Estratos que componen la piel

### 1.1.1 Epidermis

Esta capa externa, es una barrera contra las infecciones y previene la pérdida de agua y electrolitos. Su espesor es de aproximadamente 0.1 mm. La epidermis está compuesta por un epitelio estratificado plano no queratinizado que crece constantemente pero mantiene su espesor normal por el proceso de la descamación. Se identifican 4 estratos bien definidos (Figura 1.2); en caso de la piel gruesa (la cual se encuentra en las manos y las plantas de los pies) puede haber un quinto estrato. Desde la profundidad hasta la superficie estos estratos son: basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo (Figura 1.2) [15], [16].

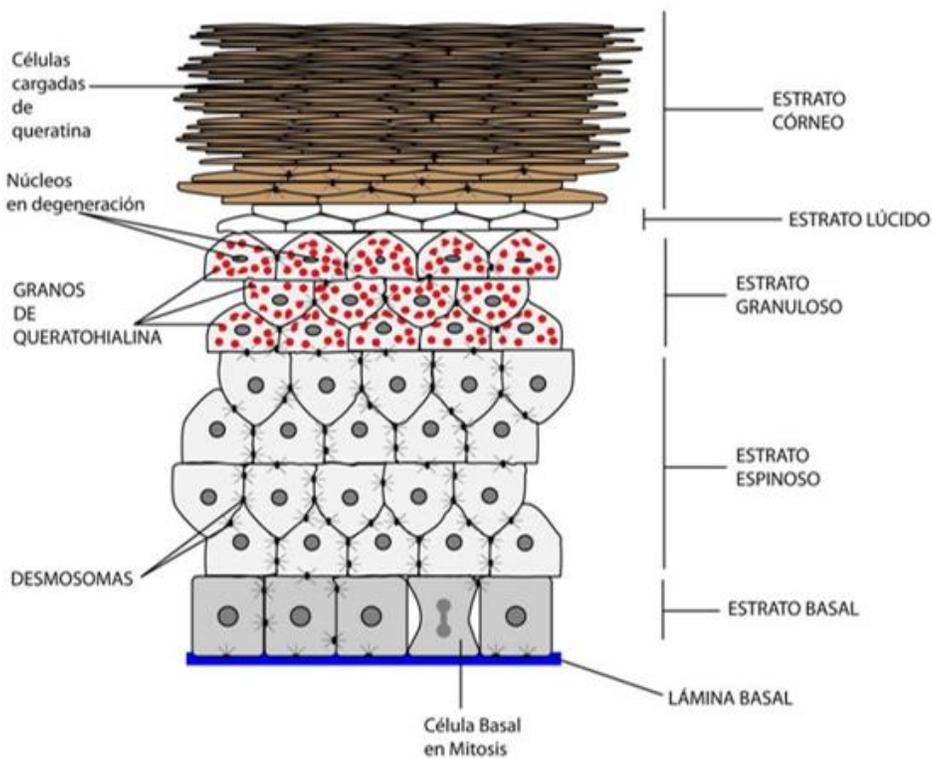


Figura 1.2. Estratos que componen la epidermis

Aproximadamente el 90% de las células epidérmicas son queratinocitos, los cuales están distribuidos en cinco capas y producen la proteína queratina. La queratina es una proteína fibrosa y resistente que protege la piel y los tejidos subyacentes del calor, microorganismos y agentes químicos. También producen gránulos lamelares, los cuales liberan un sellador que repele el agua y disminuye la entrada y la pérdida de agua e inhibe la entrada de materiales extraños [15].

Alrededor del 8% de las células epidérmicas son melanocitos, que derivan del ectodermo embrionario y producen el pigmento melanina. Sus largas y delgadas proyecciones se extienden entre los queratinocitos y les transfieren gránulos de melanina. La melanina es un pigmento de color amarillo-rojizo o pardo-negruzco que le otorga a la piel su color y absorbe los rayos ultravioletas (UV) nocivos. De este modo, protegen el ADN nuclear del daño de la luz UV. A pesar de que los gránulos de melanina preservan efectivamente a los queratinocitos, los melanocitos en sí son muy susceptibles al daño por radiación UV [15].

Las células de Merkel son las menos numerosas de la epidermis. Están localizadas en la capa más profunda de la epidermis, donde toman contacto con prolongaciones aplanadas de neuronas sensitivas [15].

Las células de Langerhans derivan de la médula ósea y migran a la epidermis, donde constituyen una pequeña fracción de las células epidérmicas. Participan en la respuesta inmunitaria desencadenada contra los microorganismos que invaden la piel y son muy sensibles a la luz [15]

#### **1.1.1.1 Estrato basal**

El estrato basal o germinativo es la capa más profunda de la epidermis, la cual consiste en una capa celular de espesor de una sola célula que se apoya sobre la lámina basal (Capa fina que separa el tejido epitelial y las células). Contiene células madre que dan origen a queratinocitos, por división mitótica. Conforme se producen nuevas células en este estrato, los queratinocitos nuevos se desplazan hacia el

estrato siguiente, con lo que inician su proceso de migración hacia la superficie. Este proceso termina cuando la célula se convierte en una célula queratinizada madura que al final se descama de la piel [15, 16].

#### **1.1.1.2 *Estrato espinoso***

Por encima del estrato basal se encuentra el estrato espinoso, el cual tiene por lo menos varias células de espesor. Sus células (los queratinocitos) son más grandes que las del estrato basal. Poseen proyecciones citoplasmáticas o “espinas” que le dan un nombre a este estrato [16].

#### **1.1.1.3 *Estrato granuloso***

El estrato granuloso es la capa más superficial de la porción no queratinizada de la epidermis y consta de una a tres células de espesor. Una característica distintiva de las células de esta capa es la presencia de gránulos oscuros de una proteína llamada queratohialina, que convierte los tonofilamentos en queratina. Estos gránulos son de forma irregular y de tamaño variable [15, 16].

#### **1.1.1.4 *Estrato lúcido***

El estrato lúcido, es considerado por algunos histólogos como una subdivisión del estrato córneo. Este estrato normalmente solo puede observarse bien en la piel gruesa de la yema de los dedos, las palmas de las manos y las plantas de los pies. Consiste en tres a cinco capas de queratinocitos muertos, transparentes y aplanados que contienen grandes cantidades de queratina y membranas plasmáticas engrosadas [16].

#### **1.1.1.5 Estrato córneo**

El estrato córneo está constituido de 25 a 30 capas de queratinocitos muertos aplanados. Estas células se descaman continuamente y son reemplazadas por las células de los estratos más profundos. Las células del estrato córneo son las más diferenciadas de la epidermis. Pierden su núcleo y sus orgánulos citoplasmáticos y se llenan casi por completo por filamentos de queratina. Entre las células hay lípidos provenientes de los gránulos que contribuyen a la impermeabilidad de este estrato.

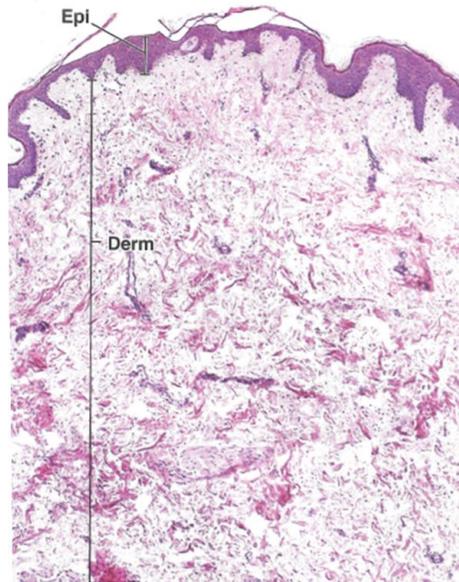
#### **1.1.2 Dermis**

Esta capa interna es responsable de la integridad estructural de la piel. Su espesor es de entre 2 mm y 5 mm. Su función es de proveer a la epidermis con nutrientes. Contiene órganos sensoriales para el tacto, presión, dolor y temperatura, así como vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas, glándulas sebáceas y folículos pilosos [17].

Está compuesta por un tejido conjuntivo denso que provee sostén mecánico, resistencia y espesor a la piel. Ésta región puede dividirse en:

1. Dermis papilar: Consiste en tejido conjuntivo laxo ubicado bajo la epidermis. Está compuesta fibras de colágeno, principalmente compuestas por colágeno tipo I y tipo III. Las fibras elásticas son filiformes y se organizan en una red irregular [16].
2. Dermis reticular: Contiene menos células que la dermis papilar. Esta capa se caracteriza por los gruesos haces irregulares mucho menos delicados. Las fibras colágenos forman líneas regulares de tensión de la piel; conocidas como líneas de Langer. Las incisiones cutáneas

paralelas a las líneas de Langer cuando se curan dejan menos cicatrices menos prominentes [16]. Esta capa de la dermis provee de fuerza y flexibilidad a la piel. La pérdida de este estrato con frecuencia da como resultado una cicatrización excesiva y contracción de la herida [18].



*Figura 1.3 Microfotografía en la que se ven las capas de la piel fina. Se muestra piel teñida con H-E, pueden verse en sus dos capas principales: La epidermis (Epi) y la dermis (derm). La epidermis es la capa más superficial. La dermis posee dos capas: dermis papilar y dermis reticular. El límite entre ambas no es obvio, pero la dermis papilar contiene una mayor cantidad de células que la dermis reticular. Además, los haces de fibras de colágenas de la dermis reticular son más gruesos que los de la dermis papilar (se aprecia en la parte inferior de la foto).*

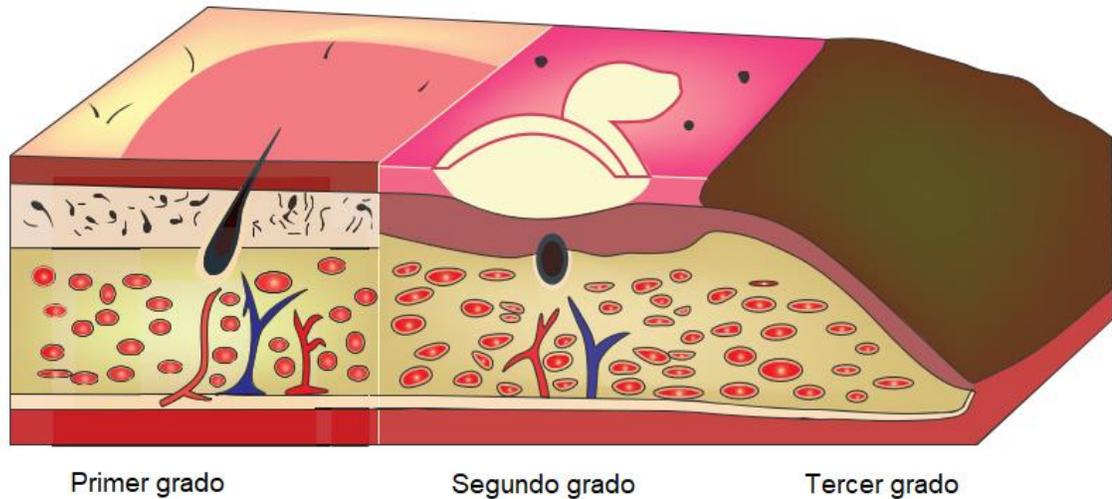
- Hipodermis, su espesor varía de entre 0.4 mm y 4 mm, principalmente compuesto por una cantidad variable de tejido adiposo organizado en lobulillos separados por tabiques de tejido conjuntivo. Está situada a más profundidad que la dermis y equivale al tejido celular subcutáneo o la fascia subcutánea de los anatomistas [16].

## 1.2 Quemaduras

Las quemaduras constituyen uno de los principales accidentes en el hogar y en la industria. La quemadura es una lesión tisular que puede ser causada por distintas agresiones como la energía térmica, eléctrica, sustancias químicas y radiación [19].

De acuerdo a la magnitud del daño que ocasionan, se clasifican en:

- Quemadura de Primer Grado. Afecta sólo la epidermis, con un daño estructural mínimo. La piel se torna eritematosa, de color rojo o rosado brillante, seca y progresivamente pruriginosa. Al aplicar presión sobre una zona aparece una coloración blanquecina que desaparece con rapidez al descomprimir. Es una lesión hiperálgica, puesto que las terminaciones nerviosas están intactas y se estimulan con la vasodilatación, por lo que es importante el tratamiento con analgésicos [20]. Este tipo de lesión puede sanar por sí misma en un lapso de 7 días [19].
  
- Quemadura de Segundo Grado. A su vez se dividen en:
  - a) Espesor parcial superficial: la lesión afecta la epidermis y dermis papilar, que tiene un aspecto rojizo, húmedo y con formación de ampollas. Es también dolorosa, necesitando tratamiento analgésico.
  - b) Espesor parcial profundo: la lesión alcanza la dermis reticular con una profundidad variable pero dejando intacta la epidermis profunda. La superficie tiene un aspecto rojizo plateado, sin formación de ampollas y con hipoalgesia.
  
- Quemadura de Tercer Grado. Afecta a todo el espesor de la piel, con un aspecto variable desde blanquecino hasta amarillo, y con una consistencia acartonada de los tejidos [20].



*Figura 1.4 Representación de los tipos de quemaduras*

### 1.2.1 Tratamiento de las quemaduras

Las quemaduras de primer grado, al afectar únicamente la epidermis, la lesión puede sanar por sí misma en un lapso de 7 días [19]. En quemaduras de segundo grado (espesor parcial profundo) y de tercer grado, las heridas no pueden ser cerradas por el proceso de curación o por sutura. La principal técnica para este tipo de quemaduras es la escisión temprana del tejido necrótico, seguido por un injerto de piel autóloga. Este procedimiento consiste en el trasplante de piel sana proveniente del paciente al sitio afectado (Figura 1.5). Dichos injertos pueden ser de grosor completo (epidermis y dermis) o espesor dividido (epidermis y dermis reticular). Desafortunadamente, en la práctica, la piel del donante es extremadamente limitada para pacientes con quemaduras severas, además del daño causado al sitio donador al obtener el injerto [21].



*Figura 1.5 Injerto de piel autólogo. A) Injerto de espesor parcial tomado de un sitio donador saludable. B) El injerto es mallado para incrementar su área superficial. C) Aplicación del injerto de piel en la herida [22].*

La curación de los sitios donantes puede ser lenta con cicatrices adicionales y posibles trastornos de pigmentación. Los autoinjertos también pueden ser sometidos a un proceso de mallado para aumentar el área de superficie disponible del injerto hasta cuatro veces. Sin embargo compromete la calidad del injerto original y la herida se cura con un patrón de malla irregular, dando como resultado cicatrices severas.

Un método para superar las limitaciones de un autoinjerto es el aloinjerto. Los cadáveres son una buena fuente de aloinjertos, aunque también puede provenir de una persona viva [22]. A pesar de ser una buena opción, existe el riesgo de transmisión de enfermedades [23].

Cuando el injerto proviene de una especie diferente, se le denomina xenoinjerto. Éstos pueden ser usados como un injerto temporal para las heridas. Los xenoinjertos comúnmente utilizados son de origen porcino [22]. Usualmente es utilizado como una cubierta temporal para heridas limpias de segundo grado [23].

## 1.2.2 Secuelas

Debido a que la tasa de mortalidad debido a las quemaduras ha sido reducida, el objetivo está siendo cambiado hacia el control de cicatrices. Las cicatrices hipertróficas y queloides en pacientes con quemaduras causa una morbilidad significativa. Las cicatrices de quemaduras pueden provocar diversas causas de debilitamiento, como dolor, prurito, despigmentación, intolerancia al calor y una limitación de movimiento, debido a la contracción de la cicatriz [21].

La cicatriz hipertrófica es una lesión fibrosa, eritematosa y pruriginosa que se forma dentro de los bordes iniciales de la herida, habitualmente en un área de tensión. Suelen tener un patrón de regresión espontánea y tiene poca tendencia a la recidiva después de la extirpación quirúrgica (Figura 1.6) [24].



*Figura 1.6 Ejemplo de cicatriz hipertrófica*

La cicatriz que loide es una lesión con aspecto tumoral, color rojo o púrpura y a veces, hiperpigmentada (Figura 1.7). Los contornos están bien demarcados pero son irregulares, sobrepasando los límites iniciales de la herida. Puede presentar prurito y dolor [24].



*Figura 1.7 Ejemplo de cicatriz queloide*

### **1.3 Ingeniería de tejidos**

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias biológicas con el objetivo de restaurar, mantener o mejorar la función tisular [25]. Existen tres componentes principales en la ingeniería de tejidos (Figura 1.8)

- Un andamio que provea de una estructura y sustrato para el crecimiento de tejido
- Una fuente de células para facilitar la formación del tejido
- Factores de crecimiento o estímulos físicos que estimulen el crecimiento y diferenciación de las células dentro del andamio

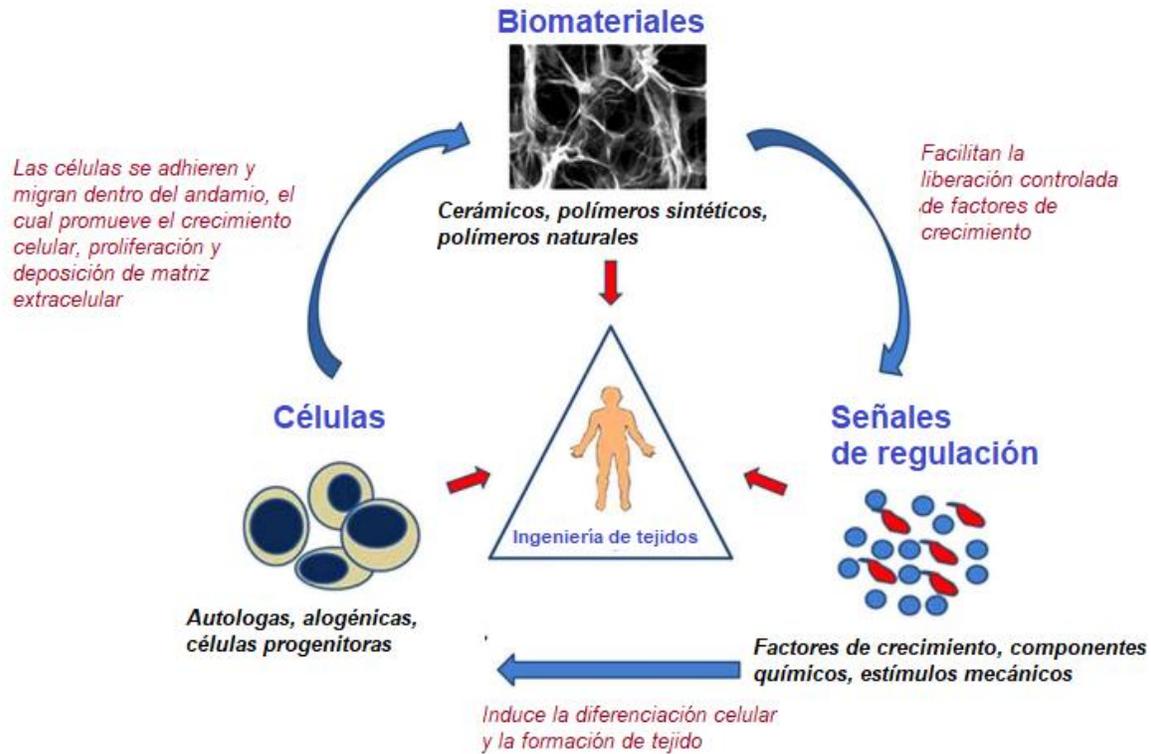


Figura 1.8 Triada de la ingeniería de tejidos

Sin embargo, estos elementos no sólo son importantes de manera individual, también se requiere de la comprensión de sus interacciones para lograr el éxito terapéutico.

Para lograr este fin, se deben combinar armoniosamente materiales y componentes celulares con el objetivo de utilizarlos en tratamientos que garanticen el éxito terapéutico. Los criterios generales para el desarrollo de un tejido incluyen serían , la recapitulación del contexto biológico ( Función de la matriz extracelular, tipos de células y vascularización) y de las señales químicas y mecánicas, así como la incorporación de señales espaciales (cultivo en 3D) [26].

### 1.3.1 Matriz extracelular (MEC)

La matriz extracelular es una red estructural compleja e intrincada que rodea y sustenta las células (Figura 1.9). Dicha matriz contiene una variedad de fibras colágenas y elásticas que están compuestas por tipos diferentes de proteínas estructurales. Además, la MEC contiene varios proteoglicanos, glucosaminoglucanos y glucoproteínas multiadhesivas. Cada célula del tejido conjuntivo, secreta una proporción diferente de moléculas de la MEC, que contribuyen a la formación de muchas organizaciones estructurales diferentes. En consecuencia, las propiedades mecánicas y bioquímicas de la MEC, son características del tejido en el cual se encuentra [16]. La matriz provee de resistencia y flexibilidad al tejido, al igual que tiene la función de ser un filtro selectivo, para controlar el flujo de moléculas entre las células [27]. Además, sus propiedades mecánicas son capaces de influenciar el comportamiento celular. Las células que se encuentran en dicha matriz, son capaces de sensar las propiedades mecánicas, a este proceso se le denomina mecanosensación. De igual modo, también son capaces de responder a estos estímulos mecánicos; a este proceso se le denomina mecanotransducción [28]. Estas señales mecánicas son capaces de modificar la adhesión, migración, proliferación y apoptosis celular [29]–[31].

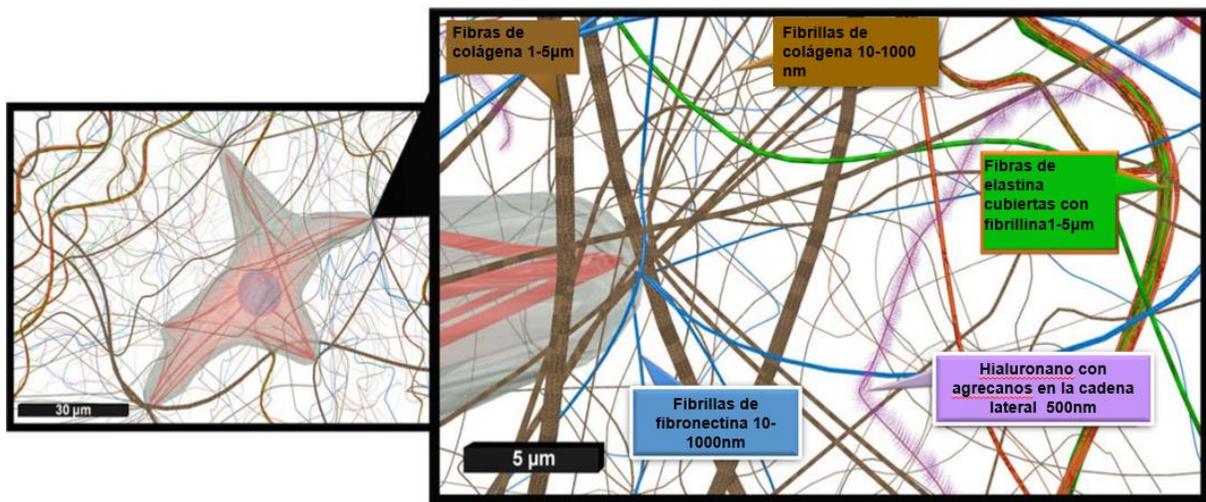


Figura 1.9 Matriz extracelular. La matriz extracelular nativa se compone de componentes que son del orden de nanómetros a unas pocas micras de diámetro, más pequeñas que la propia célula. La mayoría de los elementos de la MEC son fibrosos, produciendo una malla que es constantemente remodelada por células. En los recuadros se señalan algunos de los componentes de la MEC [12].

La célula es capaz de sentir las propiedades de la matriz por medio de receptores. Estos receptores atan la matriz al citoesqueleto, pero su papel va más allá de una simple unión mecánica. Debido a estos receptores, la célula puede responder a las señales mecánicas transmitidas por la matriz. Existen diversas moléculas que funcionan como receptores, pero las más importantes son las integrinas.

### **1.3.1.1 Integrinas**

Las integrinas son las moléculas responsables de transmitir señales mecánicas y moleculares, al igual que son capaces de transformar una señal mecánica a una señal bioquímica y viceversa (Figura 1.10). Son una familia de receptores heterodiméricos transmembranales que se encuentran en la mayoría de las células de los organismos multicelulares. Estos receptores son cruciales para la adhesión de la célula a la MEC. Constan de dos cabezas:  $\alpha$  y  $\beta$  y son capaces de reconocer sitios específicos en la MEC como la secuencia RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico) [28], [29], [32]. En la adhesión celular, la cabeza de las integrinas se adhiere a la MEC, mientras que la cola se encarga de conectarla al citoesqueleto de actina de la célula, formando una placa mediante diferentes proteínas. Estas adhesiones forman diferentes tipos de adhesiones dependiendo de las propiedades de la superficie [33]. Primero se forman complejos de adhesión focales que pueden madurar en estructuras estables, tales como las adhesiones focales, que posteriormente pueden derivar en la formación de adhesiones fibrilares (tipos de adhesión que encuentran en la interacción célula- matriz extracelular) [31].

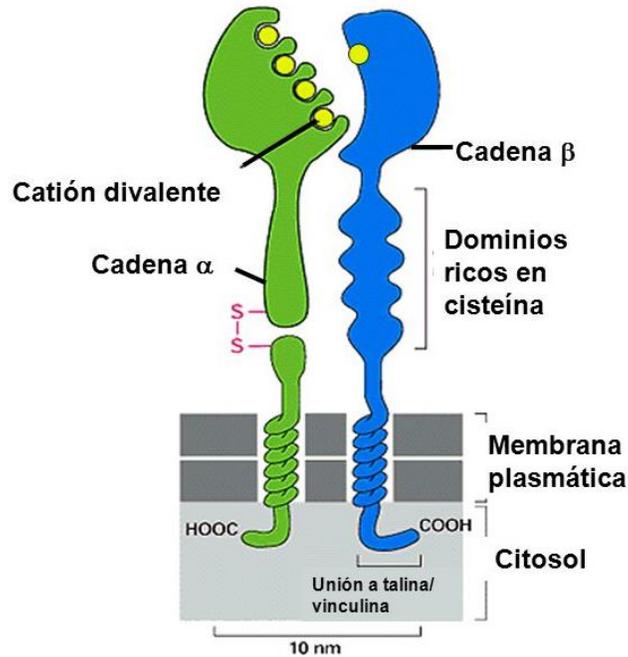


Figura 1.10 Integrina

### 1.3.2 Andamios

Un andamio es definido como un sólido tridimensional diseñado para cumplir con las siguientes funciones:

- Promover la interacción célula-biomaterial, adhesión celular y deposición de matriz extracelular (MEC).
- Permitir el transporte de gases, nutrientes y factores de regulación para permitir la proliferación y diferenciación celular.
- Degradarse aproximadamente a la misma velocidad de regeneración de tejido.
- Causar una mínima cantidad de inflamación y toxicidad[34]

Para que esto sea posible, el diseño de los andamios se basa en imitar lo más posible de manera funcional a la matriz extracelular (MEC) [35].

### **1.3.2.1 Porosidad**

El poro es una estructura fundamental durante el diseño de un andamio. Los poros deben de estar interconectados para permitir el crecimiento de las células, migración y transporte de nutrientes. Los poros muy pequeños restringen la migración celular, mientras que poros muy grandes disminuyen el área de adhesión celular [36]. Existen en la literatura numerosos estudios de andamios con diferente tamaño y forma de poro. Se ha reportado que un diámetro de poro de entre 200  $\mu\text{m}$  y 250  $\mu\text{m}$  incrementa la proliferación de fibroblastos, aunque también se ha reportado que en andamios con tamaño de poro de entre 100  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$  [37].

### **1.3.2.2 Arquitectura de un andamio y adhesión celular**

Una de las características mayormente consideradas al momento de diseñar un andamio, son las propiedades mecánicas del material. Sin embargo, existe una más, la cual es la menos considerada durante el desarrollo de un andamio, la cual es la estructura. En el estudio de *Hogrebe et al* [12], se realiza una comparación entre tres estructuras de andamios : macroporosa, nanoporosa y fibrosa. Por cada estructura, independientemente del material del que está hecho, hay un diferente comportamiento celular. En la estructura macroporosa, dado que el poro es de un tamaño mayor a la célula, este tamaño permite una la difusión de los nutrientes hacia las células, aun así su morfología difiere de la que la célula tiene *in vivo*.

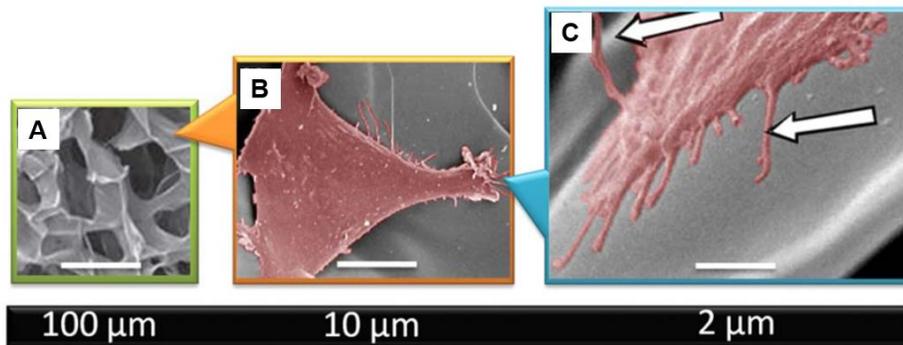


Figura 1.11 Andamio con macroporos de quitosano y gelatina. A) Vista de los poros del andamio. B) Célula de médula ósea sensando el andamio. C) La célula adopta una morfología similar a la de un cultivo plano [12]

En los andamios nanoporosos (Figura 1.12), debido al tamaño del poro, las células son confinadas, dando como resultado a una morfología esférica. Con esta morfología, notamos que la célula no está adherida a ningún sitio.

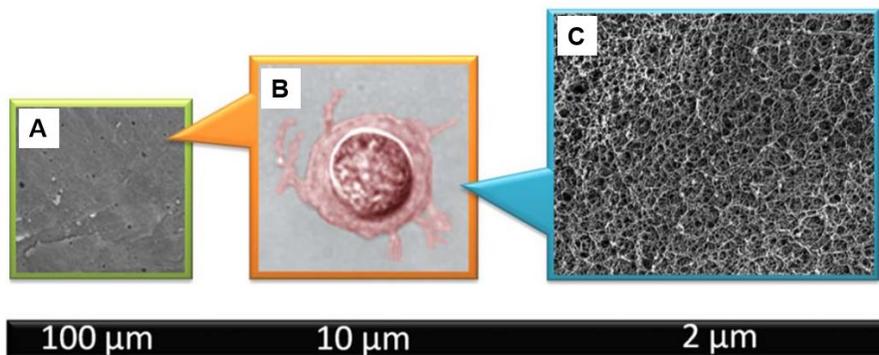


Figura 1.12 A) Andamio de alginato. B) Célula madre con morfología redonda. C) Andamio de alginato y colágena [12].

Por último, los andamios fibrosos, exhiben a una célula con una morfología muy similar a la cual se encuentran in vivo (Figura 1.13). Se han tratado de dar varias explicaciones posibles a este comportamiento. Se reporta que las fibras son capaces de incrementar la transmisión de fuerzas a través de la matriz, incrementando la habilidad de la célula de alargarse. Además, las adhesiones

focales fueron cuantificadas, dando como resultado que las adhesiones eran el doble de largas en las superficies fibrosas que en la superficie uniforme [12, 33].

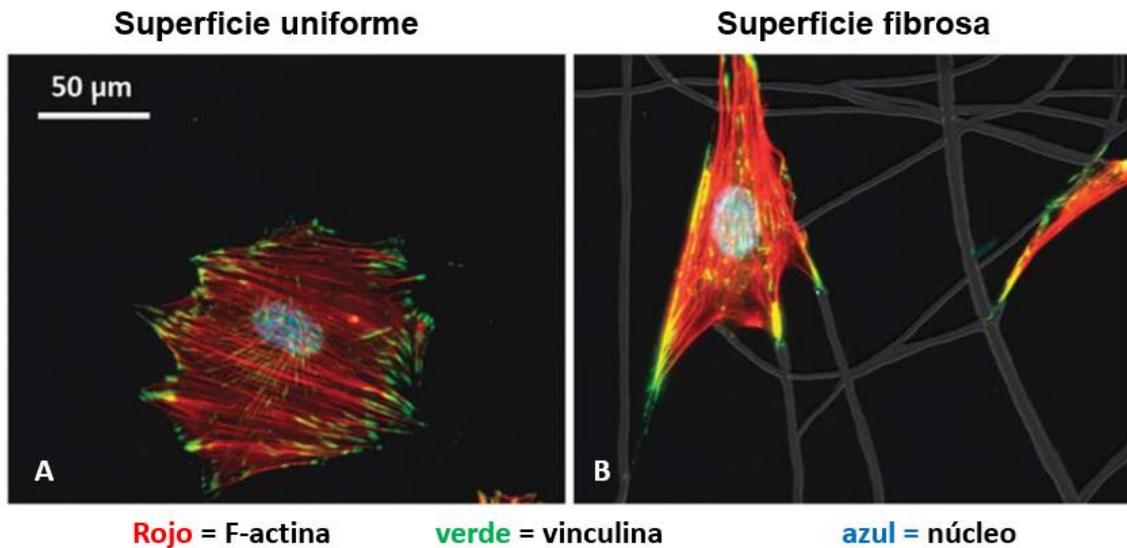


Figura 1.13 Osteoblastos cultivados en polimetilmetacrilato (PMMA) .A) Ésta célula fue cultivada en una superficie plana, por lo cual adoptaron una morfología plana. B) Células cultivadas en fibras de PMMA, las cuales permiten a la célula tomar una morfología similar a la que poseen in vivo. Imágenes modificadas tomadas del artículo de Hogrebe et al [12], pertenecientes al estudio de Ozdemir et al [33]

Como podemos notar, la morfología de la célula es un factor importante para conocer si su respuesta hacia el andamio es la adecuada o no. El citoesqueleto está compuesto por filamentos de actina (microfilamentos), microtúbulos y filamentos intermedios. Los filamentos de actina cumplen una función importante para el anclaje, locomoción celular y como regulador de la expresión genética [16, 38].

Desafortunadamente los estudios con respecto a diferentes tipos de estructuras de andamio son escasos. Uno de ellos es el estudio realizado por *Hutmacher et al* [14], se obtuvieron andamios con poros de forma hexagonal hechos de policaprolactona. A estos andamios se les cultivaron fibroblastos y células osteoprogenitoras. A pesar de que la policaprolactona es un polímero sintético que presenta hidrofobicidad, fueron obtenidos buenos resultados de proliferación celular.

## 1.4 Electrohilado

El electrohilado es una técnica que permite la fabricación de fibras continuas con diámetros de hasta unos pocos nanómetros [39]. Éste ha sido ampliamente estudiado debido a que puede ser aplicado a polímeros naturales, sintéticos, polímeros cargados con cromóforos, nanopartículas u otra clase de agentes activos así como metales y cerámicos [39]. Además, la morfología de fibras es ideal debido a que sus dimensiones resultan ser similares a las de la MEC, motivo por el cual esta técnica ha sido ampliamente utilizada por la ingeniería de tejidos. Se ha reportado que dicha morfología proporciona pistas esenciales para la organización, la supervivencia y la función celular [12, 40].

La técnica consiste en inducir una disolución de polímero a vencer las fuerzas de tensión superficial a la salida de un capilar. Al salir esta disolución, un campo eléctrico es aplicado, el cual al momento de superar la tensión superficial de la disolución, la gota formada se vuelve inestable y un chorro pequeño es expulsado de la superficie de la gota. Esta gota se va alargando conforme la tensión superficial es vencida, formando una estructura cónica denominada cono de Taylor.

A medida que alcanza un objetivo conectado a tierra, este chorro se puede recoger como una red interconectada de fibras finas [41].

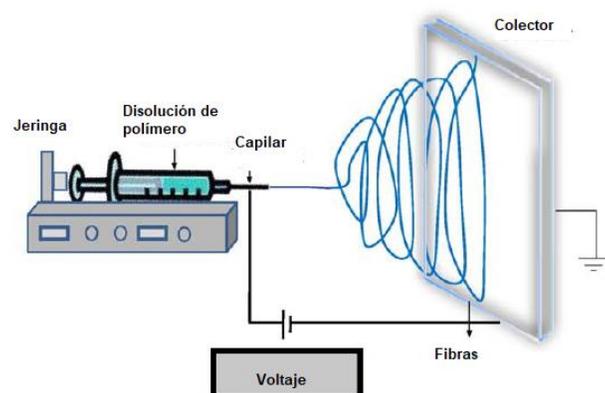


Figura 1.14 Esquema de un equipo de electrohilado [41]

Se ha reportado que las células cultivadas en un andamio electrohilado se adhieren en la superficie del andamio con mínima penetración. Esto puede deberse a la combinación de las distancias estrechas entre las fibras, diámetro de la fibra, tamaño de las células y las propiedades químicas de las fibras. Aunque bajo estas condiciones las células no sean capaces de migrar al interior del andamio, el comportamiento celular es diferente comparado con un cultivo 2D [13].

#### **1.4.1 Parámetros del proceso de electrohilado**

El proceso de electrohilado es gobernado por varios parámetros identificados ampliamente en parámetros de la disolución, parámetros del proceso y parámetros del ambiente. Los parámetros de la solución incluyen: Viscosidad, conductividad, masa molecular y tensión superficial, mientras que los parámetros del proceso incluyen campo eléctrico aplicado, distancia de la punta de la aguja al colector y flujo de la disolución. Cada uno de estos parámetros afecta la morfología de las fibras obtenidas en el proceso de electrohilado. La manipulación adecuada de dichos parámetros permite obtener una morfología y diámetros deseados [42]

#### **1.4.2 Viscosidad**

La viscosidad de la disolución es un parámetro determinante en el tamaño de las fibras y su morfología durante el proceso del electrohilado. En las disoluciones con una viscosidad demasiado baja, no hay una formación continua de fibras, además de que se encuentran defectos en ellas. Estos defectos son glóbulos y gotas (Figura 1.15 A), demostrando que las fibras no están completamente secas. Al incrementar la concentración de la disolución, esta formación de glomérulos disminuye, aunque de igual manera contribuye a aumentar la tensión superficial de la disolución [43]. Para las disoluciones con una viscosidad demasiado alta, la gota de disolución que fluye a través de la aguja, se seca, evitando la formación de fibras[42].

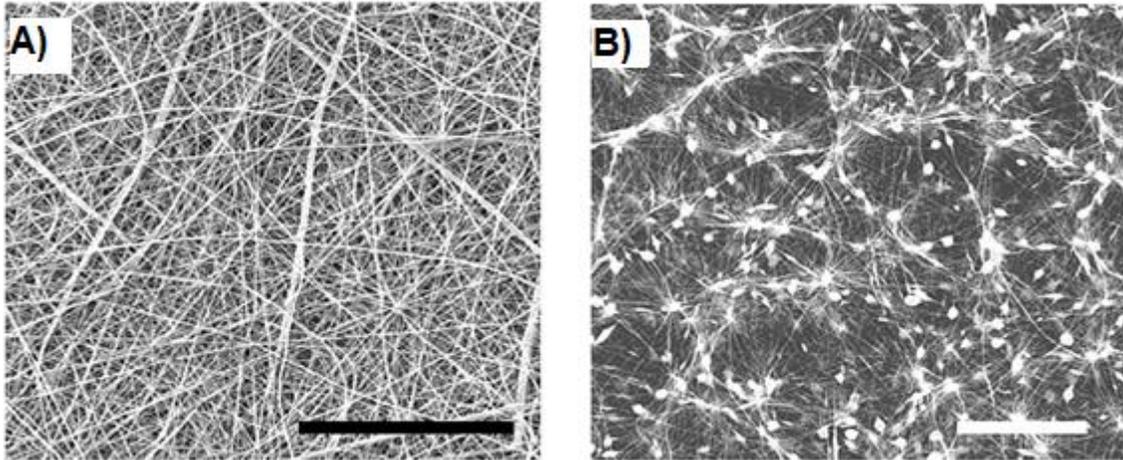


Figura 1.15 A) fibras de una solución de PCL al 9% producidas por electrospinning. B) Fibras electrohiladas utilizando una solución de PCL al 5%; a bajas concentraciones de polímero se producen defectos como las perlas que se observan en la figura

### 1.4.3 Masa molecular

La masa molecular del polímero a utilizar tiene un efecto significativo sobre las propiedades de la disolución, por lo cual afecta la morfología de las fibras. Generalmente disoluciones de polímeros con una alta masa molecular han sido usados en el electrohilado, debido a que proporcionan viscosidades deseadas para la formación de fibras. Polímeros con bajas masas moleculares tienen a formar más glóbulos que fibras, mientras que altas masas moleculares generan fibras con diámetros grandes. En contraste, se ha reportado que la alta masa molecular no es necesaria, ya que se ha reportado que incluso en disoluciones de polímeros con baja masa molecular se han obtenido fibras, esto se debe a la interacción entre las cadenas del polímero, mientras más interacciones tengan, proporciona a la disolución una mayor viscosidad, asegurando la formación de un chorro estable para la formación de fibras[44].

#### **1.4.4 Campo eléctrico aplicado**

Se aplica un campo eléctrico suficiente, para romper la tensión superficial de la disolución, así se iniciará el proceso de electrohilado. A voltajes bajos, la gota es suspendida en la punta del capilar, y el chorro originado del cono de Taylor produce fibras libres de glóbulos. Conforme el voltaje es incrementado, la gota de la disolución disminuye, causando que el cono de Taylor se encoja [42, 43].

#### **1.4.5 Distancia del capilar al colector**

Se ha reportado que la distancia entre el capilar y el colector tiene un efecto sobre diámetro de las fibras. Una distancia mínima es requerida para proporcionarle a las fibras el tiempo suficiente para la completa evaporación del disolvente antes de alcanzar el colector. También es reportado que a distancias cortas se producen fibras planas mientras que a distancias mayores, fibras cilíndricas son obtenidas [42, 43].

#### **1.4.6 Flujo de la disolución**

El flujo influye directamente en la velocidad del chorro al salir de la aguja. Un flujo a baja velocidad es deseable, debido a que le proporciona al solvente el tiempo suficiente para su evaporación. Se recomienda la velocidad mínima, ya que se ha observado que el diámetro de las fibras y el diámetro del poro incrementan conforme aumenta la velocidad de flujo. A flujos demasiado elevados, se obtiene como resultado fibras con perlas o glóbulos como se observa en la Figura 1.15 [42, 43].

## 1.5 Impresión tridimensional 3D

La impresión tridimensional (3D) es una tecnología desarrollada a principios de los años 90 en el Instituto de Tecnología de Massachusetts. Consiste en un proceso de fabricación de objetos en capas, en el cual el perfil 2D en cortes horizontales de un modelo previamente diseñado por computadora, se imprime sobre una nueva capa de polvo mediante la deposición de un aglutinante adecuado. Posteriormente se imprimen perfiles 2D sucesivos sobre una capa recién extendida de polvo hasta completar todo el modelo. Esta técnica requiere de un polvo y un líquido aglutinante que servirá de unión entre las capas [45].

El modelado por deposición fundida (FDM fused deposition modeling en inglés) es un proceso de impresión 3D ampliamente utilizado. Desarrollado por Scott Crump, FDM fabrica un modelo tridimensional por medio de la extrusión de un polímero termoplástico y depositándolo capa por capa (Figura 1.16). Las impresoras con esta tecnología trabajan con filamentos de polímeros, el cual se mueve por medio de rodillos hacia una boquilla extrusora que es un cabezal de impresión. Después el filamento es calentado hacia una temperatura deseada, en la cual el material debe pasar a un estado semifundido (por lo tanto se deben conocer bien sus características térmicas). A medida que el cabezal de impresión rastrea el diseño de cada capa transversal definida horizontalmente, los materiales semifundidos se extruyen fuera de la boquilla y se solidifican en el área deseada. La placa de impresión baja y otra capa se deposita de la misma manera. Estos pasos se repiten para fabricar una estructura 3D en una forma de capa por capa [46].

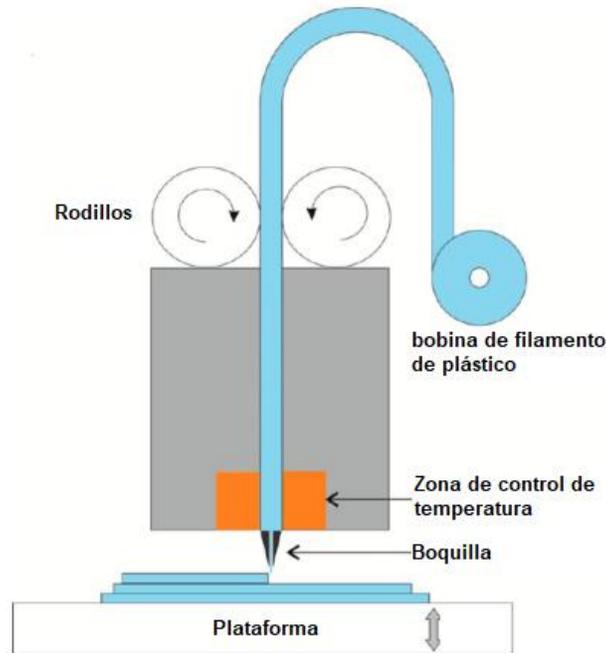


Figura 1.16 Esquema de impresión 3D por FDM [46]

FDM es una herramienta utilizada para la elaboración de andamios. Ha utilizado comúnmente polímeros biocompatibles que tienen bajas temperaturas de fusión de orden de 60°C a 200°C. Se reporta que entre los polímeros aceptados por la FDA (para uso en contacto con células) utilizados para este tipo de impresión se encuentra la policaprolactona (PCL), ácido (polilacti-co-glicólico), polimetil metacrilato (PMMA) y ácido poliláctico (PLA) [9].

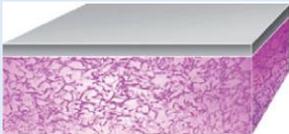
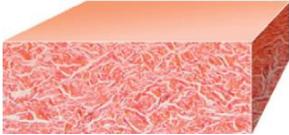
## 1.6 Sustitutos de piel

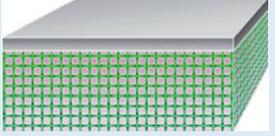
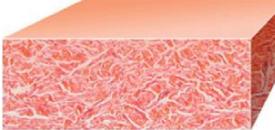
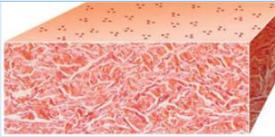
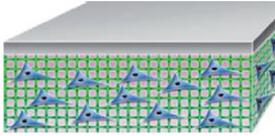
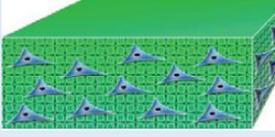
Un sustituto de la MEC de la piel debe actuar como una barrera para los microorganismos, controlar el intercambio de líquidos y poseer durabilidad y elasticidad a largo plazo. Además debe ser histocompatible, apoyar la cicatrización de la herida, carecer de antigenicidad y toxicidad, y ser rentable [47]. Desafortunadamente, a pesar de los numerosos sustitutos de piel que han sido

diseñados con el paso de los años, estos aún presentan varios problemas. Algunos de estos problemas son: falta de una vascularización adecuada, falta de una estructura adecuada, falta de resistencia mecánica, formación de cicatrices, altos costos y contracción en la herida [48, 49].

Los sustitutos de piel pueden ser clasificados según su estructura en: epidérmicos, dérmicos y dermo-epidérmicos (Compuestos). Los sustitutos epidérmicos son eficaces en el tratamiento de heridas crónicas y mejoran la calidad de vida de los pacientes. Los sustitutos dérmicos imitan la histología de la piel en su capa dérmica. La reparación y regeneración dérmica se enfoca al control de la repoblación de fibroblastos y biosíntesis de colágeno para limitar la formación de tejido cicatrizal. Los sustitutos dermo-epidérmicos intentan recrear el ambiente natural de la piel, ya que en su diseño simula la dermis y la epidermis [50].

Tabla 1.1 Comparación de ventajas y desventajas entre algunos sustitutos de piel comerciales [51], [52]

Sustituto	Composición	Ventajas	Desventajas	Esquema
<b>Integra™</b>	Matriz de colágeno de tendón bovino entrecruzado con glicosaminoglicanos	Buen resultado estético y funcional a largo plazo	Procedimiento de dos etapas, infección, hematomas y seromas. Alto costo	
<b>Matriderm®</b>	Dermis bovina liofilizada y no entrecruzada cubierta con alfa-elastina hidrolizada	Un solo procedimiento, promueve la vascularización, mejora la estabilidad y la elasticidad del tejido a regenerar	Se necesita más evidencia científica de la eficacia del procedimiento de una sola etapa	
<b>Biobrane®</b>	Membrana de silicón y nylon impregnada con	Se requiere un solo procedimiento y	Intolerante a una herida contaminada	

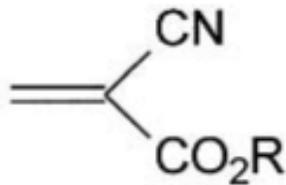
	colágeno de dermis porcina	cubre quemaduras de espesor parcial		
<b>Alloderm®</b>	Dermis humana descelularizada y liofilizada	Acelular, inmunológicamente inerte, provee de una porosidad dérmica natural para la regeneración y vascularización de la herida	Alto costo, riesgo de transmisión de enfermedades y es un procedimiento de dos etapas	
<b>Permacol™</b>	Dermis porcina descelularizada y liofilizada	Buen resultado estético y funcional a largo plazo	Infecciones, hematomas y seromas	
<b>Transcyte®</b>	Malla de nylon cubierta con colágeno porcino. Contiene fibroblastos humanos neonatales	Disponibilidad inmediata, fácil almacenamiento	Temporal	
<b>Dermagraft®</b>	Andamio bioabsorbible de biogelatina la cual contiene fibroblastos humanos	Fácil de manejar, no hay rechazo, útil para heridas crónicas y úlceras diabéticas	Pobre estructura, infecciones y celulitis	

## 1.7 Cianoacrilatos

Los adhesivos de cianoacrilato fueron desarrollados durante la década de los 40's. Su potencial como adhesivo médico se volvió evidente durante la guerra de

Vietnam, donde fue utilizado como hemostático (detener hemorragias) para los soldados heridos [53].

Los cianoacrilatos son de la familia de monómeros líquidos, consisten en alquil esterres o ácidos 2-cianoacrílicos (Figura 1.17). Polimerizan a temperatura ambiente por medio de una reacción exotérmica, liberando calor en el proceso o al contacto con una pequeña cantidad de agua para formar polímeros. Forman fuertes uniones adhesivas con una amplia variedad de sustratos como metal, madera e incluso tejidos. En general, las propiedades físicas de estos adhesivos están relacionadas a la complejidad de su cadena lateral. Los cianoacrilatos con cadenas cortas forman uniones más rígidas y fuertes que los de cadena larga. Estas uniones fuertes son deseadas cuando se requiere formar una interface [54].



**Donde R = Metil, Etil, butil, octil**

*Figura 1.17 Estructura general de un cianoacrilato[23]*

El monómero de cianoacrilato es extremadamente reactivo debido a la capacidad del grupo nitrilo y éster de recibir electrones. Este efecto es causado por el agua, la cual es responsable de la iniciación de la reacción de polimerización [23].

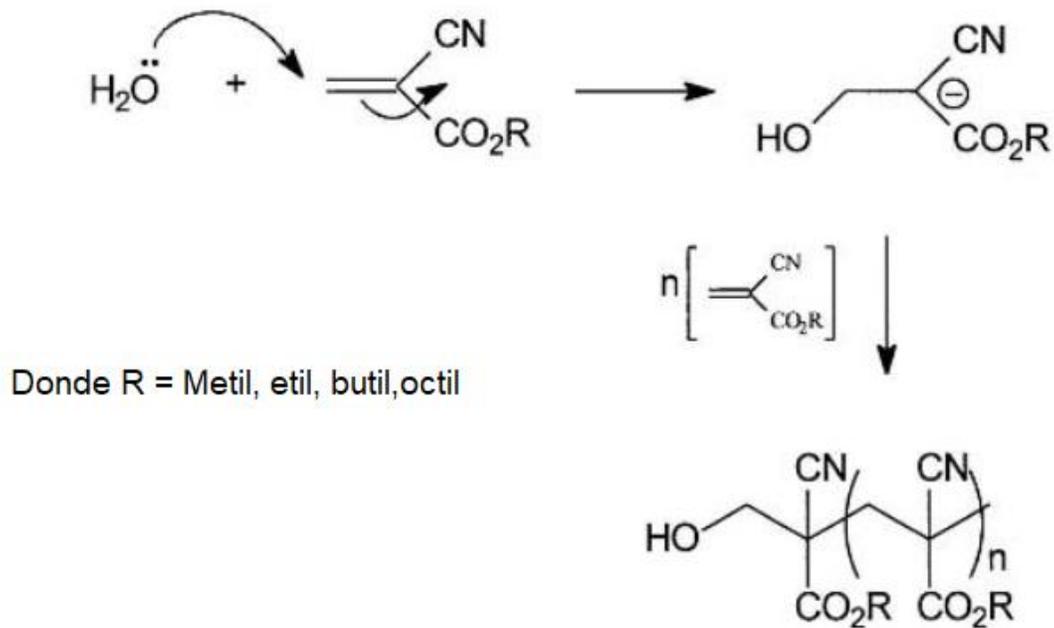


Figura 1.18 Mecanismo de polimerización de los cianoacrilatos[23].

Se ha propuesto que los cianoacrilatos son tóxicos debido a los productos de su degradación. Otro motivo por el cual se atribuyen sus efectos tóxicos, es la reacción exotérmica que se genera al momento que polimeriza. Se reporta que la toxicidad de un adhesivo comercial reduce su toxicidad considerablemente al ser incubado en media de cultivo durante 24 horas. A pesar de esto, libera sustancias tóxicas durante 2 semanas [55].

La degradación de los cianoacrilatos ocurre debido al grupo metileno en el polímero, el cual es activado por los grupos vecinos que sustraen electrones ( Figura 1.19). El agua en los tejidos induce una hidrólisis vía reacción inversa de Knoevenagel, liberando formaldehído y alquil cianoacetato. La degradabilidad de estos adhesivos se ve disminuida cuando se aumenta el tamaño de un grupo lateral como resultado del impedimento estérico.

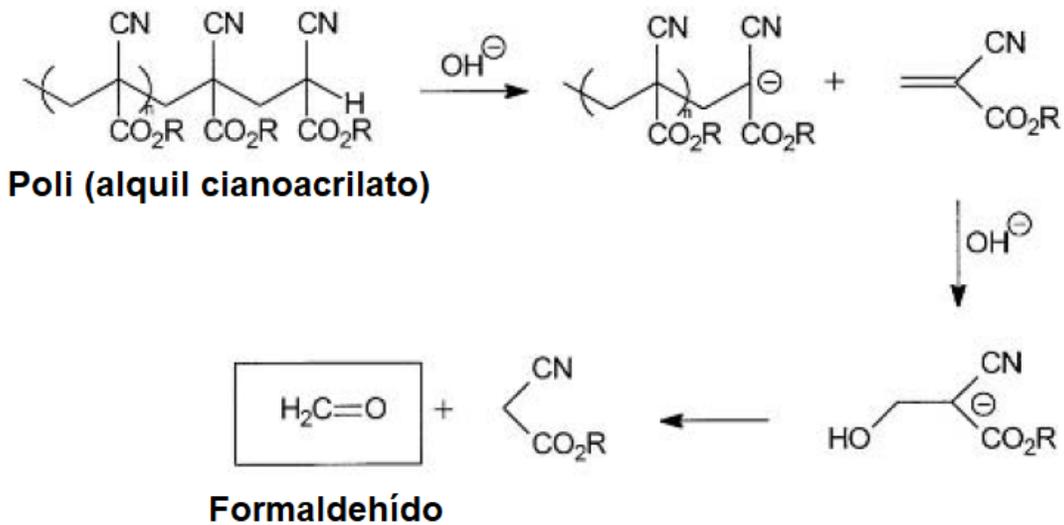


Figura 1.19 Mecanismo de degradación de los cianoacrilatos vía reacción inversa de Knoevenagel[23].

Se ha propuesto también un mecanismo alternativo de degradación, donde los cianoacrilatos son degradados por hidrólisis del grupo éster para producir ácido cianoacrílico y alcohol (Figura 1.20).

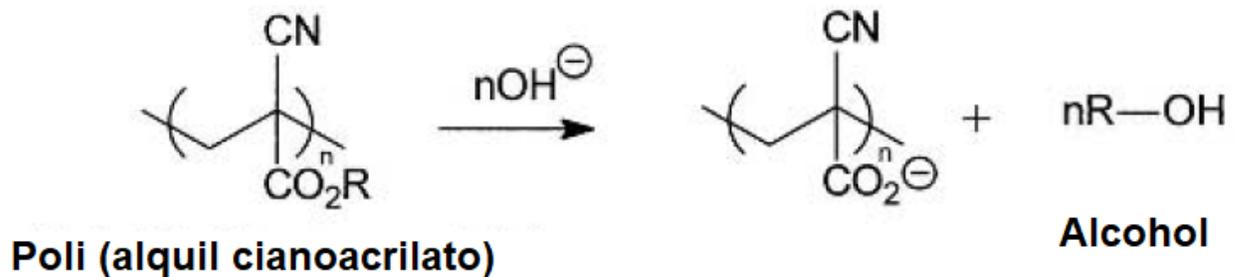


Figura 1.20 Degradación de cianoacrilatos por medio de hidrólisis[23].

A pesar de que se produce formaldehído durante su degradación, es posible que los niveles liberados *in vivo* sean lo suficientemente bajos para ser procesados por el metabolismo de los tejidos [23].

## 1.8 Ácido poliláctico (PLA)

El ácido poli L-láctico es un poliéster alifático biodegradable y biocompatible y aprobado Food and Drug Administration (FDA). Se obtiene de fuentes renovables como la caña de azúcar y el almidón de maíz [56, 57]. La degradación de dicho polímero ha sido estudiada en animales y humanos para aplicaciones médicas como implantes suturas y materiales para liberación controlada de fármacos. En este ambiente, el PLLA es inicialmente degradado por hidrólisis y los oligómeros formados son metabolizados por las células [58].

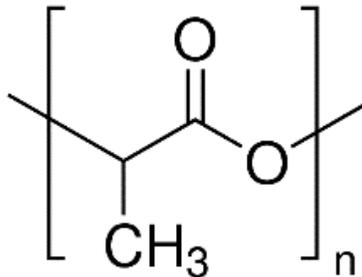


Figura 1.21 Ácido poliláctico (PLA)

El ácido láctico tiene dos configuraciones: ácido D-láctico y ácido L-láctico. Las propiedades del PLLA, por lo tanto, dependerán de la proporción en la que ambos se encuentren. Dependiendo de la quiralidad de los monómeros (L, D o mezclada), el PLLA se clasifica en PLLA, PDLA Y PDLLA. Exhibe una temperatura de transición vítrea de alrededor de 58°C, la cual varía dependiendo de su masa molecular y pureza (mezcla de los enantiómeros L y D). La temperatura de fusión también varía de acuerdo a su pureza óptica. El valor máximo obtenido para esta temperatura, es alrededor de 180°C. [39, 40].

### 1.8.1 Modificaciones superficiales



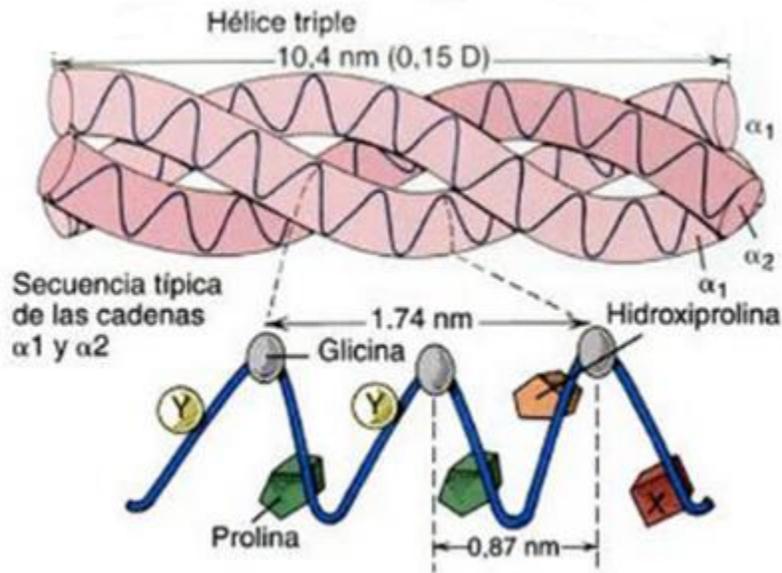


Figura 1.23 Diagrama que ilustra una fibra de colágeno. La molécula de colágeno es un hélice triple compuesta por tres cadenas  $\alpha$ . Cada tercer aminoácido de una cadena  $\alpha$  es una glicina. La posición  $x$  que sigue a la glicina, con frecuencia corresponde a una prolina y la posición  $Y$  que precede a la glicina, con frecuencia corresponde a una hidroxiprolina [16].

La gelatina se obtiene a partir de la hidrólisis del colágeno. Durante este proceso, la estructura del colágeno es desnaturalizada. Existen dos tipos de gelatina: Tipo A y B, producidas a partir de un tratamiento ácido o alcalino respectivamente [64]. Debido a que la gelatina proviene del colágeno, su composición de aminoácidos es similar a la del colágeno. La transformación de colágeno a gelatina, conlleva a cambios en la composición de varios aminoácidos. El proceso alcalino transforma la glutamina a ácido glutámico y la asparagina a ácido aspártico. En consecuencia, la proporción de ácido aspártico y ácido glutámico es mayor en la gelatina tipo B que en la tipo A [64].

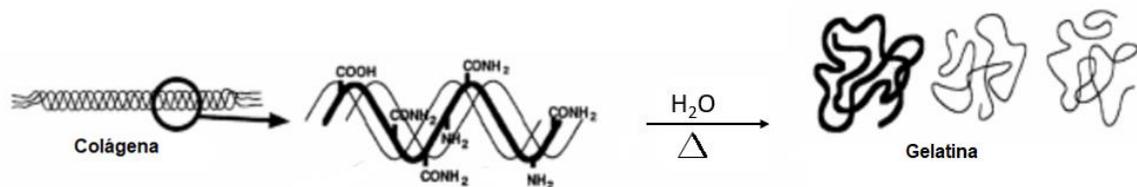


Figura 1.24 Desnaturalización del colágeno para producir gelatina[65]

Otra de las diferencias es su punto isoeléctrico (IEP). El punto isoeléctrico es el pH en el cual la molécula tiene carga neta cero. Aunque tenga sus grupos ionizados, la suma de las cargas positivas y negativas es igual a cero. Las gelatinas tipo A (tratamiento ácido) presentan un IEP que oscila entre 6 – 9.5. Las gelatinas tipo B (tratamiento alcalino) tienen un IEP que oscila entre 4.5 – 5.6 [63].

*Tabla 1.2 Propiedades de la gelatina tipo A [66]*

Polímero	Temperatura de descomposición (°C)	Módulo de Young (GPa)	Elongación (%)
<b>Gelatina</b>	~269	0.2	20.7

La gelatina es un biopolímero ampliamente utilizado para elaborar andamios debido a su bajo costo, alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Además, la estructura de la gelatina, contiene la secuencia de aminoácidos RGD (Arginina, glicina y ácido aspártico), la cual es crucial como sitio de reconocimiento para las integrinas [67].

### 1.9.1 Insolubilización de las fibras de gelatina

A pesar de las ventajas que presenta la gelatina, es necesario estabilizarla debido a su falta de estabilidad en medio acuoso, para lo cual se ha recurrido al entrecruzamiento. Un agente entrecruzante, interconecta las moléculas del polímero, incrementando sus propiedades mecánicas y su estabilidad [68].

Existen varios tipos de agentes entrecruzantes y técnicas de entrecruzamiento, estas son utilizadas dependiendo del tipo de biopolímero a entrecruzar. Entre la variedad de entrecruzantes químicos, el glutaraldehído es ampliamente utilizado debido a su bajo costo, puede reaccionar tanto con proteínas como carbohidratos y

posee una alta reactividad [68], [69]. Durante el proceso de entrecruzamiento de la gelatina con glutaraldehído, los grupos aldehído reaccionan con los grupos amina de la lisina o hidroxilisina presentes en la gelatina, formando una base de Schiff (imina). Sin embargo, el glutaraldehído es altamente tóxico en altas concentraciones. Utilizándolo a bajas concentraciones y lavando los andamios después de su uso, la citotoxicidad es reducida a valores no dañinos para el tejido receptor [70].

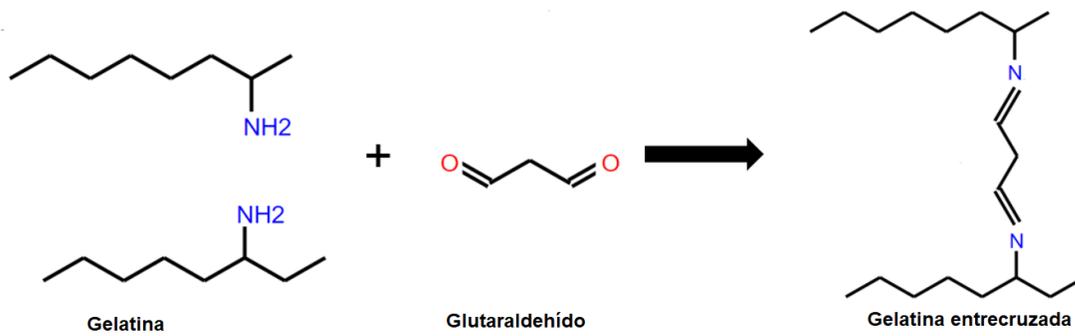


Figura 1.25 Reacción de entrecruzado de la gelatina con el glutaraldehído para formar iminas

# HIPÓTESIS

Es posible obtener un andamio bicapa constituido por una capa de fibras de gelatina electrohiladas y una de ácido poliláctico (PLLA) hecha por impresión 3D, de manera que sea compatible biológicamente.

## OBJETIVOS

### 1.10 Objetivo general

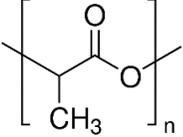
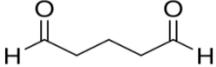
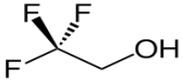
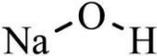
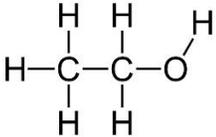
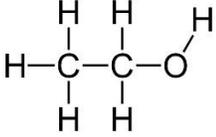
Obtener y caracterizar fisicoquímica y biológicamente andamios bicapa elaborados con una capa de ácido poliláctico (PLLA) y una capa gelatina tipo A, utilizando dos técnicas: impresión 3D y electrohilado respectivamente.

### 1.11 Objetivos específicos

- Diseñar e imprimir un andamio con morfología de poro hexagonal
- Obtener y entrecruzar andamios de gelatina por medio de electrohilado.
- Elaboración y caracterización físicoquímica y biológica de los andamios bicapa

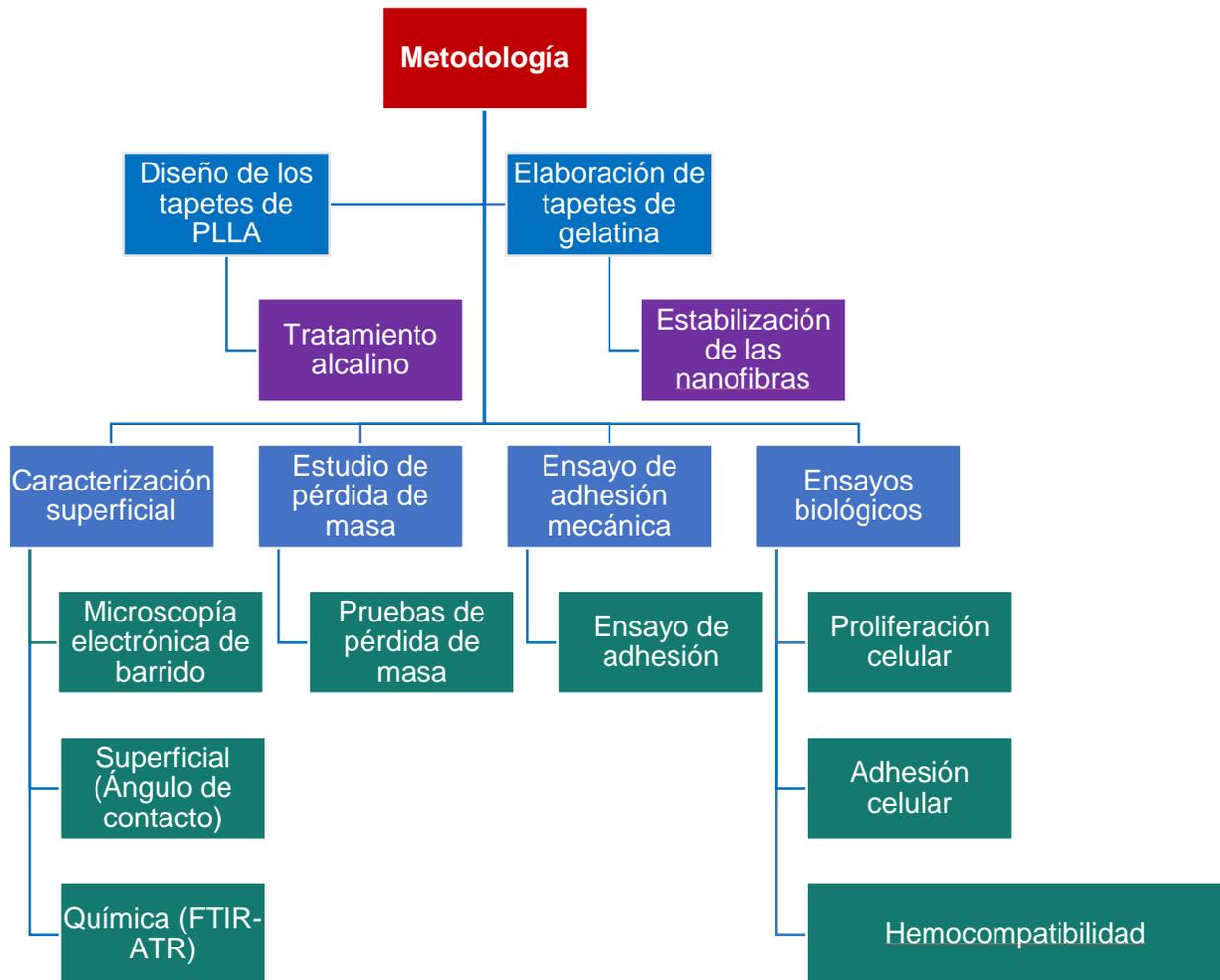
# CAPÍTULO 2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

## 2.1 Materiales

Material	Masa molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Marca	Pureza	No. Catálogo	Estructura
PLLA		160-170°C		Makerbot®	Filamento		
Gelatina tipo A	50 000-100 000			Sigma Aldrich		G2500	
Glutaraldehído	100.12		101	Sigma Aldrich	25 % en agua	G6257	
2,2,2-Trifluoroetanol	100.04		77-80	Sigma Aldrich	>99 %	T63002-500g	
Hidróxido de sodio	40			Macron		7708-06	
Etanol	46.07			Jalmek	95%		
Etanol anhidro	46.07			J.T. Baker	99.95%	9000-02	
Medio de cultivo modificado de Dulbecco (D-MEM)				Caisson	Alto en glucosa Con L-glutamina Sin rojo fenol Sin bicarbonato de sodio	DMP07-10LT	

Suero bovino fetal							
Bicarbonado de sodio	84.007			Sigma Aldrich			$\text{Na}^+ \text{ } ^-\text{O}-\text{C}-\text{OH}$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{O}$
Tripsina 1x				Gibco	Con EDTA tetrasódico Sin calcio Sin rojo fenol	1256302 9	
Fosfato buffer salino (PBS)	pH 7.4 a 24°C NaCl – 0.138 M KCl – 0.0027 M Sigma Aldrich			Sigma Aldrich	pH 7.4 a 24°C NaCl – 0.138 M KCl – 0.0027 M Sigma Aldrich	P3813-10pack	

## 2.2 Metodología



## 2.3 Diseño del andamio para la impresión 3D

Para poder hacer uso de la impresora, se procedió a realizar un diseño por medio del software “Creo Parametric” de la compañía PTC®. Este software es especializado para realizar bocetos de objetos tridimensionales. Dicho programa permite exportar los diseños a un archivo con formato “STL” (estereolitografía). Posteriormente se convirtió a un archivo con extensión “X3g”, por medio del software Makerbot®. Para este caso, fueron hechos diseños con poros hexagonales, con un diámetro aproximado de entre 100µm y 300µm, considerando lo reportado en la literatura [14].

Para la elaboración del diseño, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros

- Largo y ancho de la fibra
- Espesor de la fibra
- Forma del poro
- Distancia entre fibras

Además de estos parámetros para la elaboración del diseño, se realizaron pruebas con 3 boquillas con diferente diámetro: 200 $\mu$ m, 300 $\mu$ m y 400 $\mu$ m. Se utilizaron anchos de barra con las mismas dimensiones de la boquilla. Para el espesor de la barra, se utilizó el valor de 100 $\mu$ m, debido a que es el valor mínimo permitido en el software de Makerbot®. La distancia entre fibras fue de 0.40mm para obtener un poro de 200  $\mu$ m. En el caso de la boquilla de 400  $\mu$ m, se tomaron dos distancias de fibra, de 0.40 mm y de 50 mm, esto para obtener un diámetro de 200  $\mu$ m y 300  $\mu$ m respectivamente. Estos diseños fueron hechos con el objetivo de obtener una temperatura apta para la impresión del polímero.

Para poder elaborar el diseño con una forma de poro hexagonal, se utilizaron tres capas de líneas. La primera capa está compuesta con fibras inclinadas a 120°, la segunda capa se compone por fibras inclinadas a 60° y la última capa son fibras a 90°. Al finalizar las capas de líneas, el diseño fue cortado mediante la herramienta soldificar, utilizando 4 planos para obtener un cuadrado de 1cm<sup>2</sup>.

### **2.3.1 Impresión 3D**

Los parámetros que se tomaron como referencia se encuentran reportados en la página de Makerbot®.

Tabla 2.1 Parámetros para la impresión

<b>Parámetros.</b>	<b>Datos.</b>
<b>Temperatura de extrusión.</b>	190°C – 220°C
<b>Temperatura de la Placa de impresión.</b>	Sin temperatura
<b>Velocidad de impresión.</b>	150mm/s.

Se utilizó filamento de PLLA de la misma empresa, el cual tiene un diámetro de 1.75mm.

### 2.3.2 Tratamiento alcalino

Este tratamiento fue utilizado para mejorar la hidrofiliidad del PLLA. Para esto se realizó el siguiente procedimiento reportado por *Yang et al* [71]:

- Se preparó una disolución 0.25M de hidróxido de sodio (NaOH)
- En un vaso de precipitado se preparó una mezcla de etanol con la disolución de NaOH (v/v= 1/1).
- Los tapetes fueron dejados en la disolución durante 6 horas a 22°C.
- Posteriormente fueron lavados con agua destilada. Fueron inmersos en el agua 3 veces durante 10 minutos. Después fueron secados al vacío a 25°C.

## 2.4 Electrohilado de las fibras de gelatina

Para elaborar las fibras de gelatina, se utilizó trifluoroetanol (TFE). La gelatina fue disuelta en TFE a una concentración al 10% (m/v). Las disoluciones fueron mezcladas con agitación magnética durante 24 horas, a temperatura ambiente (25°C) y fueron colocadas en jeringas de 10ml [6].

Se tomaron como referencia los siguientes parámetros reportados en la Tabla 2.2:

Tabla 2.2 Parámetros de referencia para el equipo de electrohilado [72]

Voltaje (kV)	Distancia al colector (cm)	Rapidez de inyección (ml/h)	Diámetro interior de la aguja (mm)
10	15	0.8	0.9

## 2.5 Insolubilización de las fibras de gelatina

El proceso de insolubilización por entrecruzamiento se realizó de la siguiente manera:

1. Las muestras fueron colocadas en un desecador, junto con un vial que contendrá 10ml de una disolución de glutaraldehído al 25% (m/m) en agua.
2. El desecador se selló utilizando una bomba hasta alcanzar un vacío parcial (~75mm de Hg), a una temperatura de 22°C, las muestras permanecieron en el desecador durante 6 horas para ser entrecruzadas con los vapores del glutaraldehído (GTA).
3. Después del tiempo de exposición, el desecador se abrió en una campana de extracción durante una hora para eliminar parte del exceso de GTA.
4. Posteriormente se extrajo el vial con la disolución de GTA y las muestras fueron colocadas nuevamente en el desecador para secar con vacío durante 1 hora y así remover parte del exceso de GTA presente en la muestra[73].
5. Para eliminar por completo el GTA, los tapetes fueron lavados en agua destilada sobre una charola de teflón. El exceso de agua fue removido con una jeringa y fueron secados a temperatura ambiente durante 4 horas.

## **2.6 Elaboración de la interfaz**

Para la elaboración de la interfaz entre ambas fases se plantearon dos maneras

- Depositar las nanofibras de gelatina sobre los soportes de PLLA utilizando el electrohilado.
- Utilizando un adhesivo (2 etil - cianoacrilato).

### **2.6.1 Deposición de fibras sobre el diseño de poro hexagonal**

Para evitar el uso de algún aditivo, se utilizó el electrohilado para depositar las fibras sobre el diseño de PLLA. Para esto se idearon diferentes estrategias descritas a continuación.

- La primera estrategia, fue colocar el diseño de PLLA sobre la Placa colectora. La con el objetivo de mantener la impresión en contacto con la Placa colectora.
- La placa colectora fue cubierta con parafilm, dejando libre el área donde fue colocado el tapete de PLLA (área de 1 cm x 1 cm).
- Se utilizaron filamentos de cobre a los lados del tapete de PLLA.
- Utilizando un cautín, se soldaron varias piezas de filamentos de cobre, con estos filamentos, los poros del tapete del PLLA fueron atravesados y conectados a tierra.
- En última instancia, se utilizó pintura de plata para volver al PLLA conductor. Se utilizó una gota de pintura de plata en el centro del tapete de PLLA y de igual manera se pintó todo el tapete de PLLA.

## 2.6.2 Adhesivo cianoacrilato

Para adherir ambos tapetes, se utilizó una brocha para cubrir el tapete de PLLA con adhesivo y posteriormente se colocó el tapete de gelatina.

## 2.7 Caracterizaciones

### 2.7.1 Caracterización morfológica

Las caracterizaciones morfológicas fueron realizadas a las siguientes muestras:

- Tapetes de PLLA
- Tapete de gelatina sin entrecruzar
- Tapete de gelatina entrecruzada
- Corte transversal de los andamios bicapa.
- Fibroblastos sembrados en las siguientes muestras :
  - Andamio bicapa PLLA-Gelatina
  - Tapete de PLLA
  - Andamio bicapa de PLLA (con tratamiento) – gelatina
  - Tapete de PLLA (con tratamiento) (véase 2.7.6.2 *Adhesión celular*)

1. Previamente, las muestras fueron recubiertas, con una fina capa de partículas de oro, durante 60 segundos, para hacer a las muestras conductoras y poder observar su morfología en el microscopio electrónico.
2. Se tomaron las imágenes de la superficie del andamio mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM) marca JEOL JSM-6360LV, a un voltaje de aceleración de 20 kV y diversas ampliaciones de acuerdo a la escala de las fibras para lograr una mejor visualización.

### **2.7.1.1 Distribución de diámetros**

La medición del diámetro de las fibras y su distribución, se llevó a cabo mediante un método manual, utilizando el programa de análisis de imagen “*ImageJ*” aplicándolo a las imágenes obtenidas por SEM, de la siguiente manera:

1. Primero, se correlacionó el valor de la barra de escala en ( $\mu\text{m}$ ) de la micrografía con el número de pixeles que detecta el programa.
2. Se trazó una rejilla para orientarse en la imagen, de  $5\mu\text{m}^2$  por división.
3. Se convirtió la imagen a una imagen binaria, para tener mayor contraste.
4. Se realizó un aumento de entre 4000 y 5000 ampliaciones.
5. Se seleccionó una fibra dentro del primer cuadro de la rejilla y se midió la distancia entre ambos lados, perpendicular al eje de la fibra y los datos fueron guardados.
6. El paso 5, se repitió moviéndose a través de la rejilla, hasta que un total de 100 mediciones fueron obtenidas de entre al menos 3 micrografías.
7. Finalmente, el histograma de distribución de diámetros, es graficado mediante el programa “*Kaleidagraph*”.

### **2.7.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR)**

Este tipo de estudio se realizó a las muestras con el fin de visualizar el cambio químico causado por el tratamiento alcalino:

- Diseños de PLLA sin el tratamiento alcalino
- Diseños de PLLA después del tratamiento alcalino

Esta prueba se llevó a cabo mediante la técnica de reflexión total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflectance). Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo (Nicolet 8700), en el cual se colocaron los andamios en un cristal seleniuro de zinc, en un intervalo de  $600\text{cm}^{-1}$  a  $4000\text{cm}^{-1}$ , realizando un total de 60 barridos y con una resolución de  $4\text{cm}^{-1}$ .

### **2.7.3 Ángulo de contacto**

Esta técnica fue utilizada para poder verificar un cambio en los tapetes de PLLA después del tratamiento alcalino. Para poder utilizar esta técnica, se realizaron películas con el filamento de PLLA. Para esto se realizó una disolución de PLLA en cloroformo al 7% m/v y se dejó en un agitador magnético durante dos horas. Después, la disolución fue vertida en una charola de teflón y colocada en la campana durante 12 horas para la evaporación del disolvente. Una vez obtenidas las películas se realizaron 10 películas de PLLA sin tratamiento y 10 películas de PLLA con tratamiento.

Los ángulos de contacto fueron medidos a  $24^{\circ}\text{C}$ , en un medidor de ángulo de contacto "Tantec's Cam Plus Micro", que utiliza la técnica del semiángulo. Las muestras analizadas fueron:

- Películas de PLLA sin tratamiento alcalino
- Películas de PLLA con tratamiento alcalino

Una gota de agua destilada de  $10\mu\text{L}$ , fue aplicada mediante una micropipeta a muestras de  $5\text{cm}^2$ . Para cada muestra, por lo menos 8 mediciones fueron realizadas en tiempos de 1 a 10 segundos posteriores a la colocación de la gota.

### **2.7.4 Pruebas de pérdida de masa**

Es importante conocer la degradación del andamio debido a los cambios físicos y químicos que puede presentar las estructuras de los polímeros que lo conforman. Los cambios durante la degradación de un polímero pueden ser físicos o químicos y son manifestados dependiendo del tipo de degradación. La pérdida de masa es una de las variaciones físicas observables en la degradación de un polímero. Esta pérdida de masa, puede deberse al rompimiento de las cadenas poliméricas. Al formarse cadenas más cortas, éstas son suficientemente pequeñas para migrar fuera de la estructura del andamio, por lo que la masa original es reducida.

- Las pruebas de pérdida de masa fueron realizadas al andamio bicapa, para ello, se realizaron 5 réplicas por semana y se realizó el siguiente procedimiento:
- Se cortaron muestras de andamio de aproximadamente 1cm x 1cm y fue medida su masa inicial ( $W_0$ ).
- Cada muestra fue colocada en un vial con 5 ml de buffer salino de fosfatos (PBS), que fue renovado cada 8 días para mantener un pH de 7.4, en una incubadora a 37°C.
- Después de 7, 14, 21, 28,35 y 42 días, las muestras fueron lavadas con agua destilada, y el excedente fue eliminado con papel filtro. Se dejaron reposar a temperatura ambiente (25°C) durante 12 horas. Posteriormente fueron secadas en un horno de vacío a 37°C durante 48 horas.
- Finalmente, fue registrada la masa final ( $W_t$ ). El porcentaje de pérdida de masa a un tiempo t se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de pérdida de masa (\%)} = \frac{(W_0 - W_t) \times 100}{W_0}$$

Donde  $W_0$ , es la masa inicial de la muestra y  $W_t$ , la masa después de cada tiempo de observación.

### 2.7.5 Pruebas mecánicas de adhesión

Para realizar esta prueba, se realizó una modificación a la norma ASTM-D3163. Se utilizaron tres distancias para determinar la adecuada, las distancias utilizadas fueron 2.5mm, 2mm y 1.5mm. Para esta prueba se utilizó una máquina de pruebas universal (Autograph AGS-X de Shimadzu). Para realizar las pruebas se elaboraron tres muestras de cada distancia seleccionada. El procedimiento para elaborar las probetas fue el siguiente (Figura 2.1):

- Se tomó un tapete de PLLA y se midió la distancia correspondiente de un extremo al centro
- En el área medida, se agregó el adhesivo con una brocha
- De manera rápida, se colocó el tapete de gelatina sobre el adhesivo adicionado.
- Se dejó secar por 10 minutos, y sobre el tapete de gelatina adherido, se colocó un tapete de PLLA.

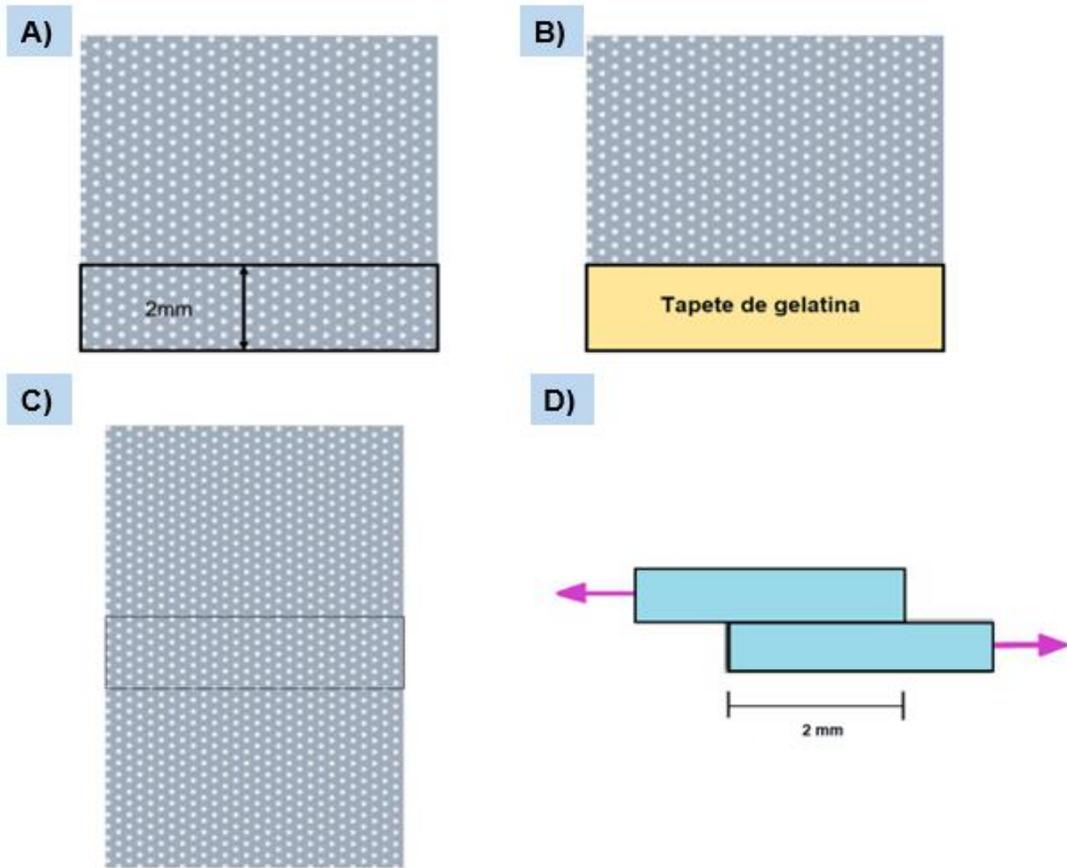


Figura 2.1 Representación gráfica del procedimiento para realizar las probetas para las pruebas mecánicas. A) Medir la distancia de superposición. B) Pegar el tapete de gelatina sobre la distancia medida. C) Pegar el tapete de PLLA. D) Dibujo lateral de la muestra terminada.

- Las muestras fueron realizadas un día antes del ensayo para permitir un secado completo del adhesivo.
- La rapidez de la mordaza en el ensayo fue de 1.3mm/min.

Una vez obtenida la distancia adecuada, se realizaron 30 ensayos.

### 2.7.6 Caracterización biológica

Las células utilizadas fueron fibroblastos donados por la doctora Nayeli Rodríguez Fuentes del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Fueron donadas dos botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con fibroblastos. Para este experimento se preparó medio de cultivo D-MEM al 5% de suero bovino fetal, 1% de antibiótico-antimicótico y 1% de glutamina. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera de aire al 95% y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.7.6.1 Proliferación celular**

#### **2.7.6.1.1 Esterilización de los andamios**

Para realizar el ensayo se seleccionaron las siguientes muestras:

- Andamio bicapa PLLA-Gelatina
- Tapete de PLLA
- Tapete de gelatina
- Andamio bicapa de PLLA (con tratamiento) – gelatina
- Tapete de PLLA (con tratamiento)

Estos andamios fueron seccionados a círculos de aproximadamente 0.5mm de diámetro. Después fueron esterilizados de ambos lados por medio de luz ultravioleta durante 30 minutos por cada lado. Después de ser esterilizados, fueron colocados en una placa de 96 pozos para el ensayo.

#### **2.7.6.1.2 Viabilidad celular**

Una vez preparada la placa con los andamios, se obtuvieron las células del frasco del cultivo para su siembra. Una vez que las células proliferaron a un 80% de confluencia en las botellas de cultivo, la siembra de células a los andamios se realizó de la siguiente manera:

- A cada botella se le agregaron 2 mL de tripsina 1x, ambos frascos fueron introducidos en una incubadora por 5 minutos.
- El contenido de las botellas fue vertido en un tubo cónico de 15 mL. Posteriormente, ambas cajas fueron lavadas con PBS con 1% antibiótico antimicótico para retirar el mayor número de células. El PBS de estos lavados fue vertido en otro tubo cónico de 15 mL.
- Los tubos fueron centrifugados a 1200 rpm durante 10 minutos. Una vez formado el botón celular, el líquido fue decantado y el precipitado fue re-suspendido con 1mL de medio de cultivo. El contenido de ambos tubos fue mezclado para cuantificar la concentración de células.
- Del tubo cónico con células (suspensión celular), se tomaron 20  $\mu$ L y fueron transferidos a un tubo *ependorf*, para poder ser mezclados con 20  $\mu$ L de azul de tripano. Posteriormente se incubó la preparación durante 5 minutos a 25°C, se tomaron 10 $\mu$ L para realizar el conteo de las células *Neubauer*.

Para el conteo de las células se utilizó la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{A + B + C + D}{4}\right) (1000)(Factor\ de\ dilución)$$

Una vez contadas las células, se realizaron los cálculos para que en cada pozo haya un total aproximado de 3000 células. Los fibroblastos fueron cultivados sobre los andamios elegidos con anterioridad. Como control negativo, se utilizaron células en presencia de agua oxigenada, el cual es dañino para éstas, y como control positivo células con medio de cultivo estándar.

Posteriormente la placa se dejó en una incubadora de cultivo por 24 h. Después de este periodo, las células fueron lavadas con PBS y se les sustituyó el medio de cultivo.

Finalmente, para evaluar la proliferación celular se utilizó el kit CCK-8, el cual es una sal de tetrazolio ([2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica]).

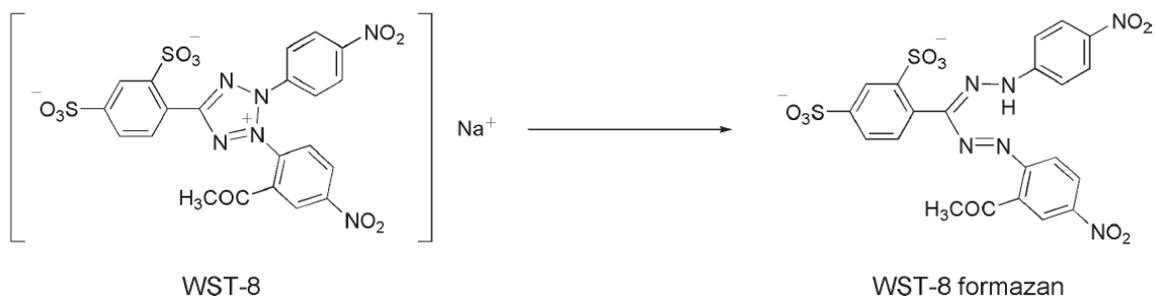


Figura 2.2 Estructura del compuesto WST-8 y su reducción a formazan [74]

Esta sal es reducida por acción de la deshidrogenasa en las células, el cual produce formazan (Figura 2.2), cuyo color es naranja. La cantidad de formazan producido es directamente proporcional al número de células vivas[74].

A cada pozo se le agregó 10 $\mu$ L de esta sal, después la placa fue cubierta en papel aluminio y se dejó en la incubadora. Por último se llevó a un lector de placas CYTATION3 para cuantificar su absorbancia a 450 nm. Finalizada la lectura, todos los andamios fueron teñidos con cristal violeta durante 5 minutos. El exceso de tinte fue retirado con agua destilada, esto se realizó con el objetivo de evidenciar la morfología celular en contacto con los andamios.

### 2.7.6.2 Adhesión celular

Se utilizó la microfotografía electrónica de barrido como método cualitativo para poder observar su morfología, las células fueron cultivadas sobre los andamios y posteriormente fijadas de acuerdo al procedimiento descrito a continuación

Con estos fundamentos, podemos utilizar una microfotografía como método cualitativo para poder definir si la célula está adherida al andamio. Para poder observar su morfología, las células fueron cultivadas sobre los andamios y posteriormente fijadas de acuerdo al procedimiento descrito a continuación.

Para realizar el ensayo se seleccionaron las siguientes muestras:

- Andamio bicapa PLLA-Gelatina
- Tapete de PLLA
- Andamio bicapa de PLLA (con tratamiento) – gelatina
- Tapete de PLLA (con tratamiento)

Estos andamios fueron seccionados a círculos de aproximadamente 0.5mm de diámetro. Después fueron esterilizados y colocados en una placa de cultivo de 48 pozos. La cantidad de células cultivadas en los andamios fue de 10000.

#### 2.7.6.2.1 Fijación de células en los andamios

Para esto se preparó buffer salino de fosfatos (PBS) con un pH de 7.2. Para acidificar la solución se utilizó ácido clorhídrico (HCL) 2N.

#### 2.7.6.2.2 Preparación del fijador

Se preparó una disolución al 4% de paraformaldehído en PBS.

#### 2.7.6.2.3 Cultivo

Una vez obtenida una caja de 25cm<sup>2</sup> con fibroblastos a un 80% de confluencia, las células fueron tripsinizadas y cultivadas sobre los andamios. Se cultivaron 10000 células por cada muestra. El procedimiento fue el mismo utilizado en la sección

#### 2.7.6.2.4 Fijación

Las células fueron cultivadas sobre las muestras (previamente esterilizadas y colocadas en una placa de cultivo de 48 pozos) y se incubaron por 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se añadieron 500µL del fijador a cada muestra. Después la placa fue cubierta con papel aluminio y almacenada a 25°C durante 72 horas.

#### 2.7.6.2.5 Lavado de muestras

Una vez transcurridas 72 horas, se retiró el fijador y las muestras se lavaron con PBS (sin fijador) para eliminar residuos del mismo.

#### 2.7.6.2.6 Deshidratación

Después de lavar las muestras, se procedió a deshidratar las muestras con etanol de manera gradual. Para esto se elaboraron disoluciones de etanol al 30%,50%,70%,85% y 95% (etanol en PBS). El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se añadieron 1000µl de etanol al 30% a cada muestra. Se dejó reposar por media hora.
- Finalizada la media hora, las muestras se lavaron con PBS (sin fijador)
- Después, se añadieron 1000µl de etanol al 50% a cada muestra y se dejó en reposo por media hora.
- Al terminar la media hora las muestras se lavan con PBS (sin fijador) y después se añadieron 1000µl de etanol al 70% a cada muestra, posteriormente las muestras fueron almacenadas a 25°C durante cuatro días.
- Después se continuó deshidratando las muestras con etanol al 85% y al 95%. Esperando una hora por cada disolución y dejando en reposo por 40 minutos.
- Por último las muestras fueron recubiertas de oro para ser visualizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL JSM-6360LV

### **2.7.6.3 Hemocompatibilidad**

Los eritrocitos son células sanguíneas especializadas en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono. Son capaces de realizar esta función gracias a la hemoglobina presente en ellos. En condiciones normales, la vida media de los eritrocitos es de unos 120 días, al final de su ciclo, sucede la hemólisis, la cual es la destrucción de los eritrocitos. Sin embargo, este tiempo puede disminuir debido a la presencia de alguna enfermedad.[16].

Para realizar este ensayo, se obtuvieron 3 ml de sangre de un paciente sano. La sangre fue colectada en un tubo para centrífuga, el cual contenía 500µL de EDTA al 17% como anticoagulante. Después se centrifugó por 10 minutos a 1500rpm. Finalizado el proceso, mediante una micropipeta el sobrenadante (la parte superior de cualquier mezcla después de ser centrifugada) fue retirado, dejando los eritrocitos al fondo del tubo. Después se realizaron los siguientes pasos en condiciones de esterilidad:

- Se realizó una suspensión al 5% con los eritrocitos obtenidos, utilizando como disolvente solución isotónica inyectable estéril.
- Los andamios previamente esterilizados fueron colocados en tubos de ensayo. A estos viales les fueron agregados 5ml de solución salina isotónica y 250µl de la suspensión de eritrocitos.
- Como control negativo y positivo, se colocaron 5ml de solución isotónica y después se agregaron 250µL de la suspensión de eritrocitos al 5% y 5ml de agua destilada y después 250µL de la suspensión al 5% de eritrocitos respectivamente.
- Las muestras y los controles se incubaron durante una hora a 37°C
- Una vez terminado el tiempo de incubación, se tomaron 100µl de cada vial y fueron transferidos a una placa de 96 pozos para su lectura a 410nm. Para calcular el porcentaje de hemólisis se utilizó:

$$\%Hemólisis = A_{muestra} \frac{100}{A_{positivo}}$$

Donde:

- $A$  corresponde a absorbancia
- $A_{muestra}$  corresponde a absorbancia de la muestra
- $A_{positivo}$  corresponde a la muestra con solución salina isotónica

## 2.8 Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía para los resultados de proliferación celular con un nivel de significancia  $P > 0.5$  y utilizando la prueba de Tukey. El software utilizado fue Minitab 16.1 para Windows

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Diseño e impresión de los andamios

El diseño del andamio con una geometría hexagonal de poro, se realizó en una computadora. Con la herramienta “esbozo” se dibujó una línea vertical de 40 mm de longitud. Posteriormente utilizando la herramienta “extruir” se le da volumen al dibujo (grosor y ancho). El grosor utilizado fue de 100  $\mu\text{m}$  y el ancho fue de 400  $\mu\text{m}$ . Con la herramienta “patrón” la barra obtenida fue replicada 40 veces. La distancia utilizada fue de 700  $\mu\text{m}$ , debido a que el programa mide la distancia en la mitad de los dibujos. Obteniéndose una distancia entre las barras de 300  $\mu\text{m}$  ( Figura 3.1 Proceso paso a paso mediante el cual se elaboró el diseño. A) Paso 1, rejilla a 120°. B) Paso 2, rejilla a 60°. C) Paso 3, rejilla a 90°. D) Vista en donde se observan los planos hechos para el corte del diseño.A). Una segunda rejilla fue construida utilizando el mismo procedimiento, con la diferencia de que la línea dibujada fue orientada a 60° respecto a la primera rejilla. Una tercera rejilla se orienta a 60° respecto a la segunda. (Figura 3.1 B). La línea dibujada de la tercera rejilla fue colocada a 90° (Figura 3.1C), una vez creadas las tres rejillas, se obtienen las oquedades hexagonales. Para obtener un andamio cuadrado con dimensiones de 1 cm x 1 cm, se crearon dos planos paralelos al eje X, con una distancia de 1 cm entre ambos y dos planos paralelos al eje Y. con una distancia de 1 cm entre ambos. Por cada plano se utilizó la herramienta “soldificar”, de manera que se corta la sección del diseño para dejarlo uniforme.

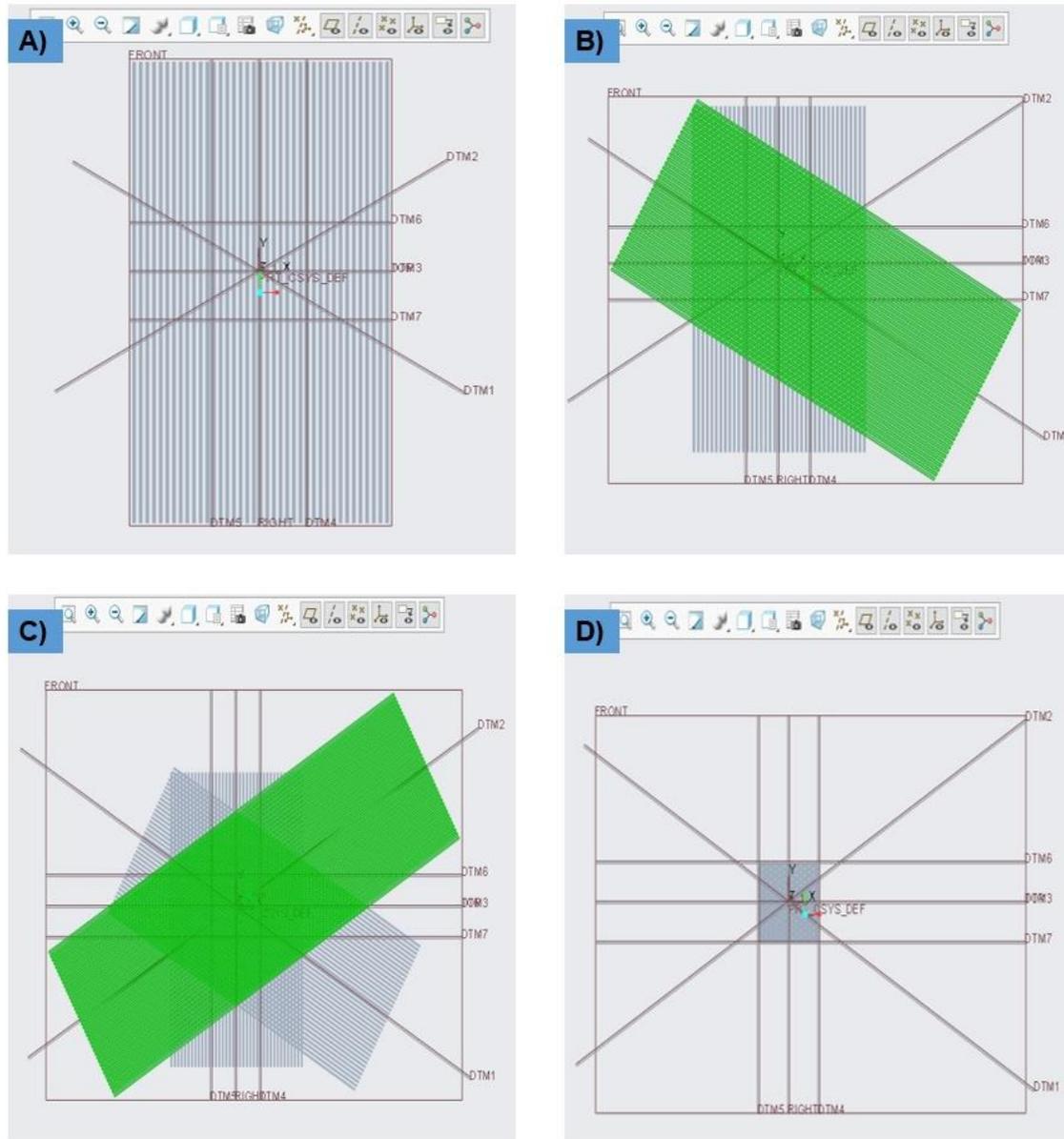


Figura 3.1 Proceso paso a paso mediante el cual se elaboró el diseño. A) Paso 1, rejilla a 120°. B) Paso 2, rejilla a 60°. C) Paso 3, rejilla a 90°. D) Vista en donde se observan los planos hechos para el corte del diseño.

En la Figura 3.2 A y B, se aprecian dos diferentes vistas, en donde podemos distinguir el espesor del diseño y el poro hexagonal obtenido.

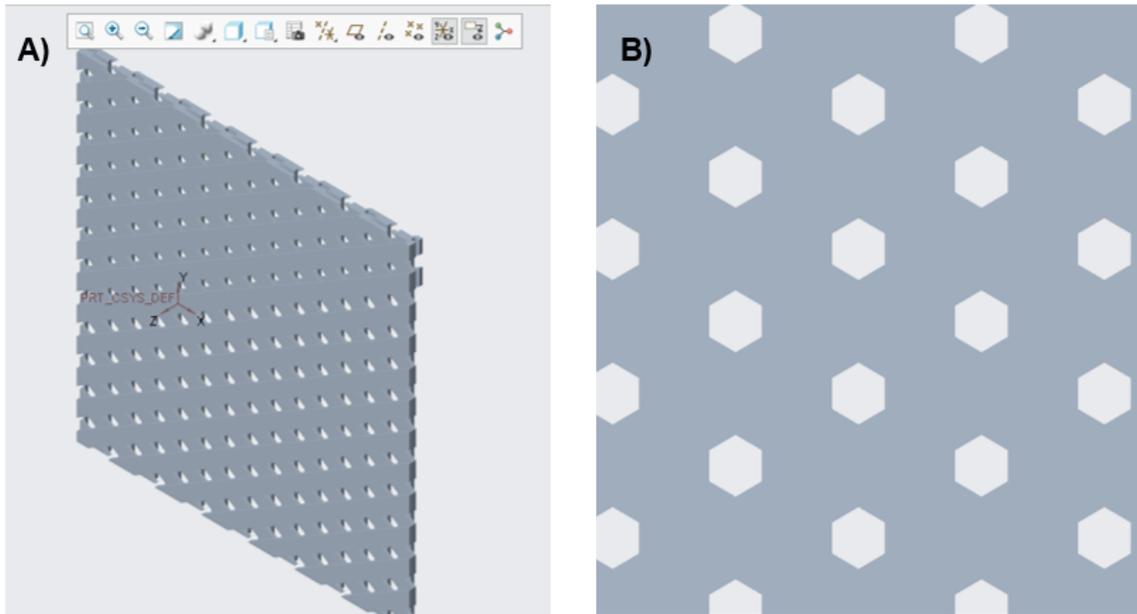
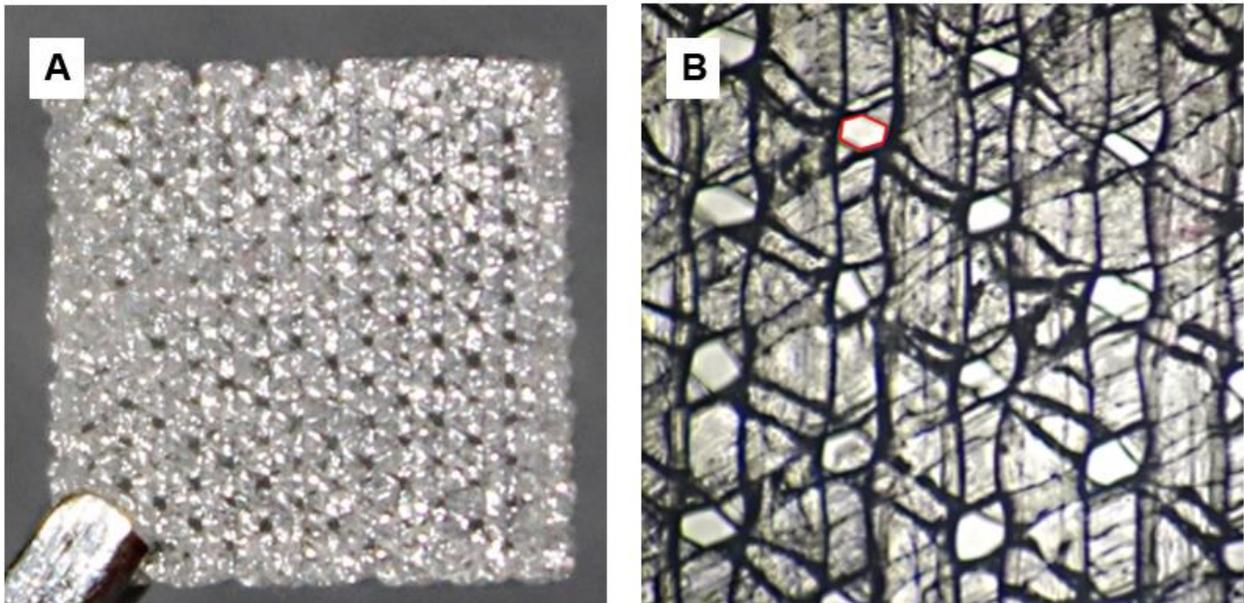


Figura 3.2 A) Vista en orientación estándar del diseño con poro hexagonal en el software) Vista frontal del diseño con poro hexagonal en donde podemos apreciar la morfología del poro.

La temperatura adecuada para la impresión, se obtuvo mediante la realización de pruebas con la boquilla de 400 $\mu$ m con el diseño correspondiente. Para que el polímero fluya adecuadamente a través de la boquilla, se varió la temperatura, obteniendo resultados óptimos a 205°C. Las fibras de 300 $\mu$ m de separación tuvieron una mejor definición que las líneas de 200 $\mu$ m por lo cual se optó por seguir utilizando el modelo de 300 $\mu$ m.



*Figura 3.3 A) Tapete de PLLA obtenido con una boquilla de 400  $\mu\text{m}$ . B) Tapete de PLLA observado con el microscopio invertido con el objetivo de 4x*

Después de haber obtenido los soportes de PLLA, se observaron en el microscopio invertido con el objetivo de 4x. En la Figura 3.3, podemos apreciar que la estructura hexagonal no está bien definida, además de que las barras que forman la impresión son irregulares, ensanchándose en varias partes. Por este motivo se optó por cambiar la boquilla de la impresora de 400 $\mu\text{m}$ , a una de 300 $\mu\text{m}$ . El resultado obtenido fue el esperado. Sin embargo, los poros resultaron ser mayores a 400 $\mu\text{m}$

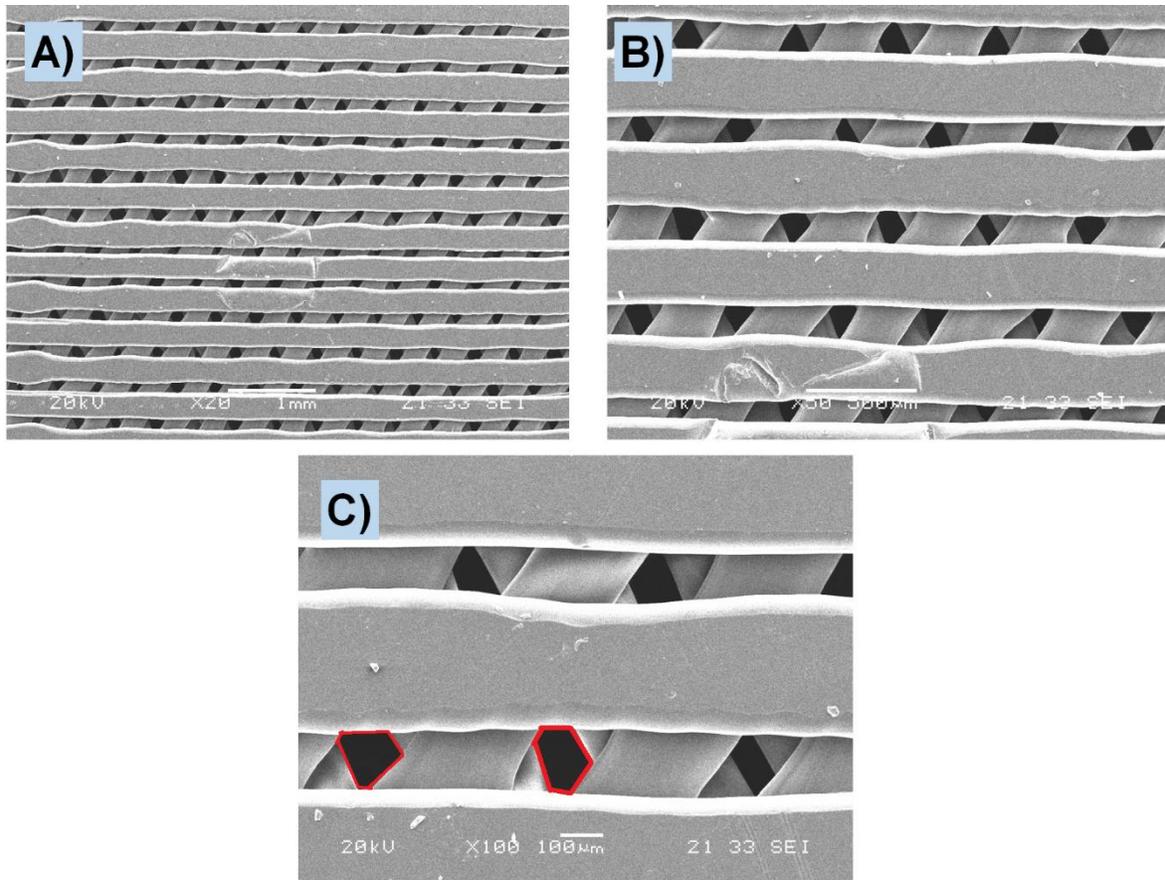


Figura 3.4 Microfotografía SEM del andamio de poro hexagonal a diferentes aumentos, obtenido con la boquilla de 200µm. A) 20X. B) 50X. C) 100X.

Se tomaron imágenes de 4 secciones del andamio para poder realizar las mediciones. Las medidas fueron realizadas mediante software “ImageJ”, obteniendo que el diámetro promedio de estos soportes son de  $116 \pm 22.95 \mu\text{m}$ . El cuál es un diámetro adecuado para permitir la proliferación celular.

### 3.2 Electrohilado de las fibras de gelatina

Se obtuvieron fibras de gelatina electrohiladas. El área del colector fue reducido a  $2 \text{ cm}^2$  con parafilm para obtener membranas de dicho tamaño. Esto con el objetivo

de que después del entrecruzado, el tamaño de las membranas fuera mayor al del diseño con poro hexagonal.

Tabla 3.1 Parámetros propuestos y utilizados en el electrohilado

Parámetros	Propuestos	Utilizados
<b>Voltaje aplicado</b>	10kV	12.26kV
<b>Rapidez de inyección</b>	0.8ml/h	0.6ml/h

Disminuimos la rapidez de inyección debido a que a 0.6ml/h, la gota se formaba mejor, mientras que el voltaje fue aumentado para poder romper la tensión superficial de la disolución para que las fibras pudieran ser formadas.

Las fibras fueron previamente observadas en el microscopio invertido con el objetivo de 40x para corroborar que la estructura sea fibrosa y no contenga glóbulos ni algún defecto (Figura 3.5).

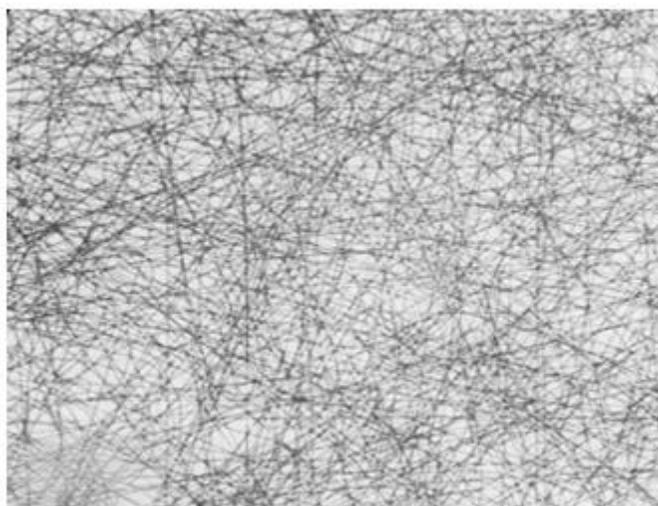


Figura 3.5 Fibras de gelatina obtenidas observadas en el microscopio invertido con el objetivo de 4x.

Una vez corroborada la estructura fibrosa obtenida, se obtuvieron microfotografías mediante el microscopio electrónico de barrido para poder medir la distribución de diámetros de las fibras.

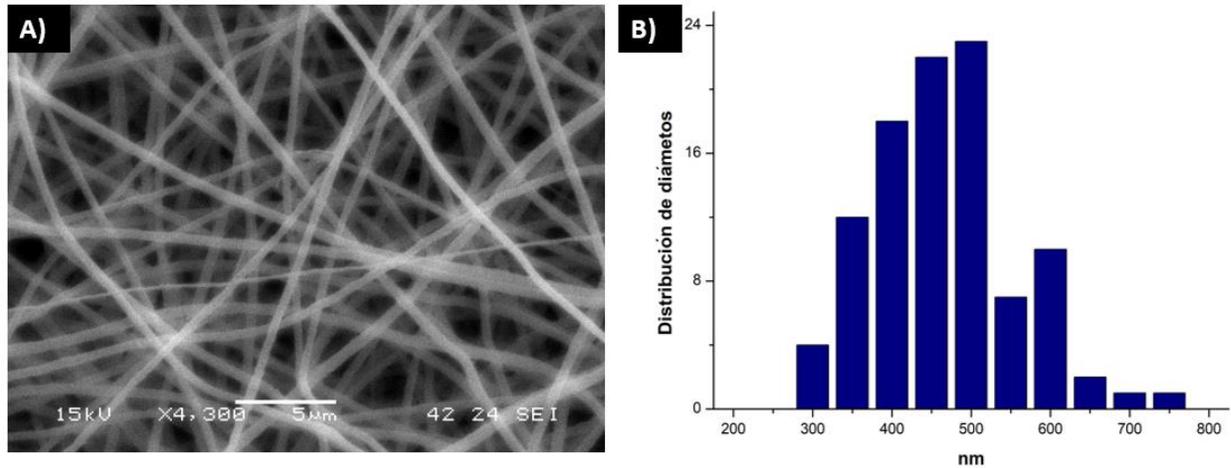


Figura 3.6 A) Microfotografía de las nanofibras de gelatina. B) Distribución de diámetros de las nanofibras.

Mediante este cálculo, obtuvimos que el diámetro promedio de las fibras es de  $464.18 \pm 91.14$  nm.

### 3.3 Insolubilización de las fibras de gelatina

Las nanofibras de gelatina, fueron sometidas al proceso de entrecruzamiento durante seis horas. Se observa una pequeña contracción de la membrana y un cambio de su color de blanco a amarillo. Estas dos observaciones se atribuyen a la formación de los enlaces imina[72], [73].

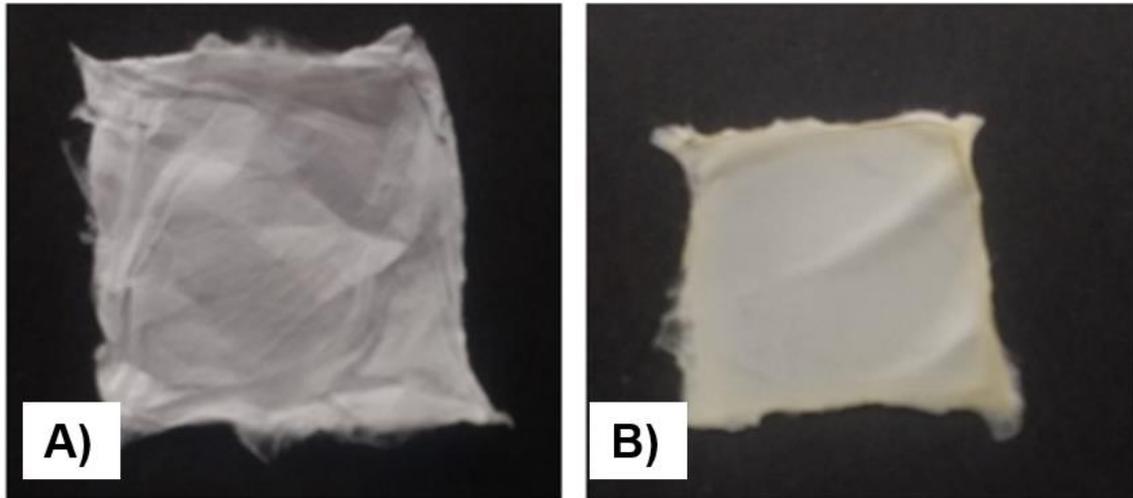


Figura 3.7 A) Tapete de gelatina electrohilada sin entrecruzar. B) Tapete de gelatina electrohilada entrecruzada

Los tapetes fueron inmersos en agua destilada durante 10 minutos. Con esta prueba se confirmó que estas condiciones de entrecruzado fueron suficientes para que el grado de entrecruzamiento de las macromoléculas de la gelatina, mantengan una buena flexibilidad. Debido a que el grosor del tapete es de aproximadamente 0.50mm, es posible que permita una mejor difusión de los vapores del glutaraldehído hacia el interior del tapete.

La Figura 3.8 muestra una imagen de SEM de un tapete. Han desaparecido las fibras independientes ( Figura 3.6 A) observándose ahora una red, esto debido al entrecruzamiento.

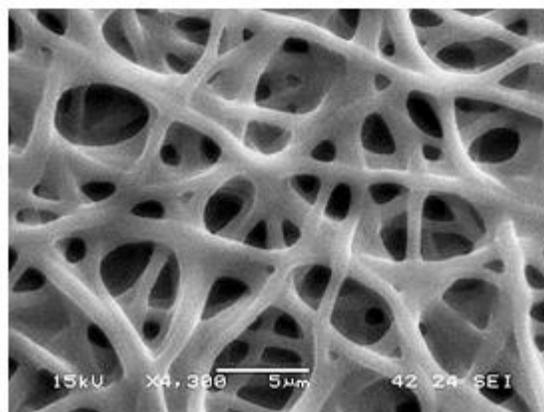


Figura 3.8 Microfotografía obtenida mediante el Microscopio Electrónico de Barrido, en donde podemos observar la morfología del tapete de gelatina entrecruzado durante 6 horas.

### 3.4 Elaboración de la interfaz

#### 3.4.1 Ensayos mediante el electrohilado

Para que el tapete de PLLA esté en contacto con la placa colectora del electrohilador, se colocó de manera horizontal (Figura 3.9). La aguja se colocó de tal forma para que al momento que gotee la disolución por la aguja, no caiga sobre el tapete.

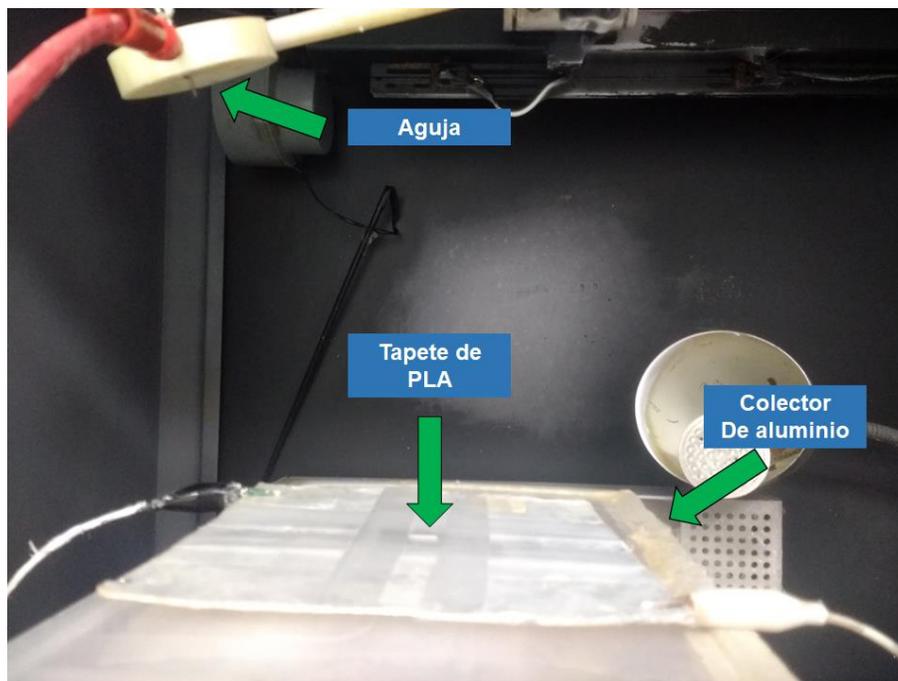
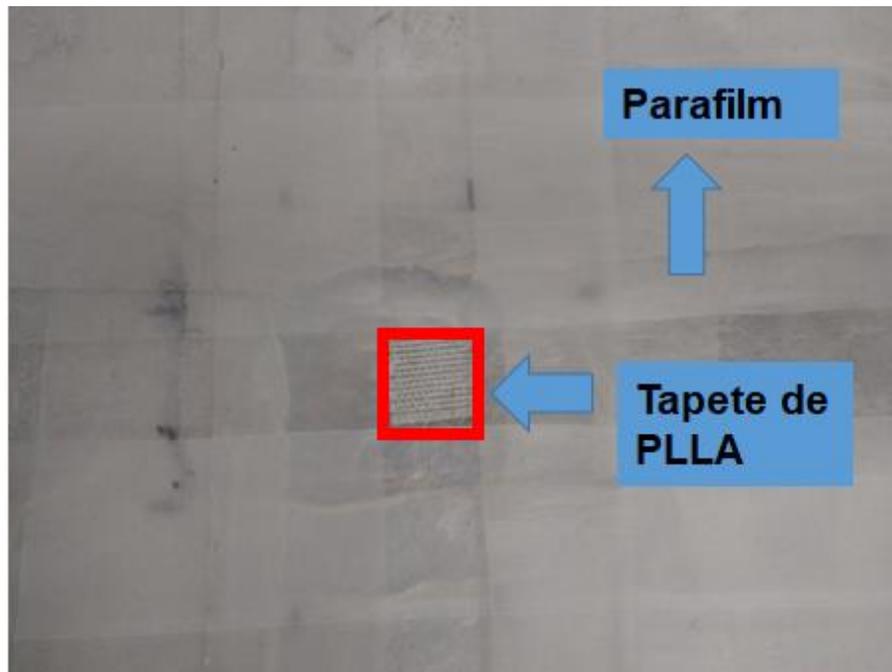


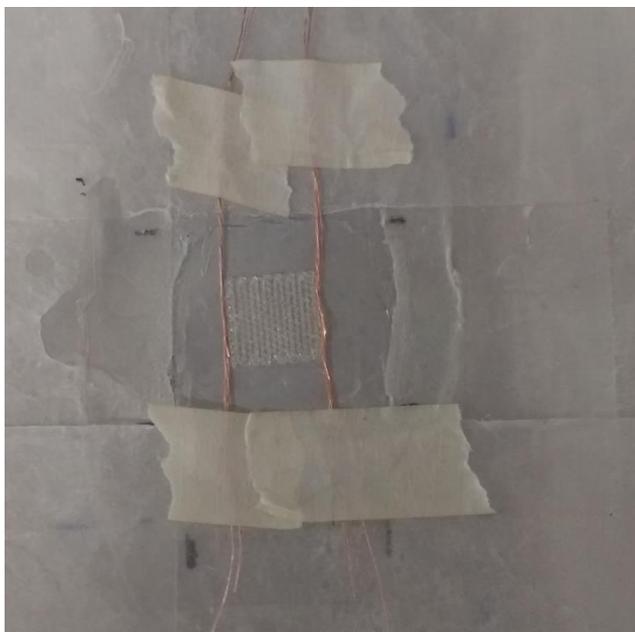
Figura 3.9 Fotografía del equipo de electrohilado, en donde la placa colectora fue colocada de manera horizontal para mantener el contacto entre el tapete de PLLA y la placa.

La primera estrategia utilizada fue cubrir con parafilm la placa colectora y se dejó libre el área donde se colocó el tapete de PLLA como se observa en la Figura 3.10.



*Figura 3.10 Fotografía de la placa colectora cubierta con parafilm y un tapete de PLLA en el centro*

Aunque el voltaje fue aumentado, la distancia de la aguja al colector fue disminuida y aumentada, se dejó por una hora el tapete, sin embargo, no hubo una deposición de fibras sobre el tapete. Entonces se recurrió a otra estrategia, a colocar filamentos de cobre a los lados del tapete de PLLA (Figura 3.10), con el fin de inducir la deposición de nanofibras. Aun así, no hubo una deposición sobre el tapete.



*Figura 3.11 Fotografía de la prueba realizada con filamentos de cobre*

El principal problema para la deposición de las nanofibras sobre el tapete de PLLA, es que el material no es conductor, por lo que no es capaz de atraer a la disolución del polímero y se formen las nanofibras. Como se ha explicado en el capítulo 1, el electrohilado es una técnica en la cual a la disolución polimérica se le aplica un voltaje. La placa colectora es de un material conductor (en este caso aluminio) con el objetivo de generar una diferencia de carga para atraer la solución polimérica a la placa colectora. La solución a este problema es volver conductor al tapete de PLLA, para esto, el tapete fue pintado con pintura de plata. Sin embargo, la pintura de plata, al ser de base acetona, deforma el tapete de PLLA. Al realizar la prueba colocando el tapete sobre la placa colectora, no se observó la deposición de las fibras.

La manera de resolver este problema, sería recubrir el PLLA con algún material conductor, una opción sería la polimerización por plasma. Además, al recubrir el tapete con algún material conductor, debe causar una citotoxicidad mínima.

Debido a este problema que presenta el PLLA, la interfaz entre el tapete de gelatina y PLLA se hizo con un adhesivo de cianoacrilato (2 etil cianoacrilato). Este adhesivo es ampliamente utilizado en cirugías y para fijar injertos de piel. Para adherir ambos

tapetes, se agregó el adhesivo sobre el tapete de PLLA con una brocha y se le colocó el tapete de gelatina. Se hizo un corte transversal del resultante andamio bicapa para observar la interfaz. En la Figura 3.12 A Y B podemos observar los dos tapetes unidos. En las microfotografías no fue posible detectar el cianoacrilato, lo cual nos indica que está en una cantidad mínima.

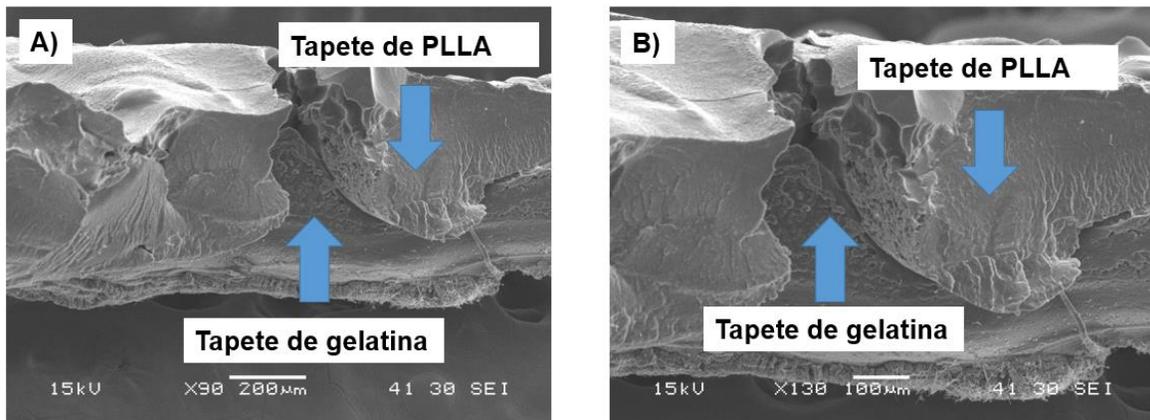


Figura 3.12. Microfotografías de la sección transversal del andamio bicapa, en ambas se aprecian ambos tapetes. A) Imagen a 90x. B) Imagen a 130x

### 3.5 Caracterizaciones

#### 3.5.1 Espectroscopía de infrarrojo por reflexión total atenuada (FTIR-ATR)

Una vez realizado el tratamiento alcalino, se realizó un análisis infrarrojo para verificar el cambio en la estructura química de la superficie de PLLA. La Figura 3.13 muestra el espectro de FTIR del PLLA sin tratamiento. En la Tabla 3.2 Principales longitudes de onda para el PLLA reportadas en la literatura y comparadas con las obtenidas en este trabajo.

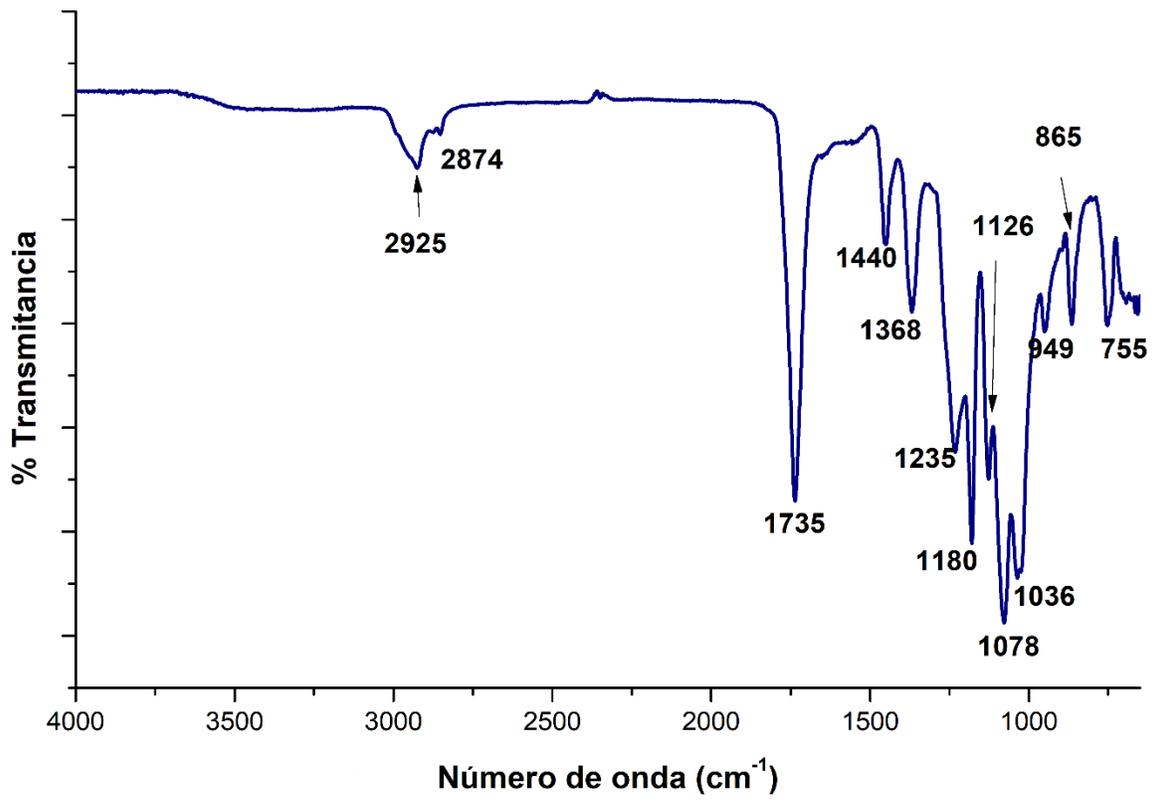


Figura 3.13 Espectro IR del tapete de PLLA

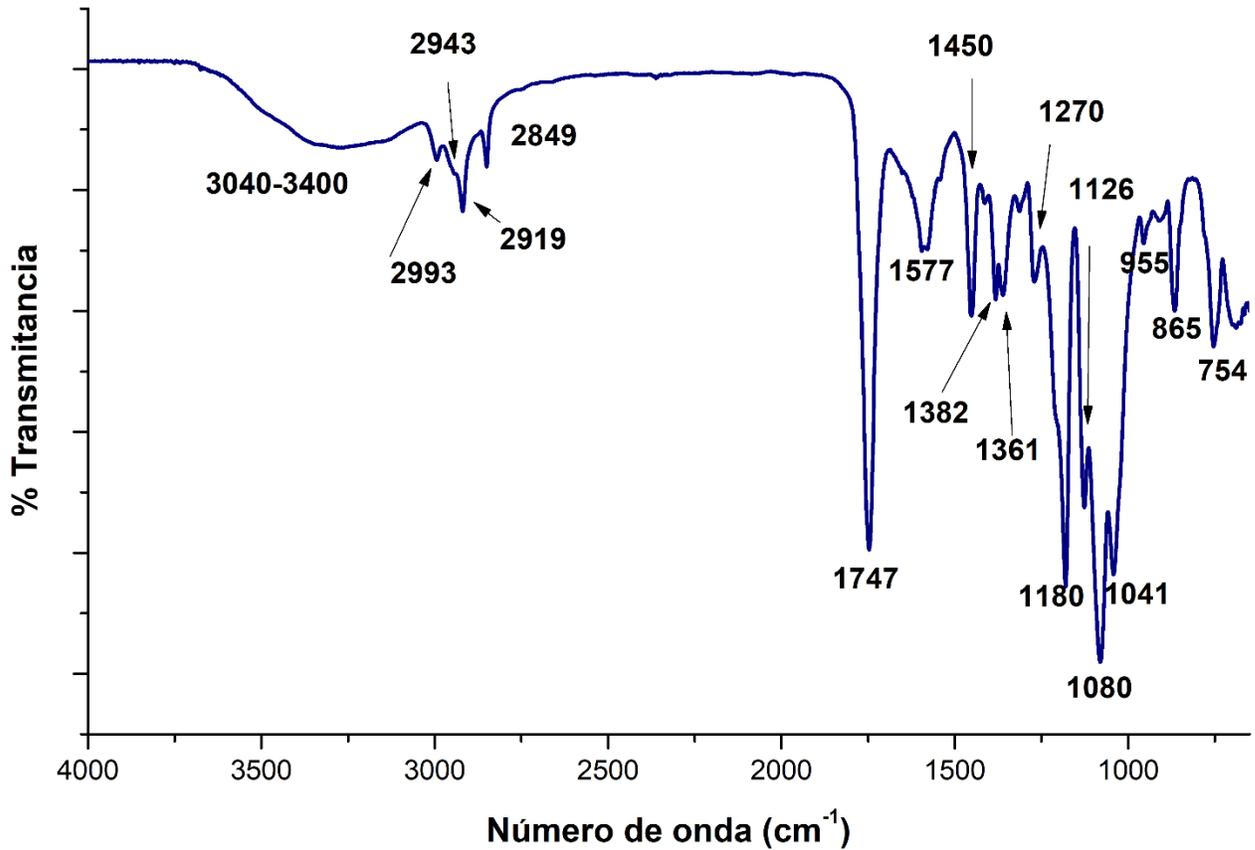


Figura 3.14 Espectro IR del tapete de PLLA después del tratamiento alcalino

Tabla 3.2 Principales longitudes de onda para el PLLA

Tipo de enlace	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	
	Experimental	[75]
Tensión asimétrica CH <sub>3</sub>	2937	
Tensión simétrica CH <sub>3</sub>	2874	
Tensión C=O	1735	1750
Flexión simétrica CH <sub>3</sub>	1440	1459

<b>Flexión</b> <b>asimétrica</b> <b>CH<sub>3</sub></b>	1368	1360
<b>Flexión C=O</b>	1235	1265
<b>Tensión C-O-</b> <b>C</b>	1180	1182
<b>Tensión C-O</b>	1126	1130
<b>Tensión C-O</b>	1078	1088
<b>Tensión C-C</b> <b>fase amorfa</b>	865	872
<b>Tensión C-C</b> <b>fase</b> <b>cristalina</b>	755	754

Después de haber realizado el tratamiento y haber secado las muestras, se realizó un FTIR-ATR para caracterizar el cambio químico sufrido por las mismas (

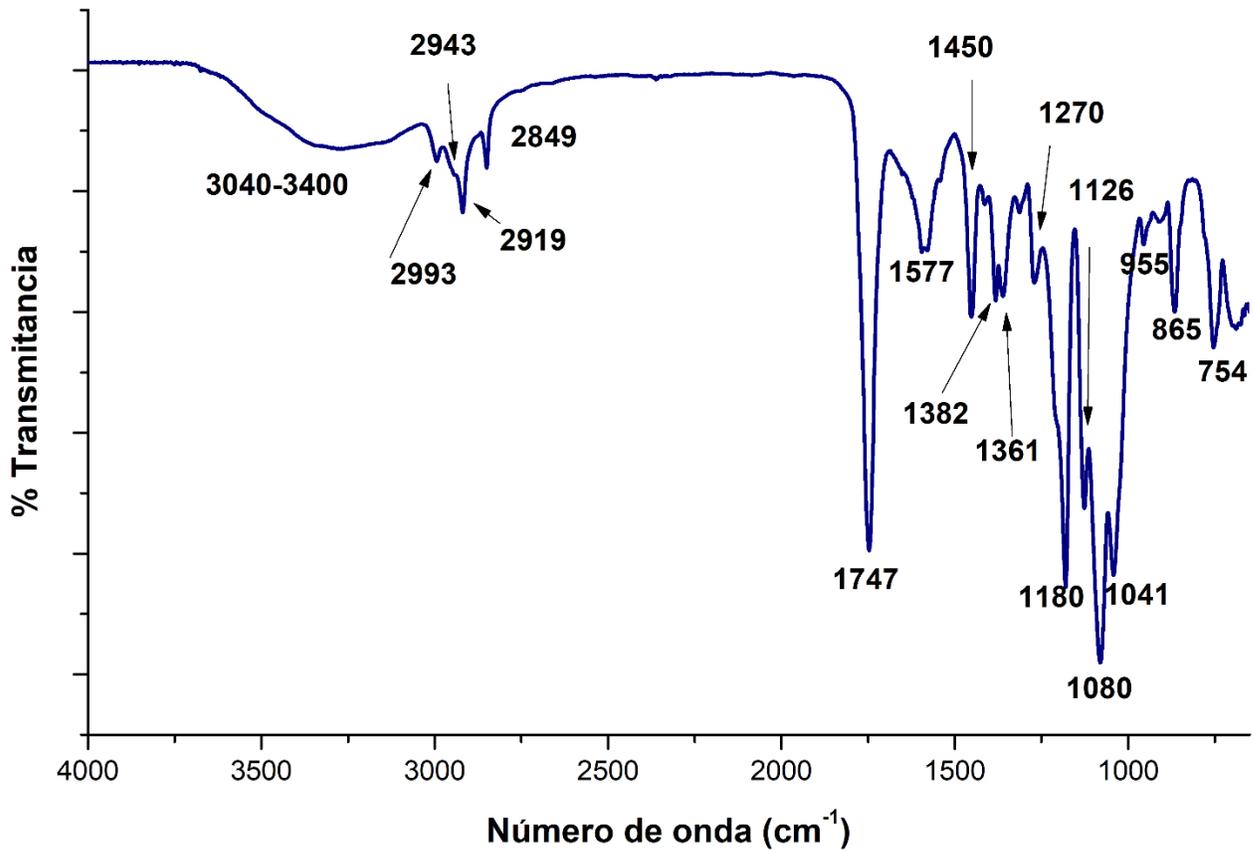


Figura 3.14).

La principal señal que nos indica que el tratamiento funcionó, es la banda ancha entre  $3000\text{cm}^{-1}$  y  $3400\text{cm}^{-1}$ , atribuida al grupo hidroxilo, mejor apreciada en la Figura 3.15 (Movimiento de estiramiento). Comparando ambos espectros, podemos notar que entre el número onda de  $3000\text{cm}^{-1}$  y  $2840\text{cm}^{-1}$  en vez de dos picos, se observan tres, incluso parece haber un pico sobrepuesto en  $1241\text{cm}^{-1}$ . Estos picos son atribuidos a movimientos simétricos y asimétricos de los C-H.

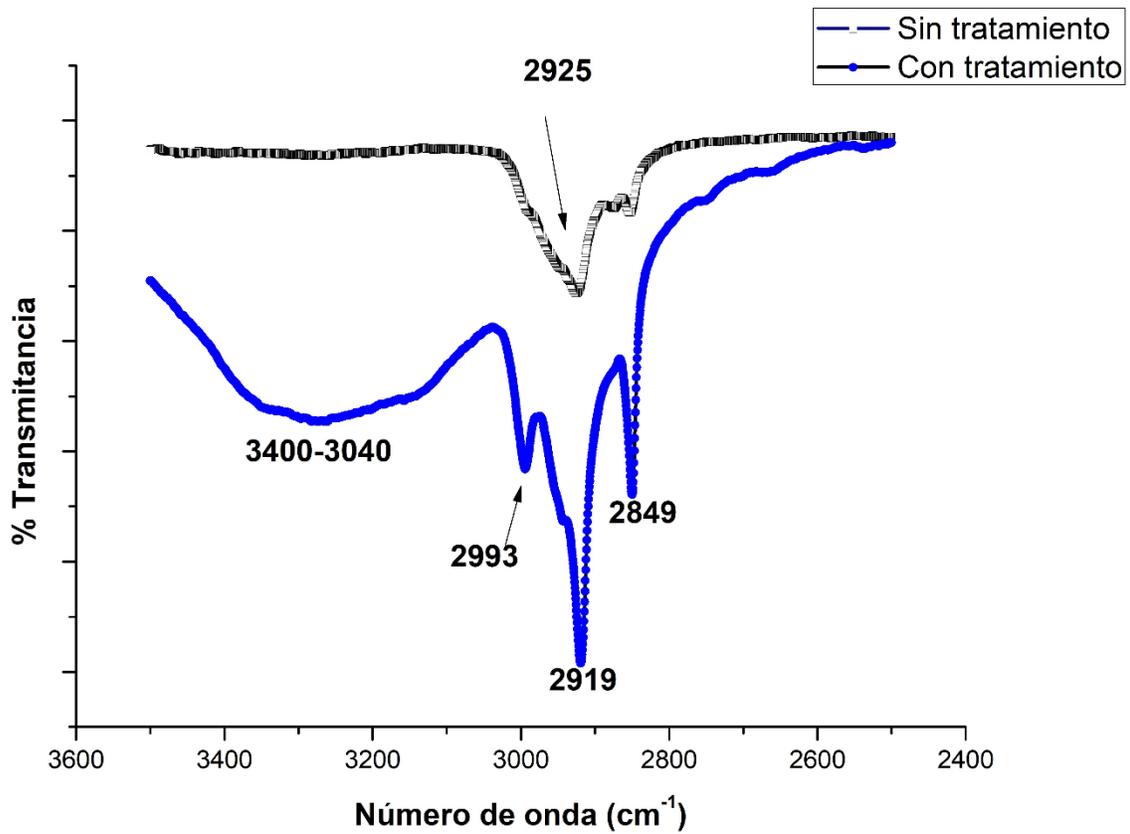


Figura 3.15 Espectro aumentado del FTIR del PLLA con tratamiento de 2400cm<sup>-1</sup> a 3600cm<sup>-1</sup>

Para corroborar el grupo hidroxilo, en el espectro se encuentra una banda a 1382 cm<sup>-1</sup>, que corresponde con el grupo hidroxilo (Figura 3.16). Dicha banda no se encuentra en el tapete de PLLA sin tratamiento.

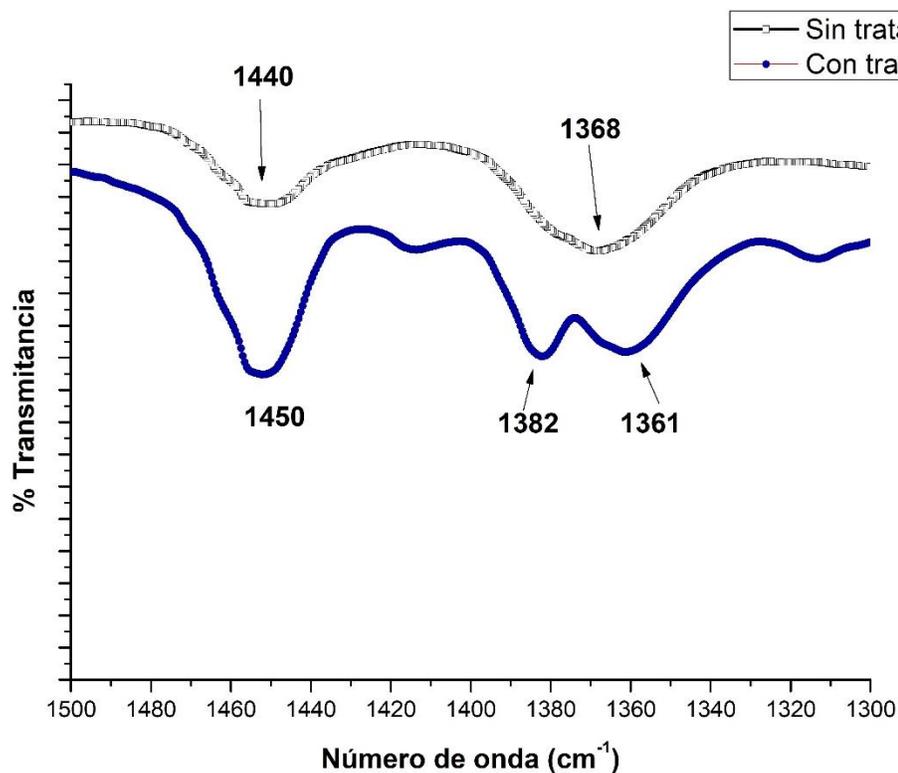


Figura 3.16 Espectro FTIR del PLLA con tratamiento ampliado de  $1300\text{cm}^{-1}$  a  $1500\text{cm}^{-1}$

Con respecto a las bandas correspondientes en la Figura 3.16, no hay un desplazamiento drástico en las bandas, lo cual probablemente es debido a que no hay una degradación total durante el tratamiento alcalino, las cadenas del polímero sufren escisiones en la superficie para dar lugar a grupos carboxilo e hidroxilo.

De acuerdo a la reacción de hidrólisis por vía alcalina para el PLLA, consiste en un ataque nucleofílico del ión hidroxilo presente en el NaOH al grupo carbonilo[61]. Esto produce escisiones en las cadenas del polímero, dando como resultado grupos hidroxilo y carboxilo[76]. De acuerdo a Yang *et al*, el etanol fue utilizado con el fin de ayudar al ataque nucleofílico [71].

Tabla 3.3 Longitudes de onda del PLLA después del tratamiento alcalino

Tipo de enlace	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		
	Experimental PLLA Tratado	PLLA sin tratamiento	[75]
Estiramiento del grupo OH	3200-3555	-	-
Tensión simétrica y asimétrica de los grupos CH	3000-2840	3000-2870	-
Tensión C=O	1747	1735	1750
Sal de ácido carboxílico	1577		-
Flexión simétrica CH <sub>3</sub>	1450	1440	1459
Flexión OH	1382		-
Flexión asimétrica CH <sub>3</sub>	1361	1368	1360
Flexión C=O	1270	1235	1265
Tensión C-O-C	1180	1179	1182
Tensión C-O	1126	1132	1130
Tensión C-O	1080	1180	1088
Deformación fuera del plano COOH	955	-	-
Tensión C-C fase amorfa	865	865	872

Tensión C-C	754	755	754
fase cristalina			

A  $1577\text{cm}^{-1}$ , aparece una banda que corresponde a la sal de un ácido carboxílico. Esta reacción puede darse durante el proceso de hidrólisis básica, ya que durante la reacción, al momento que el ión hidroxilo reacciona con el grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ), el catión sodio puede formar una sal con el anión éster que se forma al momento de la escisión de la cadena polimérica (Figura 3.17).

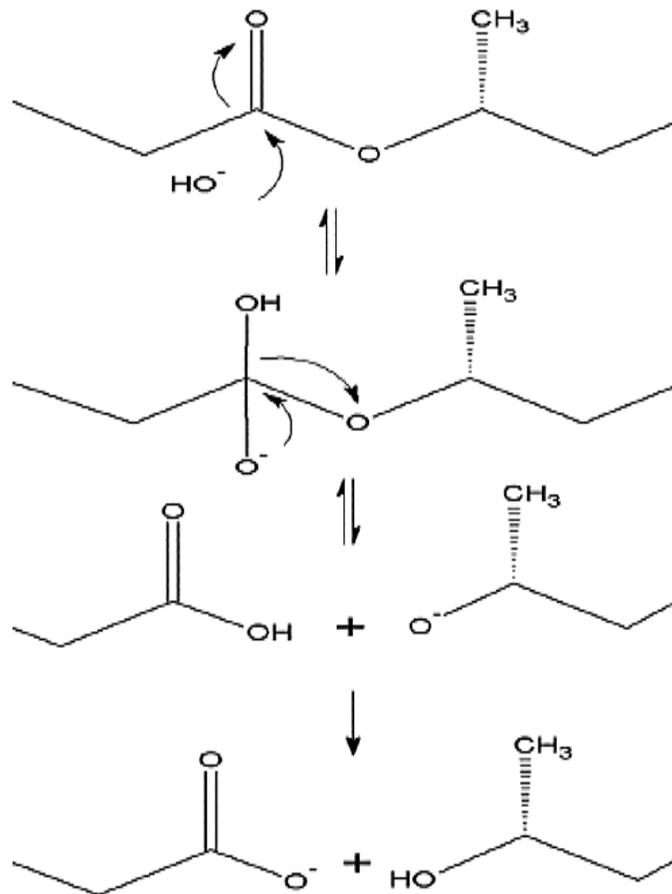


Figura 3.17 Mecanismo de reacción de la hidrólisis alcalina con NaOH del PLLA [61]

De acuerdo a la reacción de hidrólisis por vía alcalina para el PLLA, consiste en un ataque nucleofílico del ión hidroxilo presente en el NaOH al grupo carbonilo [61]. Esto produce escisiones en las cadenas del polímero, dando como resultado grupos hidroxilo y carboxilo [76]. De acuerdo a Yang *et al*, el etanol fue utilizado con el fin de ayudar al ataque nucleofílico [71]. De dicho trabajo, no se realizó un FTIR para verificar la modificación de sus muestras. Su objetivo fue obtener una mayor hidrofiliidad, la cual corroboraron mediante ángulo de contacto. Aun así, con los resultados que se obtuvieron del FTIR, podemos afirmar que la superficie de los tapetes de PLLA contiene grupos hidroxilo (OH), el cuál es el responsable de poder formar puentes de hidrógeno, lo cual contribuye a la hidrofiliidad del material modificado.

### 3.5.2 Ángulo de contacto

La evaluación del carácter hidrofóbico de las películas de PLLA sin tratamiento, con agua desionizada resultó en un ángulo de contacto promedio de  $90.88^\circ \pm 0.97$ . Las películas que recibieron el tratamiento alcalino sufrieron un descenso en el ángulo de contacto de  $90.88^\circ \pm 0.97$  a  $40.8^\circ \pm 1.6$ . Con estos datos podemos confirmar lo reportado por el estudio de Yang *et al* [71]. De acuerdo a su estudio, el etanol es un solvente que ayuda al ataque nucleofílico de los iones hidroxilo hacia el grupo carbonilo, reportan que se debe debido a que esta reacción se ve restringida por la hidrofobicidad del PLLA. El etanol, debido a su estructura química, posee una parte hidrófoba y otra hidrófila. Entonces, la parte hidrófoba es capaz de interaccionar con el PLLA debido a que igual es hidrófobo, haciendo al material más susceptible a los iones hidroxilo.

Los resultados obtenidos concuerdan con el trabajo de Yang *et al* [71], el reporta un ángulo de contacto de  $38^\circ$ , pero considerando su desviación estándar en su gráfico,  $40.8^\circ$  está dentro de este intervalo. Además, mediante esta prueba, podemos

aseverar que el ángulo de contacto ha cambiado drásticamente, ocasionando una mejora a la hidrofiliidad del PLLA.

Como se ha mencionado con anterioridad, la razón de que el material cambie su hidrofiliidad se debe a la presencia de grupos carboxilo e hidroxilo en su superficie, grupos que son capaces de interaccionar con el agua.

### 3.5.3 Pérdida de masa

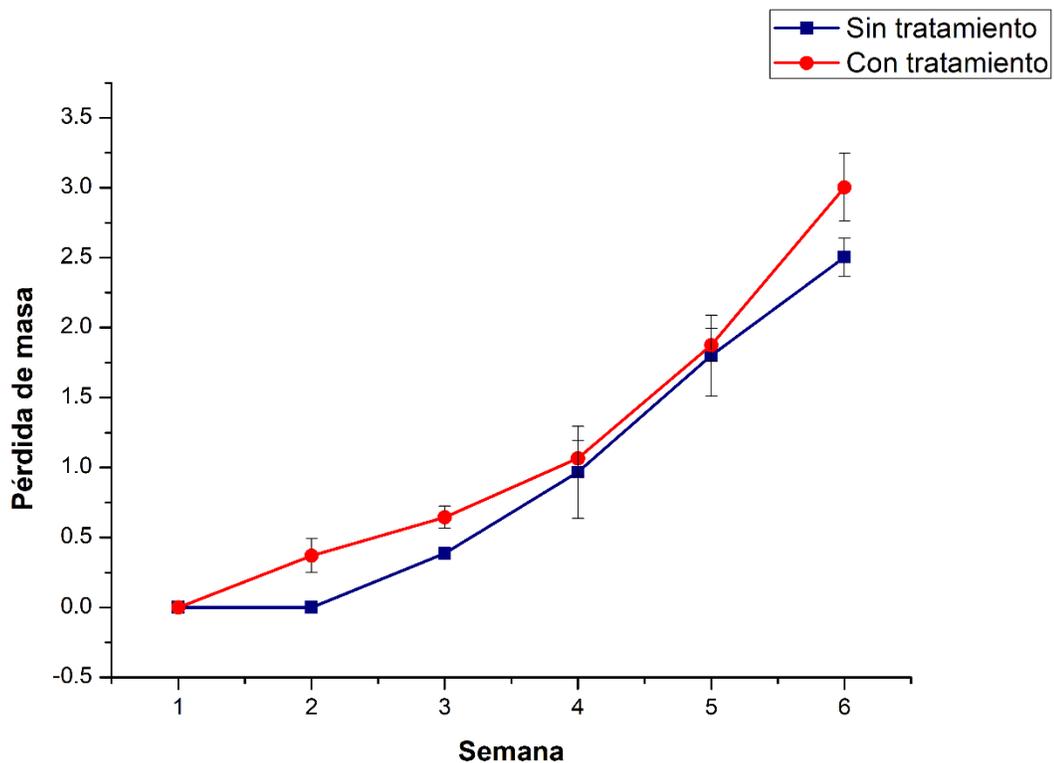


Figura 3.18 Porcentaje de pérdida de masa de los andamios bicapa sin tratamiento alcalino

Físicamente, el andamio bicapa mantuvo su integridad durante las 6 semanas de este experimento. Es decir, a simple vista, no había un cambio notorio del andamio a nivel macroscópico. Ambos tapetes, tanto el de PLLA como el de gelatina se

mantuvieron unidos, demostrando que el adhesivo fue capaz de mantener la interfaz entre los materiales.

En la Figura 3.18, apreciamos que hasta la cuarta semana, no hubo un cambio perceptible en la masa del andamio. El PLLA es un material cuya degradación en PBS ha sido estudiada [77], es reportado que hasta la cuarta semana se detecta la pérdida de masa. Con respecto a la gelatina entrecruzada por 6 horas, se reporta que no hay una pérdida notoria de masa hasta la tercera semana [73]. Sin embargo cabe destacar que el espesor de las muestras de gelatina es de aproximadamente 50µm. Esto puede contribuir a un mejor entrecruzamiento de la misma, contribuyendo a una mejor estabilidad de las nanofibras. Por este motivo es posible que hasta la cuarta semana no haya un cambio notorio en la pérdida de masa del andamio bicapa.

Con respecto a la degradación de los andamios en los cuales el PLLA tenía el tratamiento alcalino la pérdida de masa se observó a partir de la segunda semana. Esto puede atribuirse a que el tratamiento alcalino genera grupos hidroxilo y carboxilo, los cuales son grupos hidrofílicos, en consecuencia las muestras se vuelven hidrofílicas y más susceptibles a la degradación [77]. Aun así, podemos observar que la pérdida de masa es levemente mayor comparada con las muestras que no tenían tratamiento. De acuerdo a *Yang et al* [71], el tratamiento utilizado en este estudio fue el que dio como resultado en una mayor hidrofiliidad y en una menor pérdida de masa. De acuerdo a estos resultados, observamos que el tratamiento alcalino efectivamente resulta en una sensibilización del andamio a la degradación, sin embargo, el tratamiento utilizado no resulta en un grado alto de agresividad, debido a que la pérdida de masa con respecto a los andamios con tratamiento es levemente mayor.

#### **3.5.4 Adhesión entre los andamios**

En la Figura 3.19 se representa la primera prueba que se hizo, la cual no fue satisfactoria debido a que el tapete de gelatina se rompió antes de terminar la

prueba. Por este motivo se recurrió a la metodología mencionada con anterioridad. La distancia de sobreposición de los tapetes ocurrió en 1.5 mm y 2 mm. Se utilizó la distancia de 2mm debido a que es una distancia adecuada para que las mordazas fijen correctamente la muestra.

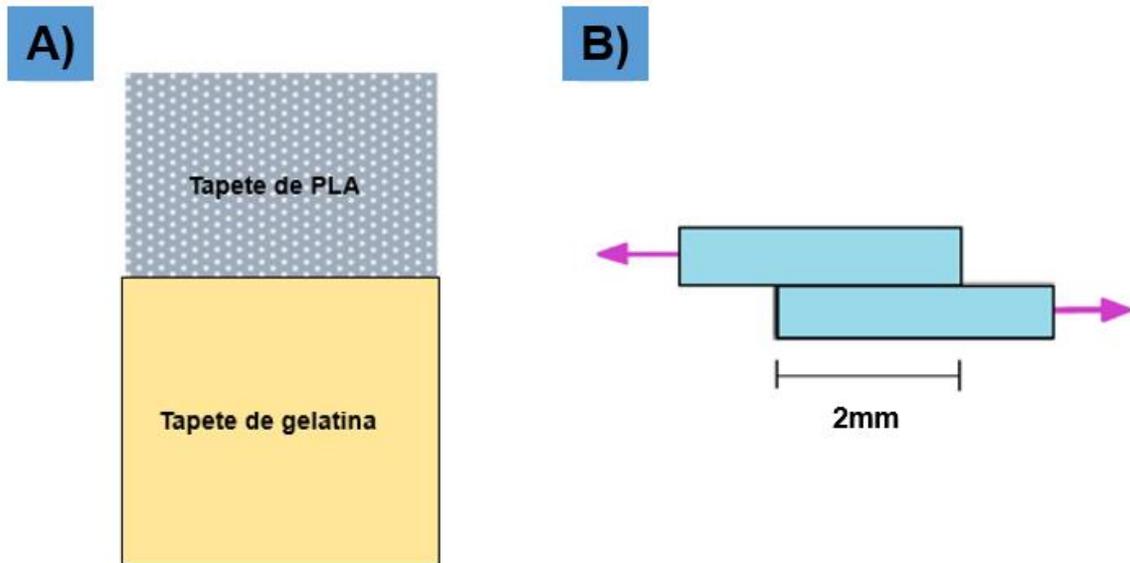


Figura 3.19 Elaboración de probetas para el ensayo de adhesión A) Tapete de PLA adherido al de gelatina. B) Distancia a la cual las probetas fueron pegadas.

En la Figura 3.20 se muestra el comportamiento de desprendimiento del tapete de gelatina respecto al tapete de PLLA. En esta curva se observan 6 regiones. La A, corresponde al aumento de la fuerza que se aplica al tapete de gelatina para obligarlo a despegarse del tapete de PLLA, la región C, posiblemente es una pequeña zona de los tapetes que se desprende sin afectar al resto de las áreas de adhesión, la región D corresponde a la fuerza máxima para vencer la inercia causada por el pegamento (cianoacrilato) que fue de  $37.2 \pm 1.0\text{N}$  e inmediatamente cae la fuerza y se vuelve constante (región E), esta región de la fuerza constante corresponde al deslizamiento del tapete de gelatina respecto al PLLA. En la región F se observa una inestabilidad de la fuerza, esto se puede atribuir a que no es homogénea la capa de pegamento sobre las superficies de los tapetes. Al desprenderse completamente los dos tapetes, la fuerza cae a cero.

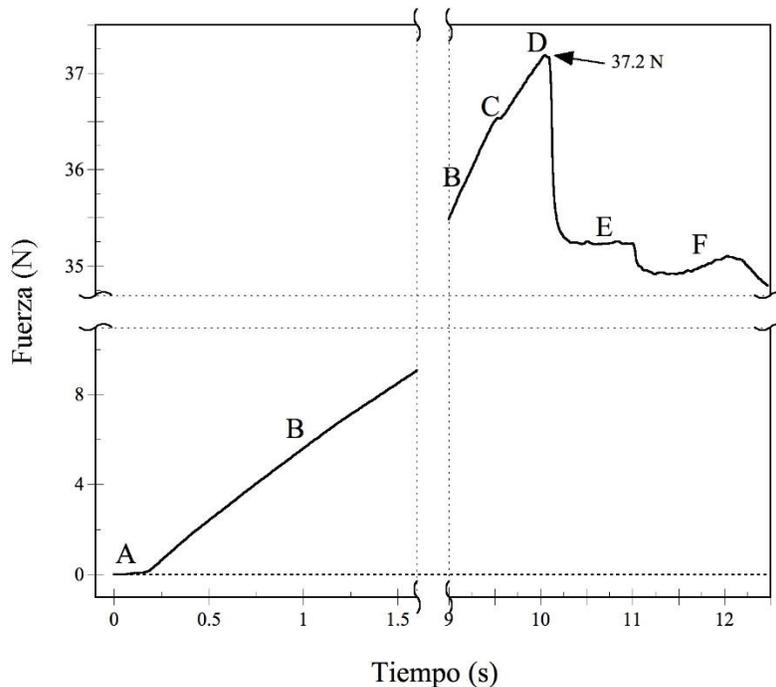


Figura 3.20 Gráfica en la cual se representa el punto de falla del adhesivo

### 3.5.5 Caracterización biológica

#### 3.5.5.1 Proliferación celular

Los andamios obtenidos en este trabajo demostraron ser atóxicos debido a que promovieron la proliferación celular, aspecto que es considerado como un indicativo de que un andamio es biocompatible. En nuestro caso de estudio, las muestras evaluadas no presentaron señales de citotoxicidad, es decir, todas las muestras presentaron una proliferación celular mayor al control positivo. El control positivo, consta de únicamente las células en medio de cultivo, por lo que si en un andamio las células proliferaron más que en el control, nos indica que el andamio estimula la proliferación celular. La viabilidad celular es útil para reportar cuando una muestra es citotóxica, dado que se toma el control positivo como referencia para poder comparar con la muerte celular.

El andamio de gelatina es en el que más proliferaron las células, su alta afinidad a las células es atribuida a su composición, debido que al ser derivada de la colágena cuenta con el sitio de reconocimiento a integrinas (secuencia RGD)[78].

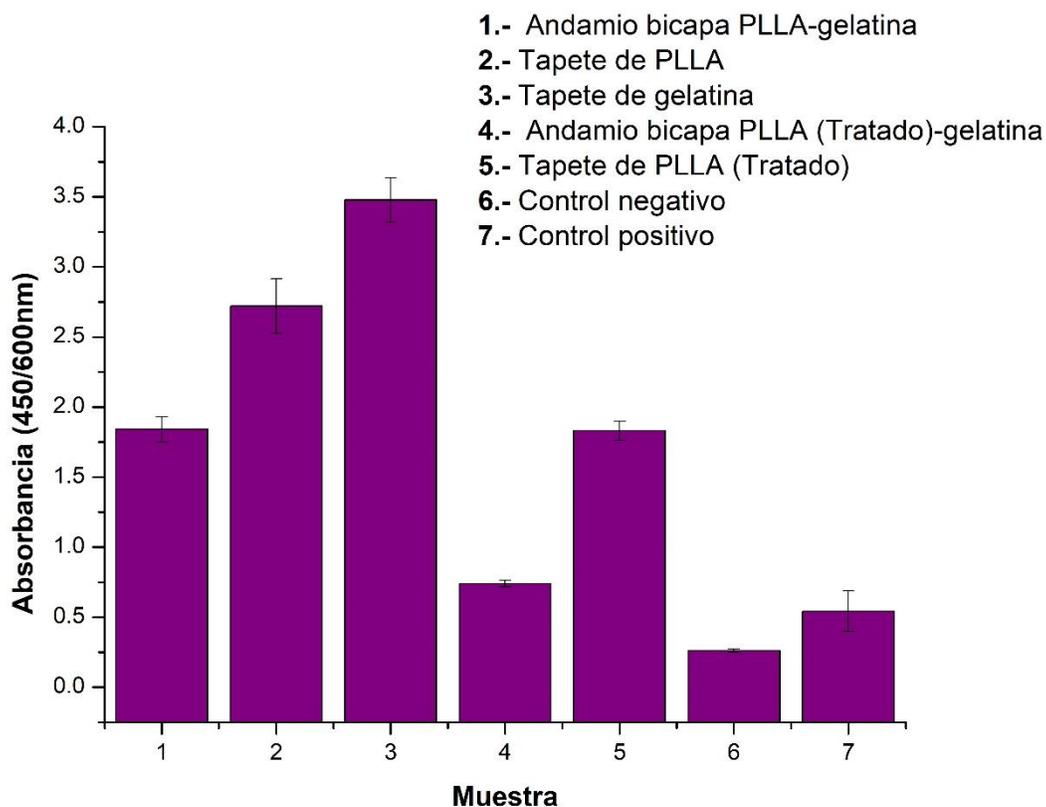


Figura 3.211 Resultados del ensayo de proliferación

Seguido a la gelatina, se encuentra el tapete de PLLA, que debido a su posición como polímero sintético, no permite la proliferación celular como la gelatina. El andamio bicapa de PLLA-gelatina tuvo menor proliferación que en el andamio de PLLA.

La muestra con menor proliferación, fue el andamio bicapa de PLLA (Tratado)-gelatina, probablemente porque contenía adhesivo en mayor medida que el andamio bicapa PLLA-gelatina. Además de que el tamaño de poro y morfología del poro pudo haber influido, debido a que las impresiones realizadas con PLLA, a pesar

de presentar una morfología similar entre sí, las distancias varían, al igual que la morfología varía, tal vez no en gran medida, pero podría haber afectado el ensayo.

Con respecto a nuestra muestra problema, andamio de PLLA (sin tratamiento)-gelatina y PLLA (con tratamiento)-gelatina, en ambas hubo una mayor proliferación con respecto al control positivo. Lo que nos indica que a las células les agrada el ambiente de dichos andamios.

Utilizando un ANOVA de una vía, se obtuvo que efectivamente alguna de las medias es diferente, por lo que se realizó un análisis de Tukey para identificar cuál tratamiento fue el mejor.

Grouping Information Using Tukey Method

Trat	N	Mean	Grouping
3	2	3.4775	A
1	2	1.8420	B
2	2	0.9365	C
4	2	0.9315	C
5	2	0.6260	C D
6	2	0.6075	C D
7	2	0.2535	D

Means that do not share a letter are significantly different.

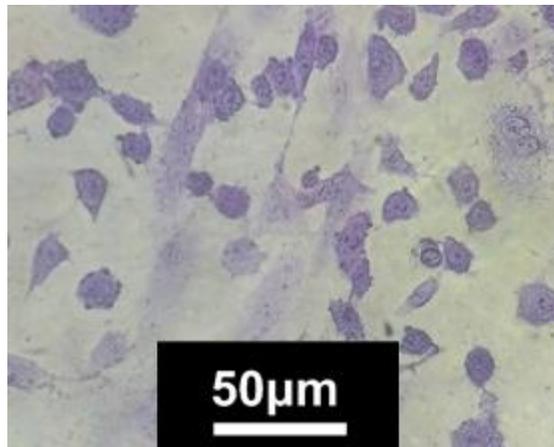
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Trat

Individual confidence level = 99.46%

De los siguientes datos, obtenemos que la muestra 3 y la muestra 1 son estadísticamente significativos. Es decir, estas dos muestras son las que indujeron una proliferación celular estadísticamente superior al control positivo.

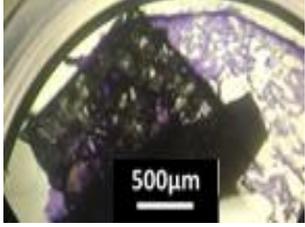
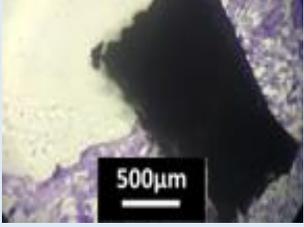
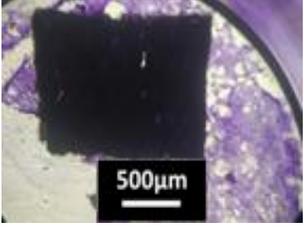
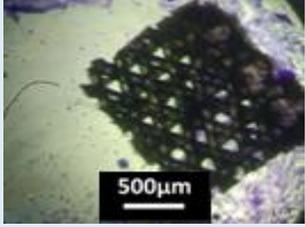
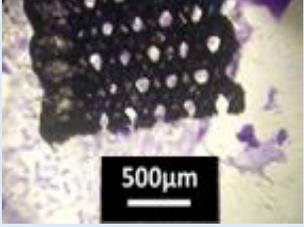
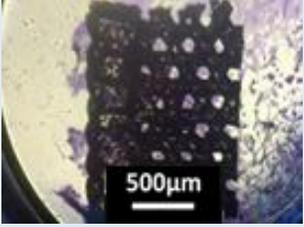
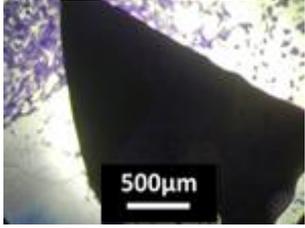
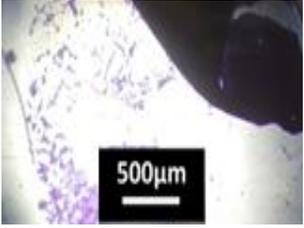
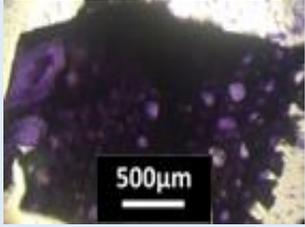
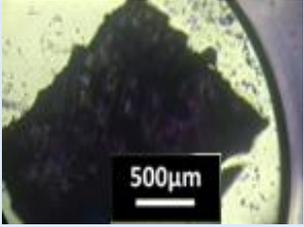
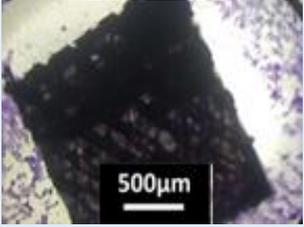
En la Tabla 3.4, podemos notar las diferencias estructurales entre el tapete de PLLA tratado y sin tratar, este es un posible factor que pudo haber afectado su proliferación

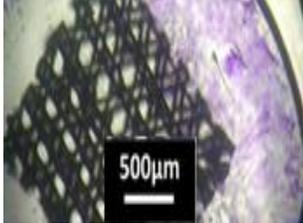
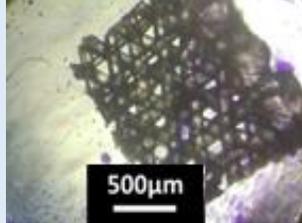
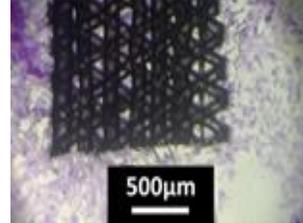
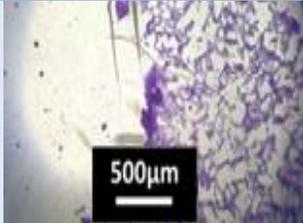
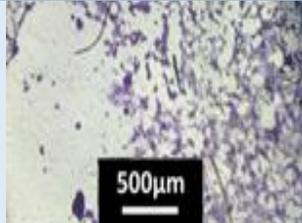
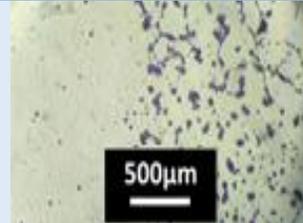
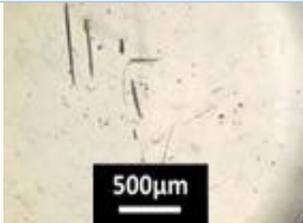
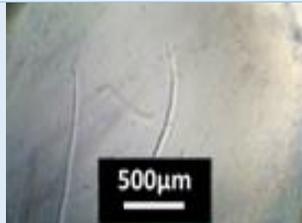
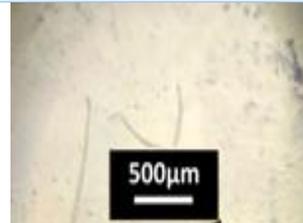
Las tinciones realizadas cuando el ensayo finalizó, fueron con el objetivo de observar la morfología de las células y observar si en ellas había algún efecto negativo. Las fotografías de las muestras se encuentran en la Tabla 3.4, en las que se observa la morfología de las células. En todas las muestras hubo proliferación celular y no se observaron células con morfología diferente al control positivo (sólo células). Mientras que en el control negativo (células a las cuáles se les agregó peróxido de hidrógeno) observamos poca o nula cantidad de células. En la Figura 3.22, podemos apreciar fibroblastos teñidos con cristal violeta, en donde podemos observar los núcleos y el citoplasma. Por lo que en la tabla 3.4, observaremos manchas morados evidenciando la presencia de fibroblastos.



*Figura 3.22 Fotografía tomada en el microscopio invertido con el objetivo de 40x. En esta figura observamos fibroblastos de la muestra 1 del andamio de PLLA-gelatina.*

Tabla 3.4 Tinciones de las muestras realizadas con cristal violeta, fotografías tomadas con el objetivo de 4x. Los núcleos de las células se ven de color morado intenso, por lo cual se pueden observar en las imágenes manchas de color morado, evidenciando la presencia de las células.

Muestra	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3
PLLA-Gelatina			
PLLA			
Gelatina			
PLLA (tratado-Gelatina)			

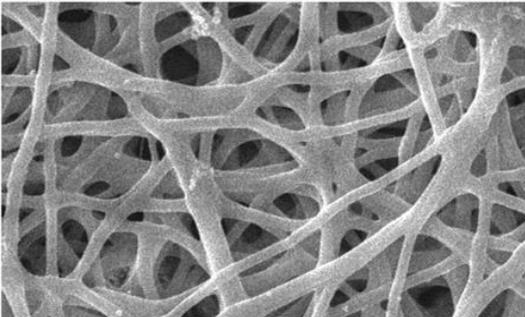
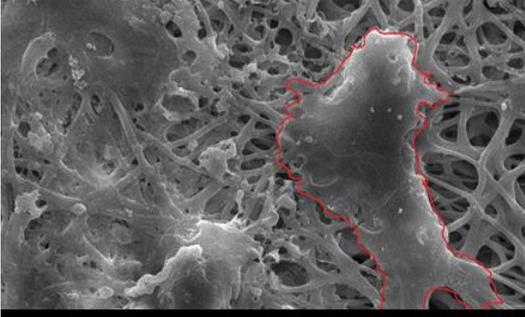
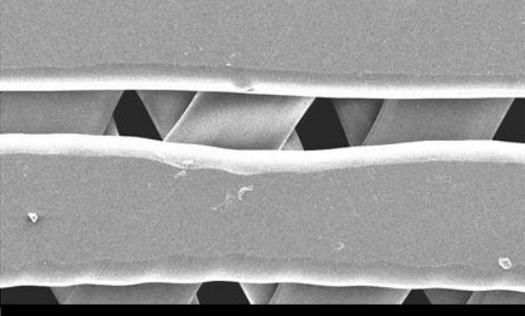
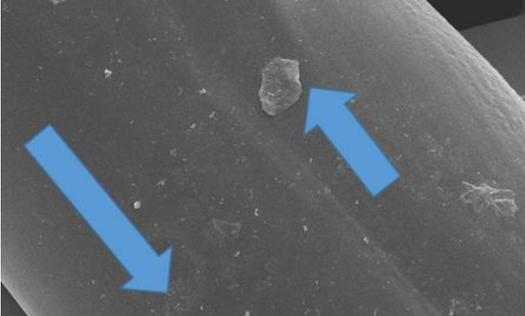
<p><b>PLLA (tratado)</b></p>			
<p><b>Positivo</b></p>			
<p><b>Negativo</b></p>			

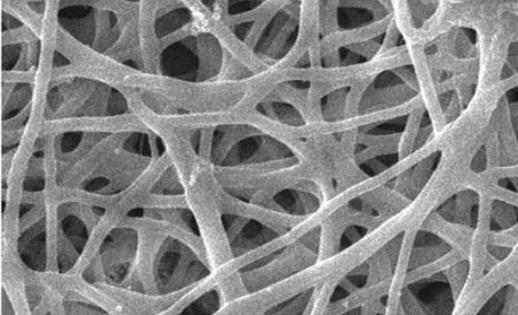
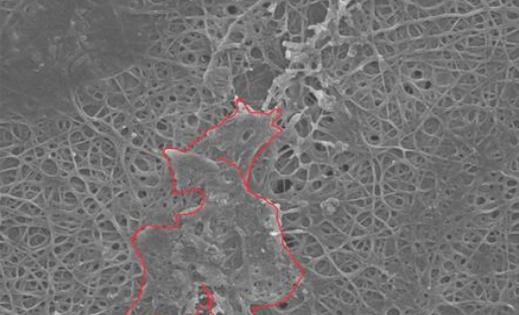
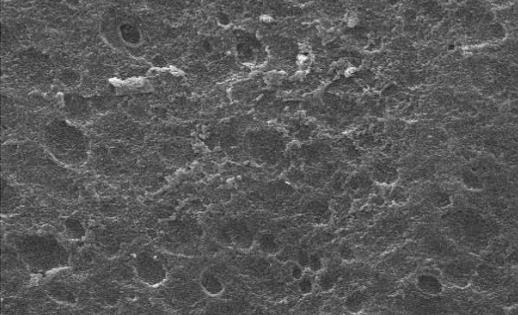
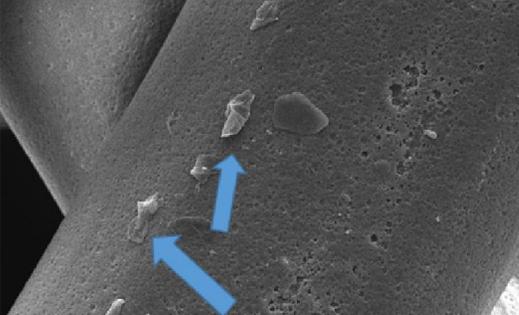
### **3.5.5.2 Adhesión celular**

En la Tabla 3.5 , se aprecian comparaciones entre las muestras que contienen células y las que no contienen células.

Podemos observar que las células exhiben adhesión en todas las muestras analizadas como puede apreciarse a través de la presencia de células adheridas en el andamio, lo que nos confirma la biocompatibilidad de todas las muestras, tanto de los andamios bicapa (tratado y no tratado) como de las muestras de PLLA. Sin embargo, las células cultivadas sobre las fibras presentan una morfología alargada con proyecciones del citoesqueleto (filiopodios) adosados a la fibra, dichas estructuras no se aprecian en los andamios de PLLA sin tratar o tratado, lo cual nos indica que la incorporación de la gelatina al PLLA promueve la interacción célula andamio,

*Tabla 3.5 Tabla comparativa entre las muestras sin células y con células cultivadas*

Muestra	Sin células	Con células
Andamio de PLLA( sin tratamiento)-gelatina	 <p>20 kV x800 22 33 SEI 20µm</p>	 <p>20 kV x1000 22 33 SEI 10µm</p>
Tapete PLLA(sin tratar)	 <p>20 kV x100 21 33 SEI 100 µm</p>	 <p>20 kV x350 22 33 SEI 50 µm</p>

<p>Andamio          PLLA          (tratamiento)-          gelatina</p>	 <p>20 kV x800 22 33 SEI          20 <math>\mu</math>m</p>	 <p>20 kV x350 22 33 SEI          50 <math>\mu</math>m</p>
<p>Tapete PLLA          (tratado)</p>	 <p>20 kV x1000 22 33 SEI          10 <math>\mu</math>m</p>	 <p>20 kV x350 22 33 SEI          50 <math>\mu</math>m</p>

### **3.5.5.3 Hemocompatibilidad**

Los andamios obtenidos en este trabajo demostraron ser hemocompatibles debido a que dieron negativo en la prueba de hemólisis. En la Figura 3. B, podemos apreciar la diferencia entre el color del control negativo (eritrocitos en solución fisiológica) y la del control positivo (eritrocitos en agua destilada). El color rojo brillante de la muestra utilizada como control positivo, se debe a que el agua destilada induce la lisis de los eritrocitos ocasionado a su vez la liberación de hemoglobina, que posee una coloración rojiza. Si comparamos los tubos de ensaye, podemos observar que de manera cualitativa, los tubos de ensayo que contenían eritrocitos en presencia de los andamios fueron semejantes al control negativo y diferente del control positivo

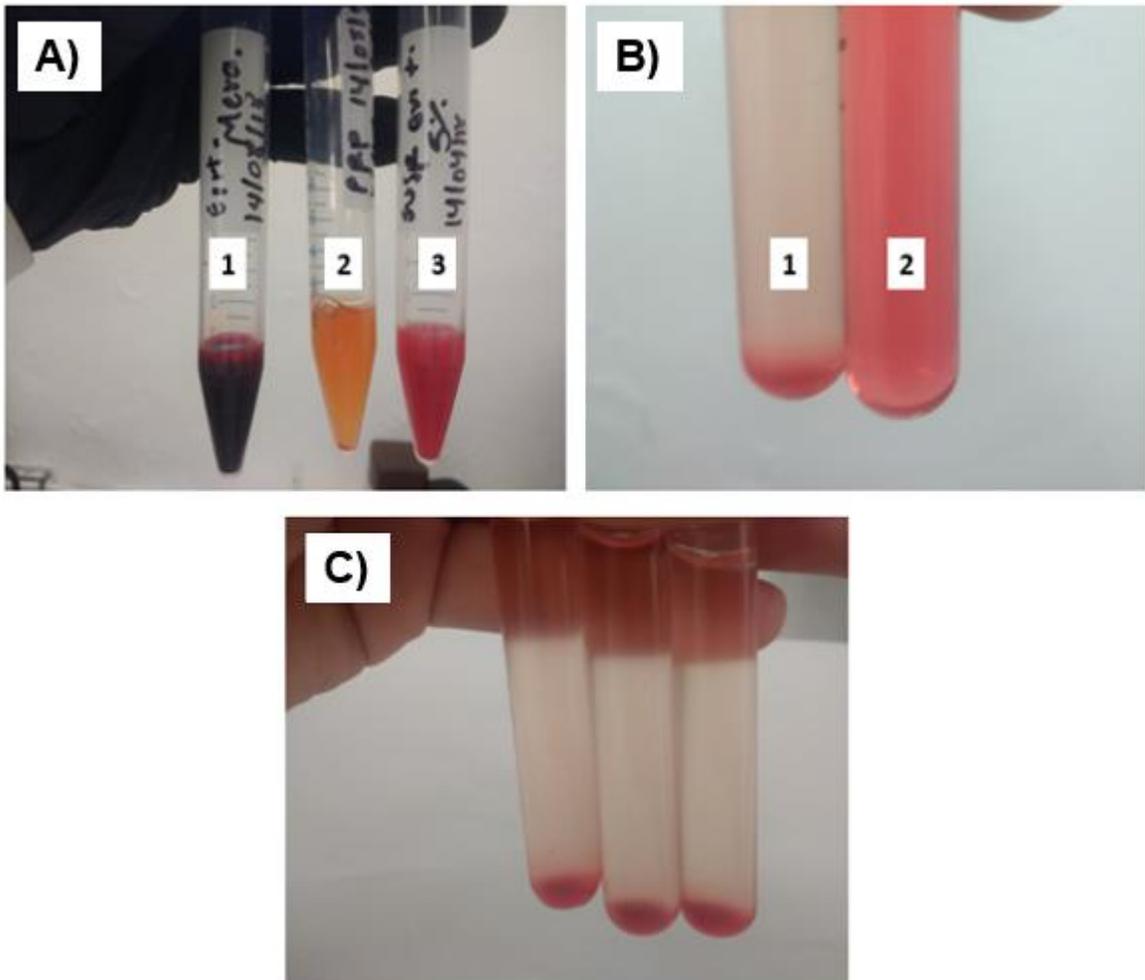
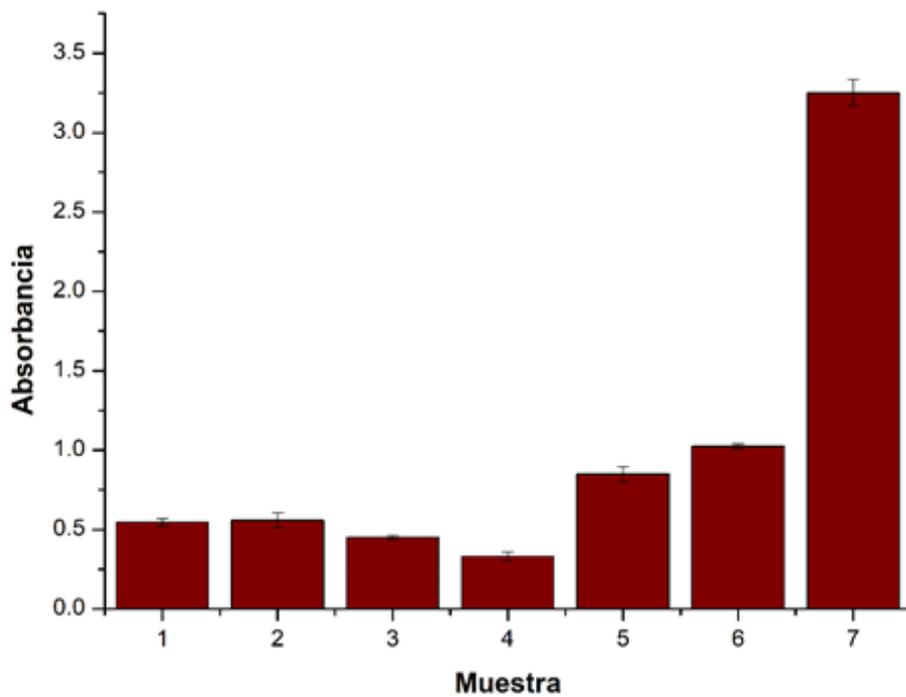


Figura 3.23 Imágenes de ensayo de hemocompatibilidad. A) En el tubo 1, se encuentra la sangre centrifugada, el tubo 2 contiene plasma rico en plaquetas y el tubo 3 es la suspensión al 5% de eritrocitos. B) El tubo 1 consiste en la muestra de control negativo mientras que el tubo 2 es el control positivo. C) Fotografías de algunas muestras en donde comparadas con el control negativo, son similares visualmente.

Graficando en porcentaje de hemólisis para comparar con los controles negativo y positivo (Figura 3.), se observa que las absorbancias de las muestras se acercan a la absorbancia del control negativo. Esto nos indica que todas tienen un porcentaje de hemólisis mínimo. De todos los andamios evaluados, el andamio de PLLA (con tratamiento alcalino)-gelatina, hubo una hemólisis menor. Esto es posiblemente debido a la combinación del PLLA hidrofílico, mientras que la gelatina, derivada de la colágena, se encuentra en el cuerpo humano. Incluso, el porcentaje de hemólisis de este material es similar al del tapete de gelatina. Por lo tanto, los andamios

evaluados, al presentar una hemólisis similar a la del control negativo, se consideran hemocompatibles.



- 1.- Andamio PLLA (sin tratar)-gelatina
- 2.- Tapete de PLLA (Sin tratar)
- 3.- Tapete de gelatina
- 4.- Andamio PLLA (Tratado)-gelatina
- 5.- Tapete PLLA (Tratado)
- 6.- Control negativo
- 7.- Control positivo

Figura 3.24 Gráfica del porcentaje de hemólisis,

## CONCLUSIONES

Fue posible obtener un andamio bicapa compuesto por una capa hecha por impresión 3D y otra hecha de gelatina.

La morfología hexagonal de poro fue obtenida con las boquillas de 200 $\mu$ m y 300 $\mu$ m de diámetro. Sin embargo, debido al tamaño de poro promedio de 380 obtenido con la boquilla de 300 $\mu$ m, se decidió optar por una boquilla de 200  $\mu$ m. Los tapetes hechos con la boquilla de 300  $\mu$ m y con tamaño de fibra correspondiente con la boquilla, tuvieron un diámetro promedio de 116 $\pm$ 22.95  $\mu$ m

Se obtuvieron fibras electrohiladas de gelatina con un diámetro promedio de 464.18 $\pm$ 91.14 $\mu$ m a 12.27kV, 15 cm de distancia de la aguja al colector y una disolución al 10% m/v de gelatina en trifluoroetanol.

El espesor de los tapetes obtenidos en un área de 2 x 2cm, tuvieron un espesor aproximado de 50 $\mu$ m. Estos tapetes fueron entrecruzados con glutaraldehído durante seis horas. El cambio de coloración de blanco a amarillo se relaciona con la formación de enlaces imida en la reacción de entrecruzamiento.

La deposición de fibras electrohiladas sobre los tapetes de PLLA no pudo lograrse debido a que el material no es conductor, por lo que la deposición de fibras fue nula a pesar de todos los experimentos realizados para inducirla.

El andamio bicapa constituido de PLLA y gelatina fue obtenido utilizando un adhesivo. El adhesivo seleccionado fue 2 etil cianoacrilato. La sección transversal fue evaluada mediante Microscopía electrónica de barrido y un ensayo mecánico de adhesión, en donde la fuerza de la unión fue de 37.2 $\pm$  1.0N.

Las caracterizaciones de ángulo de contacto y FTIR-ATR nos confirmaron que la modificación superficial del material fue exitosa. El ángulo de contacto cambió de 90° a 40°, demostrando que las películas se volvieron más hidrofílicas. La prueba de FTIR-ATR confirmó la modificación superficial, con esta prueba se observó el cambio químico de la superficie del material, observando bandas características en

el espectro correspondientes con grupos hidroxilo y carboxilo, lo cual posiblemente es atribuido al cambio en el carácter hidrofílico del material.

En el ensayo de proliferación celular, demostró que los andamios obtenidos en este trabajo son atóxicos, ya que demostraron inducir la proliferación celular, superando la inducción del control positivo. Teniendo el control positivo una absorbancia promedio de 0.687.

El ensayo de adhesión celular nos demostró que la superficie y composición de los andamios promueve la adherencia de las células a las muestras, sin embargo, en los andamios electrohilados las células estaban más alargadas que en los andamios impresos, lo cual indica que la adaptación de la célula a la superficie del material se ve influenciada por la topografía y composición del material [79] .

La adherencia de las células a las muestras, en donde los andamios electrohilados las células estaban más alargadas que en los andamios impresos. Sin embargo, la morfología de las células nos muestra que son capaces de adherirse a ambas estructuras.

La prueba de hemocompatibilidad resultó positiva, dado que ninguna muestra presentó una hemólisis estadísticamente superior al control negativo. La muestra que presentó la menor hemólisis fue el tapete de gelatina con 13.88%. Este resultado puede deberse a que su fuente de obtención es la colágena, compuesto que se encuentra en los seres vivos, y dado su origen natural, es posible que cause menos hemólisis que un polímero sintético.

## REFERENCIAS

- [1] R. Mitchlell, V. Kumar, A. Abbas, N. Fausto, and J. Aster, *Compendio de Patología estructural y funcional*, Octava. Barcelona: ELSEVIER, 2012.
- [2] L. E. Valencia-Gómez, S. A. Martel-Estrada, C. L. Vargas-Requena, C. A. Rodriguez-González, and I. Olivas-Armendariz, "Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel," *Rev. Mex. Ing. Biomed.*, vol. 37, no. 3, pp. 235–249, 2016.
- [3] E. J. Chong *et al.*, "Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution," *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 3 SPEC. ISS., pp. 321–330, 2007.
- [4] L. G. Ovington, "Advances in wound dressings," *Clin. Dermatol.*, vol. 25, no. 1, pp. 33–38, 2007.
- [5] Z. Zhou *et al.*, "Bilayer porous scaffold based on poly-(ε-caprolactone) nanofibrous membrane and gelatin sponge for favoring cell proliferation," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 5, pp. 1670–1676, 2011.
- [6] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z. M. Huang, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, "Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers," *Polymer (Guildf.)*, vol. 47, no. 8, pp. 2911–2917, 2006.
- [7] G. B. Yin, Y. Z. Zhang, S. D. Wang, D. B. Shi, Z. H. Dong, and W. G. Fu, "Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 93, no. 1, pp. 158–163, 2010.
- [8] T. Serra, J. A. Planell, and M. Navarro, "High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 3, pp. 5521–5530, 2013.
- [9] H. N. Chia and B. M. Wu, "Recent advances in 3D printing of biomaterials," *J.*

*Biol. Eng.*, vol. 9, p. 4, 2015.

- [10] J. Araujo, C. Pedro, and S. Best, "Electrospinning of bioinspired Polymer scaffolds," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 881, 2015, pp. 79–94.
- [11] D. Li *et al.*, "A comparison of nanoscale and multiscale PCL/gelatin scaffolds prepared by disc-electrospinning," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 146, pp. 632–641, 2016.
- [12] N. J. Hoglebe, J. W. Reinhardt, and K. J. Gooch, "Biomaterial microarchitecture: A potent regulator of individual cell behavior and multicellular organization," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2016.
- [13] D. R. Nisbet, J. S. Forsythe, W. Shen, D. I. Finkelstein, and M. K. Horne, "A review of the cellular response on electrospun nanofibers for tissue engineering," *J. Biomater. Appl.*, vol. 24, no. 1, pp. 7–29, 2009.
- [14] D. W. Hutmacher, T. Schantz, I. Zein, K. W. Ng, S. H. Teoh, and K. C. Tan, "Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 203–216, 2001.
- [15] B. D. Gérard J. Tortora, "Tortora - Anatomia y fisiologia humana." pp. 215–224, 2006.
- [16] M. Ross and W. Pawlina, *Histología Texto y Atlas a color con Biología Celular y Molecular*, 6th ed. Panamericana, 2012.
- [17] S. Ramakrishna, M. Ramalingan, T. S. S. Kumar, and W. Soboyejo, *Biomaterials: A nano approach*. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- [18] R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering*, Fourth., vol. 53, no. 9. Elsevier, 2013.
- [19] S. Salinas, S. Mofti, and N. Moimen, "Burns and Trauma," in *Textbook of plastic and reconstructive surgery*, D. Kalaskar, P. Butler, and S. Ghali, Eds.

UCL Press, 2016, pp. 103–121.

- [20] F. J. G. Amigueti, F. H. Morillas, J. L. G. Moreno, and R. Velázquez, “Manejo y reanimación del paciente quemado,” *Emergencias y catástrofes*, vol. 1 (4), pp. 217–224, 2000.
- [21] Y. Wang *et al.*, “Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 123, pp. 3–17, 2018.
- [22] K. Vig *et al.*, “Advances in skin regeneration using tissue engineering,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 4, 2017.
- [23] S. Dumitriu, *Polymeric Biomaterials*, Second. New York: Marcel Dekker, Inc, 2002.
- [24] C. Salem Z., A. Vidal V., P. Mariangel P., and M. Concha M., “Cicatrices hipertróficas y queloides,” *Cuad. Cirugía*, vol. 16, no. 1, pp. 77–86, 2002.
- [25] J. P. Vacanti and R. Langer, “Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation.,” *Lancet*, vol. 354, pp. S132–S134, 1999.
- [26] R. D. Abbott and D. L. Kaplan, “Strategies for improving the physiological relevance of human engineered tissues,” *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 7, pp. 401–407, 2015.
- [27] N. U. B. Hansen, F. Genovese, D. J. Leeming, and M. A. Karsdal, “The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 98, no. 2, pp. 286–294, 2015.
- [28] K. A. Jansen, P. Atherton, and C. Ballestrem, “Mechanotransduction at the cell-matrix interface,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 71, pp. 75–83, 2017.
- [29] B. R. Freedman *et al.*, “The (dys)functional extracellular matrix,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, no. 11, pp. 3153–3164, 2015.
- [30] L. Sapir and S. Tzlil, “Talking over the extracellular matrix: How do cells

communicate mechanically?," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 71, pp. 99–105, 2017.

- [31] C. Wu, "Focal Adhesion," *Cell Adh. Migr.*, vol. 1, no. March, pp. 13–18, 2007.
- [32] D. R. Tobergte and S. Curtis, *Molecular biology of the cell*, vol. 53, no. 9. 2013.
- [33] T. Ozdemir, L. C. Xu, C. Siedlecki, and J. L. Brown, "Substrate curvature sensing through Myosin IIa upregulates early osteogenesis," *Integr. Biol. (United Kingdom)*, vol. 5, no. 11, pp. 1407–1416, 2013.
- [34] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, "Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2011, no. ii, 2011.
- [35] R. C. de Azevedo Gonçalves Mota, E. O. da Silva, F. F. de Lima, L. R. de Menezes, and A. C. S. Thiele, "3D Printed Scaffolds as a New Perspective for Bone Tissue Regeneration: Literature Review," *Mater. Sci. Appl.*, vol. 07, no. 08, pp. 430–452, 2016.
- [36] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2529–2543, 2000.
- [37] Q. L. Loh and C. Choong, "Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 19, no. 6, pp. 485–502, 2013.
- [38] E. K. Rajakylä and M. K. Vartiainen, "Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression," *Small GTPases*, vol. 5, no. MAR, pp. 37–41, 2014.
- [39] A. Greiner and J. H. Wendorff, "Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 46, no. 30, pp. 5670–5703, 2007.
- [40] W. E. Teo, W. He, and S. Ramakrishna, "Electrospun scaffold tailored for tissue-specific extracellular matrix," *Biotechnol. J.*, vol. 1, no. 9, pp. 918–929,

2006.

- [41] J. B. Chiu, Y. K. Luu, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, "Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 1, no. 2, pp. 115–132, 2005.
- [42] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [43] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review.," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 5, pp. 1197–211, 2006.
- [44] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, "Electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 96, no. 2, pp. 557–569, 2005.
- [45] C. X. F. Lam, X. M. Mo, S. H. Teoh, and D. W. Hutmacher, "Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 20, no. 1–2, pp. 49–56, 2002.
- [46] B. C. Gross, J. L. Erkal, S. Y. Lockwood, C. Chen, and D. M. Spence, "Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 7, pp. 3240–3253, 2014.
- [47] T. Ahsan and R. M. Nerem, "Bioengineered tissues: The science, the technology, and the industry," *Orthod. Craniofacial Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 134–140, 2005.
- [48] M. E. Colorado Ana Cristina, Agudelo Carlos Andrés, Moncada A, "Análisis de Biomateriales para uso en ingeniería de tejidos de piel," *Rev. ing. biomed.*, vol. 7, pp. 11–23, 2013.
- [49] A. D. Metcalfe and M. W. J. Ferguson, "Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration," *J. R. Soc. Interface*, vol. 4, no. 14, pp. 413–437,

2007.

- [50] S. Roldan Vasco, C. Vargas, M. L. Mejía, J. Zapata, and M. E. Moncada, *Ingeniería de tejidos y aplicaciones*. Medellín: Instituto Tecnológico Metropolitano, 2016.
- [51] R. V. Shevchenko, S. L. James, and S. E. James, "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction," *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, no. 43, pp. 229–258, 2010.
- [52] A. W. C. Chua, Y. C. Khoo, B. K. Tan, K. C. Tan, C. L. Foo, and S. J. Chong, "Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications," *Burn. Trauma*, vol. 4, no. 1, p. 3, 2016.
- [53] K. L. Mittal, *Progress in Adhesion and Adhesives*. 2015.
- [54] A. J. Singer, J. V. Quinn, and J. E. Hollander, "The cyanoacrylate topical skin adhesives," *Am. J. Emerg. Med.*, vol. 26, no. 4, pp. 490–496, 2008.
- [55] P. A. Leggat, D. R. Smith, and U. Kedjarune, "Surgical applications of cyanoacrylate adhesives: A review of toxicity," *ANZ J. Surg.*, vol. 77, no. 4, pp. 209–213, 2007.
- [56] R. E. Drumright, P. R. Gruber, and D. E. Henton, "Polylactic acid technology," *Adv. Mater.*, vol. 12, no. 23, pp. 1841–1846, 2000.
- [57] S. Farah, D. G. Anderson, and R. Langer, "Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 107, pp. 367–392, 2016.
- [58] K. Hamad, M. Kaseem, H. W. Yang, F. Deri, and Y. G. Ko, "Properties and medical applications of polylactic acid: A review," *Express Polym. Lett.*, vol. 9, no. 5, pp. 435–455, 2015.
- [59] L.-T. Lim, R. Auras, and M. Rubino, "Processing technologies for poly(lactic acid)," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, no. 8, pp. 820–852, 2008.

- [60] R. M. Rasal, A. V. Janorkar, and D. E. Hirt, "Poly(lactic acid) modifications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 3, pp. 338–356, 2010.
- [61] C. Y. Tham, Z. A. A. Hamid, Z. A. Ahmad, and H. Ismail, "Surface Engineered Poly(lactic acid) (PLA) Microspheres by Chemical Treatment for Drug Delivery System," *Key Eng. Mater.*, vol. 594–595, pp. 214–218, 2013.
- [62] D. Liu, M. Nikoo, G. Boran, P. Zhou, and J. M. Regenstein, "Collagen and Gelatin," *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 6, no. 1, pp. 527–557, 2015.
- [63] T. Ahmad *et al.*, "Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: A review," *Food Hydrocoll.*, vol. 63, pp. 85–96, 2017.
- [64] A. Duconseille, T. Astruc, N. Quintana, F. Meersman, and V. Sante-Lhoutellier, "Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review," *Food Hydrocoll.*, vol. 43, pp. 360–376, 2015.
- [65] S. Gorgieva and V. Kokol, "Collagen-vs. Gelatin-Based Biomaterials and Their Biocompatibility : Review and Perspectives," *Biomater. Appl. Nanomedicine*, pp. 17–51, 2011.
- [66] J. M. Diop, "Preparation and Characterization of Gelatin and Chitosan Films An Honors Thesis for the Department of Chemical and Biological Engineering," 2009.
- [67] K. Su and C. Wang, "Recent advances in the use of gelatin in biomedical research," *Biotechnol. Lett.*, vol. 37, no. 11, pp. 2139–2145, 2015.
- [68] N. Reddy, R. Reddy, and Q. Jiang, "Crosslinking biopolymers for biomedical applications," *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 6, pp. 362–369, 2015.
- [69] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, and K. C. Waldron, "Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking," *Biotechniques*, vol. 37, no. 5, pp. 790–802, 2004.

- [70] K. Sisson, C. Zhang, M. C. Farach-Carson, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, "Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 7, pp. 1675–1680, 2009.
- [71] J. Yang, Y. Wan, C. Tu, Q. Cai, J. Bei, and S. Wang, "Enhancing the cell affinity of macroporous poly(L-lactide) cell scaffold by a convenient surface modification method," *Polym. Int.*, vol. 52, no. 12, pp. 1892–1899, 2003.
- [72] Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, "Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers," *Polymer (Guildf.)*, vol. 45, no. 15, pp. 5361–5368, 2004.
- [73] A. Abreu Rejón, "Estudio del efecto del grado de entrecruzamiento de gelatina electrohilada en su resistencia a la degradación," Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., 2017.
- [74] I. Dojindo Molecular Technologies, "Cell Counting Kit-8 Technical Manual," *Dojindo*, vol. 8, pp. 1–7, 2009.
- [75] J. Muller, C. González-Martínez, and A. Chiralt, "Poly(lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding," *Eur. Polym. J.*, vol. 95, pp. 56–70, 2017.
- [76] Y. S. Nam, J. J. Yoon, J. G. Lee, and T. G. Park, "Adhesion behaviours of hepatocytes cultured onto biodegradable polymer surface modified by alkali hydrolysis process," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 10, no. 11, pp. 1145–1158, 1999.
- [77] M. C. Araque-Monrós, A. Vidaurre, L. Gil-Santos, S. Gironés Bernabé, M. Monleón-Pradas, and J. Más-Estellés, "Study of the degradation of a new PLA braided biomaterial in buffer phosphate saline, basic and acid media, intended for the regeneration of tendons and ligaments," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 98, no. 9, pp. 1563–1570, 2013.
- [78] M. R. Williamson, E. F. Adams, and A. G. A. Coombes, "Gravity spun

polycaprolactone fibres for soft tissue engineering: Interaction with fibroblasts and myoblasts in cell culture,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 7, pp. 1019–1026, 2006.

- [79] E. Hoveizi, M. Nabiuni, K. Parivar, S. Rajabi-Zeleti, and S. Tavakol, “Functionalisation and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering,” *Cell Biol. Int.*, vol. 38, no. 1, pp. 41–49, 2014.