



**Centro De Investigación Científica De Yucatán, A.C.
Posgrado En Materiales Poliméricos**

**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CELULAR EN UN ANDAMIO CON
TRATAMIENTO SUPERFICIAL A BASE DE POLIPIRROL, PARA EL CASO DE LA
INGENIERÍA TISULAR DE LA URETRA**

Tesis que presenta

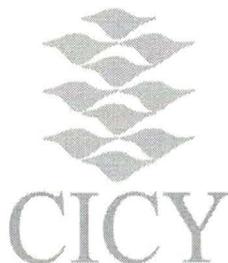
M.C JULIO CÉSAR SÁNCHEZ PECH

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS (MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán, México (Octubre 2019)

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 del M.C **Julio César Sánchez Pech** titulado “**Evaluación del comportamiento celular en un andamio con tratamiento superficial a base de polipirrol, para el caso de la ingeniería tisular de la uretra**” fue realizado en la Unidad de Materiales, en la línea de investigación de Materiales para Medicina Regenerativa en los laboratorios de físicoquímica, química macromolecular, mecánica y laboratorio limpio 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. Y de la codirección del Dr. Raúl Rosales Ibáñez de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente.

Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Mérida, Yucatán, México, a 08 de noviembre de 2019.

Agradecimientos

Agradezco a mi asesor el **Dr. Fernando Hernández Sánchez** y a mi coasesor el **Dr. Raúl Rosales Ibáñez** por todo el apoyo que me brindaron y todos los conocimientos que amablemente me regalaron, por todos los consejos de carácter científico, así como personales. Les agradezco que siempre creyeron en mí y en este proyecto que se llevó a cabo.

También agradezco al **Dr. Hugo Joel Carrillo Escalante** por todo el apoyo brindado en la parte experimental de la tesis, por toda la paciencia y también por su amistad incondicional.

Al Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Agradezco a la **MVZ María Leticia Olga Flores-Sánchez**, al **Biol. Tomás Ernesto Villamar Duque** y al **M.C. Fernando Barrón Moreno** por su invaluable ayuda para obtener las uretras de los cerdos y conejos.

Al **Dr. Alejandro Ávila Ortega** por todas las facilidades otorgadas con el reactor de plasma en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY).

Al **Dr. Pascual Bartolo Pérez** del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav) por los ensayos de XPS, quien siempre fue muy accesible y amable.

A la **Ing. Silvia Andrade Canto** por toda la paciencia que tuvo para capturar las hermosas micrografías que aparecen en este trabajo.

A la Unidad de Materiales Poliméricos del Centro de Investigación Científica de Yucatán por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

A todos mis compañeros de generación, por las pláticas enriquecedoras que teníamos por las tardes frente a los salones de posgrado.

Al **Dr. Juan Valerio Cahuich Rodríguez**, **Dr. Juan Morales Corona**, **Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes** y **Dr. Luis May Hernández** por todo su valioso apoyo en la revisión y mejora de este trabajo.

Al CONACYT por la beca No. 406037 que ha sido pilar para mi formación académica. También agradezco al Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera (PAPCA) UNAM-FESI-DIP-PAPCA-2016-14 y Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) UNAM. IA209417.

A **mi madre, mi padre, mi hermano y hermana...** Quienes siempre me apoyaron y me enseñaron que rendirse nunca será una opción.

A **mi esposa**, por brindar siempre todo su cariño y comprensión a un hombre como yo.

A todas y todos les dedico este trabajo

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Justificación del problema.....	3
Hipótesis.....	4
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
CAPÍTULO 1.- ANTECEDENTES.....	6
1.1 Ingeniería tisular de la uretra.....	6
1.1.1 Anatomía de la uretra.....	6
1.1.2 Complicaciones clínicas en la uretra.....	10
1.1.3 Biomateriales para la construcción de andamios.....	12
1.1.4 Andamios.....	13
1.1.5 Resultados clínicos.....	16
1.2 Polímeros conductores en la ingeniería tisular.....	17
1.2.1 Polipirrol.....	18
1.2.3 Tratamiento superficial del andamio mediante plasma de polipirrol.....	21
CAPÍTULO 2 . -PARTE EXPERIMENTAL.....	25
2.1 Materiales.....	25
2.2 Preparación de mezclas PCL/PLGA.....	25
2.3 Fabricación de andamios tubulares.....	26
2.4 Incorporación de polipirrol en los andamios de PCL/PLGA (80/20).....	27
2.5 Caracterizaciones físico-químicas de los andamios.....	30
2.5.1 Microscopía electrónica de barrido.....	30

2.5.2 Ensayos mecánicos	30
2.5.3 Medición de espesor en un andamio tubular	31
2.5.4 Medición del ángulo de contacto.....	32
2.5.5 Ensayos DSC	32
2.5.6 Degradación in vitro	32
2.5.7 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).....	33
2.5.8 Análisis FTIR	33
2.6 Ensayos biológicos	34
2.6.1 Obtención de uretra de conejo de Nueva Zelanda.....	34
2.6.2 Obtención de células uretrales.....	36
2.6.2.1-Digestión enzimática	36
2.6.2.2-Cosecha Celular.....	38
2.6.2.3.-Siembra de células en el andamio	39
2.6.2.4 Ensayo de viabilidad por 3-(4,5- dimetiltiazol-2-y1)-2,5 difeniltretazol (MTT)	41
2.7 Cultivo celular y citotoxicidad de los andamios con tratamiento superficial.....	42
2.7.1 Población heterogénea células uretrales de cerdo (PHCUc).	42
2.7.2 Inmunohistoquímica/inmunofluorescencia para fenotipo de células de uretra de población heterogénea de cerdos.....	42
2.7.3 Evaluaciones in vitro de siembra celular, viabilidad, proliferación y citotoxicidad.	42
CAPÍTULO 3 . - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
3.1 Fabricación de andamios	44
3.1.1.Andamio de PCL	44

3.1.2 Andamios PCL/PLGA (70/30).....	46
3.1.3. Andamio PCL/PLGA (80/20).....	47
3.1.4 Andamio PCL/PLGA (90/10).....	48
3.2 Ensayos in vitro para pérdida de masa.	51
3.3 Microscopia electrónica de barrido para los andamios elaborados con la mezcla PCL/PLGA.	52
3.4 Propiedades mecánicas de los andamios	56
3.5 Ensayos biológicos	58
3.5.1 Obtención de células uretrales.....	58
3.6 Medición espesor del andamio tubular PCL/PLGA (80/20)	61
3.7 Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	62
3.8 Polimerización por la técnica de plasma	65
3.8.1 Análisis FTIR de las películas obtenidas a partir del monómero pirrol	67
3.8.2 Comparación entre Ppy sintetizado de forma química y por medio de plasma	69
3.9 Andamios y tratamiento superficial.....	71
3.9.1 Análisis MEB de andamios con tratamiento superficial	72
3.9.2 Análisis de la superficie del andamio por XPS y FTIR.....	74
3.9.3 Ángulo de contacto.....	78
3.10 Cultivo celular y citotoxicidad de los andamios con tratamiento superficial.....	83
3.10.1 Cultivos celulares	83
3.10.2 Fenotipo de la población heterogénea células uretrales de cerdo (FPHCUC).	86
3.10.3 Citotoxicidad de los andamios PCL/PLGA (80/20) tratados con pirrol.....	87
CAPÍTULO 4 . – CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	91

Listado de tablas

Tabla 2.1.-Relación de cantidad de polímero, disolventes y parámetros de agitación.....	25
Tabla 3.1.-Dimensiones de los andamios tubulares fabricados.....	45
Tabla 3.2.-Dimensiones de los andamios tubulares fabricados.....	46
Tabla 3.3.-Dimensiones de los andamios tubulares fabricados de PLGA/PCL (20/80).	48
Tabla 3.4.-Dimensiones de los andamios tubulares fabricados de PCL/PLGA (90/10).	49
Tabla 3.5.-Porcentaje de grupos funcionales calculados a partir de las curvas XPS-C1s y XPS-N1s.	77
Tabla 3.6.-Ángulos de contacto.....	78

Listado de figuras

Figura 1. 1.- Anatomía de la uretra masculina, corte sagital.	7
Figura 1. 2.- Corte anatómico sagital de la pelvis de la mujer	8
Figura 1. 3.- Pared Uretral	9
Figura 1. 4.- Estenosis uretral	11
Figura 1. 5.- Andamio tubular de PCL/PLGA fabricado mediante la técnica de electrohilado	14
Figura 1. 6.- Queratinocitos adheridos a las fibras del andamio	15
Figura 1. 7.-Monómero de pirrol.....	18
Figura 1. 8.-Descripción breve de la conductividad en un polímero.....	19
Figura 1. 9.- Transporte de iones a través de los canales iónicos de la membrana celular. .	20
Figura 1. 10.-Uretra de conejo expuesta.....	22
Figura 1. 11.-Células ADSC en un cultivo de tipo monocapa y sobre un andamio electrohilado.	22
Figura 1. 12.-Polipirrol depositado en la superficie de fibras de poliéster.	24
Figura 2.1.-Procedimiento utilizado para la fabricación del andamio tubular	26
Figura 2.2.-Sección de un andamio tubular	27
Figura 2.3.-Esquema del reactor de plasma utilizado.....	28
Figura 2.4.-Andamios colocados sobre portaobjetos, sometidos a tratamiento con plasma	28
Figura 2.5.-Ensayos mecánicos a tensión de andamios electrohilados de PCL/PLGA.....	31
Figura 2.6.-Dimensiones del andamio tubular PCL/PLGA (80/20).....	31
Figura 2.7.-a) Cámara de CO2 b) colocación del ejemplar en la mesa de operación c) primera incisión para el acceso a la uretra	35

Figura 2.8.-Proceso de centrifugación, para la obtención del botón celular	36
Figura 2.9.-a) botón celular con población heterogénea de células uretrales, b) siembra de células previo a la incubación.....	37
Figura 2.10.-Botón celular obtenido posterior a la centrifugación.....	38
Figura 2.11.-Resuspensión de células, posterior a la centrifugación.....	39
Figura 2.12.-Siembra de células en los andamios	40
Figura 3.1.-Andamios tubulares de PCL obtenidos mediante electrohilamiento	44
Figura 3.2.-Imagen captada mediante microscopía óptica a 40x	45
Figura 3.3.-Andamio tubular de PCL/PLGA (70/30).....	46
Figura 3.4.-Andamio tubular de PCL/PLGA (80/20) e imagen capturada con microscopía óptica a 40x.....	47
Figura 3.5.-Andamio tubular de PCL/PLGA: (90/10) observado mediante microscopía óptica a 40x.	48
Figura 3.6.-Defectos en fibras, observadas en un microscopio óptico a 40x.	50
Figura 3.7.-Relación de pérdidas de masa para los andamios de PCL, PLGA al 10% y PLGA al 20%.	51
Figura 3.8.-Cuadrantes dibujados en las micrografías MEB.....	52
Figura 3.9.-Morfología de las microfibras electrohiladas a diferentes proporciones de las mezclas PCL/PLGA : (a) 100/0, (b) 90/10, (c) 80/20, (d) 70/30.....	53
Figura 3.10.-Medición de fibras y tamaños de poros de los andamios a) diámetro promedio de las fibras b) tamaño promedio de los poros.	54
Figura 3.11.-Propiedades mecánicas de los andamios para mezclas de PCL/PLGA (a) módulo elástico (b) tensión de rotura	56
Figura 3.12.-a) acceso a la uretra b) vejiga y uretra c) secciones de uretra colocadas en tubo con medio de transporte.....	58

Figura 3.13.-Fotografías obtenidas por medio de microscopía óptica de campo claro a 4x, en donde se observa poblaciones de células uretrales.....	59
Figura 3.14.- Viabilidad de células uretrales determinada por MTT en presencia de andamios de PCL/PLGA.	60
Figura 3.15.-Gráfica espesor vs longitud del andamio tubular PCL/PLGA(80/20).....	61
Figura 3.16.-Termogramas para los andamios de PCL pura, PLGA pura y la mezcla PCL/PLGA (80/20).	62
Figura 3.17.-Primera y segunda corrida del PLGA.....	63
Figura 3.18.-Reactor de plasma utilizado, ubicado en las instalaciones de Química De Materiales de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). a) reactor de plasma, b) plasma de aire, c) polimerización de pirrol por plasma, d) película obtenida a partir del monómero pirrol.	65
Figura 3.19.-Espectros FTIR de las películas obtenidas a partir del monómero de pirrol. ..	68
Figura 3.20.- (a) Gráfica polipirrol sintetizado por plasma (b) polipirrol sintetizado de forma química.	70
Figura 3.21.- a) andamio de PCL/PLGA: (80/20) b) ts=5 min c) ts=10 min, ts=15 min, ts=20 min, ts=25 min ts=30 min.....	71
Figura 3.22.-Micrografías MEB de andamios electrohilados sometidos a diferentes tiempos de tratamiento con plasma, para la incorporación de polipirrol: a) 5 min b)10 min c) 15 min d) 20 min e) 25 min f) 30 min.	73
Figura 3.23.-Espectro XPS para los andamios. a) PCL/PLGA (80/20) andamio sin tratamiento superficial b) PCL/PLGA: (80:20) andamio con 30 min de tratamiento.	74
Figura 3.24.- Espectro FTIR para el andamio. a) Andamio PCL/PLGA (80/20) sin tratamiento superficial b) Andamio PCL/PLGA(80/20) con 30 min de tratamiento superficial	75

Figura 3.25.-Imágenes de las gotas depositadas en los andamios con tratamiento superficial; a) ts=0 min, b)ts=5 min, c) ts=10 min, d) ts=15 min, e) ts=20 min, f)ts=25 min y g) ts=30 min.....	79
Figura 3.26.- a) Porcentaje de N-H calculado mediante el ajuste de la curva N1s obtenida con XPS b) ángulo de contacto vs tiempo de tratamiento superficial de los andamios.....	80
Figura 3.27.-Comparación entre el espectro FTIR de los andamios a diferentes tiempos de tratamiento con plasma.....	81
Figura 3.28.-Micrografías MEB de andamios electrohilados a) sin tratamiento b) con tratamiento superficial durante 30 min.....	82
Figura 3.29.-Fotografías obtenidas por medio de microscopía óptica de campo claro, en donde se observa poblaciones de células uretrales. a) primer pasaje, b) segundo pasaje.	83
Figura 3.30.-Imágenes de microscopía de campo claro que muestran el efecto del tratamiento superficial en la viabilidad celular.....	84
Figura 3.31.-Expresión por inmunofluorescencia para células epiteliales AE1/AE3 (verde) y (b) expresión por inmunofluorescencia para células α -actina de músculo liso. La tinción nuclear se realizó con DAPI (azul). Magnificación de 40x.....	86
Figura 3.32.-Absorbancias MTT del andamio de los andamios con tratamiento superficial *p<0.05 y **p<0.01.....	87

RESUMEN

En este trabajo, se fabricaron andamios tubulares mediante el electrohilamiento de una mezcla de PCL/PLGA y un tratamiento superficial con plasma de pirrol, ya que se ha demostrado que estos compuestos son amigables con las células, además de ser biocompatibles. Se probaron tres concentraciones diferentes de PCL/PLGA (100:0, 90/10 y 80/20), así como diferentes tiempos de exposición al plasma (5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min y 30 min). Los materiales resultantes fueron analizados fisicoquímicamente para determinar la morfología de las microfibras mediante micrografías MEB, el módulo de elasticidad y el porcentaje de deformación de los andamios también fueron calculados. De acuerdo con estos parámetros fisicoquímicos, se eligieron las concentraciones de 0%, 10% y 20% de PLGA para su caracterización biológica a través de pruebas de viabilidad celular en cultivos de células uretrales de conejo. Posterior a esta caracterización, el andamio con 20% de PLGA fue elegido para proporcionarle un tratamiento superficial con plasma de polipirrol (PPY).

La presencia de polipirrol en las microfibras, se determinó por ángulo de contacto, MEB, FTIR, y XPS. El andamio de PLGA al 20% sometido a la cámara de plasma por un intervalo de entre 10 min y 20 min presentó un sinergismo entre las propiedades mecánicas y biológicas, dado que promovieron una mayor proliferación celular, por lo que puede ser utilizado en la ingeniería de tejido uretral.

ABSTRACT

Electrospinning has proven to be a suitable technique for the production of small diameter tubes, with diverse applications, in the field of tissue engineering. In this work, tubular scaffolds were prepared by electrospinning a polycaprolactone/poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) blend and then treated with polypyrrole plasma for a possible application with urethral tissue. Scanning electron microscopy micrographs showed that for 10% and 20% of the PLGA in the blend, the microfibers, of varying diameters, were free of defects. The elastic modulus of the tubular scaffolds was highest (19 MPa) at 30% of PLGA, while the strain to break was maximum at 10–20% PLGA. However, at 30% of PLGA, within the polycaprolactone, the mechanical synergy (strain at break) was lost. Epithelial cells and smooth muscle cells viability on 80/20 blends was high. When this scaffold was treated for 15 min with polypyrrole plasma, an improvement in cell viability was observed, with few polypyrrole particles being deposited and little scaffold degradation. X-ray photoelectron spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy showed the presence of NH, C–N, and C≡N groups as the chemical groups responsible of this behavior. Therefore, these scaffolds with the polypyrrole surface treatment can be used in the urethra tissue engineering.

INTRODUCCIÓN

La medicina moderna cuenta con grandes avances en el área de trasplante de órganos que han sido desarrollados desde hace décadas, entre estos avances se encuentra el uso de inmunosupresores y técnicas quirúrgicas utilizadas para el trasplante de órganos. Sin embargo, el problema radica en la cantidad de donantes existentes, pues las listas de pacientes en espera de un órgano van en aumento, mientras que la lista de donantes se mantiene igual. Los órganos pueden provenir de dos fuentes principales: uno vivo, como un familiar que resulte histocompatible con el paciente y otro de cadáveres, sin embargo, lo último se encuentra restringido por situaciones culturales, religiosas e incluso económicas, a raíz de esta escasez de órganos surge la ingeniería tisular, una disciplina que combina los principios de biología, ingeniería y materiales para producir o reemplazar tejidos afectados por alguna enfermedad o trauma [1].

La idea básica de la ingeniería tisular es relativamente simple, en un soporte poroso biodegradable (andamio) se realiza un cultivo con células primarias o células madre apropiadas. Las células son estimuladas para inducir su proliferación y diferenciarse (en el caso de las células madre). Una vez que las células han alcanzado un número significativo, empiezan a formar la matriz extracelular (MEC) y, se inicia el proceso de degradación del andamio, el cual termina después de haber sido implantado *in vivo*.

Para la elaboración de andamios se utilizan diversas técnicas de fabricación, ya sea por medio de liofilización, impresión 3D, lixiviación de partículas, electrohilamiento, entre otras. La técnica de electrohilamiento es un método versátil que permite la creación de nanofibras y microfibras, mismas que imitan el tamaño de fibras que existen en la MEC [2].

Bajo este panorama, en este trabajo se hace énfasis en la uretra, cuya función básica es permitir a la orina salir del cuerpo; las principales causas de los problemas uretrales están asociados al envejecimiento, enfermedades o incluso defectos congénitos. Los inconvenientes que se tienen en las cirugías uretrales es que el tejido autólogo que puede

utilizarse es limitado, esto se ha intentado solucionar colocando tejido de otras partes del cuerpo, por ejemplo de escroto, sin embargo, su utilización ha mostrado ser ineficiente.

En este trabajo, se diseñó un andamio con el objetivo de ser utilizado en la ingeniería de tejidos uretrales. Los andamios tubulares se hicieron agregando diferentes cantidades de PLGA en una matriz de PCL durante el proceso de electrohilamiento. La superficie del andamio se modificó con la técnica de plasma al injertarle poli(pirrol), PPy. Finalmente, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas del andamio tratado superficialmente para determinar su uso potencial en la ingeniería tisular de la uretra.

Justificación del problema

En el siglo XIX, alrededor del 20% de hombres adultos sufrieron constricción uretral. Si bien la aparición de esta enfermedad ha disminuido dramáticamente en países desarrollados aún representa una inversión de alrededor de \$ 200 millones de dólares al año para la investigación y tratamientos de uretra[3].

La uretra puede verse afectada por defectos congénitos, accidentes e infecciones. Aunque existen procedimientos estándar para la intervención de pacientes con problemas uretrales (más de 300), algunas de ellas no son técnicas estandarizadas. La uretroplastia es uno de tales procedimientos, con una tasa de éxito del 85% al 90%. Esta cirugía consiste en la reconstrucción de la uretra mediante el uso de otros tejidos o biomateriales [4]. Sin embargo, también presenta complicaciones tales como infecciones, que son el resultado de crecimiento de vello en la nueva uretra [5].

Se han utilizado variedades de tejidos para la reparación uretral, incluyendo escroto, injertos de piel, vejiga y mucosa bucal. Sin embargo, todos estos sustitutos pueden producir complicaciones como la formación de constricciones o fallas del injerto. El uso de tejido uretral autólogo aumenta el éxito de la cirugía, pero la desventaja es su cantidad limitada disponible para reemplazar el tejido dañado[6].

La ingeniería de tejidos propone el uso de un andamio poroso para permitir la formación de tejido nuevo, ya que se ha demostrado que influye en la proliferación celular. Los andamios elaborados a partir de mezclas de PCL y PLGA, cumplen con las características mecánicas e hidrofílicas necesarias para la ingeniería tisular de la uretra [7, 8], por otra parte, existe evidencia que demuestra que un tratamiento superficial aplicado a andamios, utilizando polipirrol, aumenta el grado de adhesión y proliferación celular [9, 10].

Hipótesis

Las características mecánicas, hidrofílicas y morfológicas del andamio de PCL/PLGA obtenido mediante electrohilamiento, proporcionarán un soporte adecuado para el cultivo de células de músculo liso de la uretra. El tratamiento superficial con polipirrol aplicado al andamio por medio de plasma aumentará el grado de proliferación celular.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la proliferación de células de músculo liso sobre un andamio electrohilado, hecho a base de ácido poli(láctico-co-glicólico) y policaprolactona modificado con polipirrol.

Objetivos específicos

- Obtener andamios de PCL con distintas concentraciones de PLGA utilizando la técnica de electrohilamiento.
- Realizar un tratamiento superficial al andamio con polipirrol, mediante la utilización de plasma.
- Realizar la caracterización físico-química del andamio obtenido.
- Evaluar viabilidad y proliferación de células de músculo liso en contacto con el andamio.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Ingeniería tisular de la uretra

1.1.1 Anatomía de la uretra

La uretra es el conducto excretor de la orina que se extiende desde el cuello de la vejiga hasta el meato urinario externo. Este conducto presenta características anatómicas particulares entre el sexo femenino y masculino.

La uretra masculina posee una longitud de entre 18 cm y 20 cm, contiene células epiteliales, fibroblastos y células de músculo liso; se divide en anterior y posterior.

La uretra posterior se extiende desde el cuello de la vejiga hasta el borde inferior del diafragma urogenital. A su vez, se subdivide en uretra prostática (3-4 cm) y uretra membranosa (1-2 cm).

La uretra anterior posee longitud de entre 14 cm y 15 cm de largo. Se subdivide en uretra bulbar (1.5-2 cm) y uretra peneana, la cual, se extiende desde el ligamento del pene hasta el meato uretral externo. En la figura 1.1 se observa la anatomía de la uretra masculina[11].

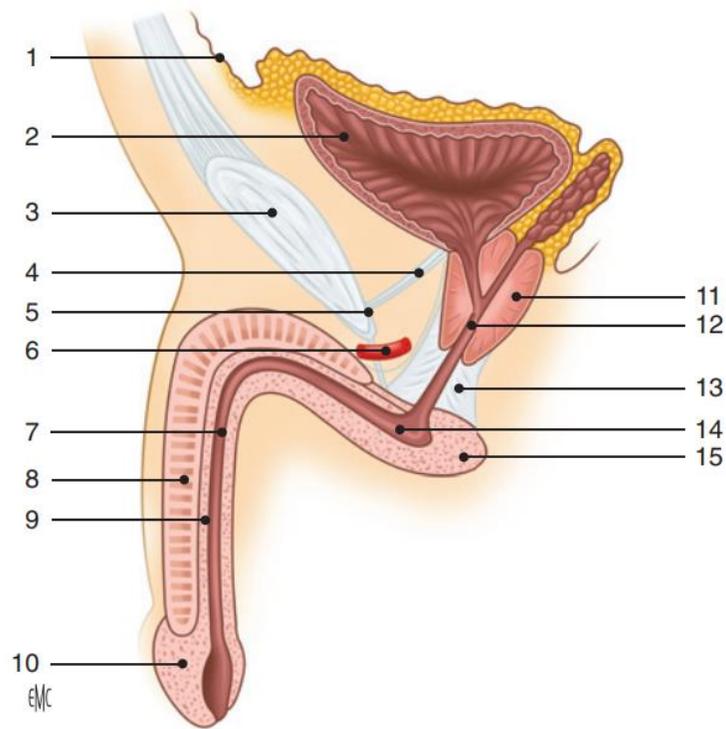


Figura 1. 1.- Anatomía de la uretra masculina, corte sagital. 1. Peritoneo; 2. vejiga; 3. pubis; 4. ligamentos pubovesicales; 5. ligamento arqueado subpúbico; 6. vena dorsal profunda del pene; 7. uretra peniana; 8. Cuerpo cavernoso; 9. cuerpo esponjoso; 10. glande; 11. próstata; 12. uretra prostática; 13. esfínter estriado de la uretra; 14. uretra bulbar; 15. bulbo del cuerpo esponjoso [12]

En las mujeres, la uretra se encuentra dentro de las paredes vaginales como se muestra en la figura 1.2. La uretra femenina es mucho más corta que la masculina teniendo 4 cm de largo aproximadamente y 7 mm de diámetro; comienza en el cuello de la vejiga y conecta al exterior justo después de pasar por el esfínter uretral. La uretra de la mujer suele tener menor frecuencia de alteración comparada con la de los hombres.

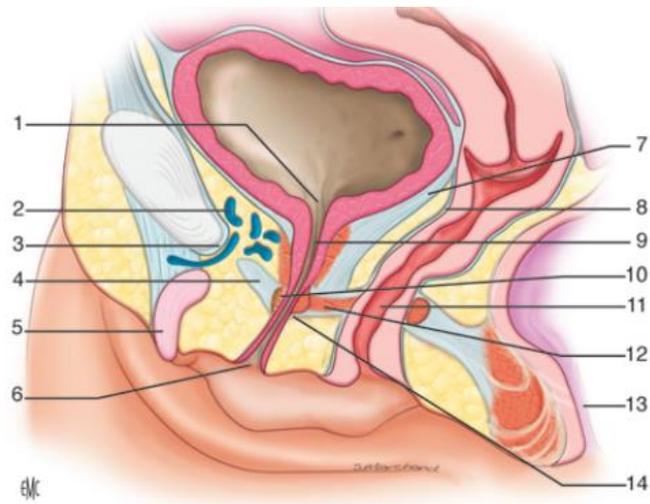


Figura 1. 2.- Corte anatómico sagital de la pelvis de la mujer 1. Orificio interno de la uretra; 2. espacio retropúbico con el plexo venoso retropúbico; 3. ligamento arqueado del pubis; 4. ligamentotransverso del periné; 5. clítoris; 6. orificio externo de la uretra; 7. fascia vesical; 8. tabique uretrovaginal; 9. uretra; 10. Esfínter uretral; 11. vagina; 12. diafragma urogenital; 13. conducto anal; 14. Rafe.

El músculo liso se encuentra a lo largo de la uretra femenina y hasta la parte membranosa de la uretra masculina. La pared uretral se compone de varias capas: urotelio, lámina propia, músculo liso circunferencia y longitudinal, así como músculo estriado, mostrado en la figura 1.3.

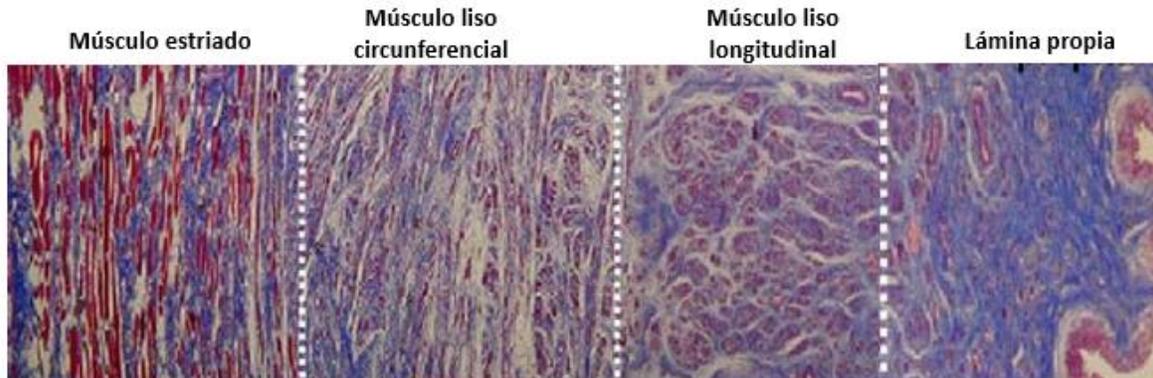


Figura 1. 3.- Pared Uretral [13]

Cuando la vejiga se encuentra llena de líquido, la función principal de la uretra es la de prevenir fugas de orina generando una presión de cierre mayor a la presión intravesical de la vejiga. Durante la micción, la presión uretral es menor y la uretra relaja los músculos que la forman, acortando su longitud, permitiendo así la salida de la orina [14].

En animales vivos, esta presión es mantenida por una variedad de elementos, incluyendo la generada en la cavidad abdominal, musculatura del piso pélvico y la contracción del músculo esquelético que rodea a la uretra. Un componente significativo del tono uretral es el generado por el músculo liso uretral, esto se evidencia con la observación que se ha realizado en una uretra de rata aislada, que es capaz de mantenerse tónicamente contraída por varias horas después que es removida del animal [15].

1.1.2 Complicaciones clínicas en la uretra

Una de las causas más comunes de la obstrucción miccional de la uretra es su estrechez (estenosis). Los pacientes con estenosis uretral presentan una prevalencia de infecciones urinarias del 41%, además el 11% presenta problemas de incontinencia urinaria [16]. Debido a la alta incidencia de accidentes de tráfico, caídas y lesiones ocasionadas por fracturas pélvicas, se originan lesiones en la uretra posterior.

En el siglo XIX, aproximadamente el 20% de los adultos varones sufrieron constricción uretral. Desde entonces, la aparición de esta enfermedad ha disminuido dramáticamente en países desarrollados como los Estados Unidos, pero aun así este país invierte alrededor de \$200 millones de dólares anuales para investigación y para problemas clínicos relacionados con la uretra. En el Reino Unido, se realizan 16,700 cirugías anuales relacionadas con la uretra [3, 17].

En el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional (HECMN) en México, se le proporcionó atención médica a 629 pacientes con el diagnóstico de estenosis de uretra, por lo que se ha llegado a calcular que el gasto anual en pacientes con problemas uretrales asciende a doscientos millones de pesos mexicanos [18].

La estenosis uretral es una enfermedad crónica y diversa, y no existe a nivel mundial ni nacional un protocolo de manejo estandarizado para su tratamiento médico, debido a una gran variabilidad clínica y gran complejidad que se debe principalmente a la longitud, localización, diámetro, grado de espongioplasia y variación anatómica de la constricción que sufre cada paciente, al igual que su respuesta de cicatrización individual. En la figura 1.4, se observa una estenosis en la uretra anterior masculina con antecedente de infección gonocócica.

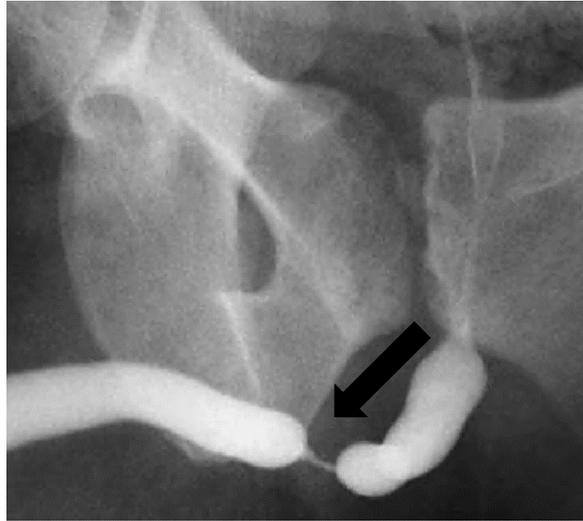


Figura 1. 4.- Estenosis uretral [19]

La reconstrucción uretral continúa siendo un campo con numerosos desafíos para los urólogos. Si bien existen procedimientos que son estándar para la intervención de pacientes con problemas uretrales, también existen más de 300 técnicas conocidas y no estandarizadas que son utilizadas para la reparación de constricciones uretrales, así como de hipospadias (anomalía congénita del pene)[20]. Esta amplia diversidad muestra la complejidad de las enfermedades de la uretra, así como la falta de un procedimiento perfecto. Existe una variedad de tejidos que han sido utilizados para la reparación uretral: injertos de piel, vejiga y mucosa bucal. Sin embargo, todos estos sustitutos presentan limitaciones en comparación con el tejido uretral autólogo, ya que pueden presentar diversas complicaciones (formación de constricciones y fallas del injerto en su mayoría) [21]. Además, la cantidad de tejido que puede ofrecer un donador es limitado, especialmente en el caso de defectos de gran longitud, por lo que esto supone un problema. Para superar estos inconvenientes, han sido explorados distintos materiales alternativos para la reconstrucción uretral.

1.1.3 Biomateriales para la construcción de andamios

De manera general, han sido utilizados dos tipos de biomateriales para la regeneración de tejidos uretrales. Unos son polímeros naturales a base de matrices descelularizadas que provienen de vejigas, intestino delgado, aorta, dermis y otros que son a base de polímeros sintéticos, tales como el poli(ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA), policaprolactona (PCL) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) [21, 22]. La ventaja que poseen los polímeros sintéticos es la facilidad con la que pueden ser manufacturados para la creación de andamios, así como la posibilidad de controlar propiedades mecánicas y tiempo de degradación.

Bisson *et al.* [23], determinó que las células uroteliales (CU) no proliferan de manera adecuada sobre poli(etilen tereftalato) (PET), sin embargo, cuando la superficie del PET fue modificada añadiendo colágeno, la adherencia y la proliferación de CU aumentó. En otro estudio, se investigó la proliferación de CU sobre andamios hechos de poli-L-láctico (PLLA) que estaban cubiertos con una capa delgada de fibras de policaprolactona obtenidas por medio de electrohilamiento [24]; en este estudio se observó que la proliferación de las CU fue mayor en el andamio compuesto de PLLA-PCL, en comparación con andamios elaborados únicamente de PCL. Rohman *et al.* [7] cultivó CU y células de músculo liso (CML) de forma separada sobre andamios hechos de PLGA y PCL, en donde el PLGA superó a la PCL en cuanto al crecimiento de CU y CML. En este mismo estudio, se determinó que las propiedades mecánicas del polímero (módulo elástico y espesor) influyen en la proliferación celular.

Una situación que resulta relevante es el co-cultivo de diferentes tipos de célula en un solo andamio. Kimuli *et al.* [25] realizó el cultivo de CU y CML, para ello utilizó Permacol® (dermis descelularizada porcina) y concluyó que este soporte permite el crecimiento de CU pero no de CML cuando son cultivados por separado, sin embargo, las células de músculo liso crecen sobre el Permacol® cuando es co-cultivada con células uroteliales.

1.1.4 Andamios

La ingeniería de tejidos propone el uso de andamios porosos, factores de crecimiento y moléculas de importancia biológica para permitir la formación de nuevo tejido, ya que se ha demostrado que influye en la proliferación celular. Estos andamios porosos se pueden fabricar mediante varios métodos, como electrohilado, separación de fases, secado por congelación, autoensamblaje, entre otros[26].

El andamio es un componente clave que funciona como una estructura tridimensional (3-D) para las interacciones celulares, cuya finalidad es la formación de MEC. Para la elección de un andamio es necesario determinar que cumpla con las características de biocompatibilidad que tendrá en el sitio del implante, así como de sus propiedades mecánicas, de composición y topografía.

También debe exhibir propiedades químicas y mecánicas que mantengan el constructo en el lugar del implante, mientras se produce la formación de la MEC y del nuevo tejido[27].

Una de las técnicas para la fabricación de andamios uretrales es la de electrohilamiento. Durante el proceso, se genera un campo electrostático mediante la utilización de altos voltajes, con el propósito de formar las fibras a partir de una disolución polimérica, estas fibras son depositadas en un electrodo que funciona como colector, el disolvente que posee la disolución polimérica se evapora y las fibras son producidas.

Estos andamios imitan la estructura de la MEC del tejido receptor, ya que permite la producción de fibras a escalas nanométricas y micrométricas de una amplia gama de polímeros[28], incluyendo polímeros aprobados por la FDA como el PLGA y la PCL [29].

En la figura 1.5 se observa un andamio fabricado mediante el electrohilamiento de PCL y PLGA [30]. La ventaja de usar PCL en la fabricación de este andamio se relaciona con sus propiedades mecánicas elásticas, una propiedad importante para las aplicaciones de ingeniería tisular [31].

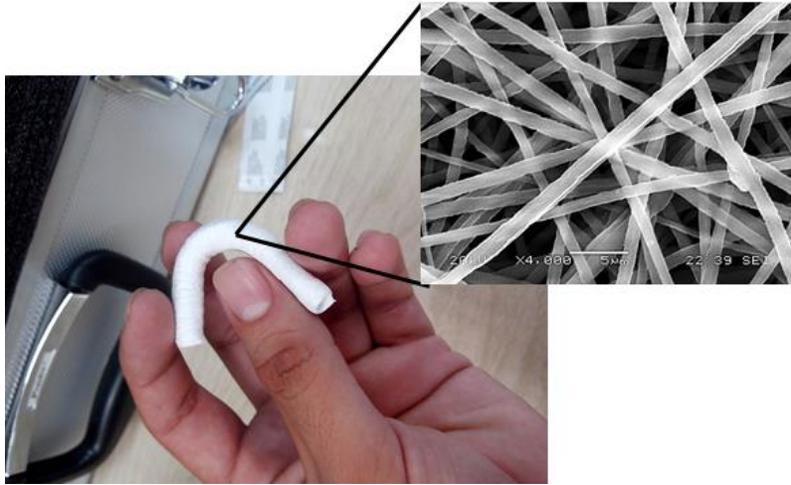


Figura 1. 5.- Andamio tubular de PCL/PLGA fabricado mediante la técnica de electrohilado [30].

Hiep *et al.*[8] evaluó la adhesión y proliferación de fibroblastos en un andamio obtenido mediante el electrohilamiento de una mezcla de PCL/PLGA. Los autores señalaron que la presencia del 20% de PLGA en el andamio aumenta la adhesión celular, en contraste con un andamio elaborado solamente con PCL. Los autores también reportaron que si el contenido de PLGA en el andamio es superior al 30% la adhesión celular disminuye.

La PCL es uno de los polímeros más empleados en la ingeniería tisular por sus excelentes propiedades mecánicas, sin embargo, su principal desventaja es su poca biocompatibilidad, por lo que a menudo se mezcla con otro polímero; la finalidad es obtener andamios con suficientes propiedades mecánicas durante el implante, y ser más atractivos para la adhesión celular. Wei *et al.* [32] propone un andamio electrohilado para la ingeniería de tejidos de la uretra; a partir de fibroína de seda, colágeno y PCL utilizando relaciones de 1:1:4, 1:1:8 y 1:1:10 respectivamente. El objetivo de su investigación fue la obtención de mucosa, por medio del aislamiento y cultivo de queratinocitos en el andamio. Para determinar la viabilidad celular en las concentraciones propuestas, realizaron ensayos de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y1)-2,5 difeniltretazol (MTT), las lecturas se llevaron a cabo en los días de cultivo 1, 3, 5 y 7. Los autores señalan que los valores de absorbancia son mayores cuando

al andamio de PCL se le agrega colágeno y fibroína de seda, en la figura 1.6 se observan células adheridas al andamio e interconectadas con las fibras.

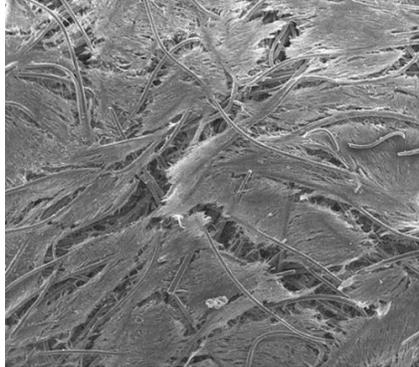


Figura 1. 6.-.-Queratinocitos adheridos a las fibras del andamio [32].

1.1.5 Resultados clínicos

Mediante el cultivo de células en andamios se han tratado constricciones uretrales. Bhargava *et al.*[33] utilizó mucosa bucal en un soporte de dermis descelularizado en cinco pacientes obteniendo resultados distintos, dos de cinco pacientes revelaron problemas en los injertos. En un paciente, el injerto fue removido y reemplazado por mucosa bucal nativa. Otro paciente requirió la eliminación parcial del injerto, los tres pacientes restantes fueron sometidos a visión directa de uretrotomía interna durante el primer año. Después de tratamientos adicionales, cuatro de cinco pacientes mantuvieron el injerto después de nueve años sin complicaciones. En otro estudio realizado por Raya-Rivera *et al.* [34], cinco pacientes cuyo diagnóstico fue constricción en la uretra posterior, fueron intervenidos para injertar un andamio tubular hecho a base de PGA cultivado con CU y CML, esta intervención resultó exitosa para cuatro de los cinco pacientes, el paciente restante requirió de una incisión transuretral sin intervenciones posteriores. Las uretras tubulares utilizadas mostraron características histológicas similares a las uretras nativas, manteniendo una función adecuada por más de seis años. En otro estudio, seis pacientes con hipospadia severa fueron tratados mediante CU que fueron cultivadas en un injerto de dermis[35]; cinco de seis pacientes mostraron resultados exitosos, en el paciente restante se llevó a cabo una uretrotomía interna después de la uretroplastia.

1.2 Polímeros conductores en la ingeniería tisular

La estimulación de varios tipos de células mediante estudios *in vitro* e *in vivo* ha sido de interés por muchos años. Existen estudios en donde se reporta varias respuestas celulares cuando son cultivados en un ambiente eléctricamente activo, incluyendo alineación celular. Incluso, durante la cicatrización de una herida, se ha encontrado la existencia de campos de ~ 1 V/cm en el espacio tisular local[36]. La aplicación *in vitro* de campos de corriente eléctrica directa de 1-10 V/cm y corriente eléctrica continua de entre 10 μ A y 100 μ A ha demostrado que afecta la migración y alineación de células (nerviosas, mioblastos, cardiofibroblastos y endoteliales)[37, 38]. Esta idea, dio paso a la utilización de polímeros conductores para la ingeniería tisular.

Dentro de la categoría de los polímeros sintéticos, los materiales electroactivos forman parte de una nueva generación de biomateriales inteligentes que permiten la liberación directa de estimulación eléctrica a las células [39]. Los primeros polímeros con propiedades conductivas se sintetizaron hace algunas décadas, el primer trabajo sobre polímeros conductores se debió a la conductividad mostrada por el poliacetileno, un polímero que normalmente solo presenta semiconducción. Sin embargo, cuando este polímero fue oxidado con vapor de yodo su conductividad aumentó diez millones de veces, este fenómeno fue denominado “dopaje” y es esencial para la conductividad de los polímeros, ya que solo a través de este proceso dichos polímeros alcanzan una alta conductividad [40]. Debido a que síntesis del poliacetileno conlleva dificultades, además de ser inestable en el aire, se inició la búsqueda de polímeros conductores con mejores propiedades. Los poliheterociclos son una familia de polímeros conductores que poseen estabilidad y alta conductancia. Esta familia de polímeros contiene a los polímeros que generalmente son objeto de investigaciones en la actualidad: polipirrol, polianilina y politiofenos [41].

1.2.1 Polipirrol

El polipirrol es uno de los polímeros conductores más estudiados en la actualidad, ya que posee propiedades de estímulo-respuesta, característica importante para el área de los biomateriales. Una de sus características más importantes es su biocompatibilidad ya sea *in vitro* o *in vivo*, posee también estabilidad química en agua y en aire, así como una alta conductividad bajo condiciones fisiológicas. Una de las desventajas del polipirrol es que es difícil de procesar una vez que es sintetizado, su estructura molecular, que se muestra en la figura 1.7, lo hace un material no termoplástico, mecánicamente rígido, frágil e insoluble después de su síntesis. Actualmente, el polipirrol es utilizado en numerosas aplicaciones, tales como: celdas de combustible, resistencia a la corrosión, pantallas para computadoras y como biomaterial para la ingeniería tisular[42].

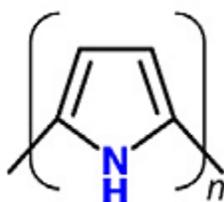


Figura 1. 7.-Monómero de pirrol

La conductividad de los polímeros se debe a la facilidad con la cual los electrones pueden moverse dentro y entre las cadenas del polímero[41]. El enlace σ se encuentra en los enlaces simples y en los enlaces dobles, presenta un enlace π . Los orbitales p en la serie de enlaces π se superponen entre sí, permitiendo que los electrones sean más fácilmente deslocalizados y puedan desplazarse entre los átomos[43]. Como se había mencionado, uno de los factores claves para la conductividad del polímero es el dopante (carga negativa, anión en la mayoría de los casos). El dopante introduce un portador de carga dentro del sistema, removiendo o añadiendo electrones de la cadena polimérica, esto resulta favorable para que el electrón sea rodeado por una distorsión local de la red cristalina, esta carga se denomina polarón (ion radical asociado con una distorsión de la red cristalina), el polarón tiene la capacidad de

moverse a lo largo de la cadena polimérica, permitiendo la conductividad eléctrica, como se muestra en la figura 1.8 [42].

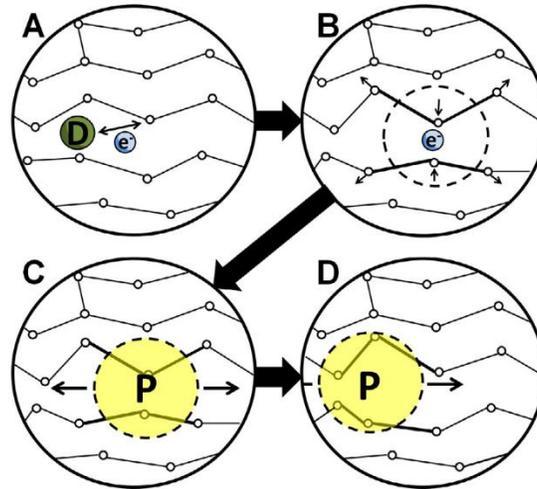


Figura 1. 8.-Descripción breve de la conductividad en un polímero, A) presencia del dopante B) carga rodeada de una distorsión provocada por la red cristalina C) polarón D) movimiento del polarón a lo largo de la cadena[42].

El polipirrol ha demostrado poseer propiedades de biocompatibilidad, así como propiedades conductoras y un proceso de síntesis simple. Además, se han realizado estudios con diferentes tipos de células, incluidas neuronas, fibroblastos y células endoteliales, en los cuales, se ha demostrado que estas células son capaces de adherirse y crecer *in vitro* sobre sustratos de polipirrol [44].

Un reto al utilizar polipirrol se relaciona con las propiedades mecánicas, ya que es difícil de manipular y procesar, lo cual limita sus aplicaciones. Para abordar este tipo de problemáticas, es posible añadir PCL para compensar las propiedades mecánicas [45].

En presencia de polipirrol, las respuestas de varios tipos de células han sido estudiado por Jakubiec *et al.*[46]. Para esto, se utilizaron cuatro grados de incremento en la conductividad del polímero, comparados con poliéster y polidimetilsiloxano sin ningún tipo de tratamiento. Los autores llegaron a la conclusión de que, para altos grados de conductividad, la viabilidad de las células (fibroblastos y endoteliales) sufre cierta alteración, ya que la activación

polimorfonuclear de la célula incrementa, y la expresión de IL-6 se reduce. La respuesta óptima de adhesión celular para los poliésteres tratados con polipirrol fueron los que poseían conductividades intermedias. Sin embargo, los autores no lograron entender completamente la causa, especularon que la liberación local de cationes provenientes del polipirrol (lo cual, asumieron que variaba entre los grados de conductividad del polímero); afectaba el comportamiento celular, debido a la modificación del transporte iónico alrededor de la membrana celular [47]. La figura 1.9 muestra un ejemplo de cómo ocurre la transferencia de iones a través de la membrana celular.

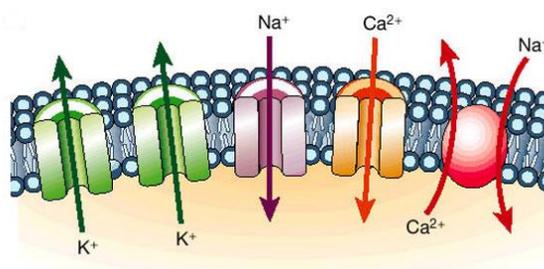


Figura 1. 9.- Transporte de iones a través de los canales iónicos de la membrana celular.

La hipótesis que brindan los autores se relaciona con el gradiente eléctrico que existe en la membrana celular, este gradiente refleja diferentes concentraciones aniones y cationes en cada lado de dicha membrana. Existen millones de iones con carga positiva o negativa en el citosol y en el fluido extracelular, este fenómeno es la base de la comunicación eléctrica entre las células. El gradiente eléctrico es también conocido como potencial de membrana y ejerce una fuerza en todos los iones que existen dentro y fuera de la célula[48].

En complemento, estudios como el de Tomita *et al.* [49], establecen la existencia de actividad eléctrica generada en las células, que es propagada a las células aledañas en una manera electrónica por medio de uniones gap [50]. Además, se tiene conocimiento de que dichas uniones se encuentran involucrados en la proliferación celular[51].

1.2.3 Tratamiento superficial del andamio mediante plasma de polipirrol.

El tratamiento superficial utilizando un reactor de plasma es un método que se utiliza para modificar la superficie de diversos sustratos. En la ingeniería tisular esta técnica es empleada para añadir grupos funcionales a los andamios. Kim *et al.*[52] determinó el efecto de proporcionar un tratamiento superficial con plasma a andamios elaborados por electrohilamiento, a partir de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA). El gas utilizado en la cámara del reactor fue oxígeno y amonio; para inducir una descarga de plasma en estos gases utilizaron una potencia de 100 W durante 3 min. El cambio en la composición química del andamio (antes y después de ser sometido al tratamiento superficial) fue detectado por medio de espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). Los resultados mostraron un aumento en la relación Oxígeno/Carbono, que se atribuye a la formación de grupos hidróxilos y peróxilos, así como la aparición del pico N1s cuando el gas amonio es utilizado.

Después del tratamiento superficial, los autores confirmaron una diferencia en el ángulo de contacto, cuyo valor de 124 ° disminuyó a 55 °. Siri *et al.*[53] evaluó el desempeño de andamios electrohilados elaborados a partir de PCL. Para aumentar el grado de adhesión celular aplicaron un tratamiento superficial utilizando plasma de oxígeno, en andamios con tamaños de poros de 475 ± 194 nm. Para la descarga de plasma utilizaron una potencia de 30 W y una presión de 2 mbar, el andamio fue colocado en la cámara del reactor durante 5 min. La viabilidad celular en los andamios se evaluó mediante ensayos MTT utilizando fibroblastos, el tiempo en el medio de cultivo fue de 24 h. Los autores concluyen que un incremento en la hidrofiliidad de la superficie (disminución del ángulo de contacto de 120° a 0°), obtenida con el tratamiento con plasma mejora la adhesión celular.

Wang *et al.*[54] propone un andamio fabricado mediante electrohilamiento a partir de ácido poliláctico (PLA), en el que se cultivaron células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC) de conejos, este andamio sería utilizado para la reparación de defectos uretrales en modelos *in vivo*. El andamio fue seccionado en partes de 1 cm³ y se cultivaron células en él, durante un período de 4 días. La uretra de los conejos fue expuesta y se colocó un tubo de silicón para mantener su funcionamiento, como se muestra en la figura 1.10.

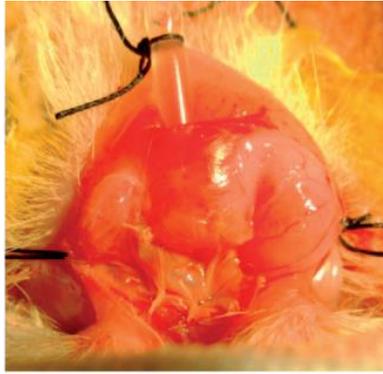


Figura 1. 10.-Uretra de conejo expuesta, se muestra la utilización de un tubo de silicón de manera provisional, para permitir la micturición del animal.

A la uretra, le fueron provocados defectos (10 mm de largo y 5 mm de ancho) y cubiertos con los constructos de PLA. Al término de la semana cuatro y la semana seis, los ejemplares fueron sacrificados para visualizar la adhesión celular en los andamios, las fotografías se muestran en la figura 1.11.

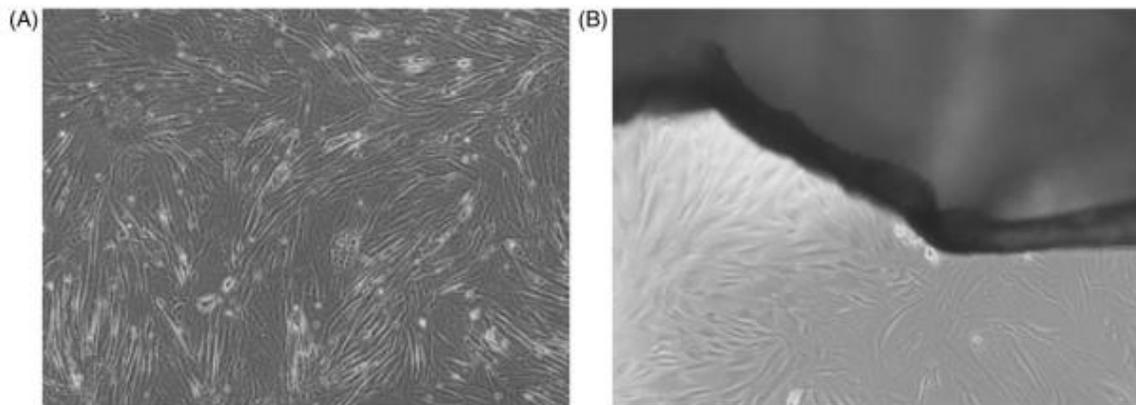


Figura 1. 11.-En (A) se aprecia la morfología de células ADSC en un cultivo de tipo monocapa (x100); en (B) se observan células ADSC sobre un andamio electrohilado.

Los autores señalan que un andamio elaborado a partir de electrohilamiento contribuye a la reparación de defectos uretrales, pues funciona como un soporte que promueve la proliferación celular.

El polipirrol es un polímero frágil después de ser sintetizado, esto ocasiona complicaciones para su procesamiento. Con la finalidad de proveer de flexibilidad al polímero, autores como Ghasemi-Mobarakeh *et al.* [41] han depositado polipirrol sobre estructuras hechas a base de poliéster. Estas estructuras demostraron ser citocompatibles, además de permitir el crecimiento celular. Shi *et al.*[55], realizó investigaciones con un andamio hecho de PDLLA, en cuya superficie depositó polipirrol en forma de nanopartículas, concluyó que el andamio mostró biocompatibilidad y crecimiento celular de fibroblastos.

Una de las técnicas más utilizadas para incorporar polipirrol a estructuras porosas se realiza mediante la deposición de polímeros por plasma, que ocurre con la activación de un precursor, que típicamente es gas que contiene monómero, creando intermedios reactivos que dan lugar a la formación de macromoléculas. Los procesos primarios son activados por medio de impacto de electrones, ya que los electrones toman la mayor parte de la energía suministrada dejando un plasma frío, esto significa que no se encuentra en equilibrio.

Zhang *et al.*[10] realizó un tratamiento superficial mediante plasma para proporcionar propiedades conductoras a fibras de poliéster, logrando su depósito como se muestra en la figura 1.12. Para esto, los autores primero activaron la superficie del poliéster con una descarga de plasma frío, con la finalidad de hacer reaccionar la superficie activa con el monómero de pirrol, generando de esta manera fracciones de monómero enlazados de manera covalente con la superficie del poliéster.

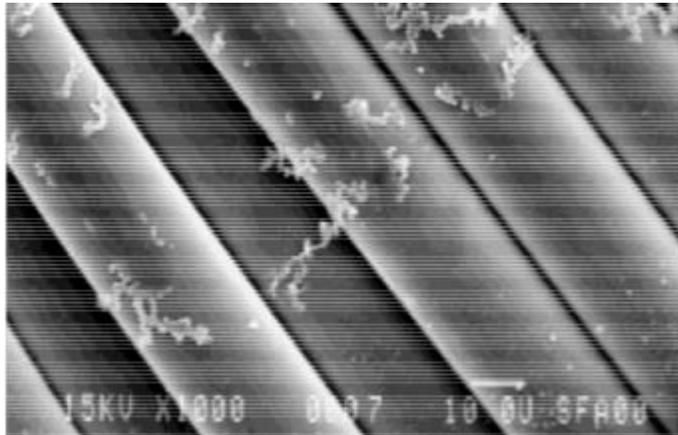


Figura 1. 12.-polipirrol depositado en la superficie de fibras de poliéster.

Los autores realizaron ensayos de adhesión y proliferación celular, concluyendo que el polipirrol proporciona propiedades de adhesión, además de promover proliferación celular.

Rowlands *et al.*[9] obtuvieron un sustrato de polipirrol dopado con ácido hialurónico. En su trabajo, las superficies de PPy se recubrieron con colágeno IV (CIV) y Matrigel®. Los autores demostraron que estos sustratos incrementan la viabilidad celular. Además, esto permite que se produzca la diferenciación en un fenotipo celular más contráctil, y esta característica es necesaria para las células musculares lisas.

Cruz *et al.*[56] electrohilieron andamios preparados a partir de PCL, PCL-colágeno y PCL-elastina. Los andamios fueron sometidos a plasma de pirrol dopado con yodo, sus resultados mostraron que un soporte tridimensional modificado de esta manera provee un ambiente adecuado para la adhesión, crecimiento y viabilidad de fibroblastos.

CAPÍTULO 2 . -PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiales

Policaprolactona (PCL) ($M_w = 80000$, $T_m = 58^\circ\text{C}$ - 60°C y $T_g = -60^\circ\text{C}$ de la compañía Perstorp) y ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA, 75:25), ($M_w = 76000$ - 115000 y $T_g = 49^\circ\text{C}$ - 55°C de la compañía Sigma-Aldrich). Cloroformo y etanol ambos con un grado reactivo de 99.9% (JALMEK, México). El pirrol utilizado fue de grado reactivo del 98% (Sigma-Aldrich, México).

2.2 Preparación de mezclas PCL/PLGA.

PCL y PLGA fueron mezclados en cuatro concentraciones diferentes: 100/0, 90/10, 80/20 y 70/30. Los polímeros se disolvieron en una mezcla de cloroformo:etanol (10:1 v/v) bajo agitación continua en una placa de calentamiento a 25°C durante 24 h. En la tabla 2.1 se muestran las cantidades de polímero, disolventes y condiciones de agitación utilizadas para la preparación de las mezclas.

Tabla 2.1.-Relación de cantidad de polímero, disolventes y parámetros de agitación

Andamio	PCL (g)	PLGA (g)	Cloroformo (ml)	Etanol (ml)	Tiempo en agitación (h)	Porcentaje de concentración
PCL	3	-	10	1	24	27.27%
PCL/PLGA (90/10)	2.7	0.3	10	1	24	27.27%
PLGA/PCL (80/20)	2.4	0.6	10	1	24	27.27%
PCL/PLGA (70/30)	2.1	0.9	10	1	24	27.27%

2.3 Fabricación de andamios tubulares

Para la fabricación de andamios tubulares se utilizó un equipo de electrospinning NABOND modelo TL-01. La solución que contenía la mezcla (3 mg / 11 ml) se colocó en una jeringa con una aguja de acero inoxidable como capilar. El caudal de la solución de polímero fue de 0,2 ml/h, el voltaje aplicado entre una aguja y el colector cilíndrico fue de 20 kV y la distancia entre la aguja y el colector de cilindro fue de 13 cm. La fabricación de andamios tubulares se realizó a temperatura ambiente (30 °C).

En el diagrama de la figura 2.1 se muestra el procedimiento para la fabricación del andamio tubular. Por medio de una bomba inyectora, la disolución polimérica es dirigida a una aguja de metal conectada a un electrodo, con la aplicación de una diferencia de voltaje la disolución polimérica es atraída hacia el colector en forma de fibras.

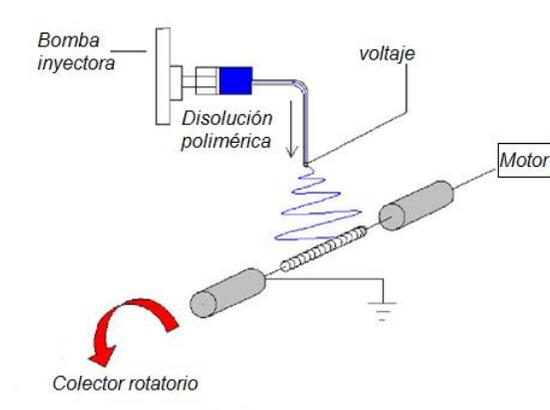


Figura 2.1.-Procedimiento utilizado para la fabricación del andamio tubular

2.4 Incorporación de polipirrol en los andamios de PCL/PLGA (80/20).

Con la técnica de electrohilamiento se fabricaron cinco andamios tubulares, cuyas medidas fueron 12 ± 0.5 cm de largo, 1 ± 0.1 mm de espesor y diámetros de 5 mm, el tiempo de fabricación de cada uno fue de 12 h. Los andamios tubulares fueron seccionados con medidas de 2 cm x 2 cm para ser colocados en la cámara del reactor, como se muestra en la figura 2.2.



Figura 2.2.-Sección de un andamio tubular

Los parámetros utilizados en el reactor de plasma acoplado un generador con 13.56 Hz de radiofrecuencia (Cesar Advance Energy, USA), cuyo esquema se muestra en la figura 2.3, fueron de: una presión de entre 5×10^{-2} Torr y 9×10^{-2} Torr, potencia de 15 W y distancia entre los electrodos de 9 cm.

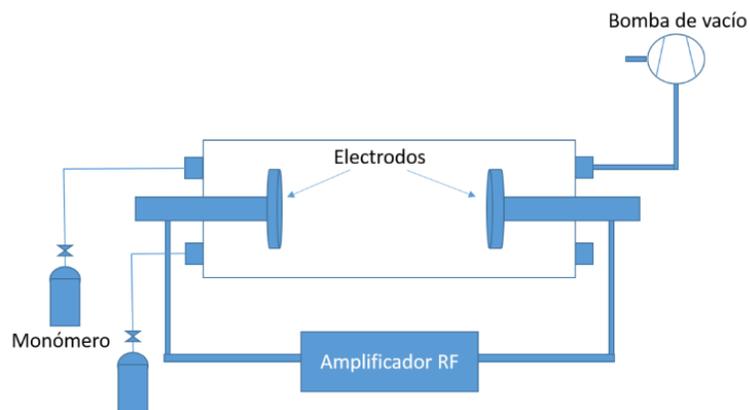


Figura 2.3.-Esquema del reactor de plasma utilizado

Dentro de la cámara del reactor se colocaron andamios seccionados con un área de 4 cm², como se observa en la figura 2.4.

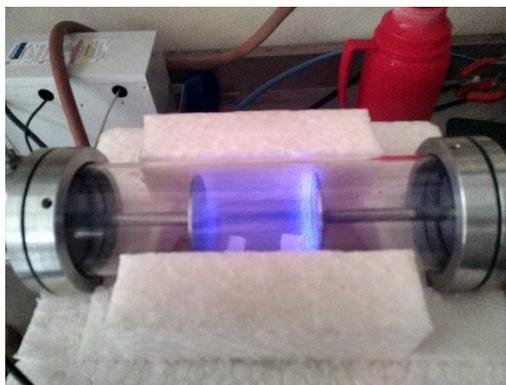


Figura 2.4.-Andamios colocados sobre portaobjetos, sometidos a tratamiento con plasma

Los tratamientos superficiales con plasma se llevaron a cabo en diferentes intervalos de tiempo: 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min y 30 min; dichos tiempos serán definidos como t_s . La válvula del recipiente que contenía el monómero de pirrol fue abierta durante cada tiempo establecido.

2.5 Caracterizaciones físico-químicas de los andamios

2.5.1 Microscopía electrónica de barrido

La morfología y la microestructura de las fibras electrohiladas se determinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM6369LV operado a 20 kV. El software Image-J se utilizó para analizar el diámetro de las fibras del andamio. Las micrografías se dividieron en cuatro regiones, para cada cuadrante se midieron 25 fibras y 25 poros para determinar el diámetro promedio de las microfibras y el tamaño de poro promedio respectivamente

2.5.2 Ensayos mecánicos

Se llevaron a cabo pruebas mecánicas para determinar el módulo de elasticidad, porcentaje de deformación y resistencia a la tensión de los andamios. Se utilizó una máquina universal Shimadzu modelo AG-I. Las dimensiones de las muestras fueron de 25 mm x 5 mm x 0.16 mm. La muestra se montó en un marco de papel para alinear la muestra con las mordazas mientras se deformaba a una rapidez de 5 mm/min como se muestra en la figura 2.5.



Figura 2.5.-Ensayos mecánicos a tensión de andamios electrohilados de PCL/PLGA.

2.5.3 Medición de espesor en un andamio tubular

Se realizó una medición de espesores con respecto a la longitud de un andamio tubular de PCL/PLGA (80/20) mostrado en la figura 2.6, esta longitud se dividió en secciones de 3 mm, dando como resultado 33 mediciones obtenidas con un Vernier de la marca Mitutoyo. A partir de estos datos, se construyó una gráfica que relaciona espesor y longitud aplicando un ajuste del tipo polinomial con el software Kaleidha Graph 4.2.

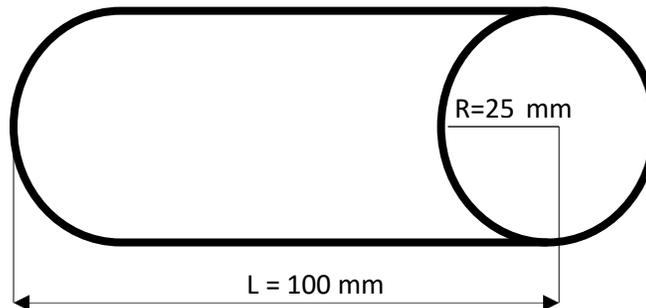


Figura 2.6.-Dimensiones del andamio tubular PCL/PLGA (80/20)

2.5.4 Medición del ángulo de contacto

Para la medición del ángulo de contacto se utilizó un equipo Ramé-hart modelo 590 y agua destilada, el procedimiento consistió en colocar una gota de aproximadamente 1 μL ; posteriormente, las fotografías de la gota fueron capturadas durante 30 s, 60 s y 120 s, se realizaron 10 mediciones por cada tiempo t_s y se capturó un total de 200 fotografías. Estas fotografías fueron analizadas con el software Image-J para el cálculo del ángulo de contacto.

2.5.5 Ensayos DSC

Se realizaron ensayos mediante un calorímetro diferencial de barrido modelo Perkin Elmer para determinar el comportamiento térmico de los polímeros cuando son mezclados. La rampa de temperatura fue de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y los ensayos fueron hechos en un intervalo de entre 0 $^{\circ}\text{C}$ y 80 $^{\circ}\text{C}$.

2.5.6 Degradación in vitro

Se seccionaron 30 muestras (5 mm x 5 mm) de cada andamio PCL, PLGA al 10%, PLGA al 20% y PLGA al 30% y se colocaron en recipientes de poliestireno con 10 ml de solución buffer salino.

Posteriormente, fueron colocados en una incubadora a 37 $^{\circ}\text{C}$. El medio fue sustituido cada 7 días. Los períodos de evaluación fueron dos, cuatro y seis semanas, al término de cada período, los andamios fueron secados en horno de convección a una temperatura de 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Para determinar la pérdida de masa en el andamio, se utilizó la siguiente ecuación 1:

$$\text{Porcentaje de pérdida de masa} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde M_i es masa inicial y M_f es masa final.

2.5.7 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

Los porcentajes de grupos funcionales sobre la superficie del andamio se calcularon utilizando XPS. Los espectros XPS se obtuvieron utilizando un modelo ESCA / SAM 560 (Perkin-Elmer). Con 600K de radiación MgKa. Para el análisis de espectros, se eligió una línea de base tipo Shirley-Sherwood utilizando el software Aanalyser. Los valores lorentzianos utilizados para el ajuste y cálculo de las áreas bajo las curvas fueron: 0.35, 0.40 y 0.25 para C1s, N1s y O1s respectivamente. Los porcentajes de compuestos químicos se calcularon mediante la ecuación 2.

$$\%n_i = \frac{\left(\frac{I_{ij}}{\sigma_{ij}KE^{0.6}}\right)}{\sum\left(\frac{I_{ij}}{\sigma_{ij}KE^{0.7}}\right)} \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde $\%n_i$ es el porcentaje atómico del elemento i , I_{ij} es el área del pico j del elemento i , KE es la energía cinética del electrón emitido que se mide en el espectrómetro ESCA y σ_{ij} es la sección transversal de fotoionización del pico j del elemento i .

2.5.8 Análisis FTIR

La identificación de grupos funcionales en la superficie de los andamios se realizó mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), con un cristal de germanio en un intervalo de número de onda de 500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} con un total de 100 barridos.

2.6 Ensayos biológicos

2.6.1 Obtención de uretra de conejo de Nueva Zelanda

El procedimiento para la extracción de la uretra se llevó a cabo en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI). La eutanasia fue realizada en una cámara de CO₂ aplicando una presión de 8 lb/in², mostrada en la figura 2.7a.

Una vez que el conejo de la raza Nueva Zelanda hembra de 4 kg, fue colocado en una mesa de operación como se muestra en la figura 2.7b, se realizó una incisión en la parte baja del abdomen. Los materiales utilizados fueron: bisturí, tijeras, pinzas, gasas estériles, tubo de transporte de 50 ml y medio de transporte (solución salina con 1% de antibiótico (penicilina, espectromicina y anfotericina).

Se colocó yodo en la pelvis del animal como antiséptico y se realizaron diferentes incisiones para la localización de la uretra, como se muestra en la figura 2.7c.

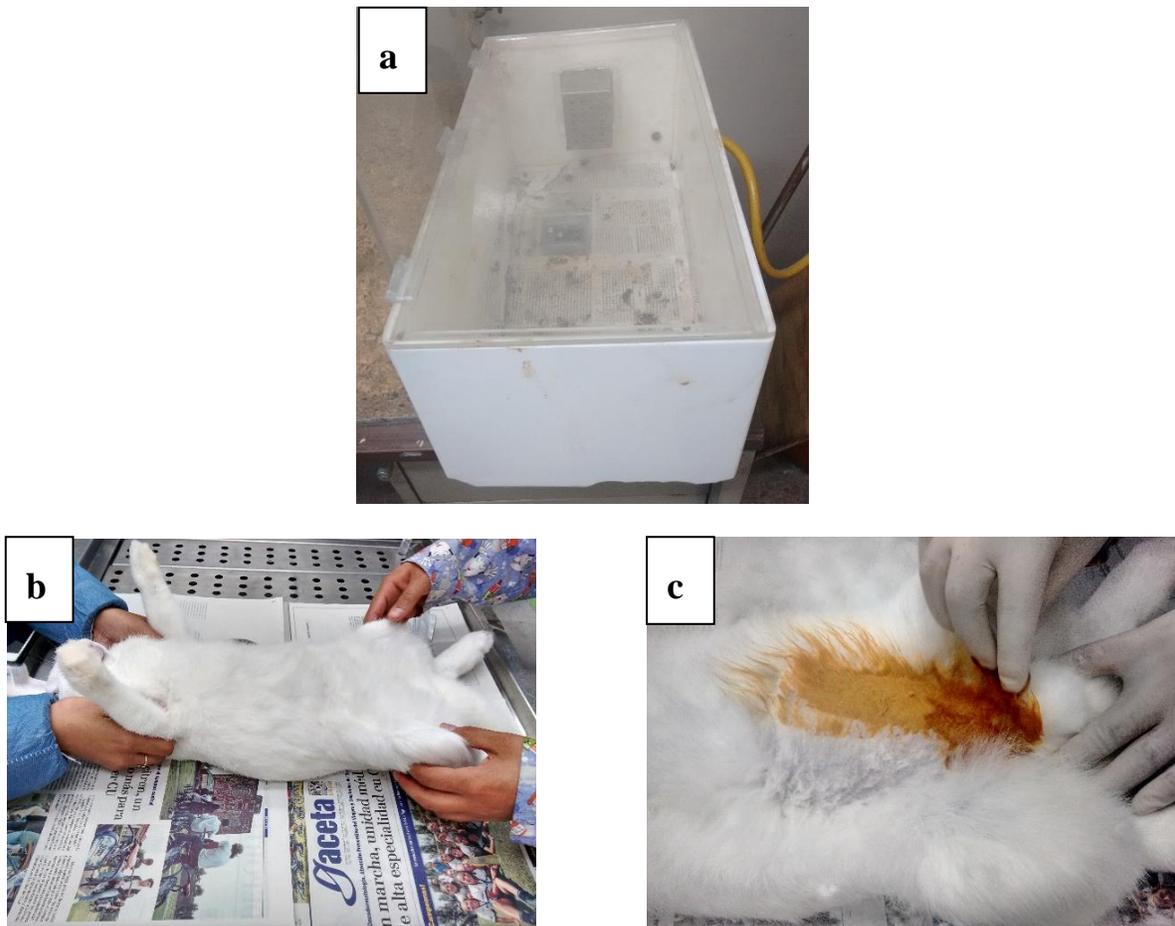


Figura 2.7.-a) Cámara de CO₂ b) colocación del ejemplar en la mesa de operación c) primera incisión para el acceso a la uretra

La uretra fue trasladada al laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional de la clínica odontológica de Cuauhtepc-UNAM/FESI; para llevar a cabo la digestión enzimática, cosecha y siembra celular.

2.6.2 Obtención de células uretrales

2.6.2.1-Digestión enzimática

Con la finalidad de degradar la matriz extracelular, se realizó una digestión enzimática (Sigma-Aldrich, EE. UU.) utilizando 5 mg de colagenasa por cada mililitro de medio de cultivo. Para la preparación del Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, BIOWEST) se utilizó 89% de DMEM con bajo contenido de glucosa, suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF, BIOWEST) y 1% de antibiótico y antimicótico (Sigma-Aldrich, EE.UU).

La uretra fue lavada con medio de transporte y posteriormente seccionada en tamaños de 2 mm² aproximadamente, en la cabina de bioseguridad de flujo laminar (Telstar Bioadvanced II). Estas secciones fueron colocadas en tubos Eppendorf cuyo contenido de colagenasa fue de 30 µl, para después ser colocados en la incubadora (Binder, modelo CB150 UL) durante 1 h a 37 °C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se realizó una centrifugación de 1000 rpm durante 10 min a una temperatura de 20 °C, con una máquina centrífuga Sigma modelo 2,15 KL que se muestra en la figura 2.8, para la obtención del botón celular.



Figura 2.8.-Proceso de centrifugación, para la obtención del botón celular

Al término de la centrifugación se obtuvo el botón celular, mostrado en la figura 2.9a. El cual, fue resuspendido en 30 μ l de DMEM y cultivado en una caja tipo T marca Nunc, mostrada en la figura 2.9b. Después, el cultivo fue incubado durante 15 min a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂ para propiciar la adhesión celular.

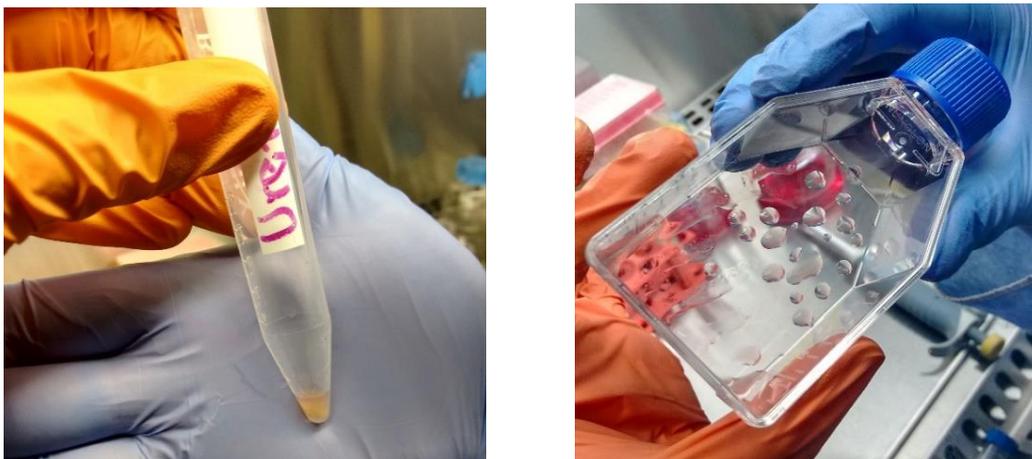


Figura 2.9.-a) botón celular con población heterogénea de células uretrales, b) siembra de células previo a la incubación

Posterior a la primera incubación, se agregaron 5 ml de medio de cultivo DMEM y se colocaron de nuevo en la incubadora, a la misma temperatura y porcentaje de CO₂ durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se realizó un cambio de medio de cultivo, mismo que se llevó a cabo cada tercer día.

2.6.2.2-Cosecha Celular

Para esto, se retiró la caja tipo T marca Nunc de la incubadora, el medio de cultivo fue retirado para colocar 3 ml de tryple Express (Sigma-Aldrich) se incubó por 3 minutos a 37 °C con 5% de CO₂, transcurrido ese tiempo se observa el cultivo al microscopio óptico invertido de campo claro (Leica modelo MIL LED), para comprobar que las células se hayan despegado de la superficie del plástico.

Se agregó medio de cultivo para inactivar la acción de la enzima y se realizó un barrido de las células mediante un raspador de células (Biologix). El contenido de la caja fue vaciado en un tubo de 15 ml para ser sometido a una centrifugación de 1000 rpm por un período de 10 min para obtener el botón celular (figura 2.10).



Figura 2.10.-Botón celular obtenido posterior a la centrifugación

2.6.2.3.-Siembra de células en el andamio

Previo a la siembra de células, los andamios (2 mm x 2mm) fueron colocados en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Thermo) y sometidos a radiación UV por 1h por lado y lado.

La siembra de células se llevó a cabo por quintuplicado con el objetivo de realizar ensayos de citotoxicidad mediante 3-(4,5- Dimetiltiazol-2-Y1)-2,5 Difeniltretazol (MTT) a 7, 14 y 21 días, para determinar el grado de proliferación de células uretrales existente, cuando están en contacto con los andamios.

Para esto, se colocaron muestras de cada tipo de andamio por quintuplicado (n=5, 2x2 mm) en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos. Controles (n=6) de células uretrales sembradas en los pocillos con medio.

El botón celular fue resuspendido (figura 2.11) en 1 ml de medio de cultivo y contabilizadas las células para hacer el cálculo de la siembra, las cuales fue de una densidad de 10 mil células por andamio.

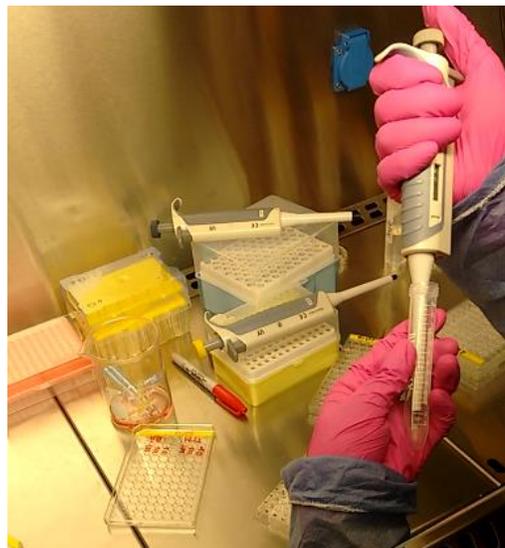


Figura 2.11.-Resuspensión de células, posterior a la centrifugación

Seguidamente, se agregó a los andamios 5 μ l de medio de cultivo con células como se muestra en la figura 2.12.



Figura 2.12.-Siembra de células en los andamios

2.6.2.4 Ensayo de viabilidad por 3-(4,5- dimetiltiazol-2-y1)-2,5 difeniltretazol (MTT)

Los andamios previamente cultivados durante 4, 7 y 14 días fueron retirados de la incubadora (37°C con 5% de CO₂) con la finalidad de añadir los reactivos para el ensayo MTT. Veinticuatro horas después, los cultivos fueron analizados mediante un lector de ELISA (Thermo Labsystem, Multiskan Ascent).

Primeramente, el medio existente en los pocillos fue retirado al término de cada período de tiempo, y los andamios fueron sometidos a dos lavados utilizando 100 µl de fosfato buffer salino (FBS), después se colocó en cada pocillo 64 µl de FBS y 6 µl de reactivo MTT. La placa de cultivo fue cubierta con papel aluminio (para evitar que los reactivos se oxiden por acción de la luz) y colocada en la incubadora durante 3 h. Transcurrido este tiempo, se agregaron 100 µl de isopropanol a cada pocillo. La placa de cultivo fue colocada nuevamente en la incubadora (37°C con 5% de CO₂), 24 h después se llevaron a cabo las lecturas por medio de un lector de ELISA (Fisher Scientific - Multiskan Ascent) utilizando una longitud de onda de 540 nm.

2.7 Cultivo celular y citotoxicidad de los andamios con tratamiento superficial.

2.7.1 Población heterogénea células uretrales de cerdo (PHCUc).

Este estudio se realizó con la aprobación del Comité de Ética de la UNAM (CE / FESI / 052017/1174). Se obtuvieron segmentos de uretra de 1 cm de cerdos vietnamitas. El tejido se cortó en trozos pequeños y se trató con 0.05% de colagenasa (Sigma-Aldrich, EE. UU.) utilizando DMEM con bajo contenido de glucosa, (Bio-west, México), suplementado con SBF al 10% (Bio-west México) y 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) Incubados durante 20 minutos a 37 ° C en una atmósfera de CO₂ del 5% con una humedad relativa del 95%. La mezcla digerida se centrifugó y el sedimento celular se resuspendió con medio fresco y se cultivó durante 10h-12h. Los medios de cultivo se cambiaron dos veces por semana y cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se recolectaron para los subcultivos.

2.7.2 Inmunohistoquímica/inmunofluorescencia para fenotipo de células de uretra de población heterogénea de cerdos.

Las células se sembraron en cubreobjetos redondos durante 48 h, y cuando las células mostraron una semi-confluencia se retiraron del medio de cultivo. Luego, las células se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a 4 ° C, seguido de una incubación de 1 h en una dilución 1: 200 de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Flour 488 (Invitrogen). El anticuerpo primario fue el anticuerpo anti-pan citoqueratina AE1/AE3 (ab86734, Cambridge, Reino Unido) y el anticuerpo anti-alfa actina del músculo liso (ab5694). La tinción nuclear se realizó con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

2.7.3 Evaluaciones in vitro de siembra celular, viabilidad, proliferación y citotoxicidad.

Brevemente, los andamios fueron esterilizados por exposición ultravioleta durante 30 minutos en cada lado. La viabilidad celular (ensayo MTT) se midió mediante la reducción de la sal de tetrazolio MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro) a formazán (Roche® Life Science; Indianapolis, IN, ESTADOS UNIDOS). Al incubar 5x10³ células a los 3, 7 y 10 días, la viabilidad y la proliferación se determinaron de acuerdo con el protocolo

del fabricante agregando una cantidad conocida de MTT a 37 ° C durante 3 h. Después del tiempo de incubación, se agregaron 100 µl de isopropanol para solubilizar las sales de formazán. Posteriormente, la mezcla se midió en una placa de 96 pocillos utilizando un lector de microplacas (Biotek Elx808) y se determinó la densidad óptica del colorante azul a 570 nm.

CAPÍTULO 3 . - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Fabricación de andamios

Para que el andamio conserve su forma tubular, es necesario aplicar vaselina en el cilindro, de esta manera se facilita el retiro del andamio del cilindro colector. En algunos casos, se realizó un corte longitudinal en el andamio para poder retirarlo. A continuación, se presentan las características de cada andamio fabricado.

3.1.1.-Andamio de PCL

En la figura 3.1 se muestran andamios tubulares elaborados a partir de PCL. Para determinar la existencia de fibras, los andamios fueron observados en un microscopio óptico, la imagen se muestra en la figura 3.2.



Figura 3.1.-Andamios tubulares de PCL obtenidos mediante electrohilamiento

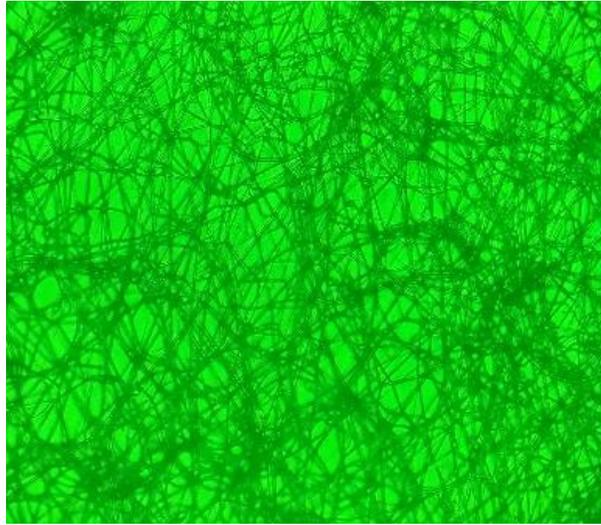


Figura 3.2.-Imagen captada mediante microscopía óptica a 40x

Las dimensiones del andamio fueron medidas mediante un vernier digital Mitutoyo, los resultados se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1.-Dimensiones de los andamios tubulares fabricados

Andamio	Relación PCL/PLGA	Espesor (mm)	Longitud (cm)	Tiempo de electrohilamiento (h:min)
PCL1	100/0	0.15±0.05	10	1:30
PCL2	100/0	1±0.04	9	3:00
PCL3	100/0	1.2±0.1	10	12:00

3.1.2 Andamios PCL/PLGA (70/30)

En la figura 3.3 se muestran los andamios obtenidos con una relación de PCL/PLGA (70/30), los andamios fueron observados por microscopía óptica a 40x para determinar la existencia de fibras.

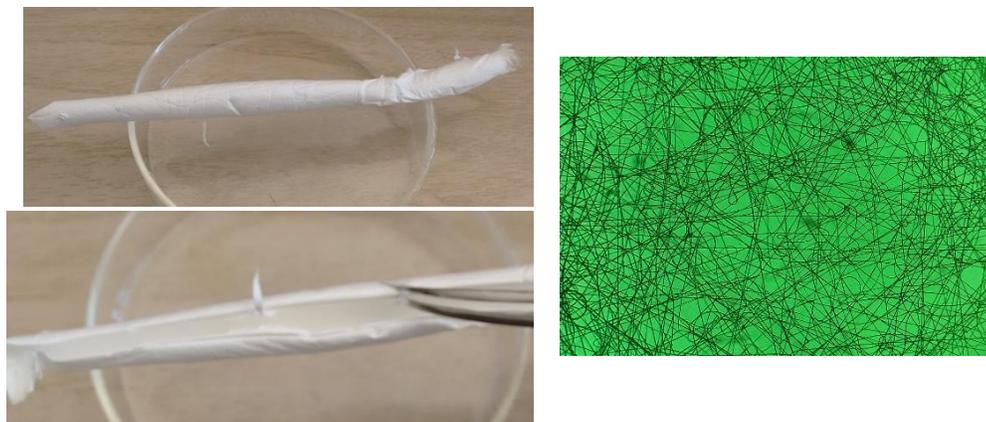


Figura 3.3.-Andamio tubular de PCL/PLGA (70/30)

Las dimensiones del andamio se obtuvieron utilizando un vernier digital Mitutoyo, los resultados se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2.-Dimensiones de los andamios tubulares fabricados

Andamio	Relación PCL/PLGA	Espesor (mm)	Tiempo de electrohilamiento (h:min)
PCL/PLGA1	70/30	0.4±0.1	1:30
PCL/PLGA2	70/30	0.65±0.1	3:00
PCL/PLGA2	70/30	1±0.1	12:00

3.1.3.- Andamio PCL/PLGA (80/20).

En la figura 3.4, se muestra un andamio retirado utilizando vaselina en el cilindro, también se muestra una imagen capturada mediante microscopía óptica para comprobar la existencia de fibras. En la tabla 3.3 se especifican las dimensiones de estos andamios.

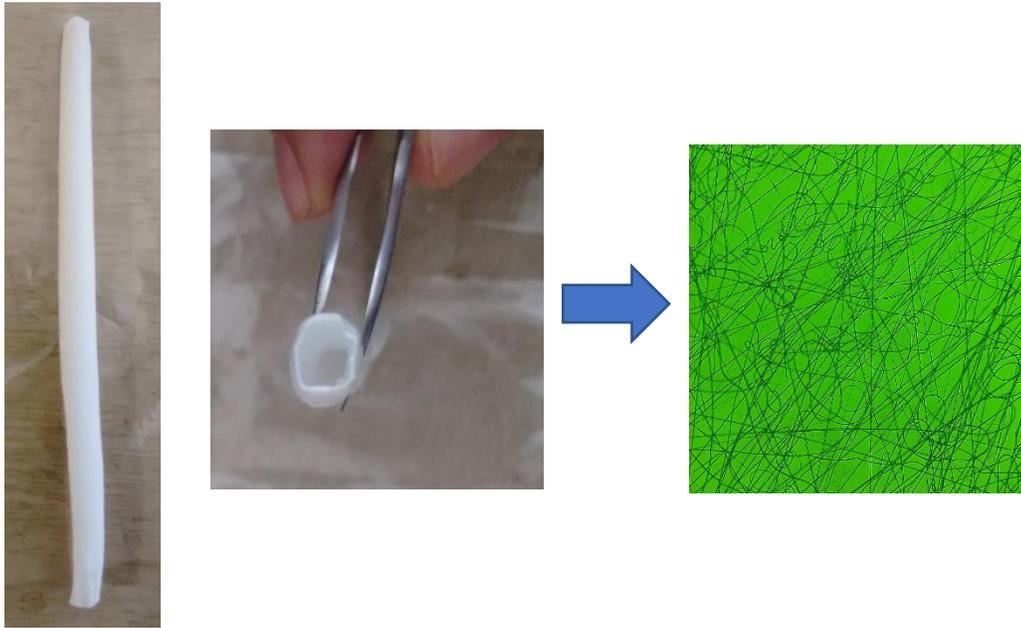


Figura 3.4.-Andamio tubular de PCL/PLGA (80/20) e imagen capturada con microscopía óptica a 40x.

Tabla 3.3.-Dimensiones de los andamios tubulares fabricados de PLGA/PCL (20/80).

Andamio	Relación PCL/PLGA	Espesor (mm)	Tiempo de electrohilamiento (h:min)
PCL/PLGA1	80/20	0.30±0.08	1:35
PCL/PLGA2	80/20	0.84±0.1	5:00
PCL/PLGA2	80/20	1±0.1	12:00

3.1.4 Andamio PCL/PLGA (90/10)

En la figura 3.5 se muestra un andamio cuya relación PCL/PLGA es de 90/10, es probable que debido a las propiedades reológicas particulares de la disolución, la fabricación de este andamio presentó mayor dificultades en comparación con las demás mezclas, por lo que solamente se presentan las características geométricas de los que se lograron fabricar.

Para verificar la existencia de fibras fue examinado mediante microscopía óptica a 40x. Las dimensiones del andamio se muestran en la tabla 3.4.

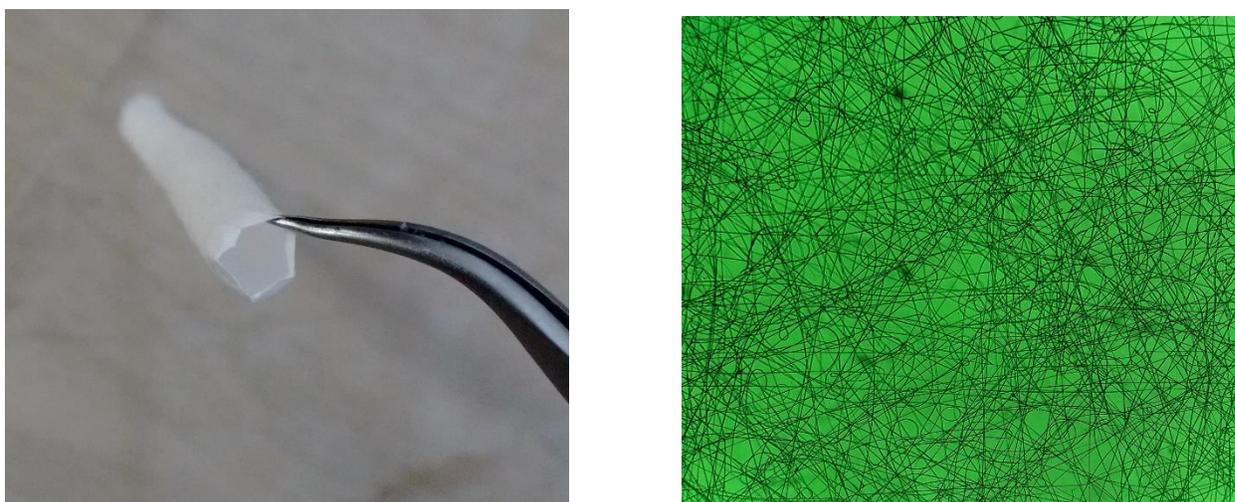


Figura 3.5.-Andamio tubular de PCL/PLGA: (90/10) observado mediante microscopía óptica a 40x.

Tabla 3.4.-Dimensiones de los andamios tubulares fabricados de PCL/PLGA (90/10).

Andamio	Relación PCL/PLGA	Espesor (mm)	Tiempo de electrohilamiento (h:min)
PCL/PLGA1	90/10	0.2±0.05	1:00
PCL/PLGA2	90/10	0.2±0.05	1:00

Los parámetros utilizados en la máquina de electrohilamiento, así como disolventes y polímeros utilizados en la disolución polimérica influyen en la formación de fibras. Manteniendo constante los parámetros de la máquina de electrohilamiento, se realizaron variaciones en la concentración de la disolución en experimentos previos y se determinó que una concentración de 27.27% m/v es la óptima para la formación de fibras. En las concentraciones menores al 27.27% m/v se presentaron numerosas imperfecciones en forma de gotas como los que se observan en la fotografía de la figura 3.6. Existen diferentes parámetros que propician la formación de estos defectos en las fibras, tales como voltaje aplicado, densidad de carga, viscoelasticidad y tensión superficial de la disolución polimérica[57]. Por otra parte, cuando la concentración del polímero en los disolventes era mayor al 27.27% m/v, la disolución polimérica no fluía a través del capilar debido a su alta viscosidad.

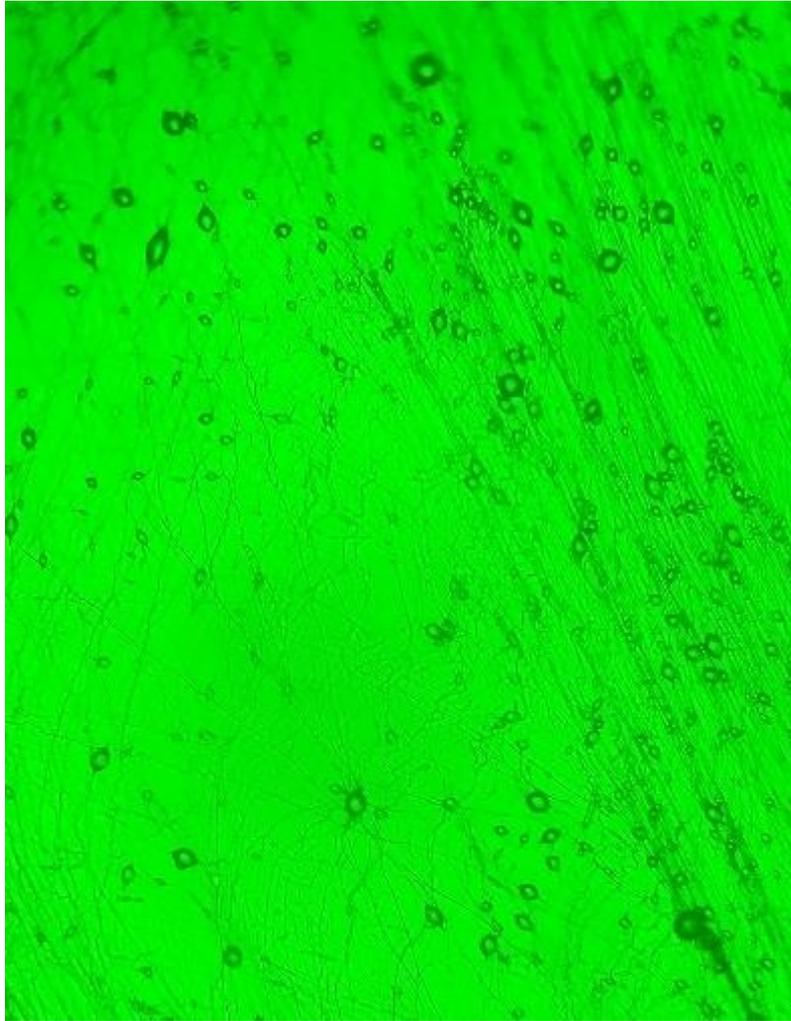


Figura 3.6.-Defectos en fibras observadas en un microscopio óptico a 40x.

3.2 Ensayos in vitro para pérdida de masa.

En la gráfica de la figura 3.7, se presentan las curvas relacionadas con la degradación del andamio, puede observarse que la PCL alcanza una pérdida de masa del 20.3% de su masa inicial, en contraste, el andamio cuyo contenido de PLGA fue del 10%, mostró una pérdida de masa al final de la sexta semana del 42% con respecto a su masa inicial. Esto era de esperar, ya que el PLGA posee un tiempo de degradación (6-8 semanas) [58], mucho menor al de la PCL (2 años)[59], sin embargo, dicho andamio perdió únicamente el 22.7% de su masa inicial al término de la sexta semana. Esta cantidad de pérdida puede ser atribuida al espesor del andamio, ya que los andamios de PCL y PLGA al 10% poseían espesores de 0,20 mm aproximadamente, a diferencia del andamio de 20% cuyo espesor fue de 0,7 mm. Probablemente, la solución salina no logró ingresar completamente al andamio, ocasionando únicamente degradación superficial.

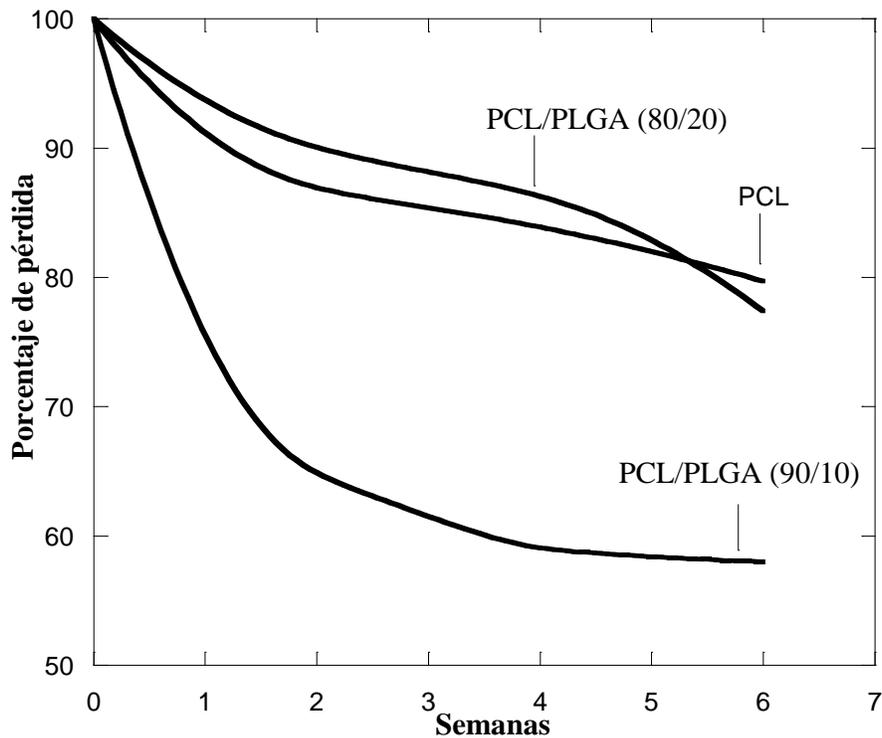


Figura 3.7.-Relación de pérdidas de masa para los andamios de PCL, PLGA al 10% y PLGA al 20%.

3.3 Microscopía electrónica de barrido para los andamios elaborados con la mezcla PCL/PLGA.

La caracterización de la morfología de las fibras de los andamios se llevó a cabo por medio de microscopía electrónica de barrido, los diámetros de las fibras fueron analizados por medio del software Image-J. Para medir este diámetro, cada micrografía se dividió en cuatro regiones como se muestra en la figura 3.8. En cada cuadrante se contabilizaron 25 fibras, dando como resultado la medición del diámetro de 100 fibras en total. Para determinar el tamaño del poro promedio, fue trazada una circunferencia entre fibras sobrepuestas en forma de triángulo o cuadrado, en cada cuadrante se realizaron 10 mediciones, dando un total de 40 mediciones de diámetros de poro.

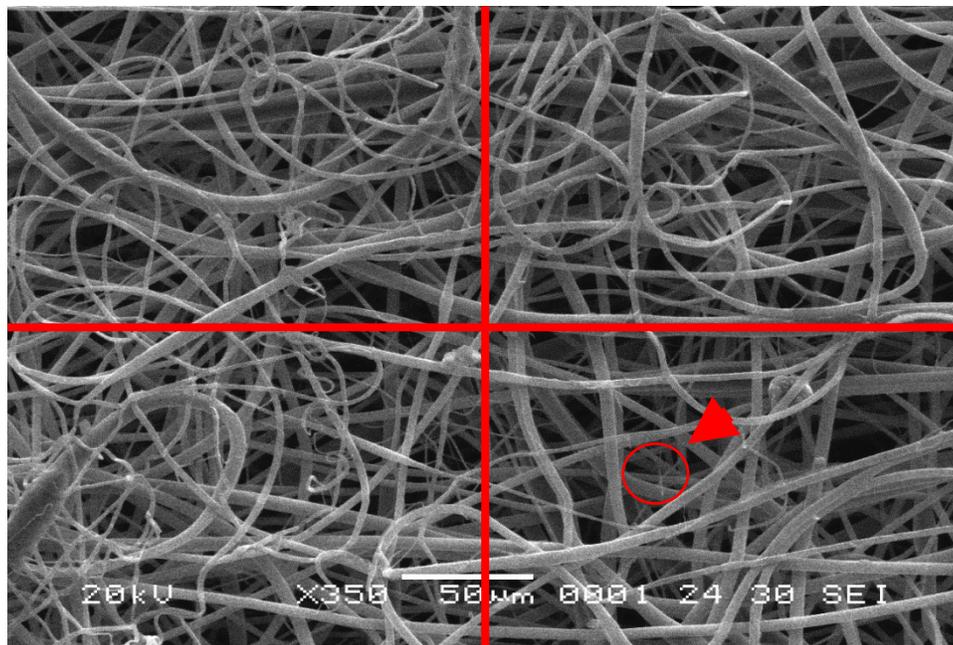


Figura 3.8.-Cuadrantes dibujados en las micrografías MEB.

La morfología de las microfibras obtenidas a partir del electrohilamiento depende del voltaje aplicado, el flujo de velocidad de la solución de polímero, la distancia entre el capilar al colector y las propiedades de la solución (concentración, tensión superficial y composición del disolvente) [60]. La Figura 3.9a-d muestra las microfibras hechas con las mezclas de PCL / PLGA para cuatro relaciones: 100/0, 90/10, 80/20 y 70/30 y las inserciones muestran la distribución de diámetro correspondiente. Los andamios 100/0, 90/10, 80/20 mostraron una polidispersidad diferente en el diámetro de las fibras, desde nanofibras hasta microfibras.

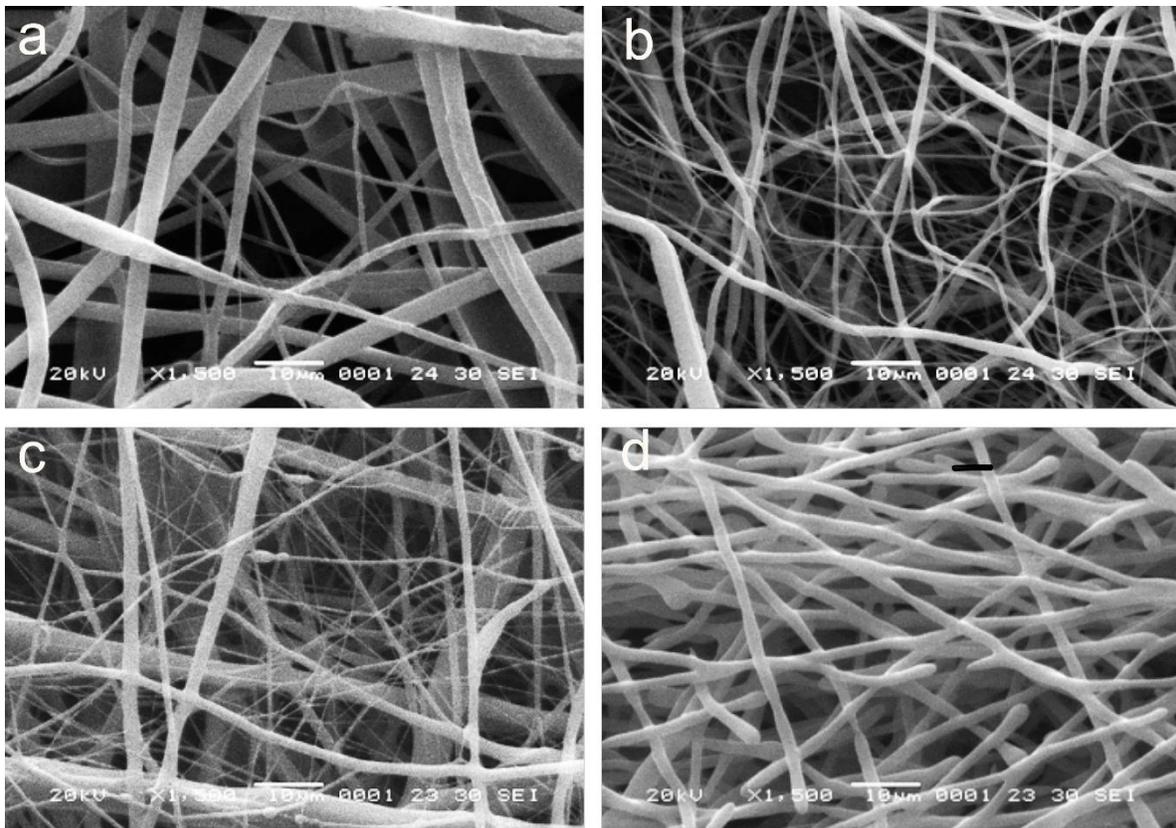


Figura 3.9.-Morfología de las microfibras electrohiladas a diferentes proporciones de las mezclas PCL/PLGA : (a) 100/0, (b) 90/10, (c) 80/20, (d) 70/30.

En general, el diámetro promedio de las microfibras se redujo a 47.5% para 90/10 y 80/20 (0.7 μm), con respecto a 100/0 (3.5 μm). Para el andamio 70/30, el diámetro no se redujo más, la polidispersidad del diámetro de las microfibras disminuye prácticamente hasta convertirse en constante, sin embargo, este diámetro es menor que en la mezcla de 100/0. Las microfibras presentes en 100/0, 90/10, 80/20, son causadas por las condiciones del electrohilamiento y la proporción de polímero en la mezcla. La ausencia de microfibras en la mezcla 70/30, se atribuyó al percolado del PLGA en la matriz formada por la PCL, esta percolación modifica la viscosidad de la disolución, evitando la formación de microfibras.

La Figura 3.10a muestra el cambio en el diámetro de las nanofibras en función del contenido de PLGA. En general, los diámetros promedio tienden a disminuir, permaneciendo constantes entre el intervalo de 10% y 20% de PLGA. La Figura 3.10b muestra que el tamaño promedio de los poros disminuye cuando aumenta el contenido de PLGA, y permanece constante entre el 10% y el 20% del contenido de PLGA. Estos resultados concuerdan con los reportados por Hiep *et al.* [8], sugieren que un exceso de PLGA (> 20%) produce efectos adversos en el proceso de electrohilado (aglomeración de polímero y microfibras incompletas).

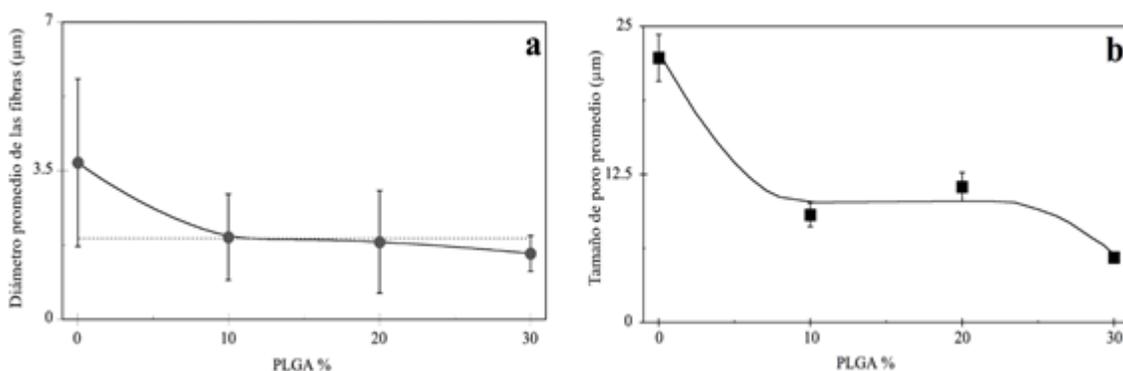


Figura 3.10.-Medición de fibras y tamaños de poros de los andamios a) diámetro promedio de las fibras b) tamaño promedio de los poros.

Fioretta *et al* [61] mostró que el arreglo entre las fibras de este tamaño permiten la adhesión y proliferación celular, en particular, las células de músculo liso. Una de las ventajas de un andamio con diámetros de poros y tamaños de fibra en una escala micrométrica es la facilidad con la que los nutrientes y el oxígeno pueden penetrar. Estas son variables críticas para la regeneración de los tejidos.

3.4 Propiedades mecánicas de los andamios

Las propiedades mecánicas de los andamios electrohilados dependen de diferentes factores, como el tamaño y la orientación de las nanofibras y microfibras, el enredo entre las mismas microfibras y, lo que es más importante, la composición de la mezcla polimérica.

La figura 3.11 muestra el módulo elástico para los andamios 100/0, 90/10, 80/20 y 70/30, en donde el módulo de la mezcla 0/100 (PLGA prístina) fue obtenido de la literatura[62].

Al variar la composición de la mezcla (PCL/ PLGA) de 100/0 a 80/20, el módulo elástico no cambió considerando las barras de error (Figura 3.11a), y mostró un valor cercano a 10.3 MPa. Para las composiciones 70/30, el módulo aumentó considerablemente hasta 19 MPa. Este incremento se debe a la percolación de PLGA en el PCL. En las mezclas 100/0, 90/10 y 80/20, el PLGA está en dominios discretos dentro de la PCL, por lo que la PCL es el polímero que gobierna las propiedades mecánicas. A una concentración superior al 20%, las fracciones de PLGA y PCL son continuas dentro de la mezcla. Por lo tanto, ambos polímeros regulan las propiedades mecánicas.

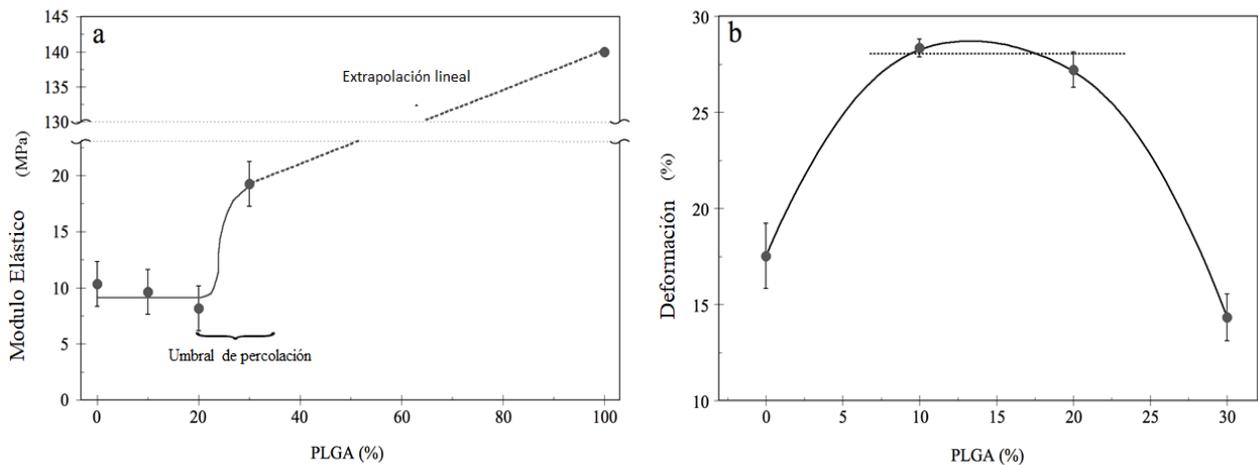


Figura 3.11.-Propiedades mecánicas de los andamios para mezclas de PCL/PLGA (a) módulo elástico (b) tensión de rotura

El PLGA está en fase discreta, actuando como un elemento de refuerzo para la PCL. En otras palabras, existe una sinergia en la tensión de rotura entre los dos polímeros, esto se muestra en la figura 3.11b. Para la mezcla 70/30, las dos fases de la muestra son continuas, destruyendo la sinergia. Esto significa que la fase continua de PLGA, ya no actúa como un refuerzo[63]. A partir de las medidas de diámetro, el tamaño de poro correspondiente y las propiedades mecánicas, solo se consideraron las mezclas PCL, PLGA 90/10 y 80/20 para los estudios de proliferación celular.

3.5 Ensayos biológicos

3.5.1 Obtención de células uretrales.

Para el acceso al sistema urinario, fue necesario realizar presiones en la pelvis, cuando los ureteros, la vejiga, y la uretra fueron localizados como se muestra en la figura 3.12a, se procedió a su extirpación que se observa en la figura 3.12b. La longitud de la uretra fue de 3 cm aproximadamente.

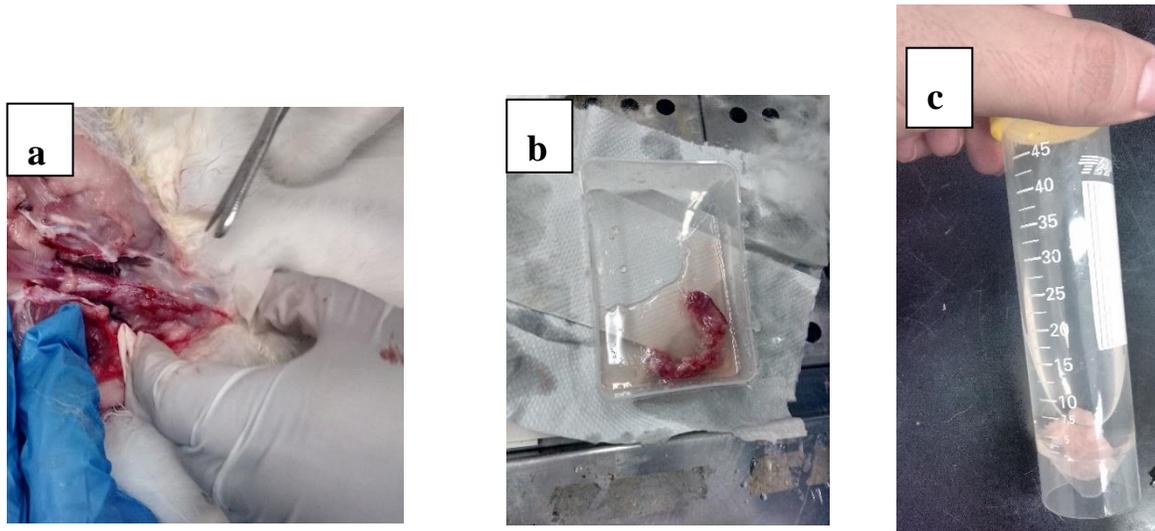


Figura 3.12.-a) acceso a la uretra b) vejiga y uretra c) secciones de uretra colocadas en tubo con medio de transporte.

Posterior a los procedimientos realizados, las cajas tipo T fueron observados en el microscopio óptico, las fotografías se muestran en la figura 3.13. En las imágenes se observa una migración de células uretrales (población heterogénea) a partir del tejido remanente.

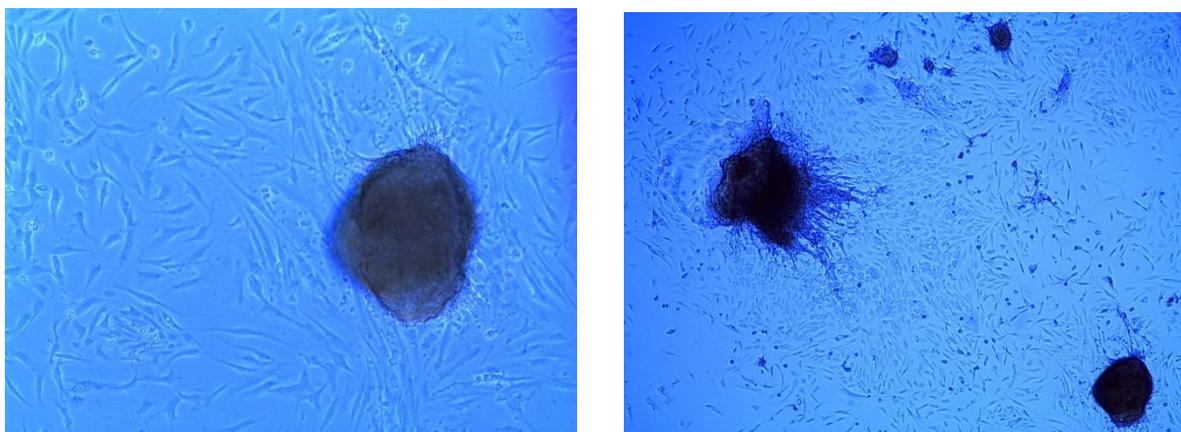


Figura 3.13.-Imágenes obtenidas por medio de microscopía óptica de campo claro a 4x, en donde se observa poblaciones de células uretrales.

En la gráfica de la figura 3.14 se muestran los resultados correspondientes al ensayo MTT, se observa un efecto de no citotoxicidad durante los cuatro primeros días. En este tiempo, el andamio cuyo contenido fue de PLGA al 10% presenta una mayor actividad metabólica. Para el análisis efectuado a los 7 días, los andamios de las mezclas PCL/PLGA (90/10) evidenciaron mayor actividad metabólica con respecto a los andamios de PCL y PCL/PLGA (80/20). Para el término del día 14, los andamios PCL/PLGA (80/20) obtuvieron notablemente mayor actividad metabólica respecto a los andamios de PCL y PCL/PLGA (90/10) por lo que este andamio demuestra que permite la adhesión celular, y sobre todo favorece la proliferación de las células uretrales.

Los resultados coinciden con el trabajo de Hiep *et al.* [8], en donde se reporta que un andamio con cierta cantidad de PLGA mejora considerablemente la proliferación celular. Esto puede explicarse debido a la relación de ácido láctico y ácido glicólico presentes en el copolímero, pues juegan un papel importante en el metabolismo celular. Un exceso de estos monómeros

podría ocasionar efectos adversos en cultivos celulares, ya que se incrementa la cantidad del ion lactato, provocando acidez en el medio [64].

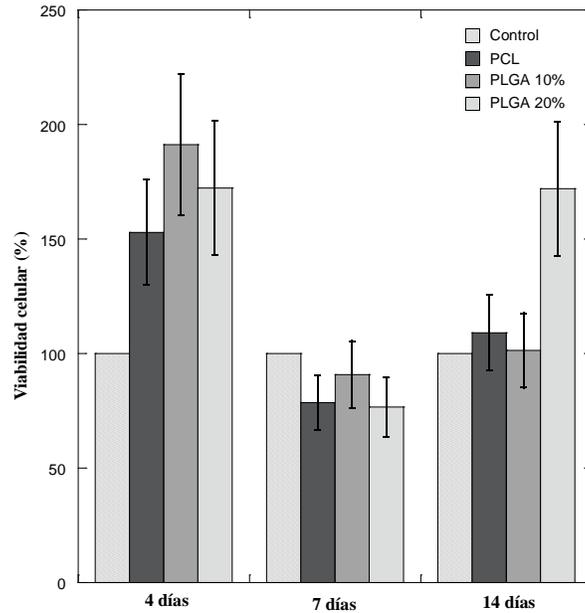


Figura 3.14.- Viabilidad de células uretrales determinada por MTT en presencia de andamios de PCL/PLGA.

Los resultados de las propiedades mecánicas y la viabilidad celular indican que la mezcla 80/20 es la óptima para la proliferación celular. Para esta mezcla, se realizaron caracterizaciones físico-químicas adicionales, y es en la superficie de este andamio en donde se polimerizará pirrol a diferentes concentraciones.

3.6 Medición espesor del andamio tubular PCL/PLGA (80/20)

En la gráfica de la figura 3.15 se muestran los espesores del andamio tubular con respecto a su longitud. Se observa que es en los extremos del andamio en donde se encuentran los valores más bajos, 0.21 ± 0.1 mm y 0.32 ± 0.09 mm respectivamente, y va en aumento conforme se acerca a la mitad del andamio, el máximo espesor fue de 0.52 mm, localizado en la longitud 48 mm. Jeong *et al.*[65] explica que durante el proceso de electrohilamiento, el depósito de fibras varía con respecto a la longitud del cilindro, en algunos casos, estas fibras pueden ser más delgadas que las demás (característica aleatoria, propia de la técnica de fabricación), por lo tanto, otro de los parámetros cuyo efecto da como resultado la diferencia de espesores, con respecto a la longitud del andamio tubular, es la rapidez de giro que posee el cilindro.

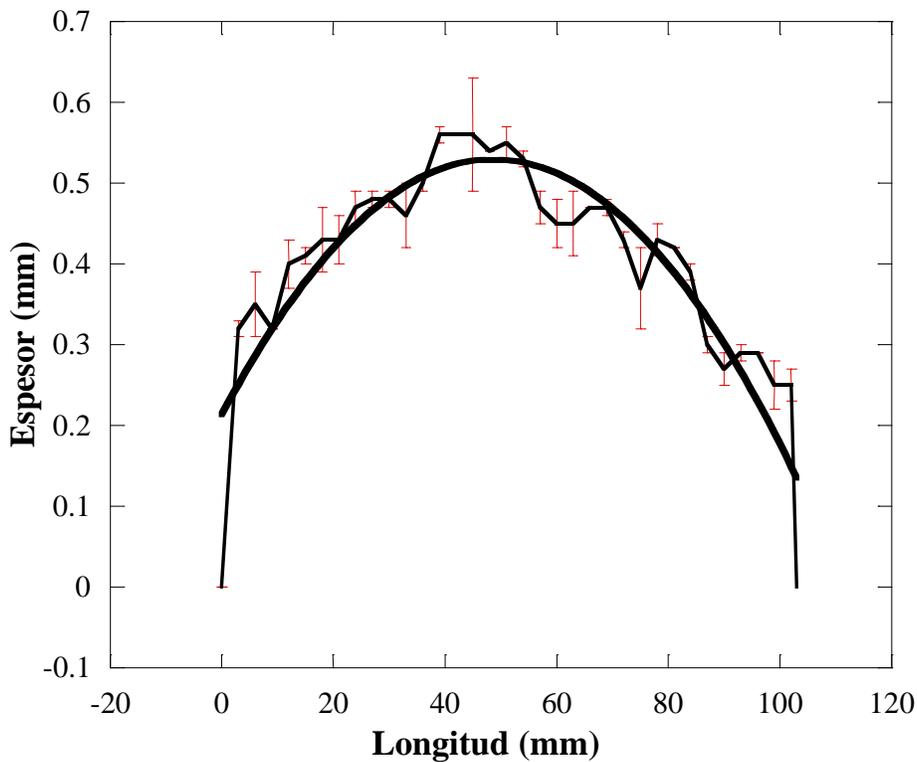


Figura 3.15.-Gráfica espesor vs longitud del andamio tubular PCL/PLGA (80/20).

3.7 Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la figura 3.16 se presentan los termogramas de DSC de la PCL, PLGA y la mezcla PCL/PLGA (80/20). La transición de fusión de la PCL se presenta como un pico endotérmico en el intervalo de temperatura entre 45 °C y 63 °C, mientras que la transición vítrea del PLGA se presenta como un escalón en el intervalo de temperatura entre 50 °C y 57 °C. La transición vítrea del PLGA queda inmersa dentro de la transición de fusión de la PCL dentro de la mezcla, o sea, se traslapan las dos transiciones. El efecto de este traslape en el termograma se observa en el pico correspondiente a la fusión de la PCL dentro de la mezcla, el cual se encuentra prácticamente 10°C por debajo del pico de fusión de la PCL pura. Esta diferencia de temperatura entre los picos de fusión de la PCL indica que estos dos polímeros son compatibles, ya que, si no hubiese una compatibilidad entre los dos polímeros, la temperatura pico de la PCL dentro de la mezcla, no tendría por qué disminuir y la transición vítrea del PLGA se observaría claramente.

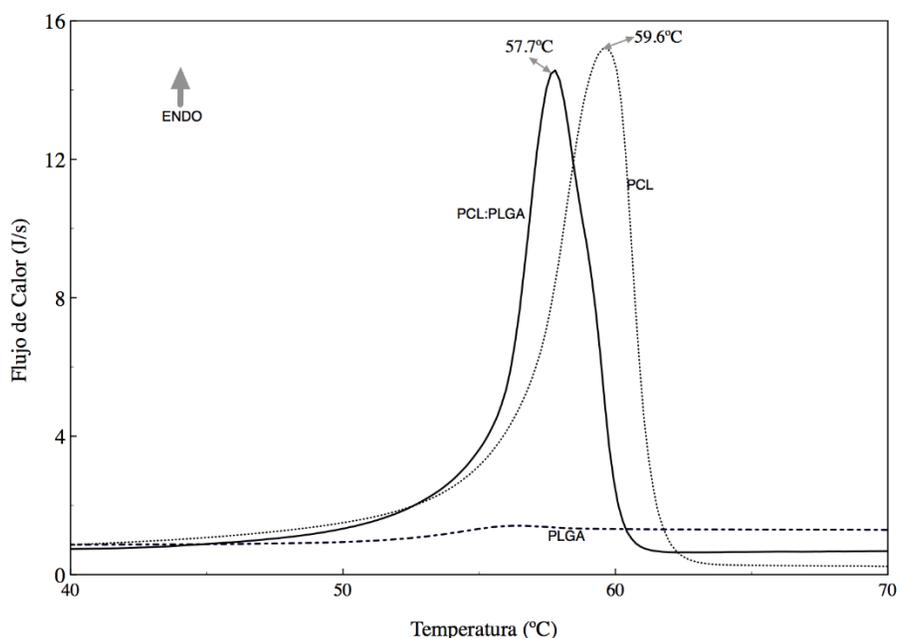


Figura 3.16.-Termogramas para los andamios de PCL pura, PLGA pura y la mezcla PCL/PLGA (80/20).

Los tres termogramas de la Figura 3.16 corresponden a una segunda corrida en el DSC, con esto se ha quitado la historia térmica de las tres muestras. Esto nos asegura que las señales que observamos, principalmente la de la mezcla, corresponden a la interacción de ambos polímeros, sin señales atribuidas a la historia térmica.

La figura 3.17 corresponde a la primera y segunda corrida en el DSC del PLGA. Se observa un doble pico (el que sean dos picos posiblemente se debe a que es un copolímero) endotérmico al terminar el escalón correspondiente a la transición vítrea. Este doble pico corresponde al fenómeno de relajación estructural de la fase amorfa del PLGA [66]. Esta relajación estructural se lleva a cabo por debajo de la transición vítrea y, su magnitud depende de las condiciones térmicas a las que estuvo expuesto el polímero. Debido a que esta relajación es metaestable. En una segunda corrida del DSC, este doblete desaparece como se muestra en la figura 3.17.

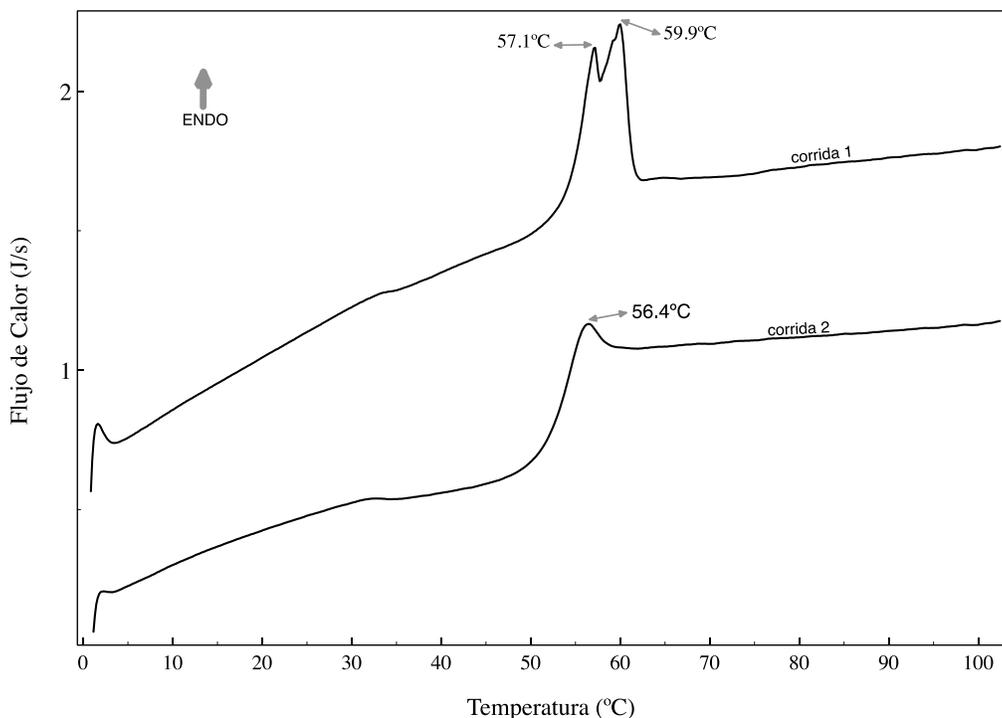


Figura 3.17.-Primera y segunda corrida del PLGA

Los pequeños cambios que se observaron corresponden realmente a las condiciones de enfriamiento a los que fue sometida la mezcla, o bien, al poco contenido de PLGA que presenta el andamio, por lo que se asume que existe una compatibilidad entre ambos polímeros.

3.8 Polimerización por la técnica de plasma

Previo al tratamiento superficial de los andamios se realizaron polimerizaciones únicamente con monómero de pirrol, esto con la finalidad de identificar los grupos funcionales existentes y posteriormente compararlos con polipirrol obtenido de forma electroquímica.

En la figura 3.18 se presenta el reactor de plasma utilizado. Posterior al tiempo de reacción se obtuvieron películas como la que se muestra en la figura 3.18d.

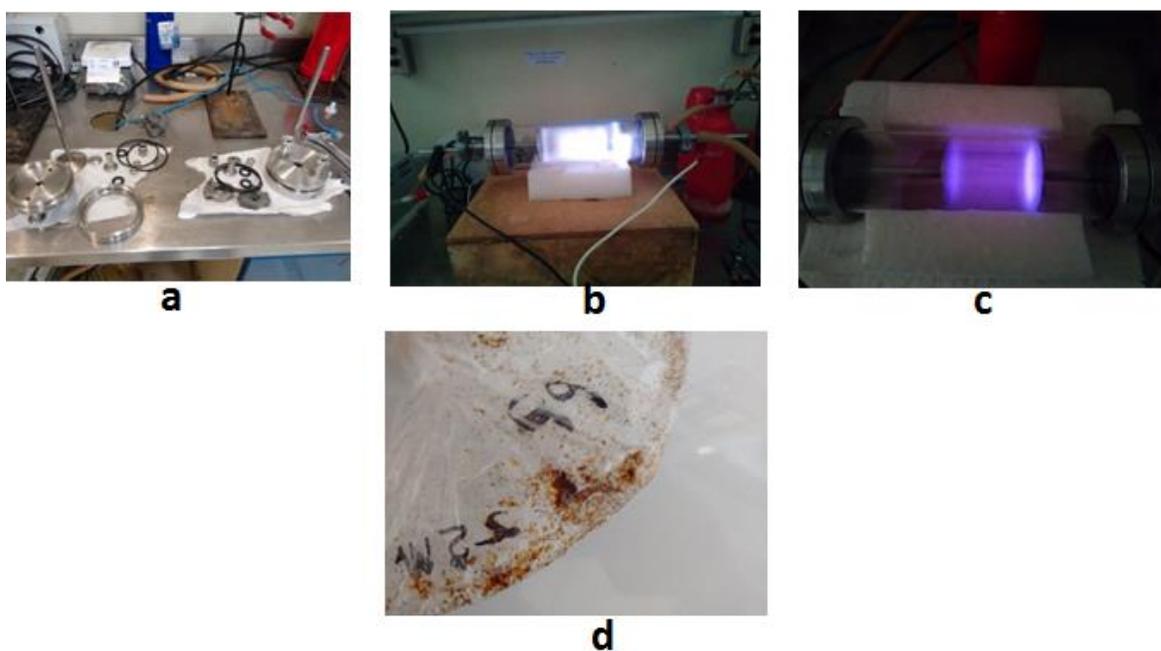
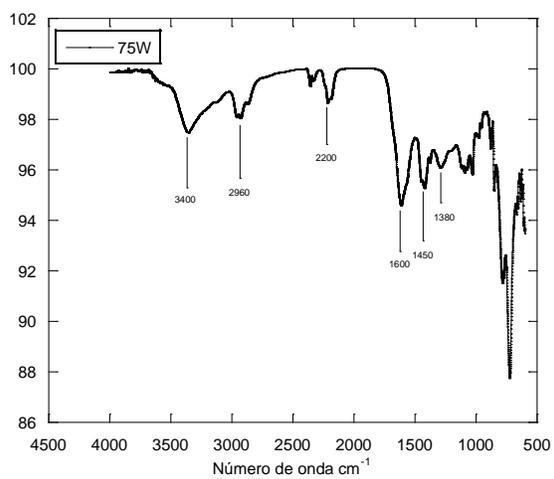
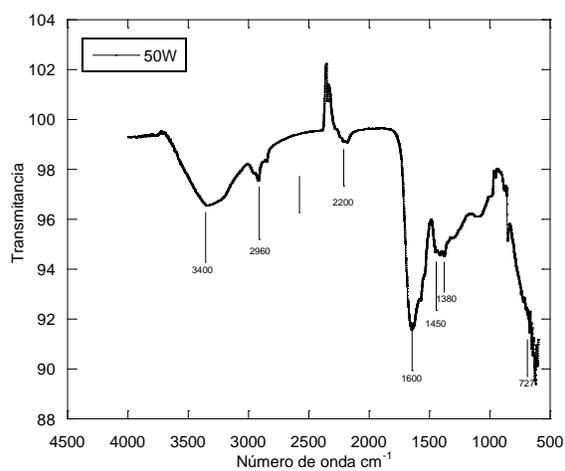
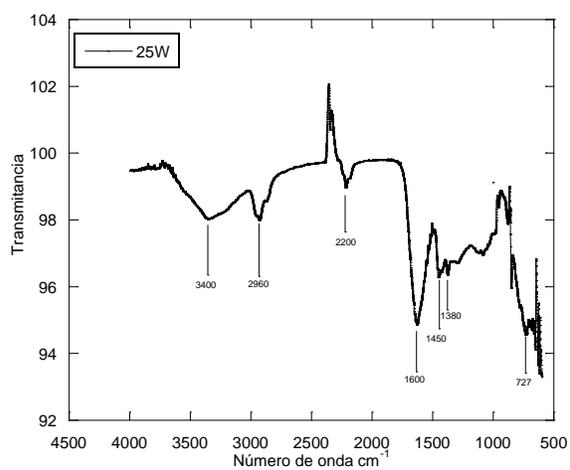


Figura 3.18.-Reactor de plasma utilizado, ubicado en las instalaciones de Química De Materiales de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). a) reactor de plasma, b) plasma de aire, c) polimerización de pirrol por plasma, d) película obtenida a partir del monómero pirrol.

En la figura 3.18a, se muestra las partes que conforman el reactor, en la figura 3.18b, se muestra una fotografía con una descarga de color blanca, lo que indica que no están ingresando agentes externos a la cámara, en a figura 3.18c se muestra la cámara del reactor cuando la válvula del pirrol es abierta. Por último, en 3.18d se observa la película recolectada de los electrodos.

3.8.1 Análisis FTIR de las películas obtenidas a partir del monómero pirrol

En la figura 3.19 se presentan los espectros FTIR de las películas obtenidas a diferentes potencias (25W, 50 W, 75W). La banda que se observa en 3400 cm^{-1} se atribuye a la banda de los aminos en tensión. La presencia de otro pico característico se encuentra en 1635 cm^{-1} - 1700 cm^{-1} que corresponde a los enlaces C=N y N-H en flexión. Los picos que se observan en el intervalo de 500 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} pertenecen a los alquenos, que son resultado de algunas rupturas de los anillos del pirrol, otros enlaces que se generan a partir de la ruptura del anillo son los C=C y C=N que se encuentran en 2200 cm^{-1} [39, 50, 51]. Los picos que se observan en 2360 cm^{-1} corresponden a dióxido de carbono, por lo tanto, no está asociado a la muestra, tal como reporta Walter *et al.* [67].



Banda	Número de onda cm^{-1}
N-H tensión	3400 y 2960
C-H tensión	3133
$\text{C}\equiv\text{C}$ $\text{C}\equiv\text{N}$ ruptura del anillo	2200
$\text{C}=\text{N}$ y N-H en flexión	1635-1700
Vibración en el plano del anillo pirrol	1467 y 1380
C-H fuera del plano flexión	727
Absorciones correspondiente a alquenos que son resultado del rompimiento del anillo	500-1000

Figura 3.19.-Espectros FTIR de las películas obtenidas a partir del monómero de pirrol.

3.8.2 Comparación entre Ppy sintetizado de forma química y por medio de plasma

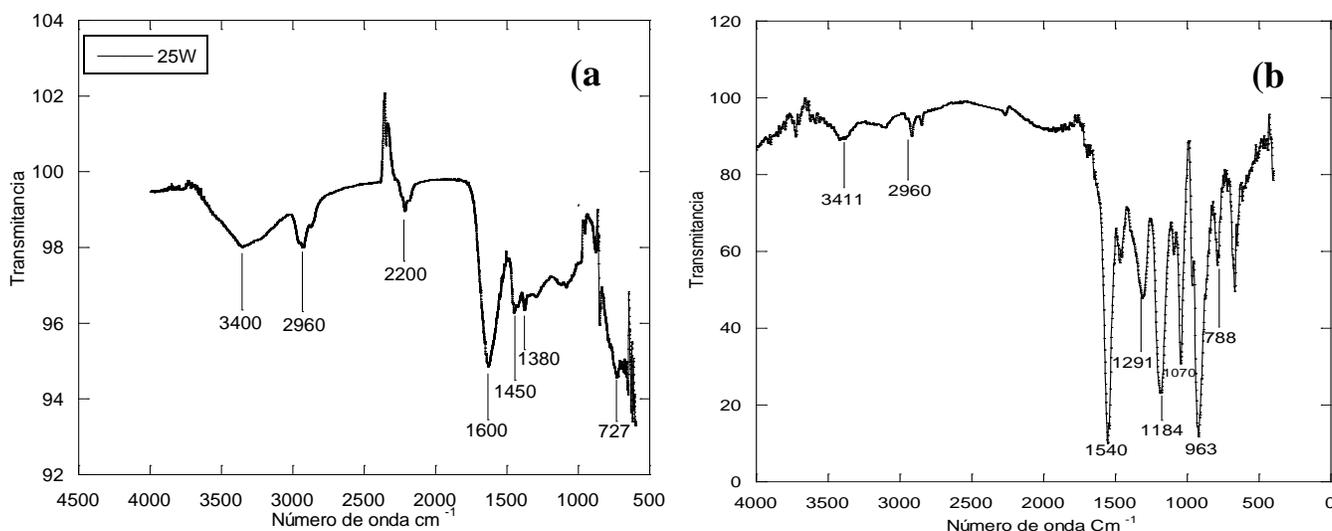
El polipirrol (Ppy) puede ser obtenido por medio de síntesis química o electroquímica utilizando varios tipos de solventes orgánicos o medios acuosos, también puede ser sintetizado utilizando un reactor de plasma. La ventaja de la síntesis electroquímica (con respecto a las otras) es la producción de películas con un mayor espesor, además de un mejor control de la conductividad cuando se modifican los parámetros en el equipo de síntesis, principalmente la densidad de la corriente, el tipo de sustrato, el pH del medio y el dopante.

La síntesis química del polipirrol se realiza por medio de dos rutas: polimerización por condensación o polimerización por adición. Una de las ventajas más notorias de esta síntesis es que puede hacerse a gran escala —principalmente para fines comerciales—, algo imposible actualmente con el método electroquímico. La síntesis de este polímero utilizando un reactor de plasma posibilita su incorporación en la superficie de sustratos añadiéndoles nuevas propiedades. En la figura 3.20 se muestra una comparación entre el espectro FTIR de Ppy sintetizado por medio de un reactor de plasma, y Ppy obtenido por sintetización química [68].

En el espectro FTIR del Ppy sintetizado por plasma, la banda que se observa en 3400 cm^{-1} se atribuye a los N-H en tensión. Otro pico se encuentra en 1635 cm^{-1} , que corresponde al enlace C=N en flexión. Los picos que se observan en el intervalo de entre 500 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} pertenecen a los alquenos, que son resultado de algunas rupturas en los anillos del pirrol, otros enlaces que se generan a partir de esta ruptura son los C=C y C≡N que se encuentran en 2200 cm^{-1} [67, 69].

El espectro FTIR del polipirrol sintetizado de manera química posee un pico en 3411 cm^{-1} que pertenece al enlace N-H en tensión, este enlace también aparece en 788 cm^{-1} . El pico en 1291 cm^{-1} pertenece a la deformación del enlace C-H; 1540 cm^{-1} y 1467 cm^{-1} corresponden a vibraciones del anillo de polipirrol. El pico en 1640 cm^{-1} pertenece al enlace C=C y en 1184 cm^{-1} el enlace N-C en tensión [70, 71].

Ambos polímeros comparten algunos picos (ligeros corrimientos en el número de onda). La principal diferencia se halla en 1070 cm^{-1} del espectro de la síntesis química (figura 3.20b); se relaciona con la polimerización de los monómeros de pirrol. En la figura 3.20a, se observa que los picos en el intervalo de $500\text{ cm}^{-1} - 1000\text{ cm}^{-1}$, pertenecientes a los alquenos, son diferentes a los picos de la figura 3.20b en el mismo intervalo, esto es debido a que dichos alquenos son el resultado de la ruptura del anillo de polipirrol, cuando la síntesis con plasma es realizada, esta ruptura no ocurre en la síntesis química.



Banda	Número de onda cm^{-1}
N-H tensión	3400 y 2960
C-H tensión	3133
C≡C C≡N ruptura del anillo	2200
C=N	1635
Vibración en el plano del anillo pirrol	789, 963, 1467 y 1380
N-C tensión	1184
C-H fuera del plano flexión	727
Absorciones correspondientes a alquenos que son resultado del rompimiento del anillo	500-1000

Figura 3.20.- (a) Gráfica polipirrol sintetizado por plasma (b) polipirrol sintetizado de forma química.

3.9 Andamios y tratamiento superficial

En la figura 3.21a se muestra un andamio tubular electrohilado de PCL/PLGA (80/20), en todos los casos, las longitudes de los andamios fueron de ~ 10 cm, con un diámetro de ~ 5 mm y un espesor de ~ 0.50 mm. En la figura 3.21 se muestran los andamios antes y después del tratamiento superficial.



Figura 3.21.- a) andamio de PCL/PLGA: (80/20) b) $t_s=5$ min c) $t_s=10$ min, $t_s=15$ min, $t_s=20$ min, $t_s=25$ min $t_s=30$ min

3.9.1 Análisis MEB de andamios con tratamiento superficial

La polimerización del pirrol inducida por el plasma de aire produce un destello púrpura dentro de la cámara. Como resultado del tratamiento de la superficie, los andamios cambiaron de blanco a marrón oscuro. La polimerización del pirrol se lleva a cabo mediante la producción de los átomos libres del plasma, que se eliminan de los átomos de hidrógeno del sustrato polimérico, provocando la formación de los radicales libres que dan lugar a la polimerización del pirrol, y su vez, su entrecruzamiento [72]. La Figura 3.22 muestra el número de partículas de polipirrol que se forman en la superficie del andamio PCL/PLGA (80/20). Este número depende del tiempo de exposición al plasma. La Figura 3.22a muestra el andamio tratado durante 5 minutos dentro de la cámara de plasma donde se observa que su superficie permanece sin modificaciones. En contraste, después de diez y quince minutos dentro de la cámara de plasma, se observan pequeños fragmentos de estrellas de polipirrol en los andamios. La Figura 3.22d muestra el andamio que estuvo veinte minutos dentro de la cámara de plasma donde se formó una película heterogénea de polipirrol en algunas microfibras del andamio. Después de veinticinco minutos, se observaron partículas y películas de polipirrol en algunas fibras como se muestra en la Figura 3.22e. Finalmente, la figura 3.22f muestra andamios que estuvieron treinta minutos dentro de la cámara de plasma. Estos andamios mostraron un aumento significativo en el número de partículas y películas de polipirrol en sus superficies. La figura también muestra que las fibras comienzan a romperse, debido al plasma de alta energía y al largo tiempo de exposición.

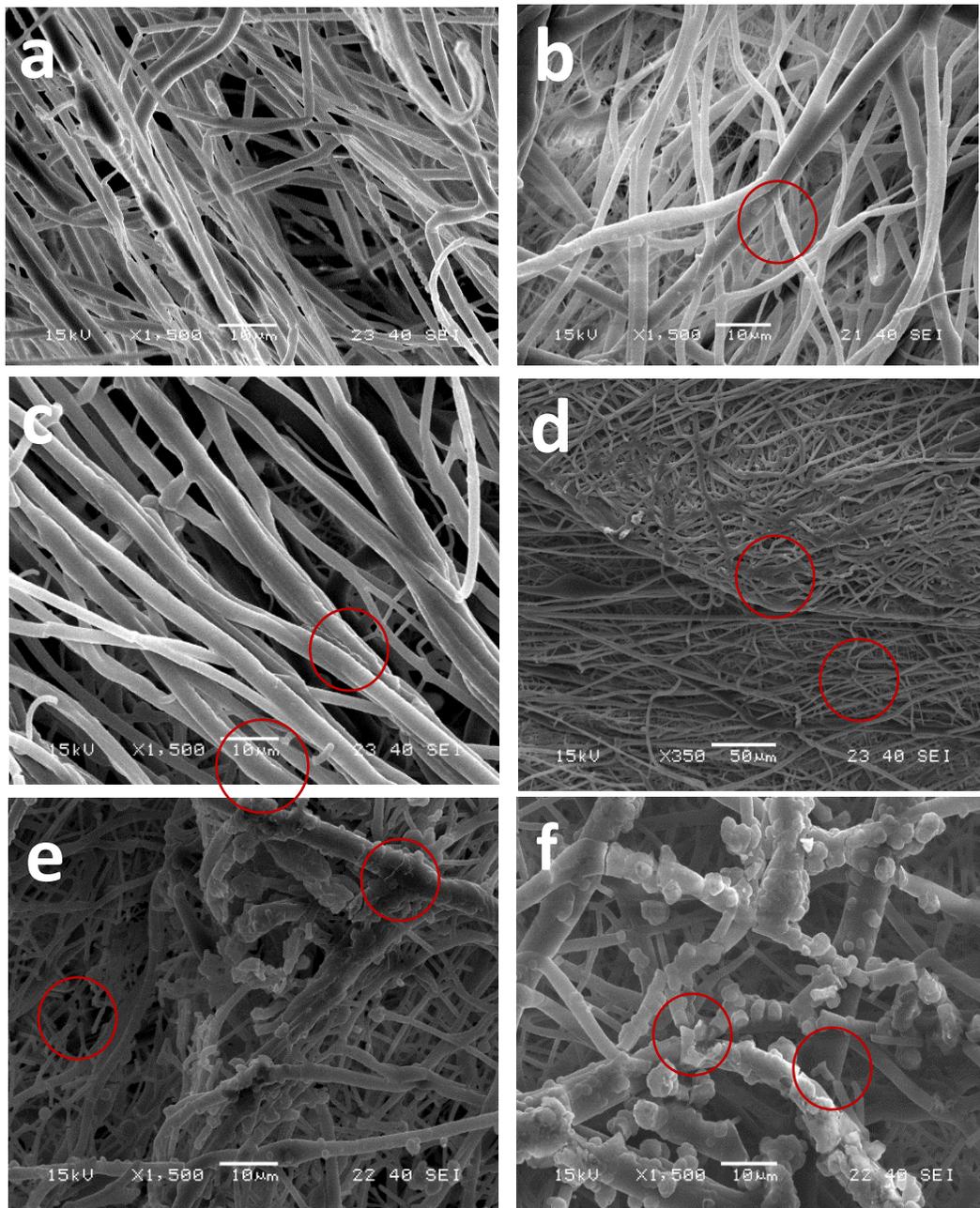


Figura 3.22.-Micrografías MEB de andamios electrohilados sometidos a diferentes tiempos de tratamiento con plasma, para la incorporación de polipirrol: a) 5 min b) 10 min c) 15 min d) 20 min e) 25 min f) 30 min.

3.9.2 Análisis de la superficie del andamio por XPS y FTIR.

Para determinar el porcentaje de grupos funcionales, se utilizaron tanto como XPS como FTIR.

La Figura 3.23a muestra la deconvolución de los espectros XPS C1s para las mezclas 80/20 sin tratamiento superficial, mientras que la Figura 3.23b muestra los espectros correspondientes para la mezcla PCL/PLGA (80/20) tratada durante 30 minutos con plasma de polipirrol. La Figura 3.23a muestra tres picos que corresponden a los dos polímeros [73-76].

El primer pico, ubicado a 284.4 eV, se asignó al grupo C-C, el segundo pico a 286.4 eV se atribuyó al grupo C-O y el tercer pico a 288.7 eV se atribuyó al enlace C = O. Sin embargo, en la Figura 3.23b se observa un pico más. A 287.0 eV, que se atribuye al grupo C = N del PPy, mientras que el pico a 285.8 eV se atribuye a la presencia del grupo C-O de la mezcla de polímeros y la presencia de los grupos C-N y C≡N del PPy [77, 78].

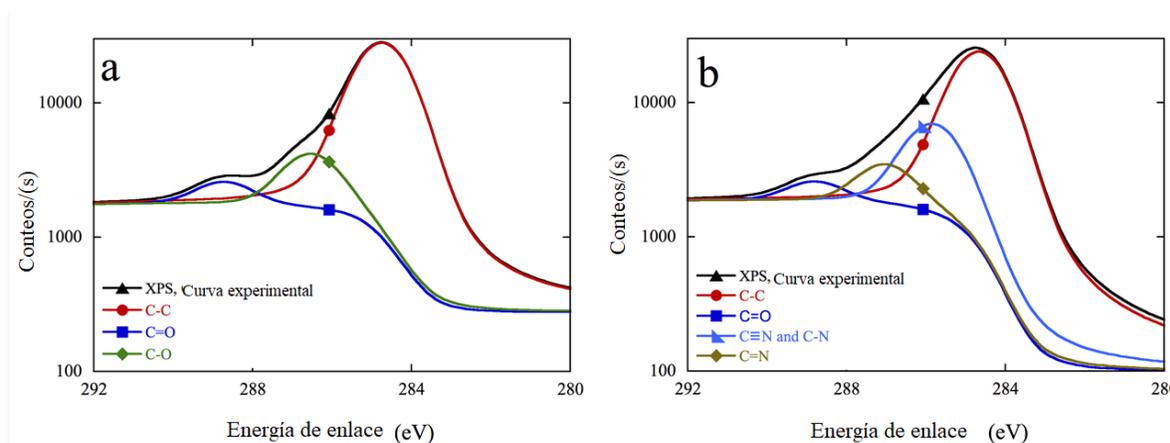


Figura 3.23.-Espectro XPS para los andamios. a) PCL/PLGA (80/20) andamio sin tratamiento superficial b) PCL/PLGA: (80:20) andamio con 30 min de tratamiento.

Las energías de enlace de los grupos N-C y C≡N se observaron en el mismo valor, por lo que sus picos se traslaparon en el espectro XPS[8]. Para confirmar que estos dos grupos están presentes, se obtuvo el espectro FTIR de la mezcla 80/20 para todos los tiempos de tratamiento superficial. Las figuras 3.24a y 3.24b muestran el grupo C≡N a 2200 cm⁻¹ [79]. Este grupo aparece después de 10 minutos de tratamiento del andamio en la cámara de plasma. Esto significa que después de 5 minutos de residencia del andamio en la cámara de plasma, el PPy no se ha sintetizado en la superficie del andamio o no es suficiente para ser detectado. La Figura 3.24b muestra la presencia del grupo N-C a 1184 cm⁻¹ atribuido al PPy. Aunque tanto la PCL como el PLGA tienen grupos (C-O) que vibran en este número de onda, se observa que después de los 5 minutos de tratamiento de la superficie, la forma del pico cambia con el tiempo. Este cambio puede atribuirse a la presencia de grupos que contienen nitrógeno de PPy[80].

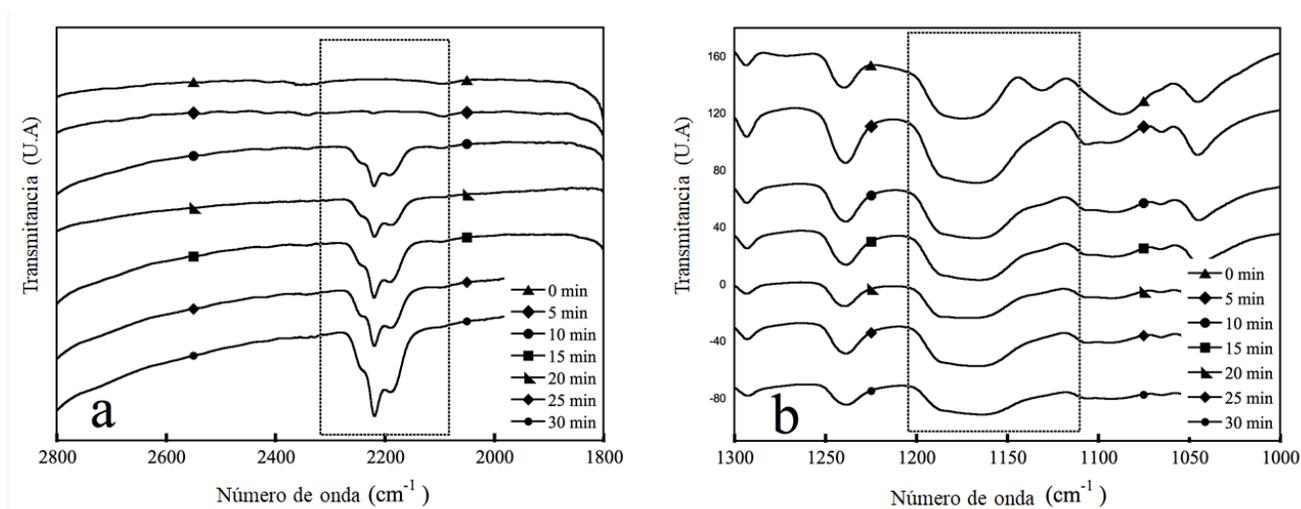


Figura 3.24.-. Espectro FTIR para el andamio. a) Andamio PCL/PLGA (80/20) sin tratamiento superficial b) Andamio PCL/PLGA (80/20) con 30 min de tratamiento superficial

La Tabla 3.5 muestra que en los andamios no tratados disminuyó el contenido de C-C, posiblemente debido a la alta energía del plasma que promueve la ruptura de los enlaces C-C de la PCL y el PLGA[81]. Después de cinco minutos, se observó la presencia de pirrol cuando comenzaron a aparecer los enlaces N-C y C≡N. Sin embargo, las contribuciones individuales no se muestran y solo el valor acumulado correspondiente a ambos enlaces se muestra en la Tabla 3.5. La presencia del enlace C = N, a los 25 y 30 minutos, se atribuye a la deshidrogenación y oxidación de la PPy [82], la literatura informa que este enlace C = N es tóxico[83, 84]. La tabla 3.5 muestra los cambios en el porcentaje del enlace C = O (este enlace corresponde solo al PCL). Por lo tanto, este cambio puede estar asociado con la degradación de PCL debido al mismo plasma[85]. Para todos los tiempos de tratamiento superficial, el contenido de enlace C-N permanece constante y con bajos porcentajes. Esto puede explicarse por la degradación del enlace de nitrógeno del pirrol polimerizado en la superficie del andamio, durante los primeros cinco minutos de tratamiento con plasma [86].

Tabla 3.5.-Porcentaje de grupos funcionales calculados a partir de las curvas XPS-C1s y XPS-N1s.

Tiempo del andamio	<i>XPS-C1s</i>				<i>XPS-N1s</i>	
	C-C ±1.0	C-N C≡N ±1.0	C=N ±1.0	C=O ±1.0	N-H ±1.0	C-N⁺ ±1.0
0 min	82.86	-	-	2.56	-	-
5 min	84.19	5	-	4.14	2.46	-
10 min	66.51	16.77	-	4.33	7.56	0.54
15 min	69.68	14.38	-	3.98	6.83	0.26
20 min	67.77	14.62	-	4.42	6.46	0.29
25 min	61.99	17.61	4.72	2.47	8.05	0.36
30 min	65.92	15.33	4.92	2.12	6.77	0.26

*La potencia utilizada fue 15 W a una frecuencia de 13.5 MHz.

3.9.3 Ángulo de contacto

En la tabla 3.6 se muestran los datos obtenidos para los ángulos de contacto medidos para cada tipo de andamio.

Tabla 3.6.-Ángulos de contacto

Andamio	PCL/PLGA	$t_s = 5 \text{ min}$	$t_s = 10 \text{ min}$	$t_s = 15 \text{ min}$	$t_s = 20 \text{ min}$	$t_s = 25 \text{ min}$	$t_s = 30 \text{ min}$
	(80/20)						
Ángulo de contacto	124.8±4.6	100.7 ± 12.1	96.9 ±7.9	108.57±10.84	118.3± 10.5	118.3 ± 9.1	55.8 ± 9.2

Los valores del ángulo de contacto obtenidos a partir de la superficie de los andamios revelan que el efecto del tratamiento superficial comienza a ser visible en $t_s = 30 \text{ min}$, como se muestra en la figura 3.25.

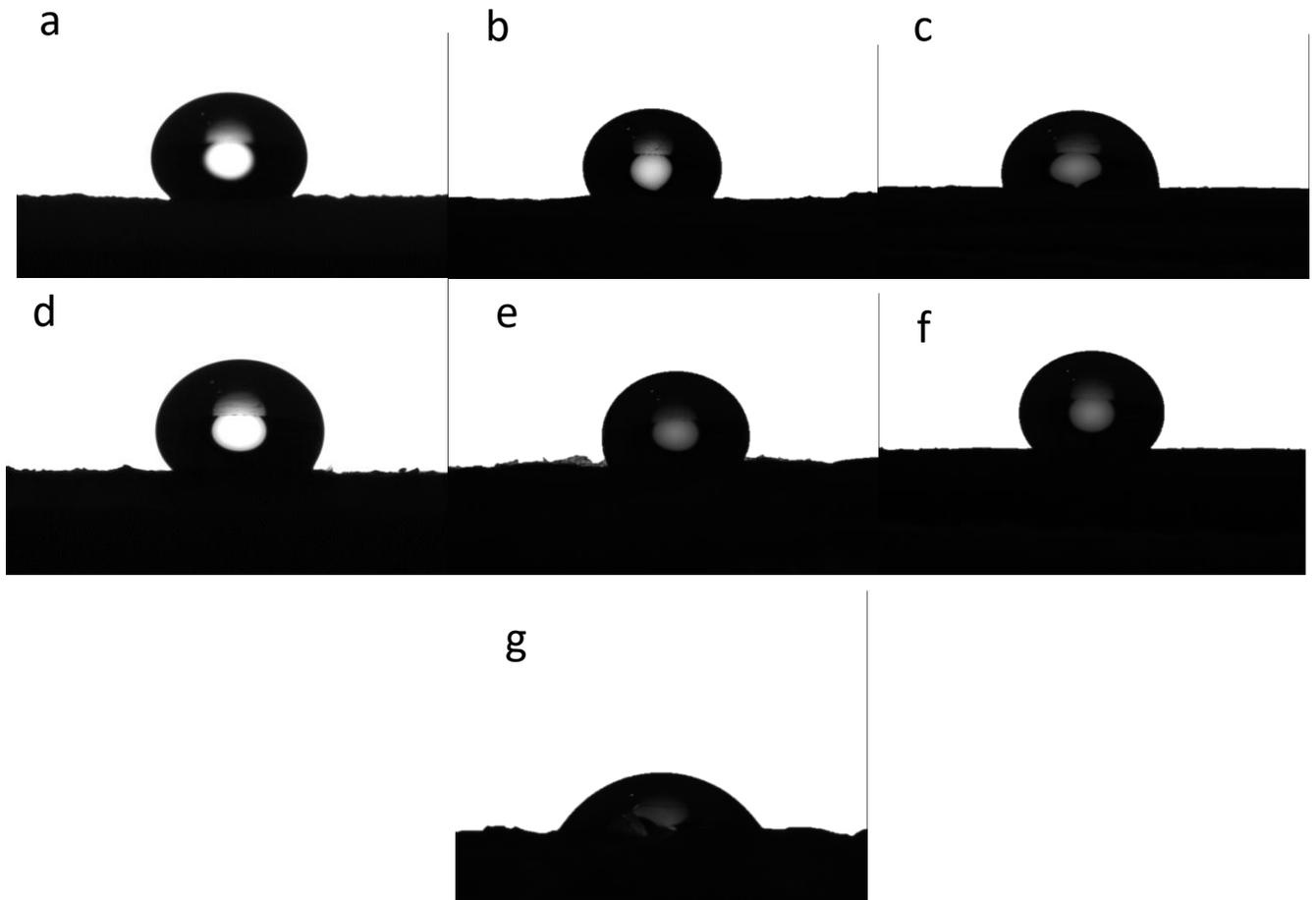


Figura 3.25.-Imágenes de las gotas depositadas en los andamios con tratamiento superficial; a) $t_s=0 \text{ min}$, b) $t_s=5 \text{ min}$, c) $t_s=10 \text{ min}$, d) $t_s=15 \text{ min}$, e) $t_s=20 \text{ min}$, f) $t_s=25 \text{ min}$ y g) $t_s=30 \text{ min}$

En el cálculo de porcentajes de N-H obtenidos mediante los espectros XPS (N1s), se corrobora que la cantidad de aminas presentes en el andamio varía de manera no lineal (figura 3.26a), y se observa que en $t_s = 20 \text{ min}$ existe una disminución de este grupo funcional dando como resultado un aumento en el ángulo de contacto (figura 3.26b), esto ocurre porque las aminas (N-H) aportan hidrofiliicidad [87]. De hecho, la gráfica de porcentaje de aminas (obtenida por XPS) así como la de ángulo de contacto pueden relacionarse con el siguiente comportamiento: A mayor contenido de aminas menor ángulo de contacto. No obstante, en el tiempo $t_s = 30 \text{ min}$ esta correspondencia en las gráficas ya no se cumple.

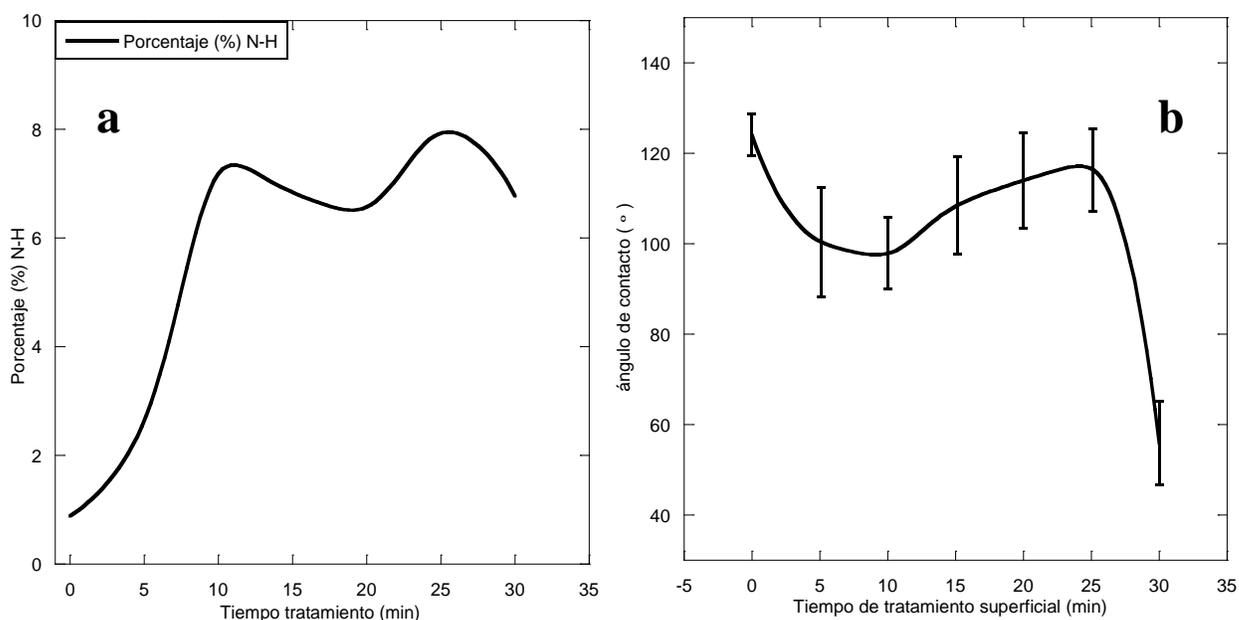


Figura 3.26.- a) Porcentaje de N-H calculado mediante el ajuste de la curva N1s obtenida con XPS b) ángulo de contacto vs tiempo de tratamiento superficial de los andamios.

Esto puede justificarse si se observa el perfil de espectros FTIR construido a partir de los andamios tratados superficialmente (figura 3.27), ya que se hace evidente que en $t_s = 30 \text{ min}$ existe una mayor cantidad de aminas secundarias, esto puede explicar la disminución en el valor del ángulo de contacto.

Estas diferencias entre los resultados obtenidos por XPS y FTIR probablemente sean ocasionadas por dos factores que ocurren durante el tratamiento superficial. El primero se relaciona con las energías de los electrones generados durante la descarga de plasma, que son dependientes de la zona del reactor[88], y el segundo con la distribución de las partículas de pirrol en la superficie del andamio, como se observa en la figura 3.28.

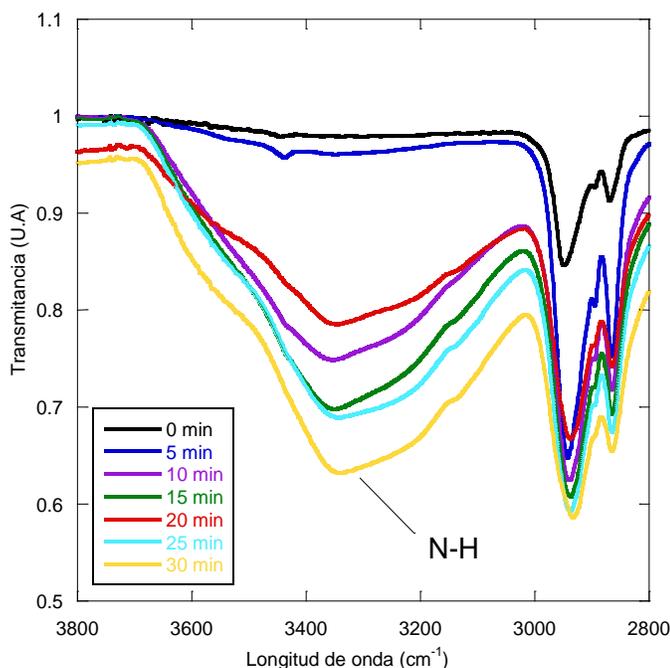


Figura 3.27.-Comparación entre el espectro FTIR de los andamios a diferentes tiempos de tratamiento con plasma

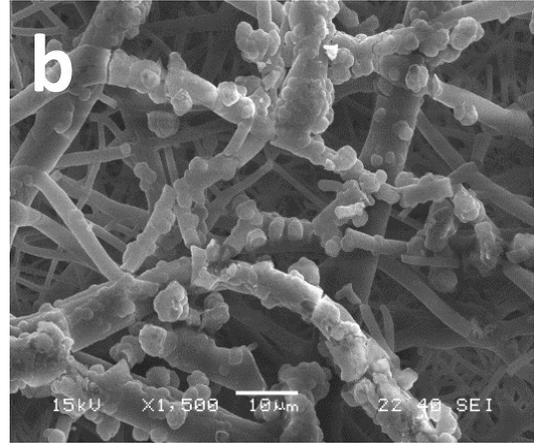
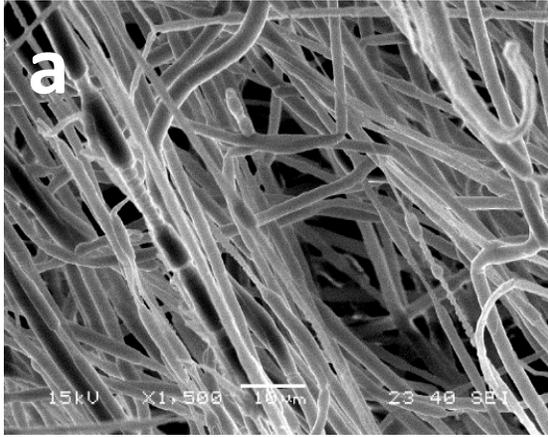


Figura 3.28.-Micrografías MEB de andamios electrohilados a) sin tratamiento b) con tratamiento superficial durante 30 min.

3.10 Cultivo celular y citotoxicidad de los andamios con tratamiento superficial.

3.10.1 Cultivos celulares

El tratamiento enzimático proporcionado al tejido uretral muestra que el aislamiento celular resultó exitoso. En la figura 3.29 se muestran poblaciones de células uretrales obtenidas durante el primer y segundo pasaje. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Patel *et al.*[14], quien también utilizó un método enzimático para la obtención de células de la uretra.

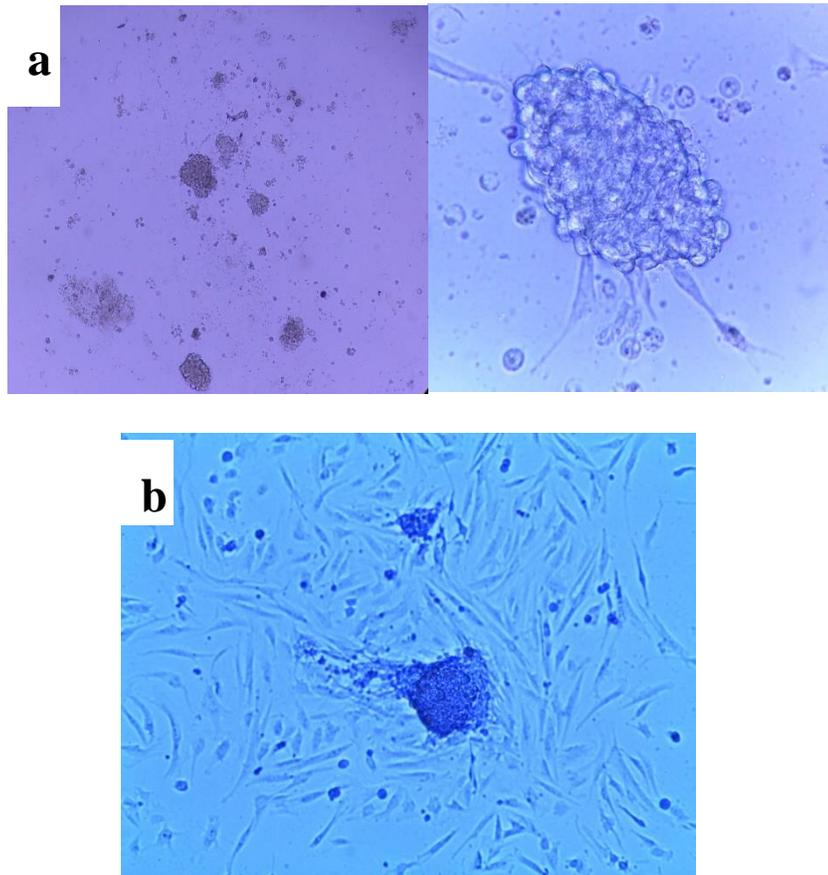


Figura 3.29.-Fotografías obtenidas por medio de microscopía óptica de campo claro, en donde se observa poblaciones de células uretrales. a) primer pasaje, b) segundo pasaje.

En la figura 3.30 se muestran las fotografías de microscopía de campo claro de células uretrales, a los 10 días de haber estado en contacto con los andamios tratados

superficialmente. Se observan que las células fueron capaces de colonizar y extenderse en presencia de los andamios tratados con polipirrol.

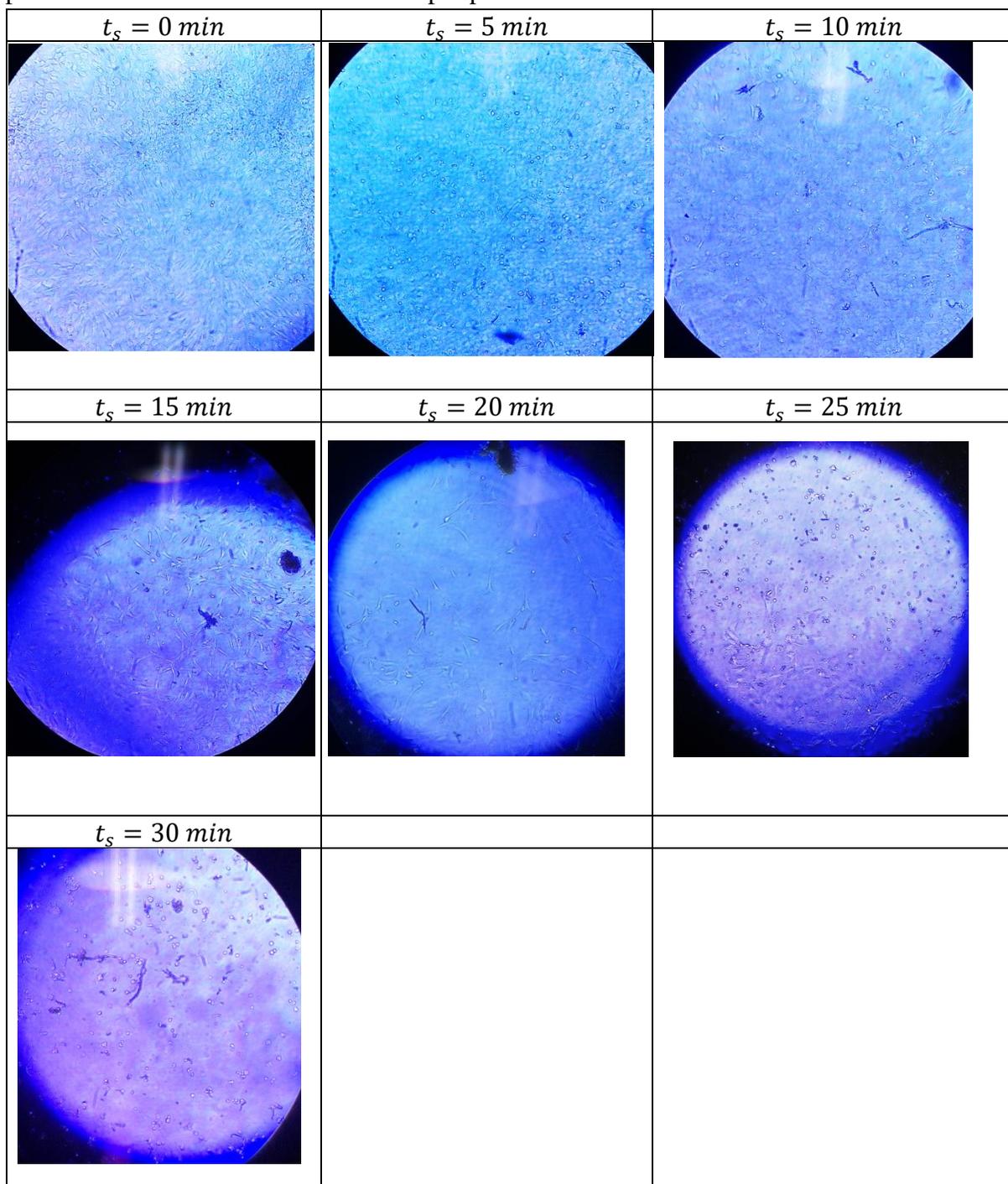


Figura 3.30.-Imágenes de microscopía de campo claro que muestran el efecto del tratamiento superficial en la viabilidad celular

Estos resultados muestran que los andamios con $t_s = 25 \text{ min}$ y $t_s = 30 \text{ min}$ poseen un aparente efecto citotóxico según la norma ISO 10993-5:2009[89] aplicada a la evaluación biológica de dispositivos médicos. Ya que existe una menor cantidad de células en comparación con tiempos menores de tratamiento, pues es visible una reducción en la viabilidad celular de más del 30% aproximadamente (determinación cualitativa).

3.10.2 Fenotipo de la población heterogénea células uretrales de cerdo (FPHCUC).

Los anticuerpos anti-pan citoqueratina AE1/AE3 y anti-alfa actina del músculo liso confirmaron la presencia de células epiteliales y CML, respectivamente. La inmunofluorescencia de la figura 3.31(a) y (b) muestra la expresión positiva de células uretrales.

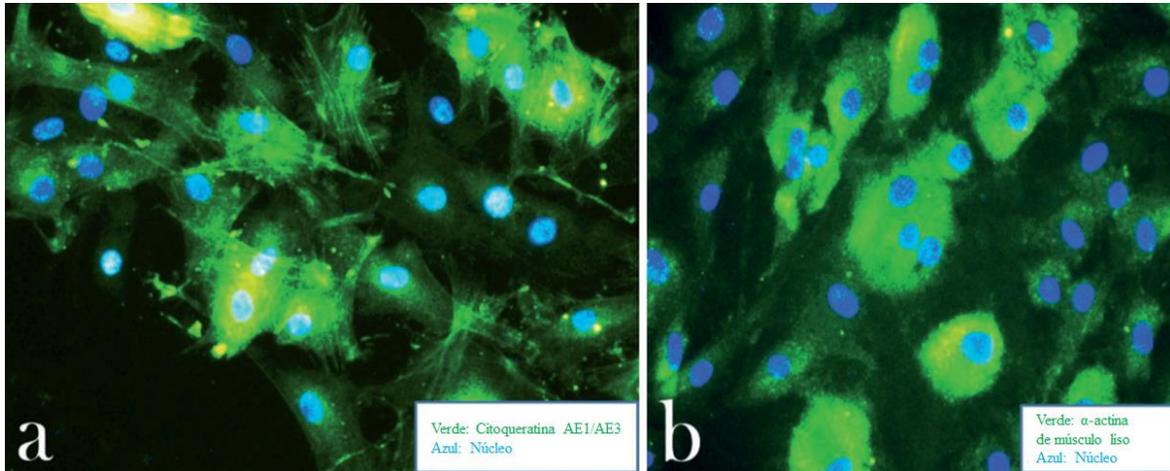


Figura 3.31.- (a) Expresión por inmunofluorescencia para células epiteliales AE1/AE3 (verde) y (b) expresión por inmunofluorescencia para células α -actina de músculo liso. La tinción nuclear se realizó con DAPI (azul). Magnificación de 40x.

3.10.3 Citotoxicidad de los andamios PCL/PLGA (80/20) tratados con pirrol

Los andamios tratados con polipirrol estuvieron en contacto con las células uretrales durante 3, 7 y 10 días. Como control, se usó un pozo cuyo contenido era células uretrales y medio de cultivo. La Figura 3.32 muestra que en el día 3, la absorbancia presenta solo pequeños cambios en sus valores, es decir, la viabilidad celular fue similar para todos los tiempos de tratamiento (10, 15 y 20 min). Después de 7 días, el andamio con $t_s = 20 \text{ min}$ mostró la absorbancia máxima (0.4) pero aún por debajo del control. Este comportamiento es típico de la proliferación celular. Sin embargo, a los 10 días, el andamio con $t_s = 15 \text{ min}$ mostró menos citotoxicidad.

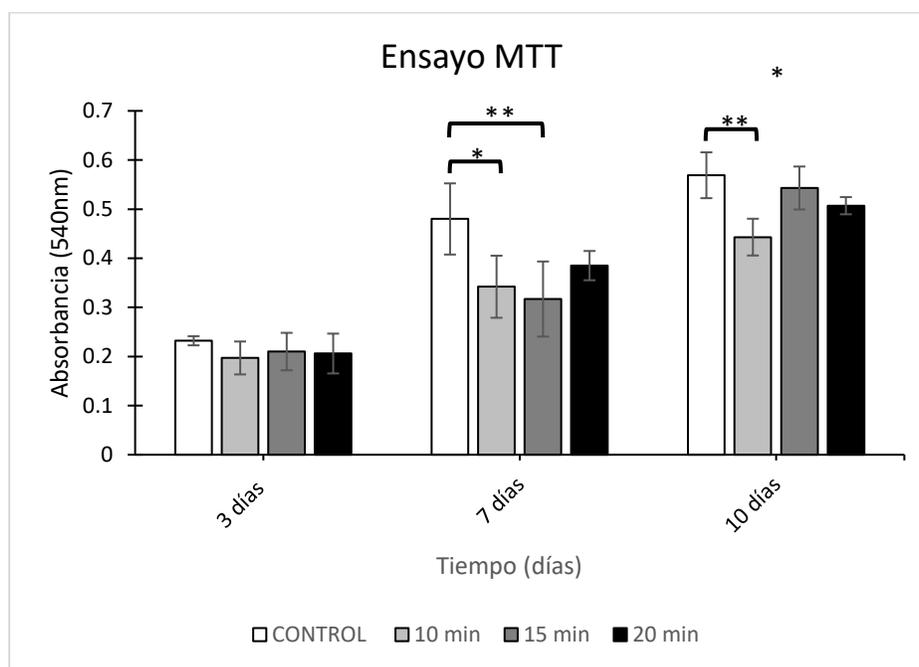


Figura 3.32.-Absorbancias MTT del andamio de los andamios con tratamiento superficial * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$

Un andamio modificado superficialmente ofrece ventajas para la viabilidad y proliferación celular porque las propiedades químicas de la superficie cambian. Estos andamios contienen nuevos grupos funcionales que representan beneficios para las células. Estos grupos funcionales pueden ser aminas, ácidos carboxílicos, entre otros [90-93]. Un tratamiento con plasma incorpora estos grupos funcionales sin modificar la estructura de los andamios y preservando las propiedades mecánicas, que tienen una gran importancia para la ingeniería de tejidos, especialmente cuando se utiliza para la regeneración uretral. Las aminas en la superficie del andamio podrían tener efectos benéficos sobre la adhesión celular, ya que estos grupos funcionales pueden unirse covalentemente con ligandos biológicos para promover una interacción receptor-ligando.

Sin embargo, el polipirrol en altas concentraciones puede causar un efecto citotóxico según la literatura, ya que los grupos $C = N$ pueden ser tóxicos. Estos efectos adversos se muestran en la tabla 1, donde se detecta la presencia del enlace $C = N$ en la superficie del andamio a los 25 min y 30 min [83, 84].

CAPÍTULO 4 . – CONCLUSIONES

Los andamios tubulares de PCL/PLGA se obtuvieron mediante la técnica de electrohilamiento. Las micrografías MEB de los andamios mostraron microfibras sin defectos que varían de entre 0.7 μm a 3.5 μm de diámetro y tamaños de poros de 9 μm a 24 μm a medida que aumenta el contenido de PLGA. Incluso cuando los andamios con 30% de PLGA mostraron el módulo de Young más alto (19 MPa) y la tensión más baja al romperse (15%) no generaron nanofibras. Por DSC se determinó que las mezclas de PCL/PLGA son compatibles pero no miscibles.

La medición de espesores en el andamio tubular muestra que es en la mitad de su longitud en donde se concentran los valores más altos de espesor, mientras que es en los extremos en donde se encuentran los valores más bajos; lo anterior, es causado por la longitud y rapidez de giro del cilindro utilizado, durante el proceso de fabricación.

Considerando que los tiempos de degradación del PLGA son menores en comparación al de la PCL, se esperaba que al aumentar la cantidad de PLGA en el andamio, también aumentara el porcentaje de degradación de este, lo cual no sucedió. Esto puede ser atribuido al espesor del andamio, ya que la cantidad de fluido que ingresa a éste depende de su espesor, de tal manera que las fibras internas no estuvieron en contacto con el fluido, por lo que probablemente no fueron sometidas a degradación.

Los resultados de las propiedades mecánicas y la viabilidad celular indicaron que la mezcla PCL/PLGA (80/20) es la óptima para la proliferación celular, por lo que a este andamio se le proporcionó tratamiento superficial.

El tratamiento con plasma de los andamiajes PCL/PLGA (80/20) permitió la incorporación de polipirrol en su superficie como pequeños fragmentos en tiempos cortos (5 minutos) y como recubrimiento polimérico con algo de daño de fibra en tiempos más largos (30 minutos). Los espectros XPS y FTIR mostraron la presencia de grupos N-H, C=O C-N y C=N en la superficie de los andamios. Los grupos N-H juegan un papel importante en la hidrofiliidad del andamio, ya que a mayor tiempo de estar expuestos a plasma de Ppy disminuye su ángulo de contacto.

Los estudios de citotoxicidad con poblaciones heterogéneas uretrales de células de cerdo mostraron que los tratamientos de entre 10 y 20 min permitieron una buena proliferación celular hasta por diez días. Por lo tanto, se recomienda que los andamios preparados por electrohilamiento tengan una composición de PCL/PLGA (80/20) y un tratamiento superficial de plasma de pirrol de entre 10 min y 20 min; estos parámetros demostraron ser los mejores para su uso en la ingeniería tisular uretral. Esto se debe a la presencia de microfibras y a la de grupos funcionales que contienen nitrógeno, los cuales, pueden promover la adhesión y la proliferación celular. Por lo tanto, es sugerido para su evaluación en estudios preclínicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. B. Chang and K. Leong, Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal*, 2008. 17(4): p. 467-479.
2. S. Nukavarapu; S Kumbar, Electrospun polymeric nanofiber scaffolds for tissue regeneration, *Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold*. 199-219 2008.
3. K Rourke, The Epidemiology, Clinical Presentation, and Economic Burden of Urethral Stricture, in *Advanced Male Urethral and Genital Reconstructive Surgery*. 2014, Springer. p. 83-93.
4. Gallegos, M.A. and R.A. Santucci, *Advances in urethral stricture management*. F1000Research, 2016. 5.
5. Z. Rashidbenam; M. Jasman; P Hafez, Overview of Urethral Reconstruction by Tissue Engineering: Current Strategies, Clinical Status and Future Direction. *Tissue engineering and regenerative medicine*, p. 1-20, 2019.
6. Q. Zou; Q. Fu, Tissue engineering for urinary tract reconstruction and repair: Progress and prospect in China. *Asian journal of urology*, 5(2): p. 57-68, 2018.
7. G. Rohman; Pettit J; F. Isaure, Influence of the physical properties of two-dimensional polyester substrates on the growth of normal human urothelial and urinary smooth muscle cells in vitro. *Biomaterials*, 28(14): p. 2264-2274, 2007.
8. N. Hiep; B.Lee, Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(6): p. 1969-1978, 2010.
9. A. Rowlands; J. Cooper-White, Directing phenotype of vascular smooth muscle cells using electrically stimulated conducting polymer. *Biomaterials*, 29(34): p. 4510-4520, 2008.

10. Z. Zhang; R. Roy; F. Dugré, In vitro biocompatibility study of electrically conductive polypyrrole-coated polyester fabrics. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 57(1): p. 63-71, 2001.
11. I. Yoder; N. Papanicolaou, Imaging the urethra in men and women. *Urologic radiology*, 14(1): p. 24-28, 1992.
12. D. Geslin; D. Gorduza; L. Paganelli , Anomalías de la uretra masculina en la infancia. *EMC-Pediatría*, 53(1): p. 1-6, 2018.
13. F. Brading; N. Dass; R. McCoy, Morphological and physiological characteristics of urethral circular and longitudinal smooth muscle. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 35(207): p. 12-18, 2001.
14. Patel, S.N., Characterization Of Smooth Muscle Cell Phenotype And Functionality For Potential Tissue Engineering Applications, PhD Thesis, University of Pittsburgh, 2009.
15. N. McKeag; K. Thornbury; M. Hollywood, Role of calcium-activated chloride channels in myogenic tone in the rat urethra, *Journal Of Physiology-London*, 10011-4221, 2001.
16. R Santucci; W. McAninch, Urethral reconstruction of strictures resulting from treatment of benign prostatic hypertrophy and prostate cancer, *Urologic Clinics of North America*, 29(2): p. 417-427, 2002.
17. D. Bayne; T. Gaither; M. Awad, Guidelines of guidelines: a review of urethral stricture evaluation, management, and follow-up. *Translational andrology and urology*, 6(2): p. 288, 2017.
18. Salud, S.d., Prevención, diagnóstico y tratamiento de estrechez (estenosis) de uretra postraumática por accidentes y procedimientos terapéuticos 2010: México.
19. M. Gorriño; A. Ibáñez; A. Oleaga, La uretrografía como método diagnóstico en la patología benigna uretral, *Radiología*, 47(5): p. 257-262, 2005.

20. A. Atala, Experimental and clinical experience with tissue engineering techniques for urethral reconstruction. *Urologic Clinics of North America*, 29(2): p. 485-492, 2002.
21. V. de Kemp; P. De Graaf; J. Fledderus, Tissue engineering for human urethral reconstruction: systematic review of recent literature, *PloS one*, 10(2): p. e0118653, 2015.
22. A. Atala; M. Danilevskiy; A. Lyundup, The potential role of tissue-engineered urethral substitution: clinical and preclinical studies. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 11(1): p. 3-19, 2017.
23. I. Bisson; J. Hilborn; J. Wurm, Human urothelial cells grown on collagen adsorbed to surface-modified polymers. *Urology*, 60(1): p. 176-180, 2002.
24. J. Kundu; Gelman, D. Tyson; Composite thin film and electrospun biomaterials for urologic tissue reconstruction. *Biotechnology and bioengineering*, 108(1): p. 207-215, 2011.
25. I. Kimuli; Eardley; J. Southgate, In vitro assessment of decellularized porcine dermis as a matrix for urinary tract reconstruction. *BJU international*, 94(6): p. 859-866, 2004.
26. T. Lu; Y. Li; T. Chen, Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 8: p. 337, 2013.
27. C. Gualandi, Porous polymeric bioresorbable scaffolds for tissue engineering. *Springer Science & Business Media*, 2011.
28. M. Maleki; A. Natalello; R Pugliese, Fabrication of nanofibrous electrospun scaffolds from a heterogeneous library of co-and self-assembling peptides. *Acta biomaterialia*, 51: p. 268-278, 2017.
29. B. Ulery; L. Nair; C. Laurencin, Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of polymer science Part B: polymer physics*, 49(12): p. 832-864, 2011.

30. J. Sánchez-Pech, Obtención de un andamio tubular de ácido poli (láctico-co-glicólico) y policaprolactona, mediante la técnica de electrohilado para la ingeniería en tejidos de la uretra. Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2014.
31. I. Fortelny; L. Fambri; M. Slouf, Phase structure, compatibility and toughness of PLA/PCL blends: a review. *Frontiers in Materials* 6: p. 206, 2019.
32. G. WE; C. Li, Q. FU, Preparation of PCL/silk fibroin/collagen electrospun fiber for urethral reconstruction, *International urology and nephrology*, 47(1): p. 95-99, 2015.
33. S. Bhargava; J. Patterson; R. Macneil, Tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty—clinical outcomes. *European urology*, 53(6): p. 1263-1271, 2008.
34. A. Raya-Rivera; D. Esquiliano; J. Yoo, Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *The lancet*, 377(9772): p. 1175-1182, 2011.
35. M. Fossum; J. Skikuniene; A. Orrego, Prepubertal follow-up after hypospadias repair with autologous in vitro cultured urothelial cells. *Acta Paediatrica*, 101(7): p. 755-760, 2012.
36. A. Barker; L. Jaffe; J. Vanable, The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 242(3): p. R358-R366, 1982.
37. X. Li; J. Kolega, Effects of direct current electric fields on cell migration and actin filament distribution in bovine vascular endothelial cells. *Journal of vascular research*, 39(5): p. 391-404, 2002.
38. M. Radisic; H. Park; R. Langer, culture of cardiac fibroblasts and myocytes enhances functional assembly of engineered myocardium. in Conference Proceedings, 7th International Congress of the Cell Transplant Society (CTS 2004), Boston, MA, November 17. 2004.

39. B. Lakard; L. Ploux; K Anselme, Effect of ultrasounds on the electrochemical synthesis of polypyrrole, application to the adhesion and growth of biological cells. *Bioelectrochemistry*, 75(2): p. 148-157, 2009.
40. H. Shirakawa; E. Louis; A. MacDiarmid, Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH) _x. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16): p. 578-580, 1977.
41. Ghasemi-Mobarakeh; L. Prabhakaran; M. Morshed, Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 5(4), 2011.
42. R. Balint; N. Cassidy; S. Cartmell, Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering, *Acta biomaterialia*, 10(6): p. 2341-2353, 2014.
43. D. Kim; S Richardson-Burns; J. Hendricks, Effect of immobilized nerve growth factor on conductive polymers: electrical properties and cellular response. *Advanced Functional Materials*, 17(1): p. 79-86, 2007.
44. Z. Huang; G. Yin; X Liao, Conducting polypyrrole in tissue engineering applications, *Frontiers of Materials Science*, 8(1): p. 39-45, 2014.
45. D. Kai; M Prabhakaran; G. Lin, Polypyrrole-contained electrospun conductive nanofibrous membranes for cardiac tissue engineering, *Journal of biomedical materials research Part A*, 99(3): p. 376-385, 2011.
46. B. Jakubiec; Y. Marois; Z. Zhang, In vitro cellular response to polypyrrole-coated woven polyester fabrics: Potential benefits of electrical conductivity, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 41(4): p. 519-526, 1998.
47. D. Ateh; H. Navsaria; P. Vadgama, Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues, *Journal of the royal society interface*, 3(11): p. 741-752, 2006.

48. Thomas, H., G. Grimes, and A. Bogisich, *Human Form Human Function Essentials Of Anatomy And Physiology*. 2011.
49. T. Tomita, Electrical activity (spikes and slow waves) in gastro-intestinal smooth muscle, *Smooth Muscle*, p. 127-156, 1981.
50. M. Takaki; H. Suzuki; S. Nakayama, Recent advances in studies of spontaneous activity in smooth muscle: ubiquitous pacemaker cells, *Progress in biophysics and molecular biology*, 102(2): p. 129-135, 2010.
51. M. Dagli; F. Hernandez-Blazquez; Roles of gap junctions and connexins in non-neoplastic pathological processes in which cell proliferation is involved. *Journal of Membrane Biology*, 218(1-3): p. 79-91, 2007.
52. S. Kim; L. Jeong; L. Lee, Fabrication and surface modification of melt-electrospun poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microfibers, *Fibers and Polymers*, 14(9): p. 1491-1496, 2013
53. S. Siri; P. Wadbua; P Amornkitbanrung, Surface modification of electrospun PCL scaffolds by plasma treatment and addition of adhesive protein to promote fibroblast cell adhesion. *Materials Science and Technology*, 26(11): p. 1292-1297, 2010.
54. D. Wang; M. Li; W. Huang, Repair of urethral defects with polylactid acid fibrous membrane seeded with adipose-derived stem cells in a rabbit model. *Connective tissue research*, 56(6): p. 434-439, 2015.
55. G. Shi; M. Rouabhia; Z. Wang, A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide. *Biomaterials*, 25(13): p. 2477-2488, 2004.
56. Y. Cruz; E. Muñoz; E. Gómez-Pachón, Electrospun PCL-protein scaffolds coated by pyrrole plasma polymerization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(10): p. 832-845, 2019.

57. Y. Liu; J. Yu; H. Zeng, Controlling numbers and sizes of beads in electrospun nanofibers. *Polymer International*, 57(4): p. 632-636, 2008.
58. H. Shin; C. Lee; I. Cho, Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(1-2): p. 103-119, 2006.
59. H. Yoshimoto; H. Shin, M. Terai, A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 24(12): p. 2077-2082, 2003.
60. J. Deitzel; J. Kleinmeyer; J. Harris, The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer*, 42(1): p. 261-272, 2001.
61. E. Fioretta; M. Simonet; M. Smiths, Differential response of endothelial and endothelial colony forming cells on electrospun scaffolds with distinct microfiber diameters, *Biomacromolecules*, 15(3): p. 821-829, 2014.
62. Y. Shin; W. Yang; W. Lee, PLGA nanofiber membranes loaded with epigallocatechin-3-O-gallate are beneficial to prevention of postsurgical adhesions. *International journal of nanomedicine*, 9: p. 4067, 2014.
63. Chawla, K.K., Composite Materials Mechanical, properties section 10.2, Mechanical properties 1987, New York: Springer-Verlag.
64. Y. He; W. Wang; J. Ding, Effects of L-lactic acid and D, L-lactic acid on viability and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Chinese Science Bulletin*, 58(20): p. 2404-2411, 2013.
65. K. Jeong; D. Paik; S. Choi, Fabrication of tubular scaffolds with controllable fiber orientations using electrospinning for tissue engineering, *Macromolecular Materials and Engineering*, 299(12): p. 1425-1429, 2014.

66. R. Aghdam; S. Najarian; S. Shakhesi, Investigating the effect of PGA on physical and mechanical properties of electrospun PCL/PGA blend nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 124(1): p. 123-131, 2012.
67. C. Walter; A. Quade; A. Weltmann. Structural Investigations of Composites Produced from Copper and Polypyrrole with a Dual PVD/PE-CVD Process. *Plasma Processes and Polymers*, 6(12): p. 803-812, 2009.
68. S. Aranda, Obtención de nanopartículas de polipirrol, Reporte de Investigación, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida Yucatán, 2017.
69. M. Totolin; M. Grigoras, Plasma induced pyrrole polymerization. *Rev. Roum. Chim*, 52(10): p. 999-1005, 2007.
70. H. Chitte; G. Shinde; N. Bhat, Synthesis of polypyrrole using ferric chloride (FeCl₃) as oxidant together with some dopants for use in gas sensors. *Journal of sensor technology*,. 1(02): p. 47, 2011.
71. C. Xu; J. Sun; L. Gao, Synthesis of novel hierarchical graphene/polypyrrole nanosheet composites and their superior electrochemical performance. *Journal of Materials Chemistry*, 21(30): p. 11253-11258, 2011.
72. L. Gomez; G. Cruz; M. Olayo, Analysis of crosslinking in polypyrrole particles synthesized by plasma. *Polymer bulletin*, 71(12): p. 3275-3287, 2014.
73. R. Ogaki, A. Shard; S. Li, Extracting information on the surface monomer unit distribution of PLGA by ToF-SIMS. *Surface and Interface Analysis: An International Journal devoted to the development and application of techniques for the analysis of surfaces, interfaces and thin films*, 40(8): p. 1168-1175, 2008.
74. J. Lee, C. Bashur; A. Goldstein, Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*, 30(26): p. 4325-4335, 2009.
75. T. Cai; M. Li; E. Kang, Preparation of stimuli responsive polycaprolactone membranes of controllable porous morphology via combined atom transfer radical

polymerization, ring-opening polymerization and thiol–yne click chemistry. *Journal of Materials Chemistry*, 22(32): p. 16248-16258, 2012.

76. L. Can-Herrera; A. Ávila-ortega; A. Oliva, Surface modification of electrospun polycaprolactone microfibers by air plasma treatment: Effect of plasma power and treatment time. *European Polymer Journal*, 84: p. 502-513, 2016.

77. J. Thunberg; T. Kalogeropoulos; V. Kuzmenko, In situ synthesis of conductive polypyrrole on electrospun cellulose nanofibers: scaffold for neural tissue engineering. *Cellulose*, 22(3): p. 1459-1467, 2015.

78. C. Malitesta; I. Losito; L. Sabbatini, New findings on polypyrrole chemical structure by XPS coupled to chemical derivatization labelling, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 76: p. 629-634, 1995.

79. S. Moosvi; K. Majid; T. Ara, Studying the electrical, thermal, and photocatalytic activity of nanocomposite of polypyrrole with the photoadduct of K₃ [Fe (CN) ₆] and diethylenetriamine, *Materials Research*, 19(5): p. 983-990, 2016.

80. A. Shillon, A. Srivastava; D. Avasthi, Experimental investigations of semi-crystalline plasma polymerized polypyrrole for surface coating, *Progress in Organic Coatings*, 69(4): p. 396-401, 2010.

81. R. Reis; L. Dumeé, L. Tardy, Towards enhanced performance thin-film composite membranes via surface plasma modification, *Scientific reports*, 6: p. 29206, 2016.

82. L. Gómez; M. Olayo; G. Cruz, Effect of energy in the size of pyrrole-derived particles synthesized by plasma. *Superficies y vacío*, 25(2): p. 88-91, 2012.

83. T. Hu, J. Curtis; J. Walter, Characterization of biologically inactive spiroptides E and F: Identification of the spiroptide pharmacophore, *Tetrahedron Letters*, 37(43): p. 7671-7674, 1996.

84. M. Stewart; J. Blunt; M. Munro, The absolute stereochemistry of the New Zealand shellfish toxin gymnodimine, *Tetrahedron Letters*, 38(27): p. 4889-4890, 1997.

85. R. Ghobeira; C. Philips; H. Declercq, Effects of different sterilization methods on the physico-chemical and bioresponsive properties of plasma-treated polycaprolactone films. *Biomedical Materials*, 12(1): p. 0150172017.
86. F. Lin; W. Li; H. Shao, High-performance polyimide filaments and composites improved by O₂ plasma treatment, *Polymers*, 10(7): p. 695, 2018.
87. X. Dai; J. Plessis; I. Kyrtziz, Controlled amine functionalization and hydrophilicity of a poly (lactic acid) fabric, *Plasma processes and polymers*, 6(8): p. 490-497, 2009.
88. J. Morales, Polimerización por plasma: Tratamiento superficial y simulación del plasma. Tesis doctoral UAM-I México, 2001,
89. M. Gomes; R. Leis; A. Cunha, Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymers: effect of several additives and processing conditions. *Biomaterials*, 22(13): p. 1911-1917, 2001.
90. F. Taraballi; S. Zanini; C. Lupo, Amino and carboxyl plasma functionalization of collagen films for tissue engineering applications. *Journal of colloid and interface science*, 394: p. 590-597, 2013.
91. J. Lee; H. Jung; H. Kang, Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups, *Biomaterials*, 15(9): p. 705-711, 1994.
92. Y. Ren; H. Zhang; H. Huang, In vitro behavior of neural stem cells in response to different chemical functional groups, *Biomaterials*, 30(6): p. 1036-1044, 2009.
93. X. Liu; Q. Feng; A. Bachhuka, Surface chemical functionalities affect the behavior of human adipose-derived stem cells in vitro, *Applied Surface Science*, 270: p. 473-479, 2013.