

Andamios eletrohilados de poli(ϵ -caprolactona) /colágeno con uso potencial en regeneración de tejido cutáneo

Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/collagen scaffolds with potential use for skin regeneration

Lizarazo-Fonseca Liliana ^{a,*}

Muñoz-Prieto Efrén ^a

Vera-Graziano R. ^b

Camacho Bernardo ^c

Salguero Gustavo ^c

Silva-Cote Ingrid ^c

Fecha de Recepción: 28.02.18

Fecha de Aceptación:08.05.19

DOI: <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n2.2019.9841>

Resumen

Dentro de los tratamientos actuales para la reparación de las lesiones en piel se encuentran los autoinjertos, los aloinjertos y los sustitutos dérmicos biosintéticos. Sin embargo, solo la terapia con autoinjerto es la que da mejores resultados y está sujeta al área de piel afectada en el paciente quemado, los demás tratamientos solo dan cobertura temporal a la herida, evidenciando la necesidad de generar estructuras que además de proteger la herida posean funciones biológicas que contribuyan a los procesos de reparación o regeneración de la piel. Con el fin de generar un apósito que reúna estas características, se fabricaron andamios de poli(ϵ -caprolactona) /Colágeno tipo I por electrohilado como posibles sustitutos dérmicos. Estos andamios se caracterizaron por SEM, ángulo de contacto, ATR-FTIR, TGA, DSC y se determinó su biocompatibilidad a partir de la adhesión y proliferación de células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW). Se encontró que la presencia de colágeno en los andamios disminuye el diámetro de fibra y mejora la hidrofiliidad favoreciendo los procesos de adhesión de las CEM-GW. Además, se demostró que no es necesario utilizar altas cantidades de colágeno para obtener un andamio con características fisicoquímicas y biológicas favorables.

Palabras clave: Sustitutos dérmicos, CEM-GW, lesiones cutáneas, biocompatibilidad.

a Grupo de Investigación Desarrollo y Aplicación de Nuevos Materiales (DANUM), Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-UPTC, Avenida Central del Norte 39-115, Tunja-Boyacá, Colombia.

b Instituto de Investigación en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, C.U., 04510 Ciudad de México, CDMX, México.

c Unidad de Terapias Avanzadas, Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud -IDCBIS, Bogotá, Colombia.

* lilianaandrea.lizarazo@uptc.edu.co

Abstract

Current treatments for skin lesions repair are autografts, allografts and biosynthetic dermal substitutes. However, only autograft therapy gives best results, but it is subject to skin area affected in burned patient, other treatments only give temporary coverage to wound, evidencing need to generate structures that besides protecting wound have biological functions that contribute to the repair or regeneration of the skin. In order to generate a dressing that meets these characteristics, poly (ϵ -caprolactone) / collagen type I scaffolds were fabricated by electrospinning to be evaluated as possible dermal substitutes. These scaffolds were characterized by SEM, contact angle, ATR-FTIR, TGA, DSC and their biocompatibility were evaluated by adhesion and proliferation of Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells (WJ-MSC). It was found that collagen presence in scaffolds decreases fiber diameter and improves hydrophilicity favoring adhesion of WJ-MSC. It was found that the presence of collagen in the scaffolds decreases the fiber diameter and improves the hydrophilicity favoring the adhesion processes of the CEM-GW. In addition, it was shown that it is not necessary to use high amounts of collagen to obtain a scaffold with favorable physicochemical and biological characteristics.

Keywords: Dermal substitutes, CEM-GW, tissue regeneration, biocompatibility and hydrophilicity.

1. INTRODUCCIÓN

La pérdida de piel puede ocurrir por diferentes razones como trastornos genéticos, heridas crónicas o agudas e incluso intervenciones quirúrgicas que pueden generar lesiones profundas que no es posible tratar con éxito mediante tratamientos convencionales y ponen en riesgo la vida de los pacientes [1]. Una de las causas más comunes para la pérdida importante de piel es el trauma térmico el cual se puede clasificar por la extensión y la profundidad de la lesión y a menudo implica largos procesos de cicatrización y aparición de defectos cosméticos y funcionales.

Los tratamientos clínicos convencionales se centran en la utilización de autoinjertos y/o aloinjertos para cubrir el área afectada y lograr reducir la formación de cicatrices [2]. Las limitaciones que presenta el uso de autoinjertos se evidencia en los pacientes con pérdida de piel que involucra más del 50% del área total de la superficie corporal limitando el área de piel sana para realizar la extracción de dermis para el trasplante, aumentando el tamaño total de la lesión [3]. Esto sumado a una barrera epidérmica deteriorada e inmunidad reducida del paciente, que puede favorecer una sepsis bacteriana, que es la principal causa de morbilidad del paciente quemado [4].

Por su parte los aloinjertos presentan problemas con el acceso a tejido suficiente para todos los pacientes que lo requieren, sumado al uso constante de inmunosupresores para prevenir

el rechazo inmunológico del injerto, lo que aumenta las posibilidades de contraer infecciones víricas y bacterianas [4, 5]. Una alternativa al uso de injertos es la terapia celular que se centra en la reparación de tejidos lesionados y consiste en el trasplante de células individuales a un tejido receptor en cantidades suficientes para que sobrevivan y restauren la función del tejido [6].

En estas terapias se destaca el uso de linajes específicos y células multipotentes aisladas de diferentes tejidos, entre las que se encuentran las células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW). Son células aisladas de cordón umbilical que presentan la capacidad de diferenciarse en varios linajes del tejido conectivo, pasar por numerosos ciclos de división celular manteniéndose indiferenciadas, activar procesos de homeostasis tisular a través de modulación inmune y producir factores que estimulan la proliferación y la diferenciación celular contribuyendo activamente en la reparación de tejidos [7].

Aunque las CEM-GW presentan innumerables características que las catalogan como una estrategia terapéutica posible, su aplicación también ha presentado limitaciones. Estudios alrededor de esta terapia han demostrado que las células que se trasplantan mediante inyección o infusión son poco retenidas en el sitio trasplantado, generando una tasa de injerto muy baja y por tanto reduciendo la eficacia del tratamiento [8-10]. Esto evidencia la necesidad de mejorar las estrategias de administración del producto celular que favorezca la entrega y disponibilidad de células

en el sitio de la lesión. Es por lo anterior que el uso de biomateriales en Ingeniería de Tejidos ha tenido un importante impacto en los últimos años a partir de diferentes combinaciones de materiales y técnicas, con el fin de proporcionar a las células un soporte con integridad estructural y suministro de agentes biológicos que favorezca un microambiente específico del tejido, regule las funciones celulares y acelere los procesos de cicatrización.

Se han utilizado diferentes métodos de procesamiento de biomateriales que abarcan los hidrogeles [11], la impresión 3D [12], el electrohilado [13, 14], entre otros. Siendo el electrohilado una opción prometedora en el campo de la regeneración de piel debido a la biomimesis de las fibras con la estructura de la matriz extracelular. El electrohilado es una técnica que ofrece una excelente relación volumen-área, permite obtener fibras con diámetros que van desde tamaños submicrométricos a escalas nanométricas [15], es versátil e implica bajos costos de procesamiento, se pueden usar una amplia gama de materiales poliméricos, tanto naturales como sintéticos utilizados para fabricar andamios por esta técnica, entre ellos se encuentran, el poliláctico (PLA), el poli(ácido glicólico) (PGA) [16, 17], el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) [18], la poli(ε-caprolactona) (PCL) [19] y polímeros naturales como el colágeno y el quitosano. Estos polímeros se pueden preparar, de forma individual y en mezcla de polímeros naturales con sintéticos, con el fin de mejorar las propiedades de los andamios, teniendo en cuenta el sitio de implantación [20, 21].

Por lo expuesto anteriormente, esta investigación se centró en el diseño y elaboración de un constructo a partir de la mezcla de PCL y colágeno Tipo I. El PCL es un poliéster alifático que se destaca por sus importantes propiedades mecánicas, su degradación por hidrólisis y su aprobación por la FDA (Foods and Drugs Administration) para uso clínico. Por su parte el colágeno tipo I es una proteína ampliamente utilizada como biomaterial gracias a sus propiedades químicas y biológicas, además de ser el principal componente de la matriz extracelular de la piel que sirve como sustrato natural para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, se degrada biológicamente por acción de las

colagenasas y debido a sus grupos funcionales es altamente hidrofílico.

Se usaron bajas concentraciones de colágeno tipo I con respecto al PCL, con el fin de determinar el grado de influencia del colágeno en las fibras de PCL. Los polímeros se mezclaron en dos proporciones diferentes PCL/COL 19:1 y PCL/COL 9:1 a una concentración total del 9% y se procesaron por medio de la técnica de electrohilado, con el fin de obtener una matriz polimérica de andamiaje. Se postuló que estas combinaciones pueden favorecer la adhesión, mantenimiento y proliferación de células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW) como una potencial estrategia para la regeneración de tejido cutáneo.

Los andamios de PCL y PCL/COL se caracterizaron mediante el análisis de morfología, de propiedades estructurales y por medio de pruebas biológicas. Las propiedades estructurales y morfológicas de los andamios se analizaron por medio de las técnicas como Microscopia electrónica de barrido (SEM), Ángulo de contacto, Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR), análisis termogravimétrico (TGA) y Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y las propiedades biológicas mediante la adhesión y proliferación celular de las células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW), para determinar el potencial uso de los andamios en la fabricación de constructos para la reparación de lesiones cutáneas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Los pellets de poli ε-caprolactona (PCL) (Mw 80 kDa) y el colágeno tipo I de piel de becerro, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). El 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) al 99% fue suministrado por Merck, los medios y suplementos para cultivo celular como el DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium, antibiótico-antimicótico Gibco 100X y Heparina, fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific (USA).

2.2 Preparación de las soluciones poliméricas

Se disolvieron 0,27 g de PCL en 3 mL de 2,2,2-trifluoroetanol para una concentración

de 9 % (p/v), para los andamios de PCL/COL se evaluaron dos relaciones: la primera 19:1 de PCL con respecto al colágeno y la segunda de 9:1, conservando una concentración final del 9 % (p/v). Para la primera relación se pesaron 243 μg de PCL y 27 μg de Colágeno Tipo I, para la segunda se pesaron 256 μg de PCL y 13.5 μg de Colágeno Tipo I, las relaciones se disolvieron en 3 ml de 2,2,2-trifluoroethanol. Las soluciones se agitaron magnéticamente a 500 rpm durante 3 y 6 horas respectivamente a temperatura ambiente.

2.3 Fabricación de las membranas por electrohilado

Cada solución se cargó en una jeringa de 10 ml y se incorporó en el sistema de inyección del equipo de electrohilado (fuente de alimentación HV 350R Unlimited Company Amherst, inyector NE modelo 4000 Syringe Pump Company). Los parámetros se ajustaron teniendo en cuenta estudios previos [22, 23]. Para los andamios de PCL se utilizó un voltaje de 19 Kv, 15 cm de distancia de la aguja al colector y 1 mL/h de inyección y para los andamios de PCL/COL se utilizó 19 Kv de voltaje, 15 cm de distancia de la aguja al colector y 0,6 mL/h de velocidad de inyección. El proceso de electrohilado se llevó a cabo a temperatura ambiente con valores de humedad entre 50 y 55%. Los andamios obtenidos se secaron al vacío durante 24 horas para eliminar remanentes del solvente en las fibras.

2.4 Caracterización andamios

Para evaluar la morfología de las fibras de PCL/COL y de PCL, los andamios se recubrieron con Au utilizando el método de pulverización catódica asistida por plasma con un voltaje para el haz de electrones de 15 KV. Las fibras se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo JEOL-JSM-7600F, la distribución de diámetros, el diámetro de fibra promedio y la estimación de la porosidad se evaluaron por medio del software Image-J, tomando 60 mediciones en diferentes aumentos. La determinación de las propiedades hidrofílicas de los andamios de PCL/COL y PCL se realizó utilizando el software Pinnacle Studio y un goniómetro (Ramehart inc Modelo 100-07-00) monitoreando el comportamiento de una gota de

agua destilada sobre la superficie de los andamios, los ángulos de la gota se determinaron con el software Image-J.

La caracterización de los grupos funcionales de los andamios se determinó en el equipo Nicolet 6700 Thermo Scientific utilizando espectroscopia infrarroja con reflexión total atenuada. La muestra se evaluó un rango de medición de 4000 a 500 cm^{-1} a temperatura ambiente. La pérdida de masa por sometimiento de los andamios a altas temperaturas se determinó en un equipo TGA Q5000 de TA Instruments. Estas mediciones se realizaron colocando aproximadamente 5 mg de muestra sometiénolas a un rango de temperaturas, desde ambiente hasta 250 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo atmósfera de N_2 . La determinación de las entalpías y temperaturas de transición se llevó a cabo utilizando el software TA Universal Analysis, las muestras se secaron en un desecador con una bomba de vacío marca VacuuBrand modelo RZ 2.5. Luego se colocaron alrededor de 10 mg de muestra en un equipo DSC Q100 de TA Instruments. Se utilizó un ciclo de calentamiento desde temperatura ambiente hasta 150 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo atmósfera de N_2 .

2.5 Esterilización de los andamios

Antes de la esterilización, los andamios se cortaron con un punzón de 1 cm de diámetro y se colocaron en una placa de cultivo de 48 pozos. Luego se esterilizaron en un equipo de radiación γ (Gamma-Medical) con fuente de radiación Cesio-137 BIOBEAM 2000 (Eckert & Ziegler BEBIG GmbH, Alemania), en dos dosis de 25 Gy por 15 min a temperatura ambiente y aislado de la luz.

2.6 Ensayos de adhesión celular.

Los andamios se sembraron con células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW) transducidas con la proteína verde-fluorescente (CEM-GW-GFP). Estas células se cultivaron en DMEM- α suplementado con lisado plaquetario humano (hPL) 10 % (v/v), penicilina 1 % (v/v) estreptomycin y 0.32 % (v/v) y heparina. Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO_2 . Las células

se sembraron en frascos de cultivo T75 hasta alcanzar un 70 – 80 % de confluencia. Después fueron cosechadas para sembrarlas sobre los andamios a una densidad de 5×10^4 células/cm². La evolución de la adhesión celular de CEM-GW-GFP sobre los andamios se observó en un microscopio invertido de fluorescencia a las 24 horas, 48 horas y 3 días.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para que un andamio pueda ser considerado una alternativa prometedora en ingeniería de tejidos, además de tener una estructura similar al tejido diana, se debe tener en cuenta algunos atributos importantes como son la composición química, la estructura física y proporcionar un microentorno adecuado para el crecimiento celular [24].

3.1 Morfología de los andamios electrohilados de PCL/COL y PCL

El electrohilado es una técnica que permite obtener andamios altamente porosos con

diámetros de fibra submicrométricos. En la figura 1 se observan las fibras obtenidas en la fabricación de los andamios por electrohilado de PCL/COL 19:1 (Fig.1A), PCL/COL 9:1 (Fig.1B) y PCL (Fig.1C), por microscopía electrónica de barrido, donde se evidencian estructuras fibrosas de tamaño sub-micrométrico orientadas al azar. Las fibras no presentan evidencia de defectos, lo cual es atribuido a la disolución total de los polímeros en el TFE, y la adecuada utilización de parámetros durante el electrohilado. Estas imágenes SEM fueron analizadas, para determinar el diámetro de fibra, y el área de porosidad.

La porosidad es un factor crucial en la fabricación de andamios con potencial aplicación en la reparación de tejidos. La naturaleza porosa es esencial para facilitar la infiltración y proliferación celular. Un alto grado de porosidad garantiza un intercambio suficiente de gas y nutrientes para el mantenimiento celular y posterior curación de heridas. Estudios previos afirman que el rango de porosidad en los andamios utilizados para infiltración celular, generalmente debe ser mayor a un 60 % [25, 26].

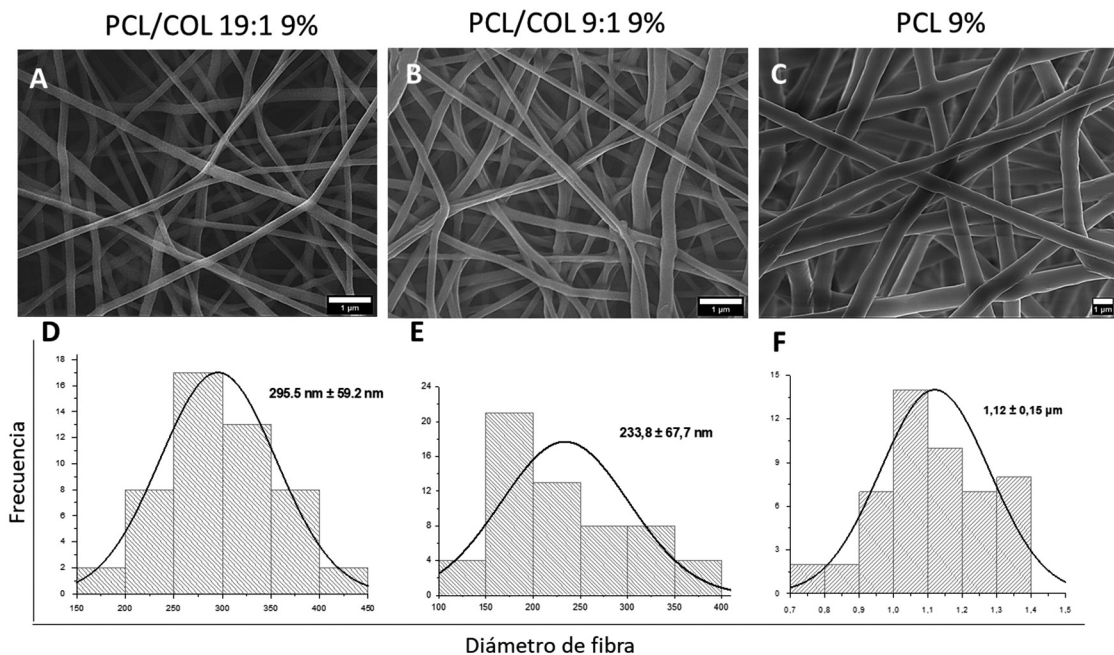


Figura 1. Morfología de los andamios obtenidos por SEM 5000x para las diferentes formulaciones (A) andamio de PCL/COL 19:1 9%, (B) andamio de PCL/COL 9:1 9%, (C) andamio PCL 9%, (D) diagrama de frecuencias para el diámetro de fibra del andamio de PCL/COL 19:1 9% (E) diagrama de frecuencias para el diámetro de fibra del andamio de PCL/COL 9:1 9%, (F) diagrama de frecuencias para el diámetro de fibra del andamio de PCL 9% y diámetro de fibra para las diferentes formulaciones de andamios de PCL/COL

El diámetro de fibra promedio para el andamio de PCL/COL 19:1 fue 295.5 ± 59.2 nm (Fig. 1D), para el andamio de PCL/COL 9:1 fue 233.8 ± 67.7 nm (Fig. 1E) y para el andamio de PCL fue $1.12 \pm 0,15$ μm (Fig. 1F) con un porcentaje de porosidad de 59.47 %, 57.57 %, 43.25 %, respectivamente. La disminución en los diámetros de fibra del PCL/COL indican que el uso de una proteína que contiene grupos amida a lo largo de su conformación estructural genera un incremento en conductividad de la solución aumentando la inestabilidad de la flexión durante el electrohilado [27] esto hace que la trayectoria del chorro sea más larga e induce a un mayor estiramiento de la solución [28, 29]. Los diámetros de fibra obtenidos se acercan a los diámetros de fibra reportados para matriz extracelular que miden en promedio de 50-250 nm [30].

3.2 Hidrofobicidad por ángulo de contacto

El comportamiento de la superficie de los biomateriales es una característica relevante, debido a que, el grado de humectabilidad de la superficie puede afectar la adhesión, mantenimiento y proliferación de las células [31]. La afinidad del agua con la matriz microfibrosa se examinó por medio del ángulo de contacto (fig. 2). El ángulo que se genera del contacto con el agua en el andamio se puede utilizar para evaluar la humectabilidad. En ese sentido, la mayoría de los polímeros sintéticos son hidrófobos y el grado de hidrofobicidad es proporcional a la ubicación y naturaleza de los grupos funcionales en los polímeros.

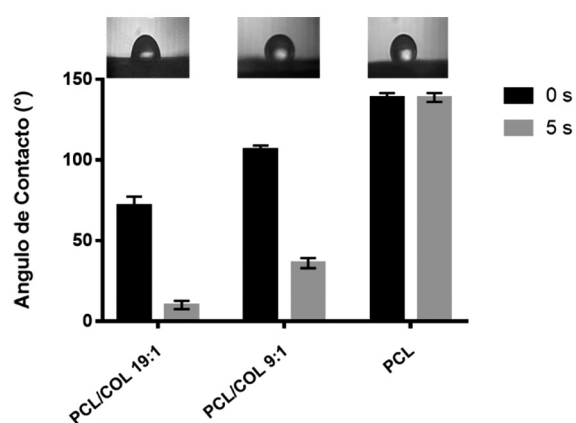


Figura 2. Ángulo de contacto para las relaciones de andamios PCL/COL y el andamio de PCL en dos tiempos, tiempo 0s cuando la gota entra en contacto con el material y transcurridos 5s de la interacción del líquido con el material

En el caso del PCL se evidencia un ángulo de $137,8$ ° debido a la baja relación de grupos éster con respecto a los grupos metilos, limitando la cantidad de hidroxilos presentes en el polímero, esto sumado al alto peso molecular del polímero utilizado, datos que coinciden con investigaciones previas [32, 33]. Por otra parte, los polímeros naturales como el colágeno son hidrófilos debido principalmente a la presencia de grupos nitrogenados en su estructura. Luego de combinar el colágeno con PCL para la fabricación del andamio se observó que la gota de agua se absorbió dentro de los primeros 5 segundos de contacto con las fibras del andamio, lo que dio como resultado un ángulo de contacto inferior a las 60° a los 5 segundos, sugiriendo hidrofiliidad de los andamios y potencial soporte para el crecimiento celular.

3.3 Análisis de Grupos funcionales por ATR-FTIR

Para confirmar la interacción de PCL con colágeno, los andamios electrohilados obtenidos de las dos combinaciones de colágeno y PCL y las materias primas puras fueron sometidos a análisis ATR-FTIR (Fig. 3).

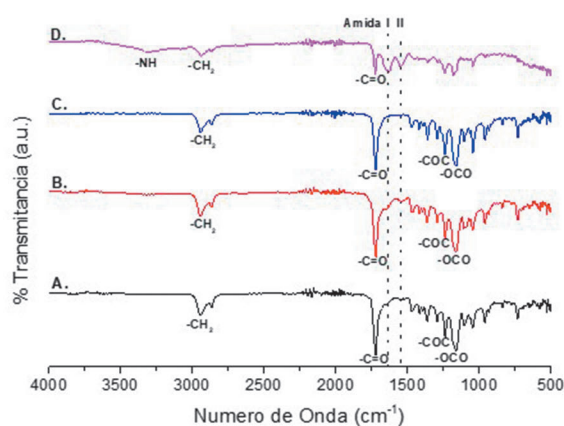


Figura 3. Espectros ATR-FTIR de los andamios de (A.) Policaprolactona/colágeno 19:1 9%, (B.) Policaprolactona/colágeno 9:1 9%, (C.) Policaprolactona 9% (D.) Colágeno tipo I

La policaprolactona presenta sus señales representativas de 2940 y 2865 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos del CH_2 y una señal aguda intensa a los 1724 cm^{-1} del estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ que coinciden con las reportadas en la literatura (Fig. 3C) [25, 34]. En el caso del colágeno se evidencian señales de la

Amida I y Amida II a los 1633 y 1548 cm^{-1} (Fig. 3D) respectivamente, estas señales se pueden identificar en los espectros de los andamios de PCL/COL (Fig. 3A - B), corroborando la presencia del colágeno en los andamios para las dos relaciones en estudio.

Así mismo, como resultado de ello, los enlaces amida puede estar altamente deslocalizado en el grupo $\text{C}=\text{O}$ adyacente (Fig. 3A - B). Esta observación también sugiere que se forman nuevos enlaces de hidrógeno entre los grupos amida del colágeno y los grupos carboxilo de PCL acorde a las observaciones en investigaciones previas [26].

3.4 Propiedades Térmicas de los Andamios

La estabilidad térmica de la Policaprolactona, el Colágeno y de los andamios obtenidos a partir de las dos formulaciones de PCL/COL se observan en la figura 4. Para la PCL se muestra la pérdida de masa de $96,54\%$ a los $346,02\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una sola etapa atribuida a la descomposición del material (Fig.

4aC) [35]. Para el caso del colágeno, se genera la pérdida de masa en tres etapas, la primera a los $41,41\text{ }^{\circ}\text{C}$ se atribuye al agua adquirida por hidratación en el material [36], la segunda a los $137,63\text{ }^{\circ}\text{C}$ relacionada con la evaporación de agua ligada a la molécula por medio de puentes de hidrogeno intermoleculares y la última a los $246,85\text{ }^{\circ}\text{C}$ atribuida a la descomposición de la proteína y generación de cenizas (Fig. 4aD). Los andamios de PCL/COL mostraron una pequeña pérdida de peso antes de la descomposición final, atribuida a la interacción de grupos amida de colágeno con grupos carboxilo de PCL a través de enlaces de hidrógeno como se evidencia en el análisis FTIR. Para los andamios de PCL/COL 19:1 y 9:1 se muestra una pérdida de masa de $89,01\%$ y $83,86\%$ a los $345,25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $346,02\%$ respectivamente (Fig.4aA - B). La variación en los porcentajes de pérdida de peso se atribuye a la presencia de colágeno, que sufre pérdida de agua y desnaturalización en la rampa de calentamiento del andamio, pero al ser cantidades tan bajas no se refleja un descenso considerable en la gráfica.

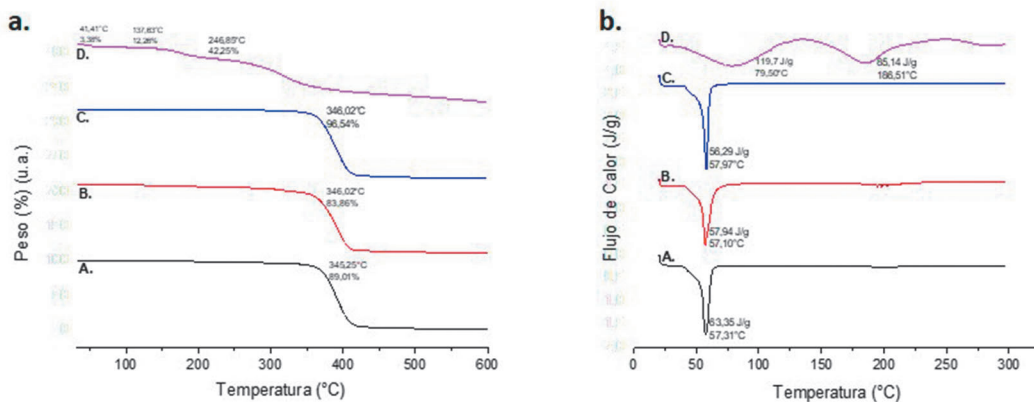


Figura 4. Análisis de TGA (a.), DSC (b.) de los andamios de (A.) Policaprolactona/colágeno 19:1 9%, (B.) Policaprolactona/colágeno 9:1 9%, (C.) Policaprolactona 9%, (D.) Colágeno tipo I

Por medio del DSC se evaluaron las transiciones térmicas de los andamios (ver figura 4.b). Para la PCL por cuenta del ciclo de calentamiento solo se identificó el punto de fusión (T_m) sobre los $57,97\text{ }^{\circ}\text{C}$, debido a que la PCL presenta un temperatura de transición vítrea (T_g) a $-59,53\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una temperatura de cristalización (T_c) $32,39\text{ }^{\circ}\text{C}$ que solo se puede identificar haciendo reciclo de calentamiento y enfriamiento en el material [37, 38].

Debido a que el colágeno se puede deshidratar o desnaturalizar cuando se calienta, los picos

endotérmicos característicos en el termograma de DSC a menudo se han denominado temperatura de deshidratación (TD) [39]. El análisis del colágeno mostró un pico endotérmico muy amplio en $79,50\text{ }^{\circ}\text{C}$ debido a la eliminación de agua libre, con un alto valor de entalpía ($119,7\text{ J/g}$). El segundo pico se atribuye al punto de fusión del Colágeno tipo I, cerca de los $186,51\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una entalpía de ($85,14\text{ J/g}$). Se calculó el % de cristalinidad de los andamios de PCL/COL mediante la siguiente ecuación:

$$X_c (\%) = \left[\Delta H_{m \text{ sample}} \left(\frac{J}{g} \right) / \Delta H_m^\circ \left(\frac{J}{g} \right) \right] \times 100$$

Ecuación 1. % de cristalinidad por diferencia de entalpías de fusión

Donde $\Delta H_m^\circ = 139,5 \text{ J/g}$, entalpía de fusión de la poli(ϵ -Caprolactona) 100% cristalina, el % de cristalinidad de los andamios de PCL/COL se ve afectado por la concentración de colágeno presente en las fibras. Así, para los andamios de PCL/COL 19:1 la cristalinidad fue de 45.41% superior con respecto a los andamios 9:1 que fue de 41.53%. Estudios previos [38] aseguran que un alto porcentaje de cristalinidad favorece la adhesión celular debido a que las células presentan preferencias sobre superficies amorfas. Los andamios de PCL/COL se probaron en el cultivo con células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton.

3.5 Cultivo celular sobre los andamios y análisis de adhesión y proliferación celular

Los andamios de PCL, PCL/COL 19:1 y PCL/COL 9:1 fueron evaluados por su capacidad para permitir la adherencia de CEM-GW-GFP+. La determinación de la adhesión celular es un requisito necesario si se tiene previsto usar estos andamios para la elaboración de constructos de ingeniería de tejidos en la reparación de piel. Con el fin de seleccionar el andamio con mejor formulación para la adhesión, mantenimiento y proliferación de las CEM-GW, se realizó un monitoreo del cultivo de CEM-GW GFP+ *in vitro*. En la figura 5 se observa la morfología y confluencia de las células sobre los andamios a las 24 horas, 48 horas y 5 días.

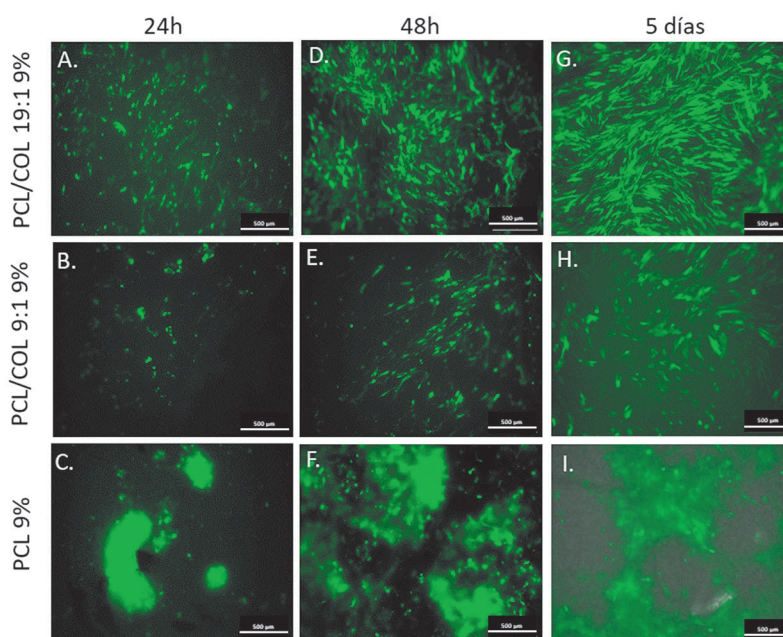


Figura 5. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia de CEM-GW-GFP+ cultivadas sobre los andamios a las 24h, 48h y 5 días de cultivo. CEM-GW-GFP+ cultivadas en los andamios de PCL/COL 19:1 9% (A, D y G), CEM-GW cultivadas en los andamios de PCL/COL 9:1 9% (B, E y H), CEM-GW cultivadas en los andamios de PCL 9% (C, F e I). (Barra de escala 500 µm).

Varios estudios en el área de biomateriales [40, 41] han demostrado que la interacción célula-andamio es dependiente de las características químicas de las matrices en las que se siembran y que es necesaria la combinación de polímeros, preferiblemente naturales con sintéticos, para poder aprovechar las ventajas que cada material ofrece [23, 41]. En este caso, se comparó la influencia de los andamios de PCL/COL y PCL en

la adhesión, mantenimiento y proliferación celular de las CEM-GW-GFP+ (fig. 5). Se evaluaron tres tiempos de cultivo (24 horas, 48 horas, 5 días) con el fin de observar el comportamiento celular en los andamios. Durante las primeras 24 horas de incubación, se observó que sobre los andamios con formulación PCL/COL 19:1 las células se adhirió y tenían la morfología fibroblastoide típica de las CEM-GW (Fig. 5-A). Por su

parte, en el andamio PCL/COL 9:1 (fig. 5B), se evidenció una menor adhesión celular, atribuido a la diferencia en la disposición del colágeno en las fibras. En ambos constructos de PCL/COL se observó en general una distribución uniforme de las CEM-GW a lo largo del andamio acompañado de un incremento del número de células, lo que sugiere proliferación celular (fig. 5 G - H).

Trascurridas 48 horas, las CEM-GW-GFP+ sobre el andamio PCL/COL 19:1 se observan morfología celular fibroblastoide definida y se evidencia mayor número de células sobre el andamio (Fig. 5D). Sin embargo, para PCL/COL 9:1 (Fig. 5-E) se evidencia menor adhesión celular, aunque las células se encuentran alargadas y orientadas sobre las fibras. A los 5 días, todas las células tienen morfología fibroblastoide y han proliferado sobre los andamios de PCL/COL 19:1 (fig.5-G), mientras que en el andamio PCL/COL 9:1 las células proliferaron menos (Fig. 5-H), lo cual sugiere que, aunque los dos andamios garantizan las funciones biológicas de las células, es mejor el de la formulación 19:1. EL andamio de PCL, mostró aglomeración de las células y distribución heterogénea en diferentes puntos del andamio a las 24 horas (Fig. 5-C) y a los 5 días aún se evidencian los conglomerados celulares presentes desde el inicio del cultivo (fig.5-I). Lo anterior se puede explicar por el grado de hidrofobicidad de la policaprolactona la cual limita las zonas de adherencia celular.

Adicionalmente, la adhesión de CEM-GW sobre los andamios PCL/COL no solo está relacionada con el aumento en la humectabilidad de los andamios, sino también con el incremento en la porosidad de los andamios, la posible formación de nuevos enlaces de hidrógeno entre los grupos amida del colágeno y los grupos carboxilo de PCL. Estos factores son críticos para proporcionar las moléculas necesarias para la adhesión de las CEM-GW [42, 43].

Estudios previos, donde evaluaron diferentes relaciones de estos polímeros, sugieren relaciones de colágeno más elevadas para obtener el cambio en las propiedades del andamio [26, 44, 45]. En esta investigación se demuestra que no es necesario utilizar altas cantidades de colágeno para obtener propiedades similares, obteniendo

un andamio que además de tener características fisicoquímicas prometedoras, ofrece rentabilidad y los parámetros deseados en la ingeniería de tejidos, para la generación de constructos bioactivos para la reparación de lesiones cutáneas.

CONCLUSIONES

La elaboración de un andamio de naturaleza bio-sintético por medio de electrohilado, permitió la creación de un soporte con las propiedades estructurales, resistencia mecánica y propiedades biológicas que lo catalogan como un sustituto prometedor en el tratamiento de heridas dérmicas.

El colágeno en bajas concentraciones con respecto a la poli(ϵ -caprolactona) genera un gran cambio en la polaridad de la membrana atribuido a la posible formación de puentes de hidrógeno entre la proteína y el poliéster, conservando las propiedades mecánicas de soporte del polímero sintético y adicionando la biocompatibilidad de la proteína natural.

El uso de células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW) en ingeniería de tejidos presenta grandes ventajas debido a la capacidad inmunomoduladora y la acción paracrina, que estimulan la proliferación y la diferenciación celular, contribuyendo activamente en la reparación de tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Böttcher-Haberzeth, T. Biedermann, and E. Reichmann, "Tissue engineering of skin," *Burns*, vol. 36, pp. 450-460, 2010.
- [2] F. J. O'brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Materials today*, vol. 14, pp. 88-95, 2011.
- [3] S. E. Wolf, J. K. Rose, M. H. Desai, J. P. Mileski, R. E. Barrow, and D. N. Herndon, "Mortality determinants in massive pediatric burns. An analysis of 103 children with \geq 80% TBSA burns (\geq 70% full-thickness)," *Annals of surgery*, vol. 225, p. 554, 1997.

- [4] J. W. Su, D. P. Mason, S. C. Murthy, and T. W. Rice, "Closure of a large tracheoesophageal fistula using AlloDerm," *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, vol. 135, pp. 706-707, 2008.
- [5] B. S. Atiyeh and M. Costagliola, "Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later," *Burns*, vol. 33, pp. 405-413, 2007.
- [6] V. F. Segers and R. T. Lee, "Stem-cell therapy for cardiac disease," *Nature*, vol. 451, p. 937, 2008.
- [7] A. Zajicova, K. Pokorna, A. Lencova, M. Krulova, E. Svobodova, S. Kubinova, *et al.*, "Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds," *Cell transplantation*, vol. 19, pp. 1281-1290, 2010.
- [8] Y. Tabata, "Biomaterial technology for tissue engineering applications," *Journal of the Royal Society interface*, vol. 6, pp. S311-S324, 2009.
- [9] W. M. Saltzman and W. L. Olbricht, "Building drug delivery into tissue engineering design," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 1, p. 177, 2002.
- [10] H. Naderi, M. M. Matin, and A. R. Bahrami, "Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems," *Journal of biomaterials applications*, vol. 26, pp. 383-417, 2011.
- [11] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering," *Chemical reviews*, vol. 101, pp. 1869-1880, 2001.
- [12] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," in *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, ed: Elsevier, 2000, pp. 175-189.
- [13] J. Lannutti, D. Reneker, T. Ma, D. Tomasko, and D. Farson, "Electrospinning for tissue engineering scaffolds," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, pp. 504-509, 2007.
- [14] W. J. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, and F. K. Ko, "Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering," *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 60, pp. 613-621, 2002.
- [15] W. Gamboa, O. Mantilla, V. Castillo, F. C. de Colombia, and G. de Bioingeniería, "PRODUCCIÓN DE MICRO Y NANO FIBRAS A PARTIR DE LA TÉCNICA "ELECTROSPINNING" PARA APLICACIONES FARMACOLÓGICAS," in *Memorias del VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería*, 2007.
- [16] Y. Luu, K. Kim, B. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, "Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers," *Journal of controlled release*, vol. 89, pp. 341-353, 2003.
- [17] X. Xu, Q. Yang, Y. Wang, H. Yu, X. Chen, and X. Jing, "Biodegradable electrospun poly (L-lactide) fibers containing antibacterial silver nanoparticles," *European polymer journal*, vol. 42, pp. 2081-2087, 2006.
- [18] J. Y. Lee, C. A. Bashur, A. S. Goldstein, and C. E. Schmidt, "Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 4325-4335, 2009.
- [19] A. Cipitria, A. Skelton, T. Dargaville, P. Dalton, and D. Hutmacher, "Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, pp. 9419-9453, 2011.
- [20] L. Li, S. Ding, and C. Zhou, "Preparation and degradation of PLA/chitosan composite materials," *Journal of applied polymer science*, vol. 91, pp. 274-277, 2004.

- [21] A.-M. Haaparanta, E. Järvinen, I. F. Cengiz, V. Ellä, H. T. Kokkonen, I. Kiviranta, *et al.*, "Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 25, pp. 1129-1136, 2014.
- [22] B. W. Tillman, S. K. Yazdani, S. J. Lee, R. L. Geary, A. Atala, and J. J. Yoo, "The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 583-588, 2009.
- [23] Y. Zhang, J. Venugopal, Z.-M. Huang, C. Lim, and S. Ramakrishna, "Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts," *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 2583-2589, 2005.
- [24] P. X. Ma, "Biomimetic materials for tissue engineering," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, pp. 184-198, 2008.
- [25] E. Abdelrazek, A. Hezma, A. El-Khodary, and A. Elzayat, "Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend," *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 3, pp. 10-15, 2016.
- [26] V. Y. Chakrapani, A. Gnanamani, V. Giridev, M. Madhusootheran, and G. Sekaran, "Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 125, pp. 3221-3227, 2012.
- [27] S. Ramakrishna, *An introduction to electrospinning and nanofibers*: World Scientific, 2005.
- [28] S. Gautam, C.-F. Chou, A. K. Dinda, P. D. Potdar, and N. C. Mishra, "Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 34, pp. 402-409, 2014.
- [29] Y. M. Ju, J. San Choi, A. Atala, J. J. Yoo, and S. J. Lee, "Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 4313-4321, 2010.
- [30] E. D. Hay, *Cell biology of extracellular matrix*: Springer Science & Business Media, 2013.
- [31] K. Ren, Y. Wang, T. Sun, W. Yue, and H. Zhang, "Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 78, pp. 324-332, 2017.
- [32] Z. P. Rad, J. Mokhtari, and M. Abbasi, "Fabrication and characterization of PCL/zein/gum arabic electrospun nanocomposite scaffold for skin tissue engineering," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 93, pp. 356-366, 2018.
- [33] S. Surucu and H. T. Sasmazel, "Development of core-shell coaxially electrospun composite PCL/chitosan scaffolds," *International journal of biological macromolecules*, vol. 92, pp. 321-328, 2016.
- [34] K. Ghosal, A. Manakhov, L. Zajičková, and S. Thomas, "Structural and surface compatibility study of modified electrospun poly (ϵ -caprolactone)(PCL) composites for skin tissue engineering," *Aaps Pharmscitech*, vol. 18, pp. 72-81, 2017.
- [35] D. Kołbuk, P. Sajkiewicz, K. Maniura-Weber, and G. Fortunato, "Structure and morphology of electrospun polycaprolactone/gelatine nanofibres," *European Polymer Journal*, vol. 49, pp. 2052-2061, 2013.
- [36] F. Pati, B. Adhikari, and S. Dhara, "Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability," *Bioresource technology*, vol. 101, pp. 3737-3742, 2010.
- [37] V. Speranza, A. Sorrentino, F. De Santis, and R. Pantani, "Characterization of the polycaprolactone melt crystallization:

- complementary optical microscopy, DSC, and AFM studies,” *The Scientific World Journal*, vol. 2014, 2014.
- [38] V. Speranza, A. Sorrentino, F. De Santis, and R. Pantani, “Characterization of the polycaprolactone melt crystallization: complementary optical microscopy, DSC, and AFM studies [Internet]. *Sci. World J.* 2014 [cited 2018 Mar 4],” ed.
- [39] Z. Chen, P. Wang, B. Wei, X. Mo, and F. Cui, “Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 372-382, 2010.
- [40] E. M. Harnett, J. Alderman, and T. Wood, “The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture,” *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, vol. 55, pp. 90-97, 2007.
- [41] E. Dawson, G. Mapili, K. Erickson, S. Taqvi, and K. Roy, “Biomaterials for stem cell differentiation,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, pp. 215-228, 2008.
- [42] Z. Ruszczak, “Effect of collagen matrices on dermal wound healing,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 55, pp. 1595-1611, 2003.
- [43] S. Chattopadhyay and R. T. Raines, “Review collagen-based biomaterials for wound healing,” *Biopolymers*, vol. 101, pp. 821-833, 2014.
- [44] J. Dulnik, P. Denis, P. Sajkiewicz, D. Kołbuk, and E. Chojińska, “Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 130, pp. 10-21, 2016.
- [45] N.-T. Dai, M. Williamson, N. Khammo, E. Adams, and A. Coombes, “Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin,” *Biomaterials*, vol. 25, pp. 4263-4271, 2004.