



UADY

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

ELECTROHILADO DE POLIURETANO CON  
ARGININA COMO EXTENSOR DE CADENA PARA  
ANDAMIAJE CELULAR.

TESIS

PRESENTADA POR

GEORGINA ALEJANDRA VENEGAS CERVERA

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019





**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

**ELECTROHILADO DE POLIURETANO CON  
ARGININA COMO EXTENSOR DE CADENA PARA  
ANDAMIAJE CELULAR.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**GEORGINA ALEJANDRA VENEGAS CERVERA**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**





**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

**COORDINACIÓN GENERAL  
DEL SISTEMA DE POSGRADO  
INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

Mérida, Yuc., 24 de noviembre de 2019  
Oficio Num.: PICQB/260/2019

**Asunto:** Autorización de digitalización

La tesis "Electrohilado de poliuretano con arginina como extensor de cadena para andamiaje celular" presentada por Georgina Alejandra Venegas Cervera, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestra en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

**Directores de la tesis**

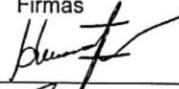
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Antonio Juárez Moreno

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocom

Sinodales

Firmas

Dr. José Manuel Cervantes Uc

  
\_\_\_\_\_

Dr. Geovanny Nic Can

  
\_\_\_\_\_

Dr. Alejandro Ávila Ortega

  
\_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE  
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"**

  
**DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS  
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**



**POSGRADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS QUÍMICAS  
Y BIOQUÍMICAS**

c.c. Archivo  
MRSC

Coordinación General de Posgrado, Investigación y Vinculación  
Periférico Norte Km 33.5 Tablaje Catastral 13615 Colonia Chuburná de Hidalgo Inn  
Teléfonos: 946 09 56, ext. 1116 | Mérida, Yucatán, México | www.uady.mx



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores de tesis, Dr. Juan Antonio Juárez Moreno y la Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocom, por el tiempo y ayuda en el desarrollo del proyecto de investigación.

A mis síndicos, Dr. Alejandro Ávila ortega, Dr. José Manuel Cervantes Uc y Dr. Geovanny Nic Can, por los consejos y recomendaciones en cada seminario para mejorar el trabajo.

A los encargados de los laboratorios por las facilidades y ayuda otorgada, especialmente a Azucena Chuc y Pablo Avalos del laboratorio de Química de Materiales.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por los momentos y experiencias compartidas, Lili, Chris, Sam, Alex, Josué, Luis, Emanuel, Laura y Claudia. Un placer toparme con ustedes en el camino.

A mis padres y familia, que me estuvieron apoyando en estos dos años y medio de maestría, muchas gracias.



Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Química de Materiales, laboratorio de Análisis Instrumental y el laboratorio de Biotecnología y Microbiología de la Universidad Autónoma de Yucatán bajo la dirección del Dr. Juan Antonio Juárez Moreno y la Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocom, con el apoyo de una beca nacional proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de becario 861075.

Se agradece a el Dr. Alfredo Rafael Vilchis Nestor y a la M. en C. Alejandra Núñez Pineda del Laboratorio de Análisis Térmico y Análisis Elemental del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable CCIQS UAEM-UNAM por su apoyo en los ensayos de caracterización del material. Y al Dr. Andrés Iván Oliva Arias del Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN unidad Mérida por su apoyo en los ensayos de microscopía.



## RESUMEN

Los apósitos cutáneos elaborados a base de polímeros con estructuras de nanofibras (electrohilados) permiten mejorar la interacción del material con células, favoreciendo la curación de heridas sin realizar modificaciones adicionales en la superficie del polímero, que resultarían en un mayor costo de fabricación. Por tal motivo, se realizó la síntesis de poli(urea-uretano) incorporando arginina como extensor de cadena (PUUR) para posteriormente electrohilar el material y determinar su efecto en andamiaje de células de fibroblastos (hFB), utilizando como control membranas electrohiladas y lisas de Tecoflex y poli(urea-uretano) con etilendiamina. PUUR se caracterizó por infrarrojo, resonancia magnética nuclear, cromatografía de permeación en gel, calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico. Posteriormente, los electrohilados se elaboraron a una concentración de polímero de 15%, a una distancia entre la aguja y el colector de 7 o 13 cm, o con una concentración de 20% a una distancia de 13 cm. Mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) se corroboró que a 20% se generaron fibras impactadas; lo cual se disminuye al reducir la concentración a 15%, aunque se observó la formación de fibras con gránulos alargados. La adherencia y proliferación celular fue determinada con la técnica LIVE/DEAD. La adhesión expresada como área superficial fluorescente de hFB fue mayor en membranas lisas que en PUUR electrohilado. Asimismo, la proliferación en las membranas electrohiladas de 20 y 15% de PUUR y Tecoflex-liso a las 24 h y las 120 h no tuvieron diferencia significativa. Sin embargo, Tecoflex-electrohilado tuvo la mayor proliferación a las 120 h, lo cual se adjudica a la formación de fibras uniformes, las cuales proveen mayor área superficial que las membranas lisas y PUUR con aglomerados. La morfología celular se determinó mediante SEM a las 24 h de cultivo, se observó una buena interacción célula-membrana por la típica extensión en forma de huso de la célula de fibroblasto sobre los materiales. Los resultados obtenidos indican que el electrohilado de polímero con ausencia de aglomerados mejoran la viabilidad de hFB sobre el apósito, siendo en este trabajo la morfología del material un factor más relevante en la respuesta celular que la composición del material.



## ABSTRACT

Skin dressings made of polymers with nanofiber structures (electro-spun) improve the interaction of cells with the material, which favors wound healing by avoiding other modifications on the polymer surface, which would result in a higher manufacturing cost. For this reason, the synthesis of poly(urea-urethane) was made from poly(caprolactone) diol and dicyclohexylmethane-4,4'-diisocyanate, incorporating arginine as a chain extender (PUUR) to subsequently make electrospun membranes with the material and determine its effect on fibroblast cell scaffolding (hFB), using as control electrospun and smooth membranes of Tecoflex and poly(urea-urethane) with ethylenediamine. The polymer was characterized by infrared, nuclear magnetic resonance, gel permeation chromatography, differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis. Subsequently, electrospun membranes were made at a polymer concentration of 15%, at a distance between the needle and the collector of 7 or 13 cm, or at a concentration of 20% at a distance of 13 cm. Scanning electron microscopy (SEM) confirmed that impacted fibers were generated at concentration of 20%; which is reduced by reducing the concentration to 15%, although the formation of elongated beads were observed. Cell adhesion and proliferation were determined with the LIVE / DEAD assays. Adhesion expressed as a fluorescent surface area of hFB was greater in smooth membranes than in electrospun PUUR. Likewise, the proliferation in the electrospun membranes of 20 and 15% of PUUR and Tecoflex-smooth at 24 h and 120 h had no significant difference. However, electrospun Tecoflex had the greatest proliferation at 120 h, which is attributed to the formation of uniform fibers, which have a greater surface area than smooth and PUUR with beads membranes. Cell morphology was determined by SEM at 24 h of cultivate, a good cell-membrane interaction was observed due to the typical spindle-shaped extension of the fibroblast cell on the materials. The results obtained indicate that the polymer electrospinning with the absence of agglomerates improves the viability of hFB on the dressing, being in this work the morphology of the material a more relevant factor in the cellular response than the composition of the material.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES .....	3
Piel.....	3
Lesión.....	4
Sustitutos cutáneos.....	5
Sustitutos acelulares.....	5
Sustitutos celulares .....	6
Polímeros sintéticos.....	6
Poli(uretano).....	7
Poli(uretanos) segmentados.....	8
Mejoramiento de respuesta celular en poli(uretano) .....	10
Electrohilado.....	12
Factores que afectan el proceso de electrohilado .....	13
Factores que afectan la interacción andamio electrohilado-célula.....	18
HIPÓTESIS .....	23
JUSTIFICACIÓN .....	25
OBJETIVO GENERAL.....	27
METODOLOGÍA.....	29
Etapa 1: Síntesis y procesamiento de poliuretano con extensor de cadena. ....	29
Etapa 2: Caracterización fisicoquímica de polímeros y membranas .....	30
Etapa 3: Ensayos biológicos In vitro de membranas electrohiladas y lisas.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
Caracterización fisicoquímica de polímeros y membranas .....	37
Caracterización de los materiales en cultivo de células de fibroblastos.....	46
CONCLUSIONES.....	65
REFERENCIAS .....	66



## INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano cuya función principal es proteger al organismo de cambios bruscos en el ambiente.<sup>1</sup> El daño de esta línea de defensa implica la pérdida de sus funciones y la exposición del tejido subyacente a invasores como bacterias, virus y hongos, los cuales promueven el desarrollo de infecciones.<sup>2</sup> Y aunque la piel tiene la capacidad de autosanarse, es necesaria una cobertura inmediata para ayudar a la reparación y regeneración del tejido cuando se causen daños<sup>3</sup> o cuando existe una disminución en la capacidad de curación del paciente.<sup>3</sup> Las afecciones de la piel más comunes derivan de traumas mecánicos, procedimientos quirúrgicos, quemaduras y úlceras crónicas. Entre los tratamientos empleados para la curación de heridas cutáneas, el injerto de piel es la técnica más utilizada, proporcionando un ambiente rico en colágeno y factores de crecimiento.<sup>4</sup> Aunque tienen la desventaja de presentar donantes limitados, riesgo de infección, y cicatrización lenta.<sup>3</sup>

Por otro lado, otros tratamientos utilizan andamios celulares o acelulares que pueden estar conformados por polímeros naturales y por polímeros sintéticos.<sup>3</sup> Una ventaja del uso de polímeros naturales es que tienen zonas de reconocimiento celular que promueven la adhesión y proliferación, además de ser biocompatibles y biodegradables. Sin embargo, una desventaja es que poseen bajas propiedades mecánicas de retracción-contracción.<sup>3</sup> En adición, implican un riesgo de transmisión de enfermedades, dependiendo del aislamiento y manejo del material,<sup>5</sup> y son relativamente caros. En caso inverso, los polímeros sintéticos, como el poliuretano, tienen fuentes menos costosas de materia prima. Además de una amplia gama de propiedades físicas, dependiendo de su técnica de fabricación. Sin embargo, tienen la desventaja de un limitado reconocimiento celular y, por lo tanto, bajos niveles de unión y proliferación celular,<sup>4</sup> lo que retarda la curación de la herida cutánea.

Algunas metodologías para mejorar la afinidad biológica de polímeros sintéticos son mediante su combinación con biopolímeros,<sup>3</sup> la modificación química de su superficie,<sup>6</sup> o mediante la inserción de biomoléculas como extensores de cadena, péptidos o aminoácidos.<sup>7</sup> Otra forma de fomentar la respuesta biológica del polímero es con la formación de andamios fibrosos, debido a que la piel, al igual que otros órganos y tejidos, tiene estructuras fibrosas organizadas y de tamaño nanométrico.<sup>8</sup> Por lo tanto, la formación de nanofibras por electrohilado es una buena propuesta para mejorar el reconocimiento celular debido a que promueve las interacciones célula-matriz,<sup>3</sup> al imitar la morfología fibrosa de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés Extracellular matrix).<sup>9</sup>

Algunos poli(uretano)s electrohilados se han combinado con polímeros naturales como colágeno,<sup>10</sup> gelatina<sup>11,12</sup> y dextrano<sup>13</sup> para mejorar la afinidad celular,<sup>13</sup> y en el caso de

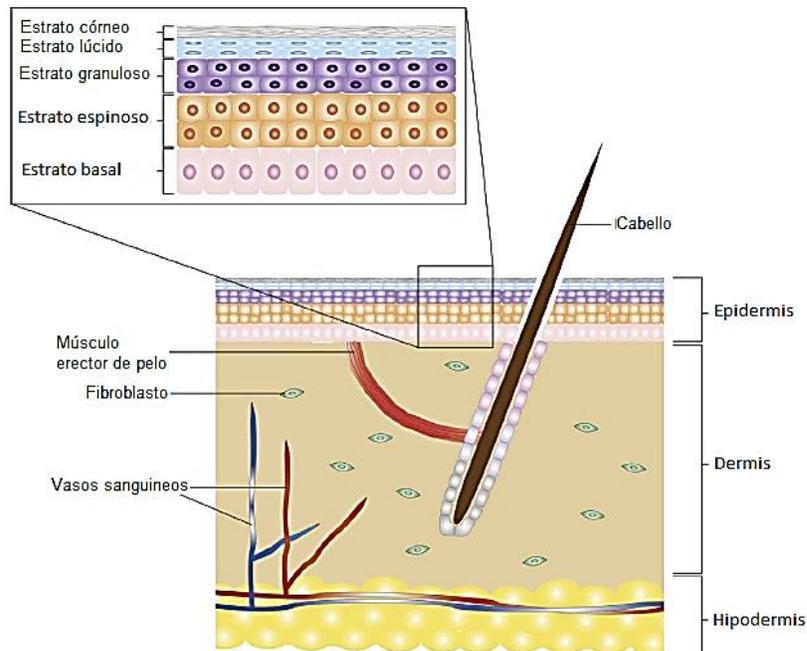
los últimos dos utilizados como sustitutos de colágeno para disminuir costos. Otra opción para evitar el uso de biopolímeros es la síntesis de polímeros que tengan secuencias de aminoácidos en la cadena del material para disminuir costos. Y así evitar la funcionalización previa de la superficie del material con otras metodologías, por ejemplo, plasma, para el anclaje del polímero natural.<sup>14</sup> A su vez, estudios han demostrado que la utilización de aminoácidos polares como la arginina promueven la adhesión y proliferación de células.<sup>15,16</sup>

Por lo tanto, en este trabajo se sintetizaron poli(urea-uretano)s segmentados usando poli(caprolactona) diol (PCL-diol), diisocianato de 4,4'-d ciclohexilmetano y el aminoácido arginina, como extendedor de cadena. Posteriormente se electrohiló el material y se obtuvieron membranas electrohiladas de poli(urea-uretano) segmentado. Siendo la aportación de este trabajo el estudio de membranas de electrohilado de poli(urea-uretano) con arginina como extensor de cadena en andamiaje de células de fibroblastos.

## ANTECEDENTES

### Piel

La piel es un órgano auto-reparador y auto-renovador que cubre toda la superficie del cuerpo y forma una barrera que separa el ambiente exterior de los órganos internos.<sup>17</sup> Se subdivide en tres capas principales; la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 1). La epidermis está conformada por un 90% de queratinocitos, y su principal función es de regulación de pérdida de agua y protección del cuerpo de elementos extraños.<sup>4</sup> La dermis es la capa más gruesa y la que sigue a la epidermis. Está conformada por la matriz extracelular, y principalmente por células de fibroblastos.<sup>4</sup> La ECM está formada principalmente por colágeno tipo I, seguido de elastina, y glicosaminoglicanos (GAG),<sup>3</sup> que proporcionan resistencia mecánica y elasticidad a la piel. La dermis se subdivide en capa papilar superficial y la capa reticular profunda. La primera está constituida de fibras delgadas de colágeno irregularmente distribuidas, y una red de fibras de elastina. En la segunda, el colágeno es grueso y denso y las fibras son longitudinales y tienden a ir en paralelo a la superficie cutánea; también las fibras de elastina son gruesas, pero presentes en menor cantidad.<sup>18</sup>



**Figura 1.-** Composición y estructura de la piel.<sup>17</sup>

La última capa de la piel es la hipodermis. Consiste principalmente de tejido adiposo y vasos sanguíneos.<sup>4</sup> Así, el conjunto organizado de estos componentes forma un entorno

por el cual diferentes tipos de células estarán comunicadas entre sí para reparar y regenerar continuamente la piel durante la homeostasis normal y durante una lesión.<sup>17</sup>

### *Lesión*

Se considera una lesión o herida a cualquier alteración en la estructura anatómica normal e integridad funcional de la piel.<sup>17</sup> De manera natural, la curación de una lesión requiere de complejas interacciones entre diferentes tipos de células, factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas,<sup>19</sup> las cuales están agrupadas en cuatro etapas que acontecen de manera traslapada: hemostásis, inflamación, proliferación y maduración. En los primeros segundos se inicia la hemostasia, donde se detiene la pérdida de sangre mediante vasoconstricción de los vasos sanguíneos dañados y por la formación de un coágulo sanguíneo.<sup>20</sup> Las plaquetas en el coágulo segregan citosinas y factores de crecimiento que generan quimiotaxis de neutrófilos, monocitos; transformados posteriormente a macrófagos, y linfocitos al coágulo.<sup>20-22</sup> Estas células se encargan de fagocitar y eliminar bacterias, tejido necrosado y elementos foráneos del área de la herida.<sup>21</sup> Además de estimular la liberación de más factores de crecimiento que promueven la etapa proliferativa, caracterizada por la angiogénesis, formación de tejido de granulación y epitelización. En esta etapa proliferativa la principal célula encargada de regenerar la matriz extracelular es el fibroblasto. Los fibroblastos migran al sitio de la herida para la formación del tejido de granulación mediante la producción de proteinasas y la síntesis de colágeno y otros componentes de la ECM; este tejido de granulación sirve como matriz extracelular provisional y proporciona un medio para la migración, crecimiento y diferenciación celular. En la última etapa, los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos, que presentan función contráctil para disminuir el tamaño de la herida y cerrar sus bordes. Las células de las etapas anteriores se remueven por apoptosis, y enzimas proteolíticas desintegran la matriz provisional mientras se remodela el colágeno tipo III a colágeno tipo I para la reestructuración de una matriz extracelular madura.<sup>21</sup> A su vez, como se mencionó anteriormente, la matriz extracelular está conformada por distintos tipos de fibras, por lo que un material fibroso puede promover buenas respuestas celulares de adhesión y proliferación.

Los pasos mencionados para la curación de una herida son en condiciones normales de salud. Sin embargo, existen otros factores que afectan el proceso de cicatrización, como la edad, sexo, historial clínico del paciente, exposición de la herida al medio ambiente; oxigenación y desarrollo de procesos de infección y generación de reacciones de tipo cuerpo extraño. Estos últimos factores ralentizan y dificultan la recuperación del tejido, por lo que el tratamiento de curación debe promover la protección de la herida, para la prevención de infección, la aireación y la aceleración en el proceso de cicatrización.

El primero registro de tratamiento de heridas cutáneas inició con los sumerios; con el uso de cataplasma compuesto de barro, leche y plantas. Los egipcios preparaban yesos

de miel y vendajes de fibras vegetales y grasas animales,<sup>23</sup> debido a la actividad antimicrobiana inherente en estos materiales. Con el avance del tiempo se empezaron, y siguieron, utilizando apósitos tradicionales como vendajes naturales o sintéticos, algodón y gasas con diferentes grados de absorbencia para el manejo de heridas.<sup>22</sup> Sin embargo, el aumento de conocimientos sobre la fisiopatología molecular y celular en el proceso de curación de heridas y el estudio de nuevos materiales ha llevado al desarrollo de nuevos apósitos, como sustitutos de piel.<sup>21</sup>

## **Sustitutos cutáneos**

Los sustitutos de piel son productos de la ingeniería de tejidos para reemplazar, temporalmente o permanentemente, la función y la forma de la piel.<sup>24</sup> Un sustituto ideal tiene las características de poseer resistencia bacteriana, baja respuesta inflamatoria, nula toxicidad, ser no inmunogénico, permitir la transmisión de gases y agua, presentar resistencia mecánica, ser elástico y plegable, de larga vida útil y ser relativamente barato.<sup>3</sup> Los sustitutos cutáneos se pueden clasificar de acuerdo al tipo de material que usa, como biológico o sintético; acelulares o celulares, según su composición.<sup>4</sup> Actualmente los sustitutos de piel combinan diferentes tipos de materiales y estructuras anatómicas para disminuir las desventajas que poseen por separado.

### *Sustitutos acelulares*

El uso de andamios acelulares inició a finales de 1970<sup>4</sup> con el objetivo primordial de funcionar como una barrera de fluidos. Éstos están formados de una matriz con base en materiales naturales y/o sintéticos con una estructura física y química que permita el fácil acceso de células huésped durante la curación de la herida.<sup>3</sup> Su uso principal es como sustituto de piel temporal para heridas o quemaduras superficiales, y de espesor parcial medio dermal.<sup>4</sup> Algunas marcas comerciales de este tipo de sustitutos de piel son AlloDerm®, Integra® y Biobrane®.

AlloDerm® consiste en una dermis desepidermizada y sin población celular, posteriormente liofilizada.<sup>24</sup> Es de alto costo y propenso a infección. Biobrane® está constituido por una película delgada de silicona y por una malla de nylon porosa con colágeno tipo I. Este material tiene la ventaja de permitir el drenaje de exudado y la permeabilidad de antibióticos debido a su porosidad,<sup>24</sup> pero al igual que AlloDerm® es propenso a infección. Integra® está conformado por dos capas; un reemplazo dérmico bicapa de colágeno bovino reticulado tipo 1 y condroitina 6-sulfato glicosaminoglicano, y un análogo epidérmico temporal de silicona.<sup>24</sup> Es el sustituto cutáneo más utilizado. Algunas de sus desventajas es su alto costo, mala adherencia,<sup>3</sup> pérdida del injerto, vulnerabilidad a la infección<sup>4,24</sup> y, atrapamiento de líquidos, requiriendo fenestración del tejido.<sup>4</sup>

### *Sustitutos celulares*

A diferencia de los sustitutos acelulares, estos remplazos de piel ya están provistos de cultivos celulares crecidos en soporte o andamio para auxiliar en la regeneración de la piel nativa del paciente. Estos pueden ser sustitutos celulares autólogos, los cuales son cultivos obtenidos a través de biopsias de piel del mismo paciente con el fin de evitar su rechazo,<sup>4</sup> una de sus desventajas es presentar problemas de fragilidad, contracción de la herida y formación de cicatrices.<sup>3</sup> Los sustitutos comerciales de este tipo necesitan un tiempo de cultivo de aproximadamente tres semanas, tienen un elevado costo, corta vida de anaquel y predisposición a generar infecciones.<sup>24</sup> Otro tipo de sustituto celular son los alogénicos, los cuales emplean células obtenidas de donantes y no del paciente. Esto disminuye los tiempos de preparación de injertos con material alogénico en comparación con la producción de injertos autólogos.<sup>21</sup> Un sustituto celular alogénico dermal es el TransCyte®, el cual se compone de fibroblastos alogénicos humanos de prepucio neonatal sembrados sobre malla de nylon cubierto con silicona.<sup>24</sup> Otro sustituto alogénico es el Dermagraft®, consiste en una malla de poli(galactina) cultivada con fibroblastos neonatales humanos y criopreservada.<sup>24</sup> Apligraf® y OrCel® son sustitutos alogénicos dermal-epidermal compuestos por una matriz de colágeno bovino sembrada con fibroblastos y queratinocitos del prepucio neonatal.<sup>4</sup>

La mayoría de las matrices de estos productos son de procedencia biológica; colágeno, fibrina, piel cadavérica y hoja de células.<sup>4</sup> Tanto los sustitutos celulares y los sustitutos acelulares que utilizan fuentes biológicas de materia prima tienen el inconveniente principal de ser de alto costo para su adquisición y presentar vulnerabilidad a la infección. Por lo que el uso de polímeros sintéticos para este tipo de aplicaciones médicas está en aumento.

### *Polímeros sintéticos*

Los polímeros sintéticos presentan variadas propiedades físicas, dependiendo de su método de fabricación y procesamiento. En general, la principal desventaja de los sustitutos sintéticos es el limitado reconocimiento celular y compatibilidad con tejidos. Debido a esto, existen varios productos que combinan polímeros sintéticos con polímeros naturales o componentes celulares, para favorecer las propiedades intrínsecas de los elementos por separado.<sup>3</sup> Algunos de los materiales sintéticos más utilizados son: nylon (Biobrane®), silicón (Integra®), poli(uretano) (PU), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA); poli(galactina) o poli(ácido láctico-glicólico) (PLGA) (Dermagraft®) y poli(caprolactona) (PCL). Tanto el silicón como el nylon se han utilizado como análogos epidérmicos en apósitos cutáneos, posicionándose en la parte externa de la herida. Sin embargo, no presentan buena biodegradabilidad.<sup>3</sup> Al contrario, en el caso de PLA, PGA y PLGA la tasa de degradación es más rápida pero su aplicación para implantes o productos a largo plazo (2-4 años) es limitada por éste motivo. Además, algunas investigaciones mencionan que los productos ácidos de la degradación de PLA

resultan citotóxicos.<sup>15</sup> En el caso de PU, cuando su formulación contiene PCL-diol puede degradarse pero no a corto plazo, y es susceptible a hidrolizarse; presentando productos de degradación no tóxicos.<sup>25</sup>

La semipermeabilidad del PU ha conllevado al uso de este material como sustituto cutáneo, al ser impermeable a las bacterias, pero permeable a gases; permitiendo el ambiente húmedo deseable para que ocurra la curación de la lesión,<sup>3</sup> además de sus buenas propiedades mecánicas, facilidad de procesamiento y biocompatibilidad.<sup>26</sup> Algunos productos comerciales basados en PU's para el vendaje de heridas son Tegaderm™, OpSite™ y Allevyn.<sup>3</sup> Opside™ consiste en películas delgadas de poli(uretano) que evita la pérdida de fluidos y permite el intercambio de gases entre la herida y el ambiente. Ha sido probada en pacientes con quemaduras de grosor parcial, dando buenos resultados en 80% de los pacientes.<sup>27</sup> Tegaderm™ está conformado por fibroblastos cutáneos sembrados en un andamio de nanofibras de poli(caprolactona)/gelatina sobre una membrana de poli(uretano), análogo epidermico.<sup>4</sup> Por este componente el material exhibe semipermeabilidad de gas, aumentando la tasa de epitelización.<sup>4</sup>

## **Poli(uretano)**

Un PU es un polímero que se caracteriza por la presencia de grupos uretano (R-NHCOO-R') en la unidad repetitiva de la cadena principal,<sup>28</sup> sin importar la composición química del resto de la cadena, que puede contener hidrocarburos alifáticos y aromáticos, grupos ésteres, éteres, amidas, ureas e isocianuratos.<sup>29</sup> La síntesis de PU's se lleva a cabo por una polimerización por condensación, donde monómeros bifuncionales reaccionan entre sí, mediante una adición simple, para producir cadenas largas del polímero.<sup>29</sup> Estos monómeros corresponden a grupos isocianato (R-NCO) y grupos hidroxilo (R-OH) de un polioli.

En cuanto a la estructura del isocianato, en la fabricación industrial del PU se usan isocianatos aromáticos, los cuales son más reactivos que los alifáticos, como el diisocianato de 4,4'-difenilmetano (MDI) y el diisocianato de tolueno (TDI); mezcla de isómeros 2,4 y 2,6, pero debido a la elevada toxicidad de sus productos de degradación se prefiere usar isocianatos alifáticos que al degradarse generan diaminas alifáticas de menor toxicidad, como son el diisocianato de 1,6-hexametileno (HDI), diisocianato de 1,4-butano (BDI) y diisocianato de 4,4'-diclohexilmetano (H<sub>12</sub>MDI).<sup>28</sup>

Para promover la selectividad entre los grupos funcionales se emplean diferentes catalizadores. El catalizador determina parte de las características del PU al influenciar en la estructura del material mediante los tipos de enlace que promueve. Catalizadores como aminas terciarias, compuestos alcalinos y organometales, tienen diferentes efectos catalíticos sobre la reactividad del grupo isocianato frente a átomos de hidrógeno

activo de grupos uretano, urea, agua y alcohol.<sup>30</sup> Para la reacción de isocianatos con grupos hidroxilo el uso de organometales, como el octoato de estaño, es el que tiene el efecto más fuerte en la formación de PU, y a su vez tiene un efecto débil en la reactividad de isocianato con agua y urea, a diferencia de las aminas terciarias y compuestos alcalinos que favorecen tanto su reactividad con agua e hidroxilo y la última también con urea y uretano.<sup>30</sup> La temperatura es otro factor que afecta la reactividad del isocianato. Estos reaccionan con grupos hidroxilo, aminas y agua a temperaturas de 25 a 50 °C, y favorece la formación de poli(uretano)s lineales. Mientras que a temperaturas altas de 100 a 150 °C se producen enlaces alofanato y biuret, y aumenta el entrecruzamiento y las ramificaciones del polímero.<sup>29</sup>

En la actualidad, se ha mejorado la selección de monómeros utilizados en la síntesis de PU's, debido a que en el pasado el uso de este polímero se suspendió por la lenta degradación y toxicidad del material, dificultando su uso en ingeniería de tejidos.<sup>31</sup> Los poli(éteres) o poli(ésteres) alifáticos terminados en grupos hidroxilo son los polioles convencionales empleados en la síntesis de materiales biomédicos. Algunos de los más comunes son la poli(caprolactona) diol (PCL-diol), PLLA, PGA y sus copolímeros.<sup>28</sup> La PCL-diol es comúnmente usada para generar biodegradabilidad en poliuretanos, debido a que los grupos éster son susceptibles a la hidrólisis química y enzimática<sup>32</sup> y que sus productos de reacción no son tóxicos. Para formar poliuretanos con propiedades elastoméricas se anexa otra molécula de bajo peso molecular que funciona como extensor de cadena. Esto genera poliuretanos segmentados que pueden ser poli(urea-uretano) (PUU) o poli(urea-amida) uretano dependiendo del enlace obtenido entre el grupo funcional del extensor y el isocianato. Diferentes extensores se han utilizado para generar la biodegradabilidad del polímero y disminuir la toxicidad de los productos de degradación.<sup>33</sup>

#### *Poli(uretanos) segmentados.*

El PU segmentado es un PU elastomérico conformado por copolímeros en bloque.<sup>28</sup> Se dice que está en estado de segmentación por la separación marcada de microfases; dominios cristalinos y amorfos, es decir, segmentos duros y segmentos blandos. Los dominios amorfos son estructuras desordenadas, cuando las moléculas del polímero están dispuestas y entrelazadas de manera aleatoria.<sup>29</sup> Este segmento blando proporciona flexibilidad y regula la biodegradabilidad del material.<sup>28</sup> Su morfología es amorfa o semicristalina, dependiendo de la longitud de cadena, geometría y estructura química del macrodiol.<sup>28</sup> El estado cristalino es cuando se tiene una estructura altamente orientada, las moléculas del polímero están ordenadas y cada átomo cae en una posición precisa, repetitiva y compactada.<sup>29</sup> Estos segmentos rígidos, que corresponden al grupo isocianato y el extensor de cadena, forman dominios discretos que actúan como puentes y partículas de relleno, reforzando la matriz segmentada blanda.<sup>29</sup> Esto se debe a la acción de fuerzas de Van der Waals y las interacciones de enlaces de hidrógeno entre



### *Mejoramiento de respuesta celular en poli(uretano)*

El poli(uretano) es un polímero que se caracteriza por poseer una superficie relativamente inerte a la respuesta celular de adhesión y proliferación; esto puede conllevar a que se generen reacciones de inflamación e infecciones cuando se prueban materiales de PU *in vivo*. Por lo tanto, para mejorar su aplicación en ingeniería de tejidos se han realizado una serie de modificaciones a la estructura y a la composición del material. Algunos métodos de funcionalización se realizan mediante:<sup>34</sup>

- La incorporación o inmovilización de biomoléculas en el material.
- Modificación química o por plasma para introducir grupos funcionales.
- Procesamiento final del material en nanofibras.

En general, se utiliza la combinación de polímeros naturales como colágeno, gelatina, heparina, fibrina, elastina y celulosa, con los PU para aumentar la afinidad celular. Esta incorporación de un polímero natural se realiza mediante el pretratamiento del material sintético con plasma;<sup>14</sup> para generar los grupos funcionales necesarios en la adhesión, o aplicando procesos químicos.<sup>35</sup> El uso de polímeros naturales se debe a que la matriz extracelular contiene zonas o elementos de reconocimiento celular a lo largo de su estructura,<sup>35</sup> generando un material biomimético.<sup>36</sup> La matriz extracelular se encuentra formada por proteínas estructurales fibrosas como colágeno, elastina, fibronectina, laminina, y proteoglicanos.<sup>37</sup> De éstas, la fibronectina y laminina son glucoproteínas principalmente relevantes para la unión de proteínas y proteoglicanos de la célula.<sup>38</sup> Ambas tienen sitios de unión específicos que interactúan con las células para anclarlas a la matriz extracelular, o entre ellas mismas. Estas interacciones se deben a secuencias peptídicas concretas, siendo de las principales la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD).<sup>38,39</sup> Descubierta en 1984 por Pierschbacher y Rouslahti como la secuencia mínima en fibronectina que estimula la adhesión celular<sup>40</sup> al unirse a la familia de proteínas integrinas presente en superficies celulares.<sup>38,39</sup>

Las integrinas son proteínas heterodiméricas con dos subunidades diferentes ( $\alpha$  y  $\beta$ ) ancladas a la membrana plasmática por una hélice transmembrana.<sup>39</sup> Los dominios extracelulares de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se combinan para formar un sitio de unión específico para proteínas extracelulares. Estos receptores varían según la línea celular, tienen la capacidad de unirse a una variedad de ligandos y, en viceversa, muchas proteínas de adhesión de la superficie celular y la matriz extracelular se unen a diversos receptores de integrina; cuyo rango de afinidad varía. En particular, la secuencia de tripéptido RGD es una de las secuencias con mayor rango de afinidad y selectividad para variados receptores de integrina.<sup>41</sup> La adhesión ocurre cuando RGD se une a la interfaz entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , el residuo R se ajusta en una hendidura en un módulo de hélice  $\beta$  en la subunidad  $\alpha$  y el D coordina un catión unido en un dominio A de von Willebrand en la subunidad  $\beta$ .<sup>41</sup>

### *Modificación de poli(uretano)*

La secuencia RGD ha sido utilizada en andamios de PU para uso vascular, y con buenos resultados en adhesión y proliferación de células endoteliales.<sup>36</sup> Una de las ventajas de utilizar secuencias cortas de aminoácidos, sobre el uso de la cadena larga nativa, es que la secuencia corta es más estable durante los procesos de modificación del material y, que la mayoría de los péptidos están disponibles para interactuar con la célula, a diferencia de las secuencias largas donde los dominios de anclaje no están siempre disponibles por impedimentos estérico.<sup>36</sup> Además, es más económica la síntesis masiva de secuencias cortas.<sup>36</sup> Otro método más directo y económico es la copolimerización o autoensamblaje de aminoácidos que conforman esta secuencia, u otras, en la estructura de polímeros para fomentar la respuesta biológica, o en su mayoría para mejorar la biodegradabilidad de un material.

Skarja<sup>42</sup> utilizó el aminoácido L-fenilalanina como extensor de cadena para la fabricación de elastómeros de PU degradables, debido a que en medio fisiológico la quimotripsina degrada la secuencia. Al igual, Parrag<sup>43</sup> empleó el dipéptido glicina-leucina en la estructura de PU para fomentar la degradación del polímero mediante la escisión del enlace peptídico entre los residuos G y L (L=leucina) por acción de metaloproteínas. El andamio fue capaz de soportar cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón durante al menos 28 días.

Wang y col.<sup>16</sup> sintetizaron poli(urea-uretano) biodegradable empleando poli(etilenglicol) como segmento blando y diisocianato de 1,6-hexametileno como segmento duro. Como extensor de cadena utilizó L-cistina y L-lisina en diferentes proporciones. La viabilidad celular aumentó en la membrana con mayor proporción de lisina en su composición y disminuyó al aumentar proporción de cistina, siendo la hidrofilia de la superficie un factor clave en la biocompatibilidad del material. Comparando con el control (láminas de vidrio) no se determinó una pérdida significativa de viabilidad celular.<sup>16</sup> Esto demostró que el polímero sintetizado fue no-tóxico y biocompatible.

Wang<sup>44</sup> realizó comparaciones de poli(éter-uretano) con diferentes aditivos modificadores de superficie basados en la secuencia RGD y los aminoácidos arginina, glicina, ácido aspártico y lisina. En la evaluación de la tasa de adhesión celular se comprobó que las superficies modificadas con la secuencia RGD y los aminoácidos K y R, mostraron los niveles más altos de adhesión celular, 124, 108 y 101%, respectivamente. En cuanto a la tasa de proliferación celular, a las 96 h, se repitió el orden de la lista anterior. Respecto al control; placas de poli(estireno), y a los aminoácidos R-G-D, se obtuvieron tasas moderadas de proliferación. La glicina y el ácido aspártico sólo lograron mantener las células, sin proliferar. En general, la compatibilidad de células HUVEC mejoró con la modificación de la superficie del polímero, respecto al material sin modificar y respecto al control comercial. Siendo un factor importante el grupo funcional terminal de los aminoácidos modificadores de superficie.<sup>44</sup> La lisina y

arginina son aminoácidos polares con carga positiva a pH fisiológico, por lo cual tanto el ácido aspártico como la glicina no tuvieron esa respuesta celular, el primero al ser un aminoácido con carga negativa y el segundo un aminoácido neutro.

Otros trabajos que emplearon aminoácidos como extensores de cadena son los presentados por Chan y col.<sup>33</sup> y Perales y col.<sup>7</sup> Chan y col.<sup>33</sup> utilizaron PU segmentado con extensor de cadena basado en los aminoácidos de la secuencia RGD debido a la capacidad de estos aminoácidos de formar especies cargadas; las cuales pueden promover la adhesión celular, y de aumentar la superficie hidrofílica, mejorando la proliferación de células.<sup>33</sup> De los resultados obtenidos se seleccionó al poliuretano con arginina como el sustrato que mejor interacciona con células HUVEC, en comparación con los otros dos aminoácidos y con el control Tecoflex®. Esto se adjudica a la presencia de más grupos amino en la estructura del polímero y a la mayor carga positiva que le proporciona a la superficie del material.<sup>33</sup> En el caso de Perales y col.<sup>7</sup> se evaluó la actividad plaquetaria, la viabilidad y la adhesión de células HUVEC expuestas a PU segmentados de glutatión, ácido L-glutámico, L-cisteína y glicina. La adhesión celular mejoró cuando se empleó glicina y cisteína como extensor (64-66%). Mientras que la actividad plaquetaria fue menor en poli(uretano)s con cisteína.<sup>7</sup>

Por lo tanto, la incorporación de aminoácidos en PU ha logrado mejorar niveles de viabilidad celular sobre el material, sin la necesidad de utilizar otros equipos y reactivos para generar en la superficie del polímero los grupos funcionales de anclaje celular. Además de evitarse el uso de secuencias peptídicas largas, disminuyendo costos. Otro método de los mencionados para promover una mejor respuesta biológica del material es realizando modificaciones físicas del polímero a través del procesamiento de éste en fibras mediante la técnica de electrohilado. Debido a que se mejoraría la biocompatibilidad de las células con el material al generarse una matriz de nanofibras del polímero, la cual tendría una estructura similar a las proteínas de la matriz extracelular fibrosa<sup>5</sup> y se incrementaría el área superficial disponible para la adhesión de células.

## **Electrohilado**

El electrohilado es una técnica empleada para fabricar fibras a partir del procesamiento de polímeros, siendo el diámetro de estas fibras en escala micrométrica y nanométrica.<sup>9,45</sup> La técnica fue descubierta por primera vez en 1897,<sup>45</sup> y en 1934 se patentó el primer dispositivo de electrohilado.<sup>46</sup> Aunque fue hasta después de los 90's que la técnica recibió mayor atención.<sup>47</sup> Una de sus recientes aplicaciones es en el campo de la ingeniería biomédica, con el desarrollo de la ingeniería de tejidos para la reparación y regeneración de órganos mediante la fabricación de andamios fibrosos.<sup>45,48</sup>

Los elementos que conforman un equipo de electrohilado son: aguja y jeringa con la solución polimérica, bomba para jeringa, placa colectora conectada a tierra y fuente de alto voltaje conectada entre la aguja y el colector. La técnica consiste en la formación de un campo eléctrico sobre el polímero. Se aplica un voltaje específico a la aguja por la cual fluirá la solución polimérica; esto causa inestabilidad dentro de la solución debido a la inducción de cargas sobre la gota del polímero formado, subsecuentemente la repulsión recíproca de las cargas inducidas produce una fuerza que se opone a la tensión superficial y, en última instancia, la solución de polímero fluye en forma de hilo en la dirección del campo eléctrico, depositándose en el colector.<sup>8,46</sup> Antes de depositarse, las fases de la disolución se separan y el disolvente se evapora, quedando solo el polímero procesado.<sup>49</sup> El colector puede ser estático; que consiste en una placa metálica, o dinámico; incluye un tambor o disco metálico giratorio.<sup>46</sup>

#### *Factores que afectan el proceso de electrohilado*

Los principales factores que influyen en el proceso de electrohilado se dividen en tres categorías: las propiedades de la solución polimérica, parámetros de electrohilado y condiciones ambientales. En el primer grupo se encuentran el tipo de disolvente utilizado, la concentración del polímero, la viscosidad y la conductividad de la solución. El segundo grupo se conforma por el voltaje aplicado, la distancia entre la aguja y el colector (TCD), la velocidad de flujo y el diámetro de la aguja. El último grupo se refiere a la humedad y temperatura del ambiente.<sup>8</sup>

- *Propiedades de la solución polimérica*

El peso molecular del polímero y la concentración usada afectan los parámetros de viscosidad, conductividad de la solución y tensión superficial.<sup>47,50</sup> Un peso molecular y una concentración polimérica muy baja dificultan el proceso de electrohilado, no se forman fibras continuas y aumenta la formación de burbujas en la membrana. A mayor peso molecular y a mayor concentración del polímero aumenta el tamaño de las fibras formadas, pero si la concentración es muy alta la viscosidad aumenta y se forman gotas en lugar de fibras, debido a la dificultad de la solución para fluir uniformemente a través de la aguja.<sup>45</sup>

En cuanto al disolvente, se prefiere el uso de disolventes no tóxicos; por los posibles residuos que podrían permanecer dentro de la membrana fabricada;<sup>51</sup> y volátiles, para que el disolvente se evapore rápidamente al solidificar el polímero.<sup>45</sup> Un disolvente poco volátil genera fibras planas y lisas o coaguladas en el colector.<sup>51,52</sup> Aunque si el solvente se evapora muy rápido se afecta el flujo de la solución debido al taponamiento de la jeringa. Disolventes volátiles generan nanofibras más porosas y de mayor tamaño de poro. Otros parámetros del disolvente son su constante dieléctrica y su conductividad. Una constante dieléctrica alta disminuye la formación de burbujas y disminuye el diámetro de las fibras.<sup>47,51</sup> En cuanto a la conductividad, ésta permite que la solución

fluya al haber mayor cantidad de cargas, lo que genera diámetros de fibra menores y disminuye la formación de gotas.<sup>45</sup> Los disolventes más utilizados para electrohilar PU's son dimetilformamida (DMF),<sup>53-55</sup> tetrahidrofurano (THF),<sup>53,55</sup> 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP),<sup>56</sup> cloroformo<sup>25</sup> y diclorometano (DCM).<sup>57</sup>

- *Parámetros de electrohilado*

El voltaje aplicado determina la forma inicial del cono de Taylor de la solución polimérica,<sup>46</sup> y ayuda a modificar en un menor grado la morfología de la fibra<sup>45</sup>. Si el voltaje es muy bajo se observa formación de gotas, mientras que con un mayor voltaje se forman las fibras y se puede reducir el diámetro de éstas. Si el voltaje es excesivo el proceso de electrohilado se vuelve inestable. En general, el voltaje ideal se establece alrededor de 10-40 kV.<sup>45</sup> El flujo de la solución es otro factor que afecta menormente la morfología.<sup>50</sup> Si el flujo es bajo, se da tiempo a la polarización de la solución.<sup>46</sup> No obstante, esto puede provocar rompimientos en secciones específicas del electrohilado, producción de burbujas y gotas, y un mayor tiempo de fabricación de la fibra.<sup>45</sup> Si el flujo es mayor se incrementa el diámetro de la fibra,<sup>45,46</sup> se consigue un chorro sostenido y sin rompimientos. Pero si este flujo excede un valor crítico, el chorro obtenido es inestable y se forman burbujas en la membrana<sup>50</sup>. Asimismo, si se excede el valor crítico se produce unión de las nanofibras. Esto ocurre al aumentar la deposición de polímero en un corto tiempo, lo que puede evitar que el disolvente se evapore,<sup>46</sup> según sea la distancia entre la aguja y el colector.

La importancia de la distancia entre la punta y el colector está relacionada con la evaporación del disolvente y la fuerza electrostática.<sup>45</sup> Si la distancia es la adecuada, el disolvente puede evaporarse por completo y el diámetro de la fibra ser menor,<sup>45,46</sup> por el estiramiento de ésta. Pero, si la distancia es muy corta el disolvente no se evapora, el diámetro de la fibra aumenta<sup>45</sup> y se puede promover la fusión y adhesión de fibra en la superficie del colector,<sup>45,58</sup> formando superficies planas. Si la distancia es demasiado grande se forman fibras con burbujas<sup>46</sup> o no se logran recolectar en la placa metálica.<sup>45</sup> En cuanto al diámetro interno de la aguja, este está relacionado con la formación de un cono Taylor estable. El tamaño común de la aguja de la jeringa es de 16 a 23 G, menor a 2 mm de diámetro interno.<sup>45</sup> Como se ha mencionado, cada uno de estos parámetros influye en la morfología del electrohilado, en el diámetro de la fibra y porosidad de la membrana. En la tabla 1 se observan diferentes parámetros para la obtención de fibras de membranas de PU electrohiladas, siendo el diámetro de fibra el valor control reportado.

**Tabla 1.-** Parámetros de electrohilado de poliuretanos

Polímero	Disolvente	Concentración (%)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Flujo (mL h <sup>-1</sup> )	Diámetro interno de la aguja	Diámetro de fibra (nm)	Porosidad (μm)	Referencias
PU (Desmopan 9370A)	THF/DMF 60/40	11	18	22	-	0.85 mm	360±80	5-6, y 1	Carlberg, 2009
PU <sup>GM</sup> (Lubrizol Advanced Materials)	Cloroformo	-	18	10	7	18 G	20000	74 Rango: 50-150	Gabriel, 2017
PU <sup>GM</sup> (Tecoflex SG-85A)	Cloroformo	9	18	10	7	-	20000	-	Gabriel, 2016
PU (Pellethane 2363-80A)	HFIP	5	20	9	0.01	22 G	880±440	-	Grasl, 2009
PCL:LDI:LEED	Clorometano	8 10 12 15	13	20	2	-	1000-1200 1400-1600 2100-2500 2900-3300	-	Han, 2011
PU <sup>GM</sup> (CardioTech International)	DMF/THF 30/70	25	18  12  9	18 12 18 6 12	-	0.5 mm	250-300 270 270 310 400	-	Khil, 2003

Polímero	Disolvente	Concentración (%)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Flujo (mL h <sup>-1</sup> )	Diámetro interno de la aguja	Diámetro de fibra (nm)	Porosidad (μm)	Referencias
PU <sup>GM</sup> (Tecophilic(S) Carbothane(D)):	DMF		15	15	0.1	18 G		-	Mi, 2015
100%S		20					200-600		
25%D		15					200-700		
50%D		15					300-900		
75%D		15					500-1000		
100%D		10					400-1000		
PU	DMF/THF 30/70	7.5	20	20	60	0.8 mm	-	-	Mondal, 2013
MDI: alquildiol	DMF	20	16	10	-	-	-	-	Verreck, 2003
PCL:HDI:HDS	HFIP	10	15	19	1	1.2 mm		-	Xu, 2015
1.5:2:0.5							1070±182		
1:2:1							503±258		
0.5:2:1.5							1156±414		
0.2:2:1.8							456 ± 214		
PU <sup>GM</sup> (Elasthane™55D)	DMF	10	13	15	0.15-0.30	0.6	520-725	-	Yekrang, 2017
PCL:MDI:BDO	DMF	5	12	15	4.8 mmh <sup>-1</sup>	-	700-50	-	Zhuo, 2008

- =No se menciona, BDO= Butanodiol, D= Segmento duro, DMF=Dimetilformamida, GM= Grado médico, GR= Grado reactivo, HDI= 1,6-diisocianato de hexametileno, HDS= Disulfuro de hidroxietilo, HFIP= 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol, LEED= Dihidrocloruro de éster etílico de L-lisina, LDI= L-lisina etil ester diisocianato, MDI= Metileno difenil diisocianato, PCL= Poli(caprolactona) diol, PU= Poli(uretano), S= Segmento suave, THF= Tetrahidrofurano.

Como se observa en la Tabla 1, la concentración de la solución polimérica a electrohilar es el parámetro que reporta mayor influencia. Mi y col.<sup>54</sup> compararon poli(uretano)s de distintas proporciones de segmento duro y segmento blando. A una proporción de 100% de segmento duro la concentración de la solución polimérica usada fue de 10% debido al aumento de la viscosidad, lo que ocasionó un incremento en el diámetro de fibra, entre 400-1000 nm. En las siguientes proporciones se fue disminuyendo la porción del segmento duro, y por consecuencia se aumentó la concentración de la solución polimérica, obteniéndose diámetros menores de fibra. La proporción de los segmentos también modificó la superficie de las fibras, siendo lisas a mayor proporción del segmento suave y rugosas al aumento el segmento duro.<sup>54</sup> Xu y col.<sup>26</sup> también variaron la proporción de precursores para la síntesis del poliuretano a electrohilar; en cuanto a los diámetros de fibras no se observó una correlación al variar las proporciones.

Zhuo y col.<sup>59</sup> estudiaron la influencia del voltaje aplicado para electrohilar. Encontró que a 5% de concentración de la solución del polímero preparada en DMF y a 12 kV obtenía fibras sin grumos de  $880 \pm 440$  nm de diámetro, mientras que si el voltaje disminuía a 10 kV la solución no se electrohila debido a la baja fuerza eléctrica aplicada. Sin embargo, cuando el voltaje se mantuvo en 20 o 25 kV, se formaron bucles y fibras irregulares a causa del exceso de la fuerza eléctrica, volviendo inestable el proceso. Khil y col.<sup>55</sup> probaron distintos parámetros de voltaje, proporciones de disolvente y distancias entre la punta y el colector, hasta obtener diámetros de fibra de 250 a 300 nm. Al aumentar la proporción al 70% de THF y disminuir el DMF al 30% se produjeron diámetros mayores, esto es debido a la conductividad y viscosidad de los solventes, mayor proporción de THF genera fibras de mayor tamaño por el aumento en la viscosidad y disminución de la conductividad, y a su vez mayores tamaños de poro por su menor punto de ebullición. En la variación de voltaje, el incremento de 9 a 18 kV produjo una disminución del diámetro de fibra de 400 a 270 nm. Además, el diámetro promedio de la fibra disminuyó de 310 a 270 nm, con un aumento de TCD de 6 a 18 cm.<sup>55</sup> En el primer caso hay una mayor salida de polímero que combinado con una mayor distancia estira suficiente la fibra y el diámetro disminuye. Mondal<sup>60</sup> obtuvo membranas no uniformes con presencia de aglomerados debido al uso de disolventes de baja conductividad como el THF el cual afecta la velocidad del flujo y la tasa de transferencia del material, por lo que no puede electrohilar continuamente.

Asimismo, Han y col.<sup>57</sup> reportaron que al aumentar el porcentaje de concentración de su PU con éster etílico de L-lisina de 8 a 15% éste aumenta en diámetro de fibra de 1.0-1.2 a 2.9-3.3  $\mu\text{m}$ , manteniendo fijas las demás variables de electrohilado. Al contrario, otros trabajos consiguieron diámetros de fibra mayores, 20  $\mu\text{m}$ , a una concentración baja (9%) y distancia no muy alta (10 cm).<sup>48</sup> Sin embargo, los autores reportan un flujo a 7 ml h<sup>-1</sup> y la aplicación de un voltaje considerado (18 kV), esto provoca que la solución polimérica se polarice a tiempo, consiguiendo un chorro sostenido y sin defectos, con un aumento en el diámetro de la fibra por las distancias y tamaño de aguja reportados. Chen y col.<sup>61</sup>

obtuvieron diámetros de fibra entre 117 a 1647 nm al variar la concentración de su solución entre 8 y 20%, aunque para la menor concentración obtuvo fibras con aglomerados cuyo diámetro fue el menor registrado por ellos, los aglomerados desaparecieron en las membranas a 428 nm y a su concentración mayor la distribución de las fibras cambio a una bimodal, probablemente por inestabilidad en el proceso. En general, es complicado realizar una comparación de los parámetros utilizados en cada estudio debido a las variaciones en la composición de las soluciones poliméricas.

#### *Factores que afectan la interacción andamio electrohilado-célula.*

Diversos estudios han sugerido que la geometría en membranas electrohiladas puede potenciar la actividad biológica de adhesión y la proliferación celular sobre la membrana polimérica.<sup>61-63</sup> Estos parámetros son porosidad, diámetro de poro y diámetro de fibra, siendo este último el más estudiado.<sup>62</sup> Otros factores que afectan en el proceso de interacción es la composición del material, o su recubrimiento, así como el ángulo de contacto, el cual es un indicador de la capacidad hidrofílica o hidrofóbica del material. Siento estos factores descritos a continuación:

- *Composición*

La composición química de los materiales repercute en la biocompatibilidad del material y la adhesión celular. El tipo de célula también afecta la respuesta de adhesión, una misma superficie de un material puede dar una respuesta diferente en dos tipos de células.<sup>63</sup> Estudios fabricaron nanofibras con mezclas de polímeros naturales y PU, o con el acoplamiento superficial del polímero natural sobre PU. En el primer caso, la combinación de dextrano, PU y ciprofloxacina, generó andamios con actividad bacteriana y con un aumento de la fijación celular y su viabilidad.<sup>13</sup> El crecimiento de fibroblastos se incrementó en un 40% al noveno día, mientras que en ausencia de dextrano la proliferación celular sólo aumentó un 10%.<sup>13</sup> Kim y col.<sup>11</sup> reportaron que el electrohilado de la mezcla de gelatina y PU aumentó la proliferación de fibroblastos y la degradabilidad del andamio. Sin la presencia de gelatina la superficie del PU sólo se recubre en un 10% en el primer día y un 20% al séptimo, a diferencia del andamio con mayor contenido de gelatina, el cual se recubre a más del 80-90%.<sup>11</sup>

En relación al uso de aminoácidos, Han y col.<sup>57</sup> compararon su membrana electrohilada de PU con LEED contra dos controles: membrana de PU con BDO y vaso sanguíneo artificial de PTEF comercial. Los PU electrohilados con LEED resultaron tener mejores propiedades de adhesión y proliferación celular que los controles. Parrag<sup>43</sup> estudio el número de células viables soportadas en PU con extensor de cadena de glicina-leucina y fenilalanina, donde el PU con fenilalanina fue capaz de soportar un número mayor de células. También, respecto a la incorporación de arginina, está se ha usado como monocapa autoensamblada<sup>44</sup> y como extensor de cadena en PU,<sup>15</sup> dando altos niveles de adhesión de células endoteliales debido a los grupos funcionales amina expuestos en la cadena.

- *Porosidad*

La porosidad es un factor que permite que las células y los nutrientes penetren en el entorno interno.<sup>62</sup> El tamaño de poro también afecta las propiedades antibacterianas de la membrana electrohilada. Un apósito fibroso típico con un tamaño de poro inferior a 5  $\mu\text{m}$  es capaz de evitar que las bacterias lleguen a la herida.<sup>64</sup> En la literatura se menciona que para el cultivo de fibroblastos el tamaño de poro óptimo es de 20  $\mu\text{m}$ .<sup>65</sup> Otros estudios de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) sin funcionalizar y funcionalizado con colágeno I muestran tamaños de poro de 5 a 20  $\mu\text{m}$  para el crecimiento interno de células de fibroblastos dérmicos humanos.<sup>66</sup>

Lowery y col.<sup>62</sup> aludieron a que el tamaño de poro ideal de fibras de PCL para fibroblastos fue mayor a 6  $\mu\text{m}$ , pero menor a 20  $\mu\text{m}$  debido a que la velocidad de proliferación celular aumentó en los apósitos con diámetros de poro mayores a 6  $\mu\text{m}$ , mientras que a valores de poro de 12 a 23  $\mu\text{m}$  las células cambiaron su conformación y se observó un alineamiento a lo largo de las fibras. También, no se observó formación de ECM en membranas con tamaños de poro  $>15\mu\text{m}$ , debido a que la interacción célula-célula disminuye.<sup>62</sup> Huang<sup>67</sup> encontró que en porosidad cercana al 90% la dispersión de las células fue más uniforme y aumentó la viabilidad y proliferación. Concluyendo que la estructura del poro tiene un gran efecto en la infiltración de las células en el material<sup>66</sup> y en la morfología adoptada por la célula.

- *Diámetro de fibra*

El diámetro de la fibra define características estructurales como el tamaño de poro y permeabilidad del apósito, además de la adhesión, proliferación<sup>68</sup> y morfología celular. Una medida patrón que se puede utilizar para establecer el diámetro adecuado de las fibras es con la consideración del diámetro del colágeno nativo de la matriz extracelular, el cual es una estructura fibrilar con un diámetro de 50 a 500 nm.<sup>47</sup> Diámetros de fibra generalmente submicrométricos aumentan el área superficial específica del material y esto genera adsorción de proteínas de adhesión ubicadas en el suero bovino fetal del medio de cultivo. Chen y col.<sup>61</sup> obtuvieron mayor adhesión y proliferación celular con el diámetro de fibra de 428 nm, este valor disminuyó al aumentar el diámetros de fibra. Esto se debió a que en fibras pequeñas se forma una capa mayor de proteína de adhesión que estimula a las células.<sup>61</sup> Sin embargo, diámetros de fibra de PU electrohilado de 20  $\mu\text{m}$  permiten la adhesión y extensión de células de fibroblastos en superficie siguiendo la morfología de la fibra,<sup>25</sup> debido al tamaño del diámetro.

Otros estudios mencionan que fibras grandes suprimen la expresión de *Col1 $\alpha$ 1*, proteínas del ligamento colágeno *1 $\alpha$ 1*, por fibroblastos dérmicos humanos. Y fibras con diámetros intermedios, entre 0.350 y 1,100, nm, aumentan la proliferación y expresión de colágeno tipo III y elastina.<sup>70</sup> Esto se corrobora con los resultados de Bashury col.,<sup>71</sup> donde diámetros de 0.82 y 2.3  $\mu\text{m}$  disminuyen los niveles de *Col1 $\alpha$ 1*. En cuestión de la

densidad celular, ésta fue mayor al tercer día a 0.28 y 0.82  $\mu\text{m}$ , aumentando más al séptimo día en 0.28  $\mu\text{m}$  de diámetro.<sup>71</sup>

- *Ángulo de contacto*

La humectabilidad del polímero está relacionada con el ángulo de contacto (AC), un AC bajo significa una alta adhesión del fluido al sólido, una superficie hidrofílica, y un AC alto indica baja humectabilidad o una superficie sólida hidrófoba.<sup>72</sup> A su vez este valor está relacionado con la composición del material<sup>73</sup> y su topografía superficial.<sup>74</sup> El AC se relaciona con la respuesta de adhesión celular debido a que la humectabilidad de la superficie regula la adsorción de proteínas de adhesión del suero bovino fetal sobre el polímero, y da como resultado diferentes estructuras secundarias que a su vez regulan la adhesión.<sup>6</sup>

Mi y col.<sup>54</sup> evaluaron la respuesta de fibroblastos expuestos a diferentes concentraciones de segmentos duros y blandos en PU termoplástico. Se obtuvo mayor unión celular tanto en el PU electrohilado como en su control en placa a una mayor proporción del segmento duro en su composición, generado por la adsorción de proteínas en la superficie del andamio a causa del incremento de su hidrofobicidad, en cambio en las membranas más hidrofílicas las proteínas ingresaron en los poros de las membranas, por lo que las proteínas en la superficie disminuyeron y se menguó la adhesión celular. El AC también influye en la morfología de las células de fibroblastos adheridas al material.<sup>54</sup>

Fibroblastos expuestos a materiales extremadamente hidrofílicos o hidrófobos redujeron su crecimiento. En fibroblastos, los ángulos de contacto moderadamente hidrofílicos son ideales.<sup>72</sup> Otro trabajo menciona que para fibroblastos y otras células de mamífero el rango de ángulo de contacto óptimo es entre 60 y 80°.<sup>75</sup> A su vez, Tamada e Ikada<sup>76</sup> reportaron que un ángulo de contacto de 70° promueve una favorable adhesión, una tasa de proliferación mayor y una morfología ordenada de fibroblastos.

- *Malformaciones en la membrana electrohilada*

La formación de aglomerados es un fenómeno común que autores asocian principalmente a la concentración,<sup>61</sup> viscosidad, tensión superficial, inestabilidad del chorro, y alta fluidez del material.<sup>62</sup> En el caso de Chen y col.,<sup>61</sup> obtuvieron aglomerados en una membrana de PCL de 117 nm de diámetro, lo que ocasionó que los niveles de adhesión y de cinética de crecimiento de fibroblastos fueran bajos en comparación con membranas sin aglomerados, a pesar del diámetro pequeño de fibra. Esto es posible que sea por la menor relación de área superficie-volumen, por lo que no hay zona para la unión celular, al igual, las cuencas formadas no permiten la distribución uniforme de las células por la estructura de bola de los aglomerados. Lowery y col.<sup>62</sup> obtuvieron igual una membrana con formación de aglomerados, de 730 nm de diámetro, cuyo pico de diámetro de poro fue de 6.5  $\mu\text{m}$ , lo que ocasionó que hubiera un espacio considerable

para alentar a la célula a formar ECM, a pesar de esto, los niveles de proliferación celular fueron bajos en comparación al resto de membranas obtenidas.

En los antecedentes de poli(uretano)s utilizados para la curación de heridas se puede notar que la composición del PU y la morfología del material son factores que influyen en la construcción de andamios celulares para promover la adhesión y crecimiento celular. Para que ésta se vea favorecida es necesario la incorporación de componentes específico y un buen procesamiento del polímero. Por lo que un objetivo de este trabajo fue incorporar el aminoácido arginina como extensor de cadena debido a los resultados positivos que se tiene de ella en otros estudios.<sup>16,33,44</sup> Y, mejorar la funcionalidad del polímero mediante su electrohilado para obtener materiales fibrosos y así aumentar el área superficial disponible para la adhesión de fibroblastos.



## **HIPÓTESIS**

Las membranas electrohiladas de poli(urea-uretano)s con aminoácido de arginina como extensor de cadena promueven una mayor adhesión y proliferación de hFB con respecto a membranas electrohiladas y lisas de poli(uretano)s obtenidos con diferentes precursores, poli(urea-uretano) con un extendedor no aminoacídico y Tecoflex.



## JUSTIFICACIÓN

En el área de la salud existe la necesidad de apósitos económicos que permitan la unión y proliferación celular para favorecer la curación de lesiones cutáneas, además de ser una barrera física contra la infección externa. Algunos polímeros naturales presentan la ventaja de favorecer esta proliferación celular, pero poseen bajas propiedades de retracción-contracción, son costosos y vulnerables a la infección, lo cual dificulta su empleo. Por el contrario, los polímeros como el PU son más retractiles y económicos, pero deben ser modificados para presentar la propiedad de adhesión celular.

En este sentido, la síntesis de poliuretanos con la incorporación de aminoácidos es una estrategia de interés debido a que es más económico y directo que realizar la funcionalización previa del poliuretano para anclar largas cadenas proteicas de polímeros naturales, o secuencias peptídicas. En la bibliografía se ha mencionado el potencial uso de aminoácidos, como arginina, para promover la adhesión y proliferación de células. Aunado a esto, el uso de andamios fibrosos recrea la matriz extracelular y mejora la respuesta biológica. Por consecuencia, se propuso sintetizar y electrohilar el polímero PUUR a partir de distintos parámetros de electrohilado; distancia, concentración del polímero, voltaje y flujo, con la finalidad de determinar su efecto sobre la adhesión de fibroblastos humanos para la regeneración de la matriz extracelular; punto crítico en la curación de heridas.



## **OBJETIVO GENERAL**

- Comparar la capacidad de andamiaje celular de membranas electrohiladas de poli(urea-uretano) con arginina con membranas electrohiladas y lisas de poli(urea-uretano) con un extendedor no aminoacídico y Tecoflex.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar fisicoquímicamente el polímero de poli(urea-uretano) por GPC, ATR-FTIR, DSC, TGA y RMN.
- Determinar el efecto de los parámetros de electrohilado de voltaje, flujo y concentración en las características fisicoquímicas de las membranas electrohiladas, diámetro de fibra, diámetro de poro y ángulo de contacto.
- Evaluar la citotoxicidad de membranas electrohiladas mediante crecimiento de hFB en periferia del material y por análisis de lixiviado de membrana por MTT.
- Comparar la adhesión y proliferación de fibroblastos humano entre membranas electrohiladas de poli(urea-uretano) con arginina, membranas electrohiladas de Tecoflex y poli(urea-uretano) con etilendiamina y membranas lisas mediante ensayo fluorescente LIVE/DEAD® y SEM.



## METODOLOGÍA

La metodología para el desarrollo de este trabajo se describe en tres etapas principales. El primer rubro inicia con la síntesis y obtención de membranas (electrohiladas y lisas) del polímero PUUR y PU con extensor no aminoacídico de etilendiamina (PUUE). La segunda parte corresponde a la caracterización del polímero PUUR y la caracterización de las membranas electrohiladas y lisas para finalmente dar paso a la tercera y última etapa la cual consiste en la evaluación biológica de los materiales, mediante el análisis de toxicidad, adhesión y proliferación de fibroblastos.

### **Etapa 1: Síntesis y procesamiento de poliuretano con extensor de cadena.**

#### *Síntesis de poliuretano:*

La síntesis de PUU se realizó empleando la metodología descrita por Chan,<sup>15</sup> mediante la reacción de los precursores poli(caprolactona) diol (PCL-diol)(Sigma), diisocianato de 4,4'-díciclohexilmetano (HMDI)(Sigma) y Arginina (Extensor de cadena)(Hycel) en una proporción molar 1:2.05:1, respectivamente.<sup>15</sup> La reacción se llevó a cabo en dos etapas, en la primera etapa una parte de PCL-diol reaccionó con 2.05 partes de HMDI, conservando el HMDI en exceso para tener la mitad de grupos terminales libres necesarios en la segunda etapa de reacción con la arginina. Primero, la PCL-diol se secó por 12 h a 60°C y se disolvió en una disolución de dimetilformamida (DMF)(Sigma). La solución se hizo reaccionar en agitación con HMDI a 60°C por 4 h, en presencia de octoato de estaño (SnO)(Sigma) al 0.3% p/p, en atmósfera de nitrógeno. Al terminar este tiempo se obtuvo un prepolímero con grupos terminales –NCO. En el segundo paso, se disolvió el extensor de cadena de arginina en DMF, acidificando el medio con HCl, y se agregó al prepolímero, agitando durante 2 h.<sup>7</sup> Al terminar las dos horas, el polímero se precipitó en agua destilada por 12 h, se cortó y se lavó en agitación durante 2 h, esto se repitió en total 3 veces. Finalmente, se secó el polímero a 60°C y presión reducida por tres días. Se sintetizó otro polímero con un extensor de cadena no aminoacídico de etilendiamina, con la misma proporción mencionada, para comparar los efectos del extensor de arginina. El poli(urea-uretano) con extensor de cadena de arginina se nombró como PUUR y el poli(urea-uretano) de etilendiamina como PUUE. También se comparó el material con un poli(uretano) de grado médico, Tecoflex.

#### *Formación de membranas con electrohilado*

Las membranas electrohiladas se obtuvieron mediante un equipo de electrohilado ensamblado y una bomba de infusión B Braun Perfusor Space, en la cual se colocó una jeringa cargada con solución polimérica del respectivo polímero. La punta de la jeringa (8 G) se conectó a la salida positiva de una fuente de alimentación de alto voltaje y el

contraelectrodo a una placa metálica cubierta con aluminio donde se depositaron las fibras obtenidas a medida que se aplicaba el potencial eléctrico. La solución polimérica se preparó en una mezcla de 30% de DMF y 70% de tetrahidrofurano (THF)(Fermont), dejándose en agitación ligera una noche previa. Los valores de los parámetros de concentración de la solución polimérica, distancia entre la punta y el colector y voltaje aplicado se variaron para obtener diferentes membranas electrohiladas.<sup>26,55,57</sup> Al conseguir un espesor manejable en la membranas electrohiladas se dejaron secar a vacío y a temperatura ambiente una semana.

## Etapa 2: Caracterización fisicoquímica de polímeros y membranas

Una vez sintetizado los polímeros y obtenidas las membranas se procedió a la caracterización fisicoquímica de estas. Se utilizaron diversas técnicas las cuales se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2.-** Técnicas de caracterización por polímero.

Material	GPC	FT-IR	RMN	DSC	TGA	SEM	AC
PCL-diol	X	X		X			
PUUR	X	X	X	X	X	X	
Tecoflex SG80A	X						
Membrana electrohilada PUUR						X	X
Membrana electrohilada PUUE						X	X
Membrana electrohilada Tecoflex						X	X
Membrana PUUR L						X	X
Membrana PUUE L						X	X
Membrana Tecoflex L						X	X

AC: Ángulo de contacto, DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido, FT-IR: Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, GPC: Cromatografía de permeación en gel, Membrana PUUR L: Poli(urea-uretano) con extensor de cadena de arginina liso, Membrana PUUE L: Poli(urea-uretano) de etilendiamina liso, RMN: Resonancia magnética nuclear, SEM: Microscopia electrónica de barrido, TGA: Análisis Termogravimétrico.

### *Determinación de la masa molar*

La masa molar se determinó mediante cromatografía de permeación en gel, utilizando el equipo Agilent 1100 Series acoplado con dos columnas Phenogel de  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  Å°. Se empleó como fase móvil THF a un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . La curva de calibración se construyó con estándares de poli(estireno) monodisperso ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) de 1,660 a  $170,800 \text{ g mol}^{-1}$ .

#### *Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier*

Se caracterizó mediante un espectrofotómetro de infrarrojo Nicolet 380 FT-IR de Thermo Electron Corporation la estructura y los principales grupos funcionales presentes en PUUR y su precursor PCL-diol. Se disolvió 10 mg de polímero en 1 mL de THF, se tomó una alícuota de la muestra disuelta y se depositó en una pastilla limpia y seca de KBr para formar una película del polímero. El análisis se llevó a cabo en un intervalo de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , promediando 100 barridos con 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolución.<sup>7</sup>

#### *Resonancia Magnética nuclear*

Se obtuvieron los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  NMR para obtener información de la estructura química del polímero según los desplazamientos obtenidos. Se utilizó el equipo Bruker Avance 400 Ultrashield a 400 MHz, como estándar interno tetrametilsilano y como disolvente cloroformo deuterado (Sigma).

#### *Análisis Termogravimétrico*

El análisis se llevó a cabo utilizando el equipo de análisis simultáneo TGA-DSC, Netzsch STA 449 F3 Jupiter para obtener la estabilidad térmica de las muestras. Se empleó una temperatura de 28 a 700  $^{\circ}\text{C}$  con una velocidad de calentamiento de 20  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  en atmósfera de nitrógeno.

#### *Calorimetría Diferencial de Barrido*

Se realizó una calorimetría diferencial de barrido para determinar las transiciones térmicas de los polímeros. Se presentan dos análisis, uno con el equipo DSC 6 Perkin Elmer a una temperatura de 10 a 100  $^{\circ}\text{C}$  con una velocidad de calentamiento de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , y otro con el equipo de análisis simultáneo TGA-DSC, Netzsch STA 449 F3 Jupiter a una temperatura de 28 a 700  $^{\circ}\text{C}$  con una velocidad de calentamiento de 20  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Ambos análisis se realizaron en atmósfera de nitrógeno.

#### *Microscopía electrónica de barrido*

La morfología, tamaño de poro y diámetro de las nanofibras se determinó con microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés Scanning electron microscope). Se depositó una capa muy fina de oro/paladio (60/40%) sobre la membrana durante 40 s con una metalizadora Quorum Q150R ES. Posteriormente la muestra se colocó en la cámara del microscopio electrónico de barrido JSM-7500F a vacío. Las imágenes se tomaron a una aceleración de 5 kV y una ampliación de 10,000X. Para obtener el promedio del diámetro y poro de fibra en la muestra las imágenes se procesaron con el programa ImageJ 1.8.0 112, tomando como  $n=50$ .

### *Ángulo de contacto*

Se determinó el ángulo de contacto de las membranas electrohiladas, con ayuda de un goniómetro óptico Rame-Hart Instrument Co model 250, utilizando el método de gota sésil a temperatura ambiente para evaluar sus propiedades hidrófilas/hidrófobas. Se tomó una muestra de cada andamio y se colocó una gota de 5  $\mu$ L de agua desionizada sobre su superficie. Se utilizaron cinco puntos de medición por cada muestra.<sup>7</sup> El ángulo de contacto se determinó mediante el programa DropProfiler.

### **Etapa 3: Ensayos biológicos *In vitro* de membranas electrohiladas y lisas**

Debido a que las células de fibroblastos tienen un papel principal en la formación del tejido de granulación de “relleno” para restaurar la matriz extracelular en heridas, se escogió esta célula como modelo para la evaluación de la calidad de andamio celular del polímero sintético, evaluando su adhesión y proliferación en membranas mediante ensayos colorimétricos de LIVE/DEAD, MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y SEM.

#### *Descongelamiento de células*

Primero, se descongelaron viables criopreservados en nitrógeno líquido de células de fibroblastos humanos (hFB, por sus siglas en inglés human fibroblasts) mediante frotación manual. Al descongelarse, el vial se vació rápidamente en un tubo cónico con 5 mL de medio de cultivo frío Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés Dulbecco's modified Eagle's medium)/Ham's F-12 (Caisson Labs), proporción 1:1. Las células se centrifugaron a 1000 rpm por 5 min a 20 °C, el pellet obtenido se resuspendió con 5 ml de medio fresco y se colocó en caja T de 75 cm (Corning) con 5 ml previos de medio.

#### *Cultivo de células de fibroblastos*

Las células descongeladas se cultivaron en cajas T con el medio de cultivo DMEM/Ham's F-12 preparado de acuerdo a las especificaciones del proveedor y suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Biowest) y 1% de antibiótico y antimicótico (100 U/mL<sup>-1</sup> de penicilina y 0.1 mg/mL<sup>-1</sup> de estreptomina) (Gibco).<sup>11</sup> Las células se incubaron a 37 °C y en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.<sup>77</sup> Las células se cultivaron de manera rutinaria reemplazando el medio de cultivo cada tercer día; se retiró el medio de la caja y se agregó PBS 1x (PBS, por sus siglas en inglés phosphate-buffered saline) (Sigma) para eliminar sólidos suspendidos y células muertas, se retiró el PBS y se agregó medio de cultivo nuevo.<sup>11</sup>

#### *Inoculación de hFB sobre membranas*

Al llegar a confluencia celular se retiró el medio de cultivo de la caja T. Se agregó PBS para lavar y eliminar residuos de suero bovino fetal de la caja, se retiró y se añadió 5 mL de 0.5% de tripsina (Caisson Labs) y se incubó a 37 °C por 5 min para despegar las

células de la superficie. Para detener la acción de la tripsina se adicionó 5 mL de medio de cultivo a la caja, posteriormente ésta se eliminó del medio mediante una centrifugación a 1,000 rpm por 5 min a 20 °C. El pellet se resuspendió en medio DMEM/Ham's F-12. Se determinó la concentración celular mediante una cámara de Neubauer; se tomó una alícuota de 50 µL de medio con células previamente resuspendido y homogenizado a la que se le adicionó 20 µL de azul tripano. Se tomó 20 µl y se colocó en la cámara de Neubauer por cada lado, se realizó el conteo celular y se calculó la concentración.<sup>78</sup> A partir de esta concentración se calculó el volumen necesario para obtener la concentración de interés.

#### *Preparación y esterilización de las membranas electrohiladas y lisas*

Las membranas electrohiladas se cortaron en círculos de ~3 mm de diámetro. Para su esterilización, los andamios cortados se expusieron a luz ultravioleta (UV) en una campana de flujo laminar durante 20 minutos, por cada lado.<sup>15</sup> Las membranas se colocaron en tubos y se agregó agua destilada estéril, se sónico por una hora con agua fría y se dejó en agitación tres días, con cambio de agua cada 24 h. Las muestras se colocaron en placas de 24 pozos y expusieron a 20 min de luz UV, se agregó PBS suplementados con 1% de antibiótico y antimicótico, se dejó en reposo 24 h. El PBS suplementado se retiró y se realizó un lavado con PBS para eliminar residuos.

#### *Prueba de citotoxicidad*

- *Crecimiento celular en periferia de membrana.*

Después del proceso de esterilización, se colocaron membranas electrohiladas en cajas de 24 pozos y se sembraron células hFB a una concentración de  $1 \times 10^5$  células por pocillo, se incubó por 24 h para asegurar la adhesión de las células y su interacción con el material. Al terminar ese tiempo se observó en un microscopio óptico invertido LEITZ Labovert FS la presencia y morfología de las células alrededor de las membranas y se comparó con las células incubadas sin material polimérico.

- *Análisis de citotoxicidad de los lixiviados de las membranas*

Se colocaron membranas electrohiladas y lisas (n=3), previamente esterilizadas, en medio de cultivo estéril en una relación de 100 mg de polímero por cada mL de medio.<sup>15</sup> Las membranas se incubaron en las condiciones anteriormente mencionadas durante 48 h para promover la difusión de lixiviados del polímero al medio de cultivo. Células de fibroblastos se inocularon en cajas de 24 pozos a una concentración de  $1 \times 10^5$  células por pocillo y se incubaron por 24 h para asegurar la adhesión de las células. Al terminar los tiempos de incubación, se retiró el medio de cultivo de las placas con fibroblastos y se agregó el medio de cultivo con lixiviados de las respectivas membranas. A los pocillos control se les agregó medio fresco. Después de incubar por 24 h se determinó el porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con MTT.<sup>15</sup>

El ensayo de MTT consistió en la reducción de tetrazolio por deshidrogenasas mitocondriales, obteniéndose formazán de coloración púrpura que es directamente proporcional al número de células viables en el pocillo.<sup>79</sup> Primero, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y 20  $\mu\text{l}$  de reactivo MTT a 5  $\text{mg ml}^{-1}$  preparado en PBS.<sup>79</sup> Las placas se incubaron durante 4 h a 37°C, después de éste tiempo se descartó el medio y se adicionó 300  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMS) para disolver el formazán.<sup>80</sup> Después, se leyó la densidad óptica de las muestras por espectrofotometría a 570 nm.<sup>79</sup> El porcentaje de viabilidad celular (%VC) se calculó a partir de la ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia de células incubadas con lixiviados}}{\text{Absorbancia de células incubadas en medio normal}} \times (100)$$

#### *Adhesión celular*

Se analizó la adhesión celular utilizando el ensayo colorimétrico LIVE/DEAD Invitrogen™ para observar la viabilidad celular por microscopía y confirmar así la adhesión en membrana. El ensayo consistió en la tinción simultánea con calceína AM verde fluorescente para células vivas, que presentaron actividad de esterasa intracelular, y con homodímero-1 de etidio rojo fluorescente para células muertas, que habrán perdido la integridad de la membrana plasmática.<sup>81</sup> Se colocaron membranas electrohiladas y lisas de PUUR, PUUE y Tecoflex (n=3), previamente esterilizadas, en placas de 24 pozos y se sembraron células de hFB a  $1 \times 10^5$  células por pocillo con un volumen de medio de 600  $\mu\text{l}$ . Después de 48 h de siembra se removieron las células no adheridas y el medio de cultivo de los pocillos y se lavaron las células adheridas con PBS. Se agregó a los pocillos la mezcla preparada en PBS de calceína AM y homodímero-1 de etidio, según las especificaciones del proveedor, hasta cubrir la superficie de las membranas y se incubó durante 40 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.<sup>33</sup> Las muestras se observaron en un estereomicroscopio de fluorescencia LEICA MZ FLIII y se tomaron registros fotográficos para evidenciar la adherencia de células en la superficie de los materiales poliméricos. Las imágenes se procesaron con ImageJ 1.8.0 112 para calcular el área superficial fluorescente correspondiente a células hFB.

#### *Proliferación celular*

Se determinó la proliferación de fibroblastos en membranas lisas y electrohiladas de PUUR, PUUE y Tecoflex al primer, tercer y quinto día de cultivo. Se inoculó células hFB a una concentración de  $2 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 24 pozos con las respectivas membranas estériles (n=3). Al término del tiempo señalado se utilizó el ensayo colorimétrico LIVE/DEAD Invitrogen™; se observó la viabilidad celular y se interpretó la proliferación celular mediante la observación por microscopía, a diferentes tiempos, el área fluorescente en membranas. Se tomaron registros fotográficos para

evidenciar el comportamiento de las células en la superficie de los materiales poliméricos y las imágenes se procesaron con ImageJ 1.8.0 112 para calcular el área superficial fluorescente correspondiente a células hFB.

#### *Morfología celular*

Se inocularon andamios (n=3) con  $1 \times 10^5$  células por pocillo en cajas de 24 pozos y después de 24 h de cultivo se realizó una microscopia electrónica de barrido para observar la interacción célula-apósito. Al terminar el tiempo, las muestras se lavaron con PBS y se agregó glutaraldehído al 2.5 % (Sigma), preparado en cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2, para fijar las células, manteniendo en contacto el compuesto con las muestras durante 1 h, al terminar este tiempo se retiró el exceso de glutaraldehído y se realizó un lavado con PBS. La deshidratación de las muestras se llevó a cabo sumergiéndolas en concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 90 y 100 % v/v) durante 10 min por cada concentración. Al retirar el etanol se añadió hexametildisilazano (Sigma) durante 3 min para el proceso de secado,<sup>82</sup> las muestras se dejaron secar por dos horas en campana de flujo laminar para eliminar el compuesto. Se depositó una capa muy fina de oro/paladio (60/40%) sobre la membrana seca durante 40 s con una metalizadora Quorum Q150R ES. Posteriormente la muestra se colocó en la cámara del microscopio electrónico de barrido JSM-7500F a vacío y se tomaron registros fotográficos a una ampliación de 1000x.

#### *Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos se presentaron con el dato promedio y su respectiva desviación estándar. De las pruebas de diámetro de fibra, ángulo de contacto, análisis de citotoxicidad de los lixiviados de las membranas, adhesión y proliferación celular se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, usando una prueba post hoc de Tukey para la comparación de medias ( $P < 0.05$ ). Los softwares utilizados para procesar datos fueron Minitab 7, OriginPro 8 y DropProfiler.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo el poli(urea-uretano) con arginina a partir de la síntesis en dos pasos de los precursores PCL-diol, HDMI y arginina. El material se seleccionó a partir de la bibliografía, la cual le adjudica al uso del aminoácido como extensor de cadena la capacidad de promover significativamente la proliferación celular en comparación con otros aminoácidos empleados provenientes de la secuencia RGD y de poliuretano de grado médico como Tecoflex.<sup>15</sup> Aunado a esto, el material se electrohiló debido a que datos bibliográficos mencionan la capacidad de mejorar la respuesta celular en materiales poliméricos mediante el procesamiento en fibras. La primera parte de los resultados la conforma la caracterización del material para corroborar la obtención del mismo, seguido de la caracterización del electrohilado y posteriormente su uso como andamio celular.

### Caracterización fisicoquímica de polímeros y membranas

Se obtuvo la masa molar de los poliuretanos PUUR, Tecoflex y PCL-diol, como se observa en la Tabla 3, existe un aumento en la masa molar de PUUR con respecto a la masa molar del precursor PCL-diol, confirmando así la reacción de éste con los demás precursores para la formación del polímero debido a la extensión de la cadena polimérica.

**Tabla 3.-** Masa molar de polímeros.

Polímero	$\overline{Mn}$	$\overline{Mw}$	Polidispersidad
PCL-diol	$3.64 \times 10^3$	$5.25 \times 10^3$	1.44
Tecoflex	$1.13 \times 10^5$	$1.69 \times 10^5$	1.51
PUUR	$1.98 \times 10^4$	$4.11 \times 10^4$	2.06

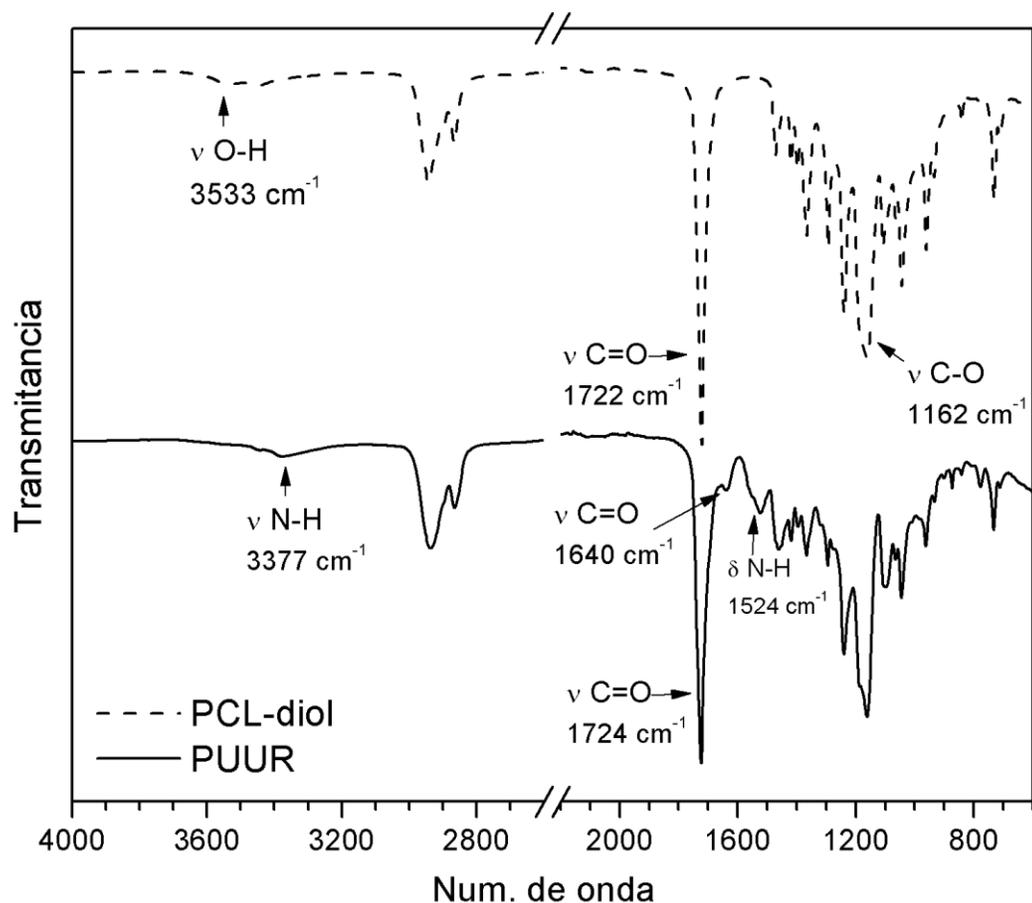
$\overline{Mn}$  = Masa molar promedio en número

$\overline{Mw}$  = Masa molar promedio en peso

### *Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier*

En la Figura 3 se presentan los espectros de infrarrojo correspondientes al polímero de poli(urea-uretano) de arginina (PUUR) y al precursor PCL-diol. Al espectro se le recortó la zona entre  $2600$  y  $2200 \text{ cm}^{-1}$  debido a la ausencia de señales en dicha área y para mejorar la apreciación de los demás picos. A primera vista se observa semejanzas en los dos polímeros debido a que la PCL-diol abarca gran porcentaje de PUUR. La síntesis de PUUR inicia con la formación de un prepolímero mediante la reacción entre grupos hidroxilo de la PCL-diol y grupos isocianato en  $\text{H}_{12}\text{MDI}$  para formar el enlace uretano (-NH-COO), cuya señal se compone de diferentes picos. Uno de ellos a  $1724 \text{ cm}^{-1}$ , señal correspondiente a estiramiento de grupos carbonilo ( $\nu \text{ C=O}$ ), en el cual se enmascaran bandas pertenecientes tanto al  $\text{-C=O}$  del grupo éster de PCL-diol como al carbonilo del

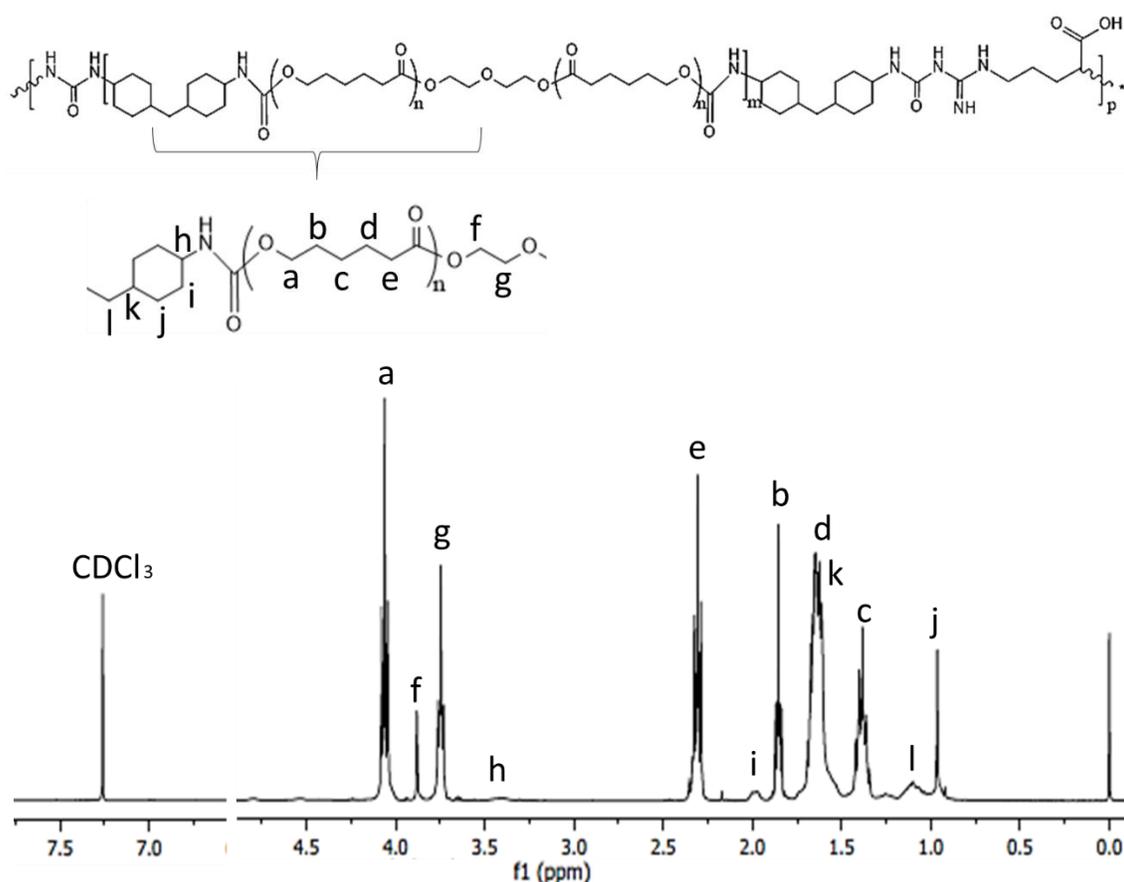
uretano, debido a la alta proporción de PCL en PUUR.<sup>83</sup> Mientras que la desaparición de grupos hidroxilo en PCL-diol ( $\nu$  O-H) y la aparición de picos a  $3377\text{ cm}^{-1}$  y  $1524\text{ cm}^{-1}$  en PUUR confirma la vibración de aminas referentes al nuevo enlace uretano, siendo la primera señal vibraciones de estiramiento de amina ( $\nu$  N-H) y la segunda a señales de torsión ( $\delta$  N-H).<sup>7,57,83</sup> Otra señal de interés es a  $1640\text{ cm}^{-1}$  en PUUR que corresponde a estiramiento del grupo carbonilo de la urea, formada en la segunda etapa de la reacción, entre las aminas primarias de la arginina y los grupos isocianato del prepolímero.<sup>84,85</sup> Debido a que en PUUR no se observó la señal correspondiente al grupo isocianato ( $2275\text{-}2263\text{ cm}^{-1}$ ) de  $\text{H}_{12}\text{MDI}$ <sup>57,85</sup> se confirma la reacción completa del compuesto sin la presencia de residuos para la formación de un poli(urea-uretano).



**Figura 3.-** Espectros de IR-FTIR KBr de poli(urea-uretano) de arginina (PUUR) y poli(caprolactona) diol (PCL-diol).

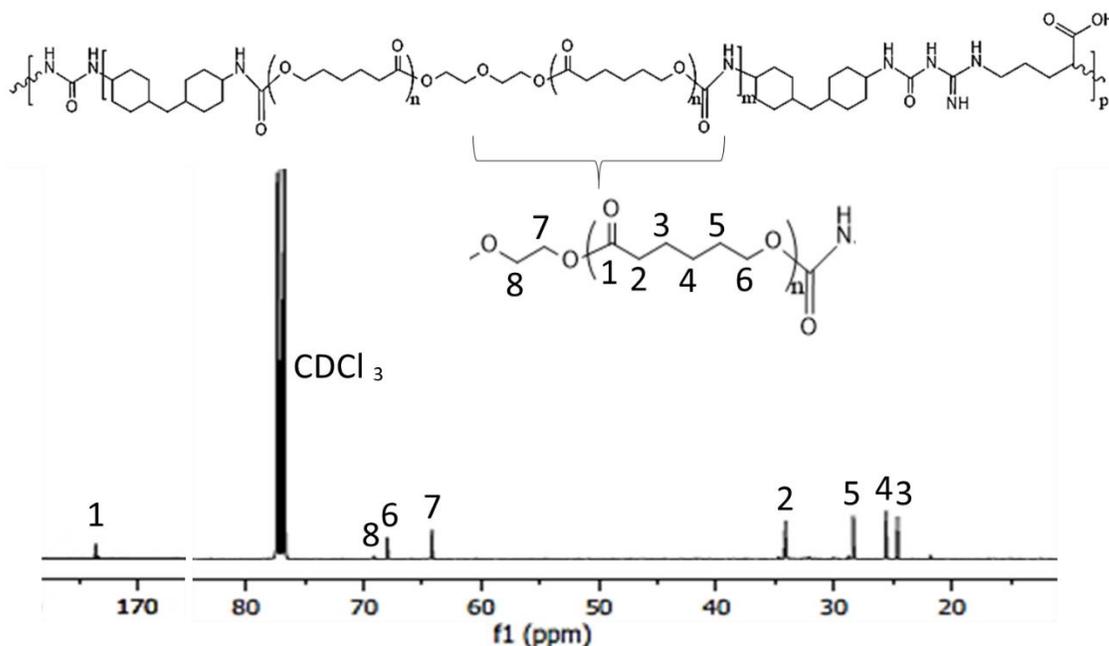
### Resonancia Magnética nuclear

Los espectros de  $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  NMR determinaron principalmente los protones de la PCL diol, al ser el compuesto de mayor porcentaje en el polímero.<sup>33</sup> La resonancia a 4.06 ppm es asignada a los protones del carbono adyacente al enlace uretano en PCL, en 2.3 ppm al carbonilo del grupo éster y los valores de 1.85, 1.62 y 1.38 ppm a los protones de metilenos.<sup>33,86</sup> Esto se corrobora con el espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR, donde a 173.56 ppm se observa el carbonilo del grupo éster, a 64.16 ppm el carbono unido al oxígeno del uretano y los metilenos a 34.14, 28.37, 25.55 y 24.59 ppm.<sup>33</sup> En cuanto al segmento duro, los protones en HMDI correspondientes a metino se observan a 3.41 y 1.65, y metileno a 1.97, 1.10 y 0.96. Sin embargo, no se observan picos característicos para grupos amida y uretanos entre 5 - 9 y 4.5 - 7.5 ppm, respectivamente, para  $^1\text{H}$  NMR. Aun así, protones adyacentes al grupo uretano se localizaron a 3.41 ppm,<sup>33,86</sup> confirmando la reacción del prepolímero. En caso de la amida, su rango de aparición en  $^{13}\text{C}$  NMR es entre 150-175 ppm, por lo que la señal del carbonilo del grupo éster interfiere con su aparición.<sup>32</sup>



**Figura 4.-** Espectros  $^1\text{H}$  NMR de poli(urea-uretano) de arginina (PUUR). Se señalan, mediante una letra alfabética, los picos obtenidos que corresponden a una señal específica de protón en la estructura del polímero.  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  (ppm): a) 4.06 (-HN-O=C-O-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-), b) 1.85 (-HN-O=C-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), c) 1.38 (-HN-O=C-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-

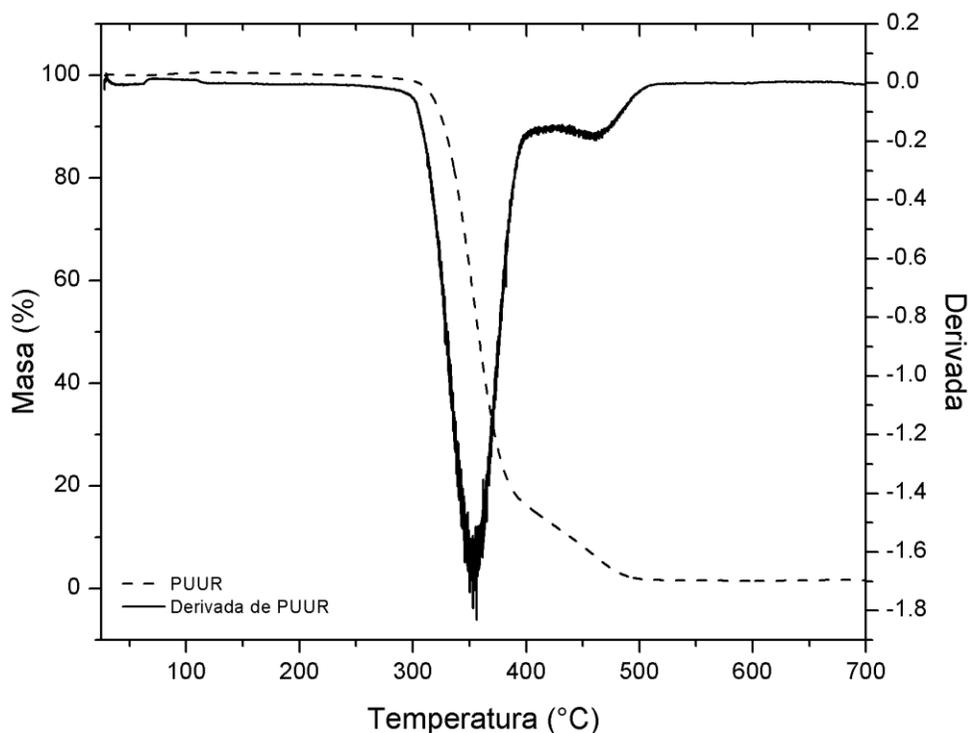
CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), d) 1.62 (-HN-O=C-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), e) 2.3 (-HN-O=C-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-), f) 3.38 (O=C-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), g) 3.74 (O=C-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), h) 3.41 (-O-C=O-HN-(CH-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>)-CH<sub>2</sub>-(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-), i) 1.97 (-O-C=O-HN-(CH-CH<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>)-CH<sub>2</sub>-(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-), j) 0.96 (-O-C=O-HN-(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)-CH<sub>2</sub>-(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-), k) 1.65 (-O-C=O-HN-(C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>-CH)-CH<sub>2</sub>-(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-), l) 1.10 (-O-C=O-HN-(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>)-CH<sub>2</sub>-(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-). La letra en negritas indica la respectiva señal de protón obtenida, como disolvente se utilizó cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 5.-** Espectro <sup>13</sup>C NMR de poli(urea-uretano) de arginina (PUUR). Se señalan, mediante un valor numérico, los picos obtenidos que corresponden a una señal específica de carbono en la estructura del polímero. <sup>13</sup>C NMR δ (ppm): 1) 173.56 (-O-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-), 2) 34.14 (-O-C=O-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-), 3) 24.59 (-C=O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 4) 25.55 (-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 5) 28.37 (-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-C=O-NH), 6) 67.98 (-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-O-C=O-NH), 7) 64.16, (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-C=O), 8) 69.06 (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-C=O). La letra en negritas indica la respectiva señal de carbono, como disolvente se utilizó cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>).

#### *Análisis Termogravimétrico*

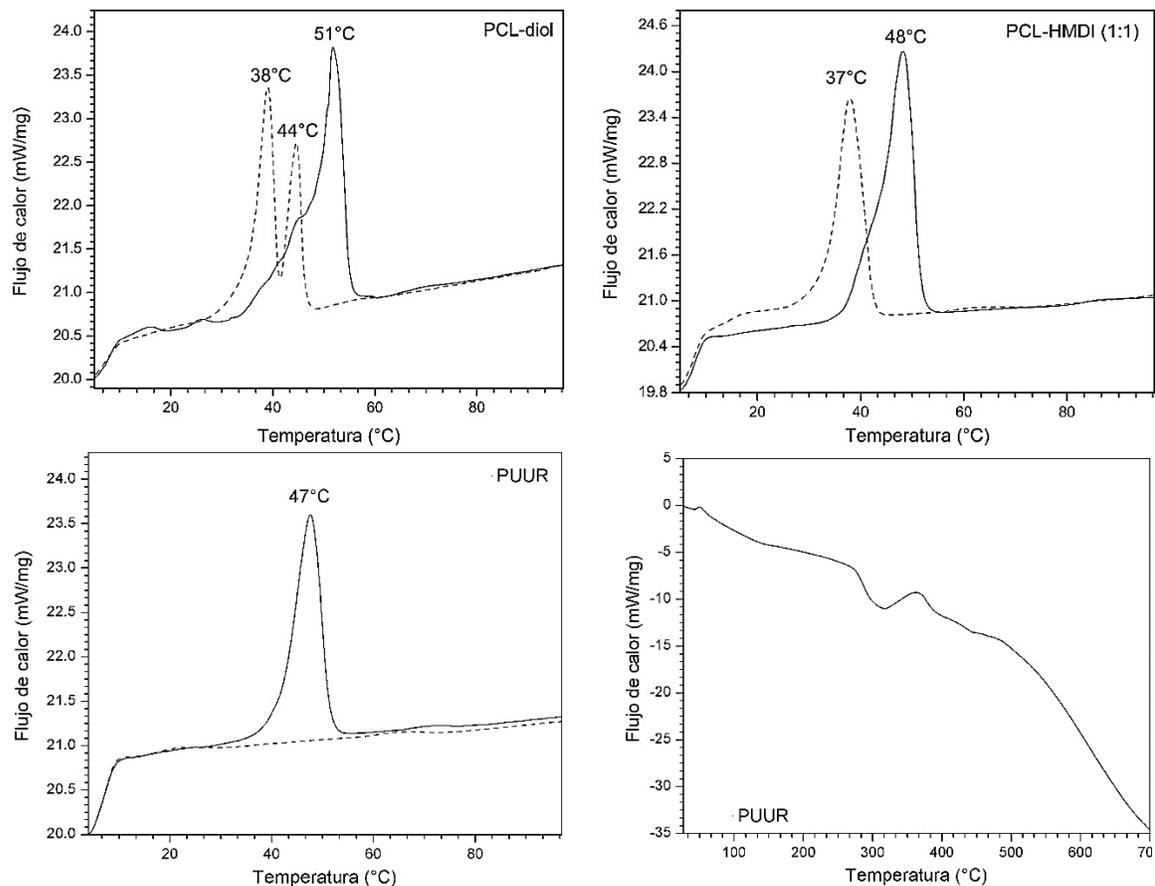
En cuanto al análisis termogravimétrico, se observó que los polímeros son termoestables a temperaturas inferiores de 280° C. Después de esa temperatura el material presentó dos zonas de degradación térmica, la primera de 283 a 390° C que representó el 82.39% de pérdida de masa correspondiente primeramente a la degradación del grupo uretano en el segmento rígido y posteriormente de los grupos esteres del segmento suave. La segunda área de 390 a 500 °C con el 15.95% de pérdida masa corresponde únicamente al segmento rígido.<sup>7,87</sup> PUUR tuvo una degradación térmica máxima a 356°.



**Figura 6.-** Termograma del análisis termogravimétrico de la masa residual de poli(urea-uretano) de arginina (PUUR) y la derivada de la masa residual.

#### *Calorimetría Diferencial de Barrido*

Con respecto al termograma de DSC (Figura 7), los polímeros muestran un pico endotérmico a bajas temperaturas, característico de los poliuretanos cuya composición contiene PCL-diol. En la figura 7 se aprecia el solapamiento de picos endotérmicos para la primera corrida de PCL-diol, correspondiente a una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de 51°C, este punto de fusión es mayor que el obtenido con la síntesis de PCL-HMDI (1:1) (48 °C) y PUUR (47°C). Esta disminución en la  $T_m$  es ocasionada por restricciones inducidas en la separación de fases y cristalización de los segmentos de PCL-diol debido al enlace químico entre éste con los bloques de uretano.<sup>88</sup> Asimismo, en los termogramas correspondientes a la segunda corrida se puede observar la aparición de dos picos definidos para PCL-diol, característicos de morfologías múltiples,<sup>89</sup> y la ausencia de pico en PUUR, no así en PCL-HMDI (1:1). La desaparición del pico endotérmico se debe al uso de extensor de cadena, el cual como se mencionó restringe la cristalización de PCL.<sup>90</sup> En cuanto a la  $T_g$ , no se observa en el intervalo de temperatura descrito. Respecto a los picos exotérmicos en PUUR, alrededor de 317°C y 498°C, corresponden a reacciones de degradación del material, tal como lo confirma el análisis de TGA.

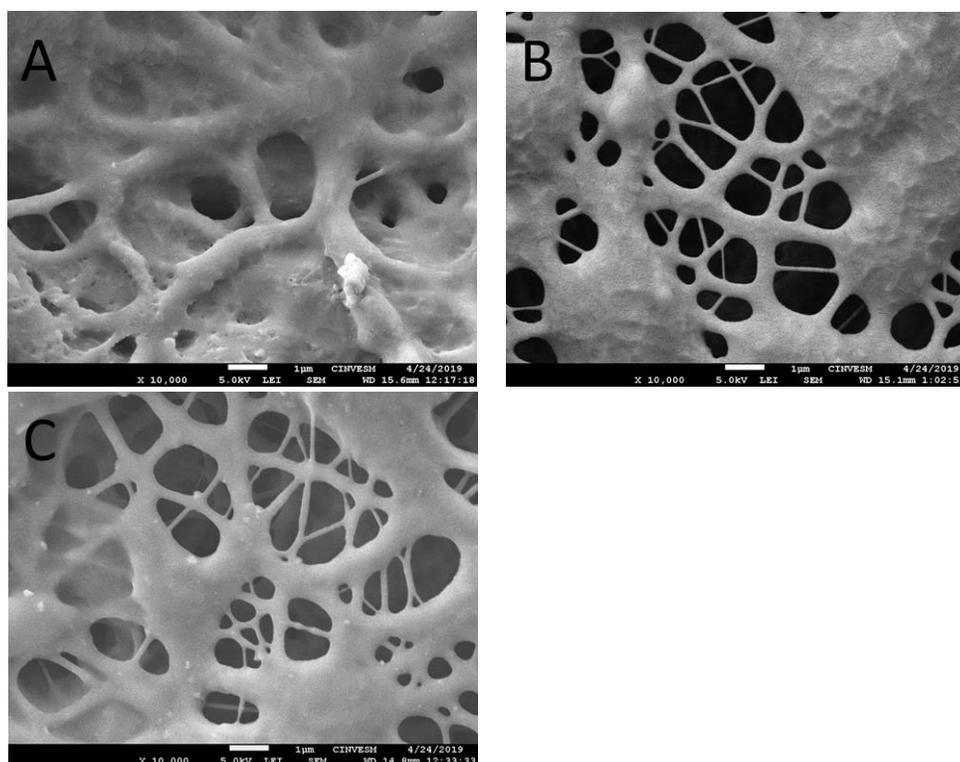


**Figura 7.-** Termograma de calorimetría diferencial de barrido de poli(urea-uretano) de arginina (PUUR), poli(caprolactona) diol y poli(uretano) sin aminoácido conformado por poli(caprolactona) diol y diisocianato de 4,4'-diclohexilmetano en proporción 1:1 (PCL-diol-HMDI (1:1)).

#### *Microscopia electrónica de barrido*

Las figuras 8-B y C correspondientes a membranas electrohiladas obtenidas a 15% de concentración, 13 cm de distancias y 20 kV presentan formación de partículas o beads alargados. Estos conglomerados son atribuidos al exceso de cargas por un voltaje alto, lo que provoca la formación de un chorro no estable al electrohilar.<sup>45</sup> Al aumentar el flujo (figura 8-C) se obtienen fibras más definidas, pero persiste la presencia partículas en las membranas. Los diámetros promedio de fibra entre B y C no presentan gran diferencia, por lo que el parámetro de voltaje ejerció una mayor influencia. Por lo tanto, se experimentó electrohilar una membrana a un menor voltaje (10 kV) y a su vez una membrana con una concentración mayor (20%). La concentración de 15% y el flujo de 1.6 ml h<sup>-1</sup> se probó a 10 kV, se observó goteo de la solución polimérica al no haber la polarización necesaria de la solución,<sup>8</sup> por tal motivo no se pudo fabricar una membrana.

En el caso de la concentración de 20%, se disminuyó el voltaje a 18 kV y el flujo a 1.2 ml h<sup>-1</sup> con el objetivo de disminuir tiempos de electrohilado. Sin embargo, la concentración fue muy alta para los demás parámetros colocados, por lo que se formó un conjunto de fibras de aspecto aplastado (figura 8-a). Un aumento en la concentración implica el aumento del diámetro de fibra, como se observa en la Tabla 4 para experimentos a 20%. Mientras que un aumento en el voltaje genera fibras más delgadas. De las membranas obtenidas no se observa una apariencia remarcada completamente definida debido a que el material es un polímero elastomérico, estos materiales son complicados de electrohilar por su baja temperatura de transición vítrea debido a la una relajación en sus cadenas lo que dificulta un electrohilado estable.<sup>91</sup> Con las membranas obtenidas se procedió a realizar la siguiente prueba de caracterización y ensayos biológicos para observar el comportamiento de células en el material.



**Figura 8.-** Microscopías de barrido electrónico de poli(urea-uretano) de arginina (PUUR), A) 20%, 18 Kv, 1.2 ml h<sup>-1</sup>; B) 15%, 20 kV, 0.8 ml h<sup>-1</sup>, C) 15%, 20 kV, 1.6 ml h<sup>-1</sup>. Distancia 13 cm.

**Tabla 4.-** Medidas de diámetro de fibra y tamaño de poro de datos obtenidos por variación de concentración, voltaje y flujo.

Polímero	Concentración (%)	Voltaje (kV)	Flujo (ml h <sup>-1</sup> )	Diámetro de fibra (nm)	Diámetro de poro (μm)
Tecoflex	-	-	-	733 ± 51 <sup>b</sup>	3.636±0.797 <sup>b</sup>
PUUE	20	10	1.2	2166± 494 <sup>a</sup>	3.949 ±0.792 <sup>a</sup>
PUUR A	20	18	1.2	620 ± 99 <sup>b</sup>	1.139 ± 0.275 <sup>c</sup>
PUUR B	15	20	0.8	329 ± 78 <sup>c</sup>	1.120 ±0.239 <sup>c</sup>
PUUR C			1.6	323± 66 <sup>c</sup>	1.075 ±0.266 <sup>c</sup>

PUUR= Poli(urea-uretano) de arginina

PUUE= Poli(urea-uretano) de etilendiamina

a, b y c= Diferentes letras señalan diferencia significativa entre los materiales.

#### *Ángulo de contacto*

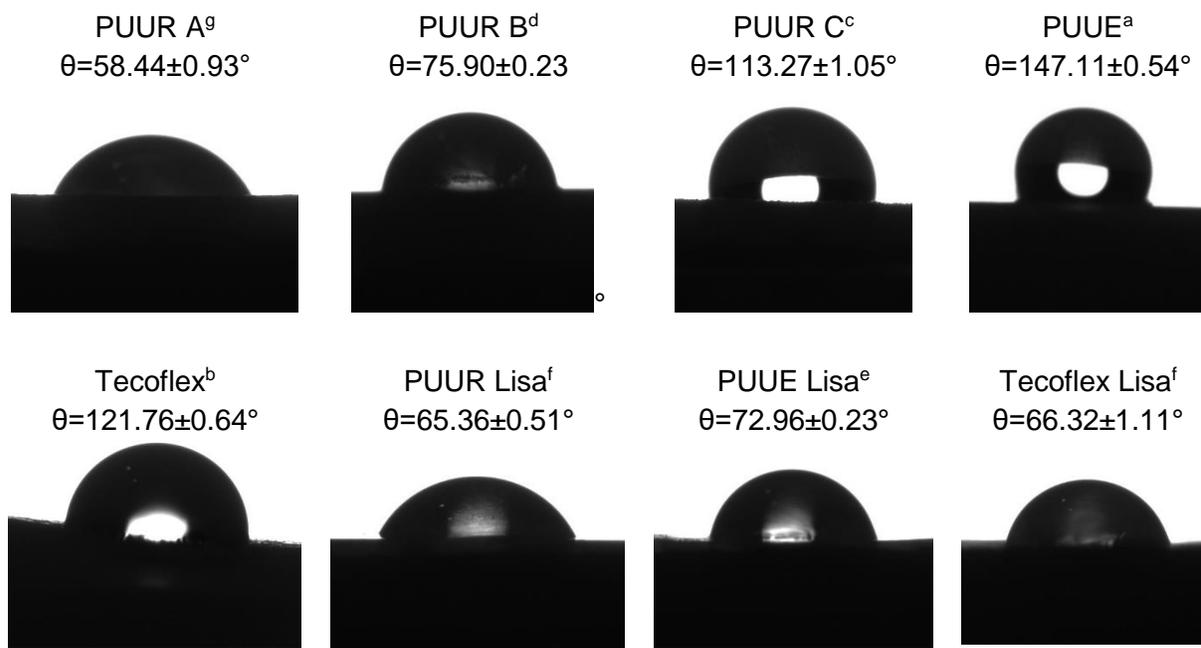
El AC es un parámetro que determina que tan hidrofílico o hidrófobo es un material, y repercute en la interacción de las células con la superficie del polímero, principalmente en su adhesión debido a la interacción con proteínas de adhesión del medio.

En el caso de materiales electrohilados la superficie generada por las fibras, no plana y con textura, influye en la medición de un ángulo de contacto aparente. Un material se considera hidrofóbico cuando su ángulo de contacto es mayor a 90°,<sup>74</sup> e hidrófilo a ángulos menores. En la figura 9 se muestran los ángulos de contacto a tiempo cero de los materiales de PUUR, PUUE y Tecoflex, procesados en membranas lisas, por evaporación de solvente, y membranas electrohiladas para su comparación. En las membranas lisas se obtienen ángulos de contacto entre 65 y 73°, siendo el orden de los ángulos PUUE L>Tecoflex L>PUUR L. Donde PUUR L y PUUE L difieren sólo en la composición del extendedor de cadena, el cual en el caso de PUUR está conformado por arginina y en PUUE de etilendiamina, ambos aportan grupos amino para su anclaje al prepolímero. Sin embargo, la arginina aporta grupos funcionales polares libres en su cadena, como grupos amina y ácido carboxílico, lo que explicaría el aumento en la mojabilidad del material, a diferencia de Tecoflex que se conforma de enlaces uretano. Aun así, no hay diferencia significativa entre los AC de Tecoflex y PUUR L,

En el caso de los materiales electrohilados, se observa un comportamiento menos hidrófilo, comparado a sus respectivos polímeros en forma de película. Siendo el ángulo contacto de PUUE>Tecoflex>PUUR C>PUUR B>PUUR A. Resultados similares fueron obtenidos por Szewczyk col.<sup>74</sup>, quienes realizaron estudios de mojabilidad en diferentes polímeros, fibrosos y lisos, y observó un aumento directo del ángulo de contacto en polímeros electrohilados comparados a sus respectivas películas. Esto se debió a que en polímeros electrohilados la formación de fibras genera un aumento en la rugosidad del material y, si en el material se disminuye la fracción de fibra, existe un aumento de

aire atrapado entre las fibras, ocasionando el incremento en el ángulo de contacto. Wang y Wang<sup>92</sup> también mencionaron que el aumento de poros en nanofibras genera una superficie más rugosa que no permite la penetración de agua en los poros de la membrana, por lo que el líquido queda suspendido en una superficie solido-aire y aumenta el ángulo de contacto. Esto confirma que el material no es necesariamente hidrófobo, pues al pasar el tiempo se modifica este valor, según la composición y morfología del material. Mi y col.<sup>54</sup> observaron cambios en el AC de sus materiales electrohilados entre el tiempo cero y a los dos segundos, altamente influenciado por la composición del material.

El aumento del ángulo de contacto en PUUE y Tecoflex es concordante con el diámetro promedio de poro, en comparación a las membranas de PUUR. Como se mencionó, en poli(uretano)s electrohilados la topografía de la superficie del material afecta la mojabilidad,<sup>93</sup> PUUR A mostró mayor mojabilidad debido a la mayor formación de fibras aplanadas, por lo que no se manifiesta el comportamiento de PUUR B y C. A su vez, este ángulo de contacto es aparente, debido a que conforme pasa el tiempo el ángulo de contacto en las membranas electrohiladas decrece. Estudios señalan que el rango de ángulo de contacto óptimo para la adhesión de fibroblastos es entre 60 y 80°, <sup>75</sup> ángulos similares a los presentados en este trabajo.



**Figura 9.-** Ángulos de contacto a tiempo cero de membranas electrohiladas y lisas.  
 a-g = Diferentes vocales señalan diferencia significativa entre los materiales.

## Caracterización de los materiales en cultivo de células de fibroblastos

### *Citotoxicidad del material.*

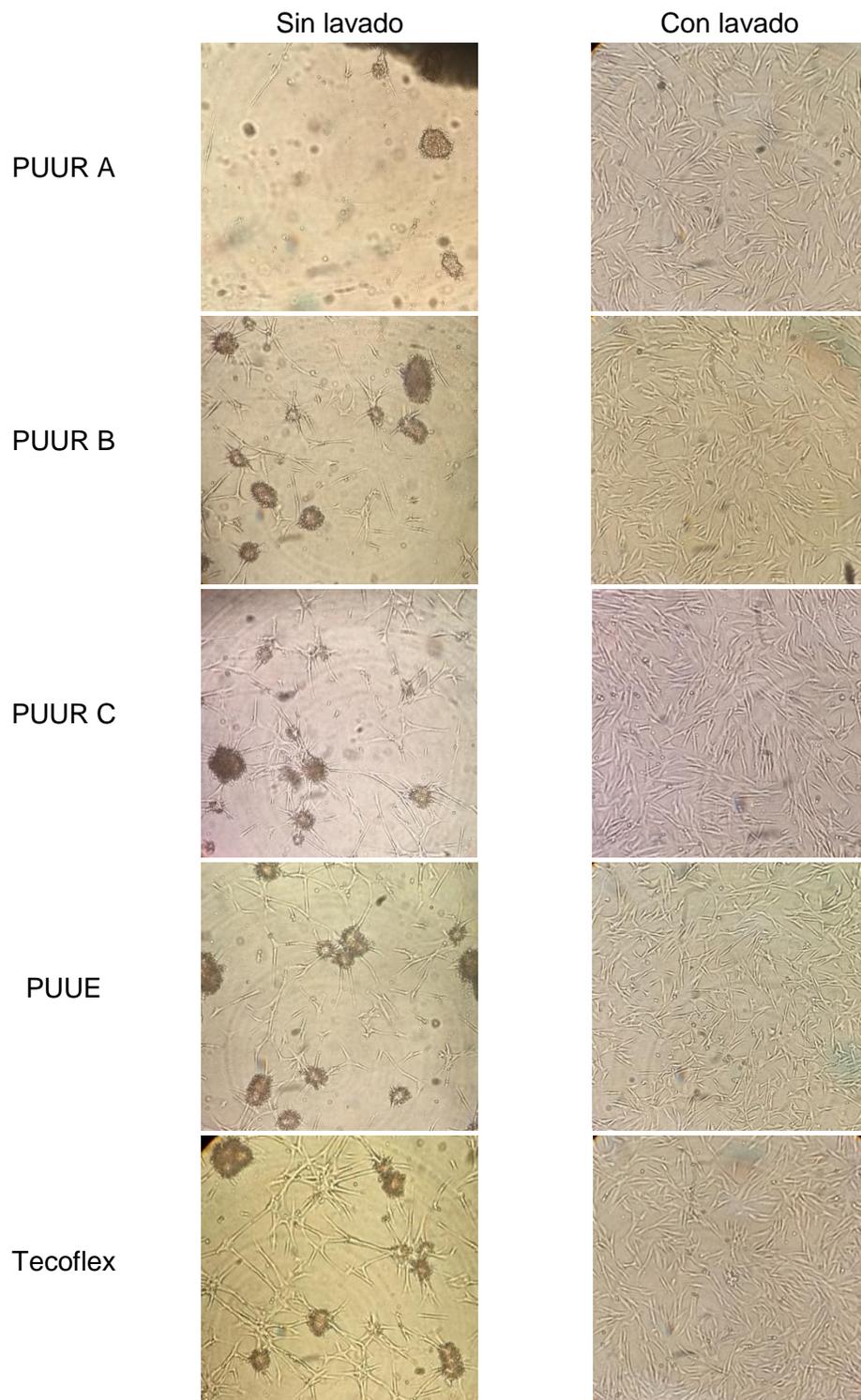
El poliuretano es un polímero que no es considerado tóxico, teratogénico ni mutagénico. Sin embargo, puede presentar lixiviación de sustancias potencialmente citotóxicas de bajo peso molecular. Estas sustancias pueden provenir de los productos de degradación, de residuos de monómero sin reaccionar o del catalizador metálico, compuestos derivados del proceso de esterilización<sup>29</sup> y, en este caso, de residuo de solventes del proceso de electrohilado.<sup>51</sup>

Un método utilizado para la detección de citotoxicidad por parte del material fue colocar los polímeros en un cultivo de células de fibroblastos durante 24 h para después observar el comportamiento de las células en la periferia del polímero.<sup>29</sup> La figura 10 corresponde a la periferia de membranas electrohiladas en pocillos de placa después de 24 horas de siembra. Se puede observar que en todos los materiales electrohilados existe disminución en la viabilidad celular y cambios en la morfología de las células en comparación del control, donde hFB mantiene su forma alargada tipo huso. Debido a que PUUR no se degrada térmicamente hasta los 280 °C (figura 6) y según investigaciones de Chan<sup>15</sup> el material presenta resistencia a la degradación en contacto con agua destilada (a 100°C por 24h) y PBS (37°C por más de 24 semanas) a pH 7.4, no se le adjudica la citotoxicidad en células por liberación de productos de degradación. Además, tanto a PUUR como a PUUE se le realizaron lavados al terminar su síntesis para retirar residuos sin reaccionar de su composición. Confirmándose en el análisis de FTIR (figura 3) la ausencia de grupos isocianato libres, los cuales son citotóxicos.<sup>29</sup> Debido a que Tecoflex es un polímero comercial de grado médico que presentó un comportamiento similar a los demás materiales electrohilados, se le adjudicó un efecto citotóxico a los solventes empleados en el procesamiento del material en fibras. Principalmente a DMF cuyo punto de ebullición es a 153°C, debido a que THF tiene un punto de ebullición a 66°C,<sup>51</sup> lo que facilita su evaporación durante el electrohilado y secado a vacío del material a temperatura ambiente. Se ha reportado que la exposición de DMF en células de fibroblastos genera desprendimiento celular y cambios en la morfología,<sup>94</sup> así como muerte por apoptosis después de 24 h.<sup>95</sup>

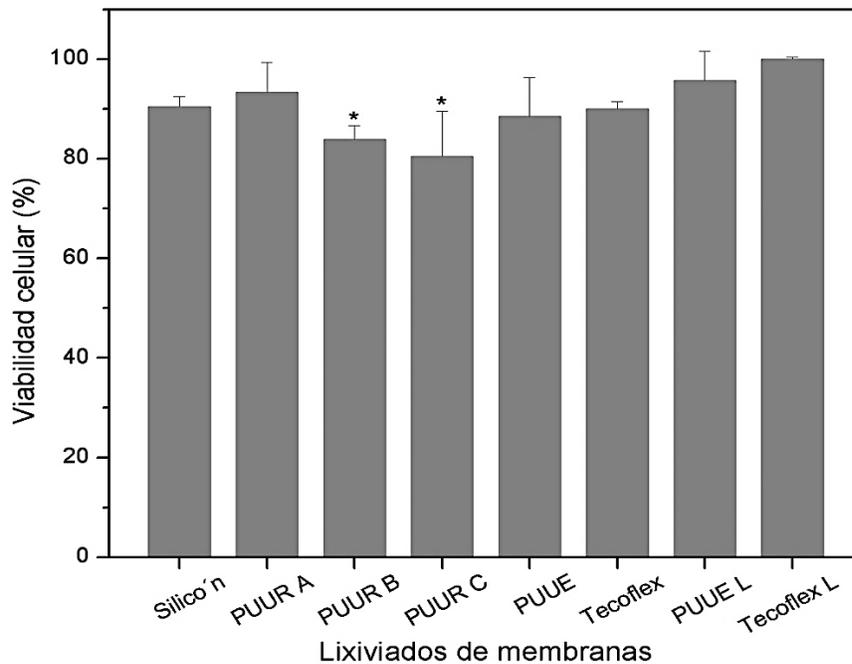
Debido a que tanto DMF como THF son miscibles en agua<sup>96</sup> se realizaron lavados con agua destilada estéril a las membranas previo a la siembra celular. Se inocularon fibroblastos en placas con membranas y se observó la periferia a las 24 h (figura 10-B), también se realizó un ensayo de citotoxicidad del material con MTT a partir de la obtención de lixiviados de cada una de las membranas electrohiladas (figura 11). En las imágenes obtenidas se observó una mejora en la morfología de las células después de los lavados de los materiales. La figura. 10 corrobora la presencia de solvente en las membranas electrohiladas sin lavar (figura 10-B) debido al cambio drástico en la

morfología y viabilidad celular observada en las imágenes en comparación con el control (figura 10-A) y las membranas con lavado previo (figura 10-C). Varios trabajos de electrohilado que emplean como solvente DMF o una mezcla de éste con otro solvente no reportan este problema, adjudicado a los tratamientos previos a la siembra celular. Nanofibras de PCL preparadas con cloroformo y DMF (8.5:1.5) obtuvieron buena viabilidad y proliferación celular debido al tratamiento de esterilización que consistió en remojar las membranas en una mezcla de etanol (70%) antes del sembrado de fibroblastos.<sup>97</sup> Como el cloroformo es un solvente volátil y el DMF un solvente miscible en compuestos orgánicos como el etanol<sup>96</sup> esto aseguró que residuos del compuesto no afectara el cultivo celular. Khil y col.<sup>55</sup> reportaron membranas electrohiladas de PU grado medico fabricadas con 70% THF y 30% DMF, sin reportar inflamación o daño en tejido en las pruebas *In vivo*, cabe mencionar que las membranas son colocadas a vacío y a 60°C para retirar el solvente. Lo cual, debido al punto de fusión de las membranas PUUR no se puede aplicar.

En cuanto al ensayo de citotoxicidad de los lixiviados obtenidos de membranas sometidas a lavados, los resultados se presentan en la figura 11 en términos de porcentaje de viabilidad celular (%VC). Se obtuvieron porcentajes mayores al 80%, porcentajes similares a los adquiridos en otros trabajos con membranas electrohiladas<sup>98</sup> y membranas lisas.<sup>15</sup> Se encontró diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) en el %VC de los tratamientos de PUUR B y PUUR C, debido a remanente de disolvente en las membranas. Aun así, los porcentajes obtenidos se consideran no citotóxicos debido a que no hay reducción mayor al 30% de viabilidad celular, con base en la norma ISO 10993-5:2009 para Evaluación biológica de dispositivos médicos. Por lo tanto, el lavado previo de las membranas a la siembra celular ayuda a retirar remanentes de solvente del proceso de electrohilado.



**Figura 10.-** Ensayo de citotoxicidad de células de fibroblastos cultivadas durante 24 h en la periferia de membranas electrohiladas de poli(urea-uretano) con arginina (PUUR) a diferentes parámetros de electrohilado (A, B y C), poli(urea-uretano) con etilendiamina (PUUE) y Tecoflex.



**Figura 11.-** Histograma del porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos humanos expuestos a lixiviados de polímeros (100 mg/ml). \*Diferencia significativa entre los tratamientos.

#### *Adherencia de células de fibroblastos*

Se evaluó la adherencia de hFB en membranas electrohiladas y lisas a las 24 h de siembra. Antes del ensayo los apósitos se lavaron con PBS para retirar las células no adheridas a su superficie y se realizó el ensayo LIVE/DEAD. A su vez se incorporó un control de cada membrana sin presencia de células para corroborar la no fluorescencia del polímero (Anexo figura 17). En la figura 12 se observan membranas con señales de fluorescencia verde correspondientes a células vivas y señales rojas para células muertas.

En todas las membranas se obtuvo la presencia de células hFB adheridas, vivas y muertas, observándose zonas de fluorescencia agrupada. La formación de estas zonas de hFB pueden indicar buena interacción de las células con el material, promoviendo la adhesión y extensión de células de fibroblasto,<sup>99</sup> o al contrario, deberse a una baja interacción entre la célula y el material y mayor fuerza de interacción célula-célula, lo que ocasiona aglomeramiento y cambios en la morfología típica de fibroblastos,<sup>100</sup> al haber menos puntos focales de adhesión. Esto está relacionado con la mojabilidad y morfología del material.

En el primer caso, el ángulo de contacto es un indicativo de la mojabilidad de un polímero. La adhesión celular en materiales se lleva a cabo por la interacción entre la

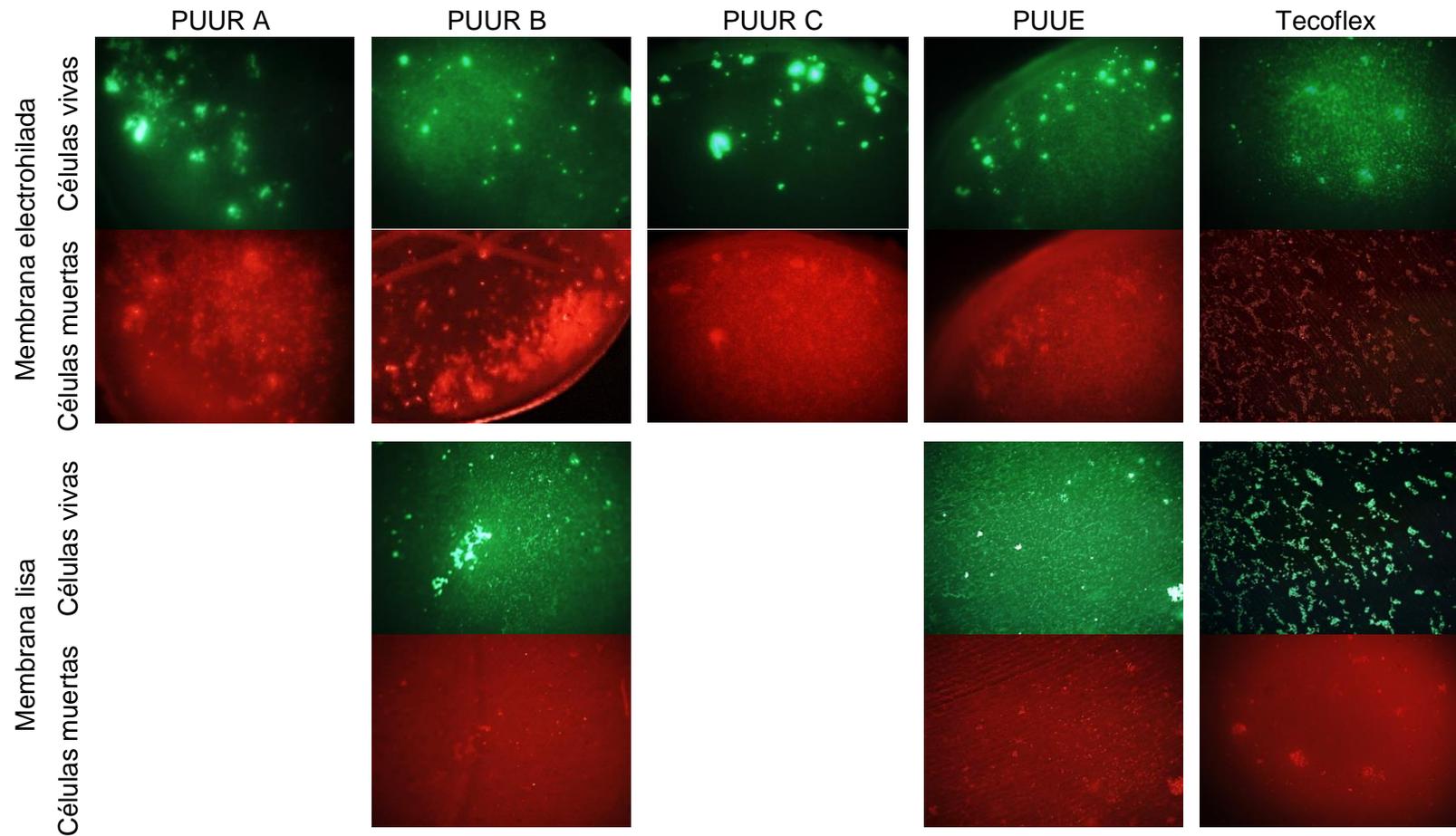
superficie del material y las proteínas adhesivas del suero bovino fetal incorporado en el medio de cultivo, estas proteínas son las que se encargan de la adhesión celular mediada por integrinas.<sup>72</sup> Se ha demostrado que la adherencia de estas proteínas está limitada en superficies altamente hidrofílicas e hidrófobas, valores de ángulo de contacto por debajo de 40° y por lo alto de 90°, respectivamente, para células de fibroblasto, cuyo valor óptimo para adhesión se encuentran entre 50-60°.<sup>101</sup> Mi y col.<sup>54</sup> observaron un comportamiento similar de zonas amplias fluorescentes en poliuretanos electrohilados de superficies hidrofílicas. Debido a la alta hidrofilia se favoreció la absorción de agua en la superficie del material, lo que disminuyó la interacción célula-material y los fibroblastos se adherieron con una conformación redonda, formando aglomerados.<sup>54</sup> Sin embargo, los ángulos de contacto obtenidos de las membranas lisas no son altamente hidrofílicos e hidrófobos, sus ángulos están dentro de los valores reportados para adhesión celular, siendo PUUE L más hidrófobo y no habiendo diferencia significativa en los ángulos de los materiales PUUR L y Tecoflex L. En el caso de las membranas electrohiladas, el ángulo de contacto es un valor aparente el cual es afectado por el aire atrapado en los poros de las fibras, por lo que el valor disminuye al pasar el tiempo según la morfología del material y su composición; en ambiente fisiológico las cadenas del polímero rotan y la parte hidrofílica se expone a la zona en contacto con agua, por lo que la mojabilidad aumenta.<sup>15</sup> En general, los material como tal de los polímeros electrohilados son parcialmente hidrofílicos y por lo tanto tienen la capacidad de mojar la superficie electrohilada, esto se confirma con la morfología celular observada por SEM de los materiales electrohilados.

Debido a las zonas grandes de fluorescencia no fue posible realizar un conteo de las células adheridas para comparar cuantitativamente las membranas. A su vez, no se logró realizar la técnica colorimétrica MTT por la coloración intrínseca del material al incubarse en ausencia de células (Anexo figura 18). Por tal motivo, las imágenes de la figura 12 se procesaron con el programa ImageJ para obtener un valor representativo del área celular proyectada en las membranas, expresado como área superficial fluorescente. En la figura 13 se reportan los valores obtenidos, puede observarse que tanto en membrana lisa como electrohilada de PUUE hay una menor área correspondiente a células vivas, concordando con un valor mayor de ángulo de contacto (figura 13 A). En el caso de los materiales de Tecoflex y PUUR L, la evidencia fotográfica no permitió los procesamientos óptimos de la imagen por falta de nitidez en los costados de éstas, pero visualmente se contempla un valor mayor de área superficial fluorescente de lo que se reporta en los gráficos.

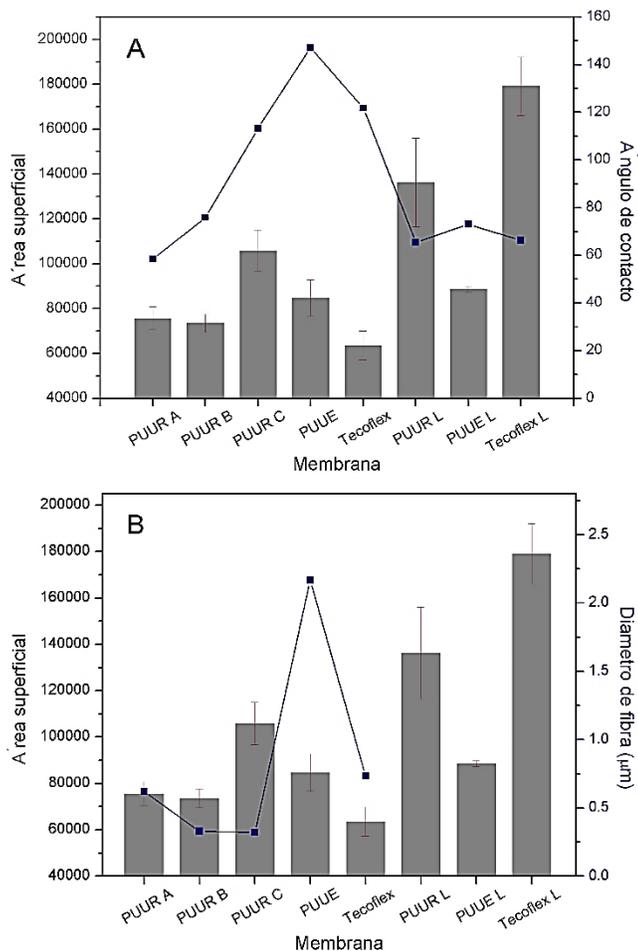
Con respecto a la morfología de las membranas, el diámetro de fibra está relacionado con la existencia de puntos focales de adhesión disponibles;<sup>102</sup> diámetros submicrométricos se han reportado como buenos precursores de adhesión celular. A su vez, morfologías con presencia de aglomerados en el proceso de electrohilado perjudican la adhesión al proporcionar menor área,<sup>61</sup> como se observa en la figura 13 B-

PUUR B y C y PUUR A y Tecoflex los cuales tienen el promedio de diámetros de fibra similares, pero la respuesta biológica difiere en los dos grupos por la morfología del material, sobre todo se observa en PUUR B y C, al ser el mismo polímero. Esto establece la importancia de la superficie de las membranas en comparación de la composición del material dentro de las 24 h.

Respecto a las células muertas, son células que se adhirieron a la superficie del material, pero comenzaron un proceso apoptótico, debido a que no se retiraron con el lavado realizado antes del ensayo de tinción. Si bien en el análisis de citotóxica se encuentra una disminución significativa de viabilidad celular de PUUR B y C, se observa que las zonas de fluorescencia roja se superponen paralelamente a las zonas de fluorescencia verde, rodeándose de células vivas tanto en materiales electrohilados como lisos. Por lo tanto, gran parte de la muerte celular se debe a muerte por dificultad de obtención de nutrientes por la distribución de las células, expuestas en el centro de dichas zonas.<sup>54</sup> Otra causa probable es por residuos de disolvente en los materiales o una interacción baja con el material.



**Figura 12.-** Ensayo de adherencia celular con LIVE/DEAD de hFB a las 24 h de incubación en membranas electrohiladas y lisas de poli(urea-uretano) con arginina (PUUR) a diferentes parámetros de electrohilado (A, B y C), poli(urea-uretano) con etilendiamina (PUUE) y Tecoflex.



**Figura 13.-** Área superficial celular de hFB vivas sobre membranas electrohiladas y lisas con respecto a ángulo de contacto (A) y diámetro de fibra (B).

### *Morfología celular*

En el análisis anterior se confirmó la adhesión de células hFB sobre los polímeros a las 24 h de incubación. No obstante, no se obtiene información de la morfología celular en este proceso, el cual es un dato esencial para determinar la interacción entre la célula y el material. Por lo tanto, se realizó SEM a andamios inoculados con hFB, a concentración celular y tiempo de incubación iguales al ensayo anterior y se realizó el mismo tratamiento a andamios incubados en ausencia de células como control (figura 14). El tratamiento para deshidratar las células con etanol afectó a los materiales por la solubilidad o hinchazón que presentaron en el disolvente, por lo que la apariencia de fibras difiere a la del material sin tratar.

La morfología de los fibroblastos observados en la figura 14 corresponden a la típica forma bipolar de huso y multipolar estrellada, lo que indica una buena interacción entre el material y la célula debido al alargamiento y extensión de hFB sobre el polímero, junto

con la formación de puntos de adhesión focal. Se visualiza movilidad celular por la elongación de hFB y extensión de lamelipodios (flechas blancas) lo cual es señal de locomoción celular.<sup>103</sup> A su vez, las células se encontraron adheridas en la superficie de los materiales sin infiltración en la estructura de las membranas electrohiladas debido a los valores de diámetro de poro obtenidos ( $< 4 \mu\text{m}$ ).

Se aprecia en la figura 14 la expansión de hFB y extensión de filopodios en interacciones célula-célula (figura 15 B) lo cual es característico de células sanas.<sup>104</sup> También se observan la formación de películas de célula que recubren parte de las fibras superficiales del andamio (figura 15 A). En general, no se encontró la presencia de morfologías pequeñas y redondeadas de hFB, lo cual indicaría una pobre adhesión a la superficie del material, detención de crecimiento o inicio de una respuesta apoptótica,<sup>100</sup> con excepción en Tecoflex L. La ausencia de estas morfologías corrobora que las zonas fluorescentes localizadas en la metodología anterior se deben principalmente a la extensión de hFB en lugar de una pobre interacción con el material, descartando a su vez problemas de mojabilidad del polímero y ángulos de contacto aparente extremos. Sin embargo, se observa en la figura 15 A que la hoja celular presenta levantamientos en los bordes de hFB cerca del material, lo cual da indicios de que la interacción célula-material se está perdiendo y permanece la comunicación célula-célula, lo que podría significar problemas con el material, como problemas de disolvente, debido a que las células adheridas tienen cambios morfológicos. Igualmente, la intercalación de células, explica la dificultad de estas para obtener nutrientes, siendo una causa de muerte celular.

En el caso de Tecoflex se observan distintas morfologías; células redondas o alargadas, lo cual indica una interacción menor en el material liso, en el cual, si bien está adherida la célula, ésta en una conformación no proliferativa-apoptótica. Esto cambia en sus andamios electrohilados, se observa cambios en la superficie polimérica en presencia y ausencia de células, en la primera se aprecia un recubrimiento sobre la superficie que forma puentes en los poros, esto no se visualiza en el andamio en ausencia de hFB, por lo deben ser componentes de la matriz extracelular excretados por las células.<sup>62</sup> Una vez que la célula se adhiere a un sustrato se continúan realizando un intercambio de señales que pueden culminar en la deposición de compuestos de la matriz extracelular o proliferación. Lowery y col.<sup>62</sup> encontraron que el tamaño de poro influye en la producción de ECM en fibroblastos, diámetros de poro menores a  $15 \mu\text{m}$  segregan más rápido ECM mientras que a diámetros mayores se tarda más tiempo. En cuestión del diámetro de fibra, se ha encontrado que la expresión de colágeno III y elastina es aumentada en diámetros de fibra de entre  $0.350$  a  $1.100 \mu\text{m}$ , aumentando al disminuir el diámetro.<sup>70</sup>

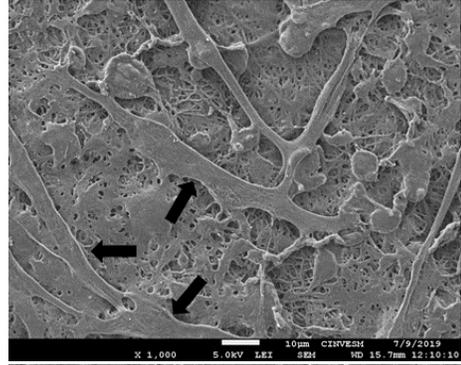
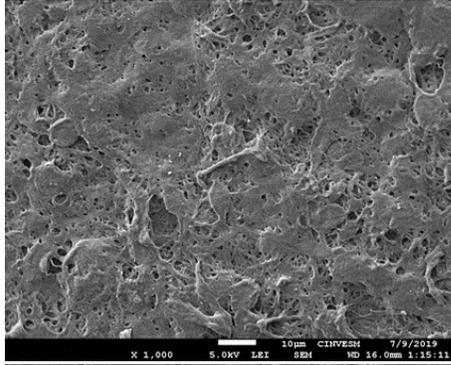
Comparando materiales lisos y electrohilados del ensayo anterior se observa mayor área superficial en materiales lisos que en materiales electrohilados debido a que hay más cúmulos de células en los últimos. Las imágenes SEM nos muestran las agrupaciones que se llevan a cabo en materiales electrohilados, dando buenos indicios en interacción célula-material, sin embargo, las fuerzas de cohesión célula-célula son altas en los materiales electrohilados de PUUR a concentraciones altas, un motivo de esto es la variación en las áreas de adhesión focal, al haber no uniformidad en las fibras los puntos

de adhesión focal disminuyen (figura 15 A y C) y aumentan los de cohesión célula-célula. De ahí que en la figura 15 A-PUUR C presente los bordes de la célula cercanos al material enrollados y mayor extensión de filopodios célula-célula. Esto no se visualiza en PUUR L, la cual tiene mejor interacción con el material.

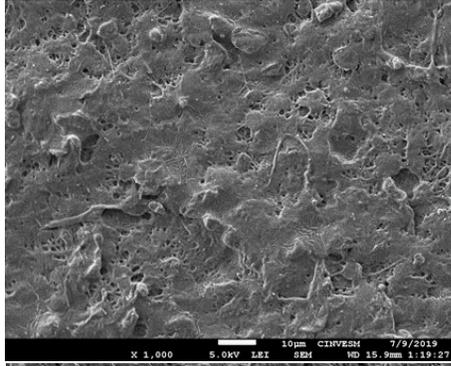
Sin células

Con células

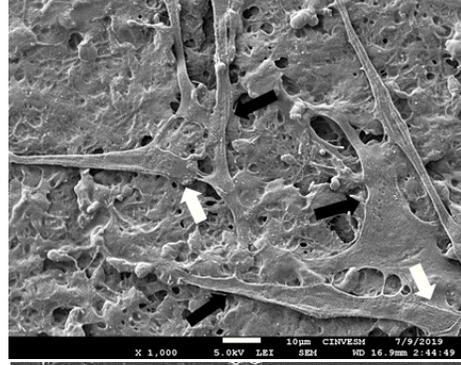
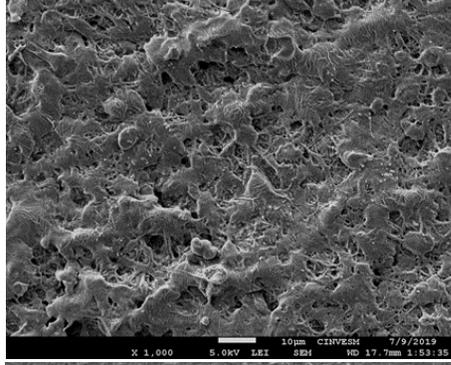
PUUR A



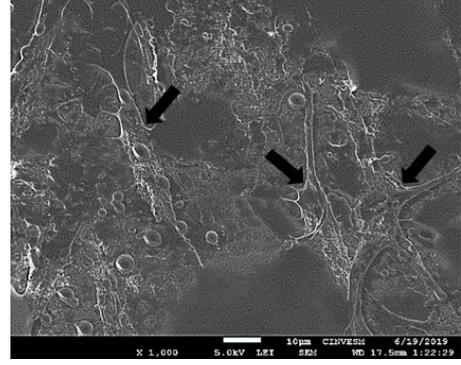
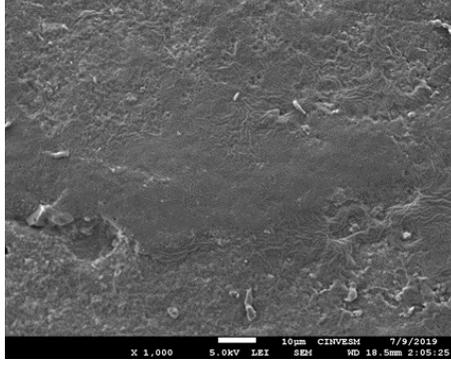
PUUR B

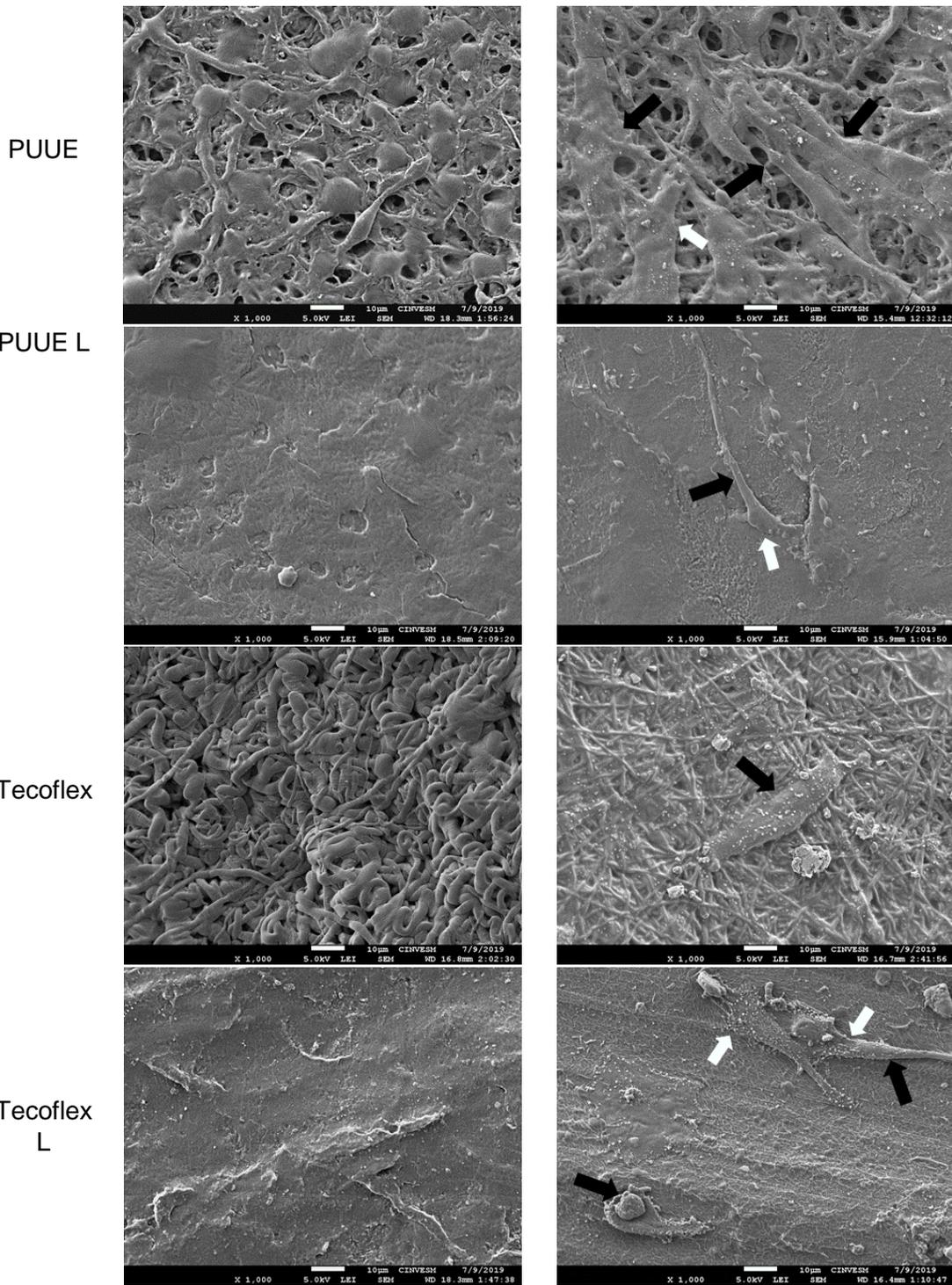


PUUR C



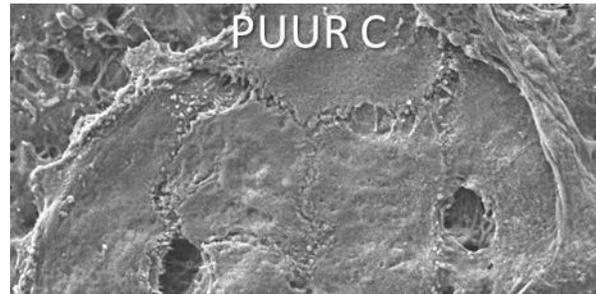
PUUR L



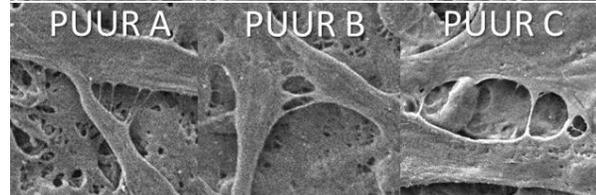


**Figura 14.-** Micrografía electrónica de barrido de células de hFB a las 24 h de incubación en membranas electrohiladas y lisas (L).de poli(urea-uretano) con arginina (PUUR) a diferentes parámetros de electrohilado (A, B y C), poli(urea-uretano) con etilendiamina (PUUE) y Tecoflex. Fecha negra indica células, flecha blanca señala lamelipodios. Amplificación x1000, 5 kV.

A.- Formación de hoja celular



B.- Interacción célula-célula



C.- Interacción célula-polímero



**Figura 15.-** Micrografía electrónica de barrido de diferentes interacciones entre la célula y el material, a las 24 h de incubación. Poli(urea-uretano) con arginina (PUUR) a diferentes parámetros de electrohilado (A, B y C) y Tecoflex Liso (Tecoflex L). Amplificación x1000, 5 kV.

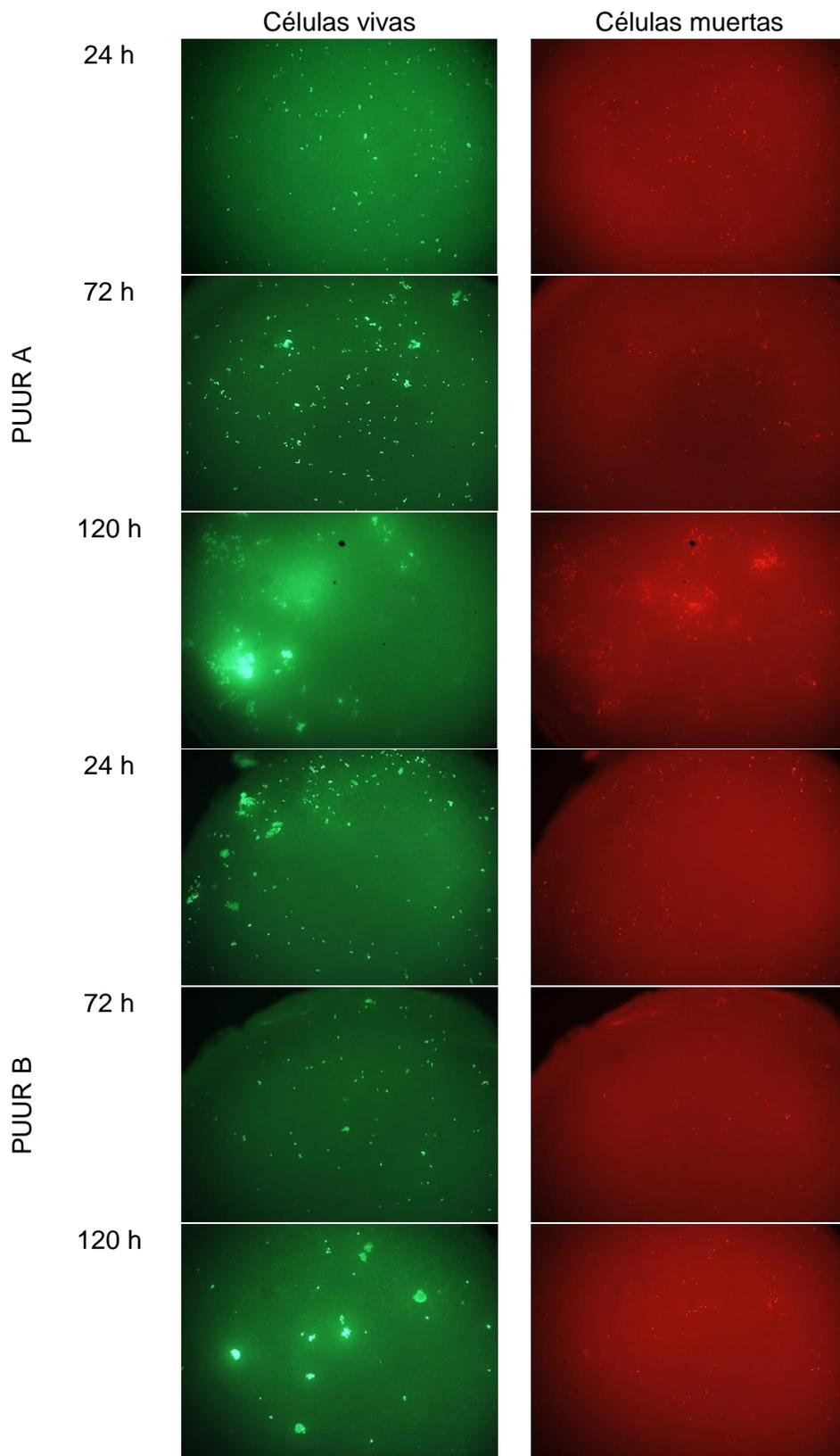
#### *Proliferación celular*

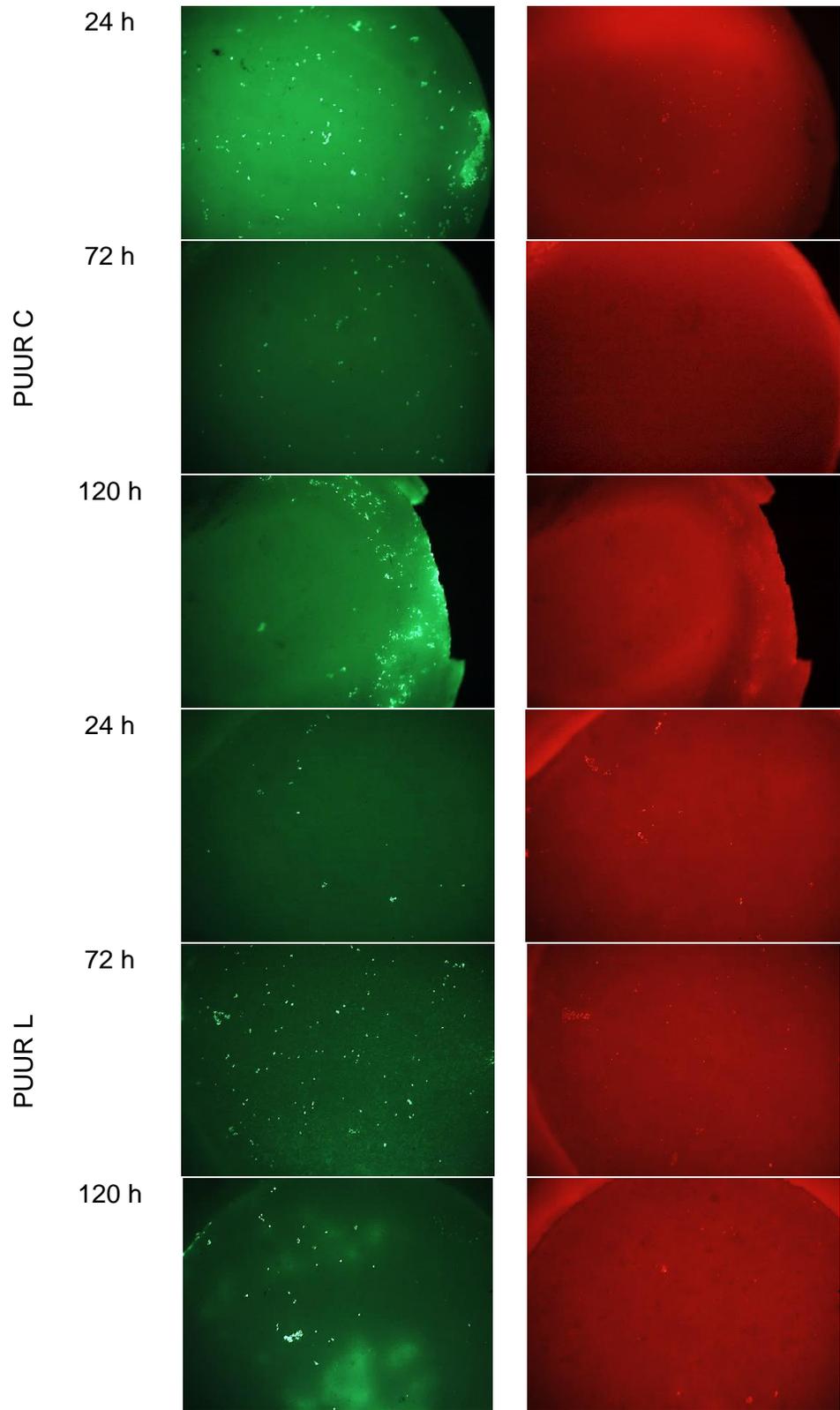
En análisis previos se observó que las células no penetran en las membranas, a su vez de presentar extensión de hFB sobre los andamios lo cual es necesario para realizar división celular. Por lo cual el siguiente paso es evaluar la proliferación de hFB. Se empleó la metodología de adhesión celular a tres tiempos diferentes para determinar la variación de área superficial fluorescente sobre las membranas, debido a que en el análisis de citotoxicidad se observó que el extracto de silicón disminuyó la viabilidad celular en un 10% en esta ocasión las membranas no se fijaron en los pocillos.

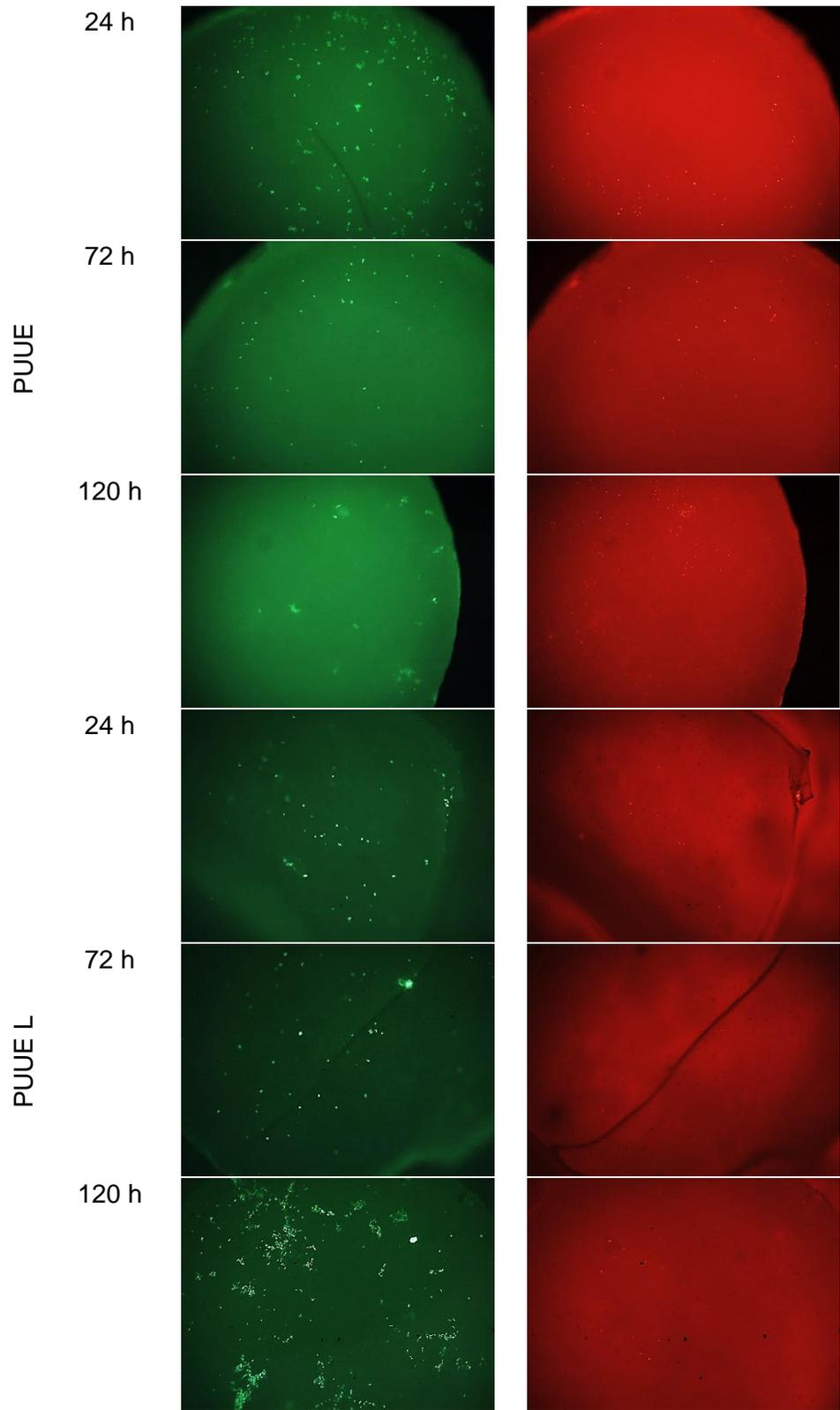
De los resultados obtenidos en la figura 16, a las 24 h las membranas Tecoflex L, PUUR C, PUUE y PUUR B tuvieron las áreas superficiales más amplias, sin diferencia significativa entre ellas. Sin embargo, tanto PUUR L y PUUE L obtuvieron bajos niveles de superficie celular. Al contrario del análisis de adhesión, esto se debe a la flotación parcial o completa de los andamios en el medio de cultivo durante el ensayo, lo que previno la interacción completa entre el material y el medio con células, reduciendo la respuesta biológica. Esto se repite en tomas posteriores, por lo que es necesario utilizar en ensayos futuros un método para la fijación del material al fondo del pocillo, otros trabajos con membranas poliméricas recurren al uso de anillos de acero inoxidable,<sup>105</sup> titanio<sup>106</sup> o vidrio.<sup>107</sup>

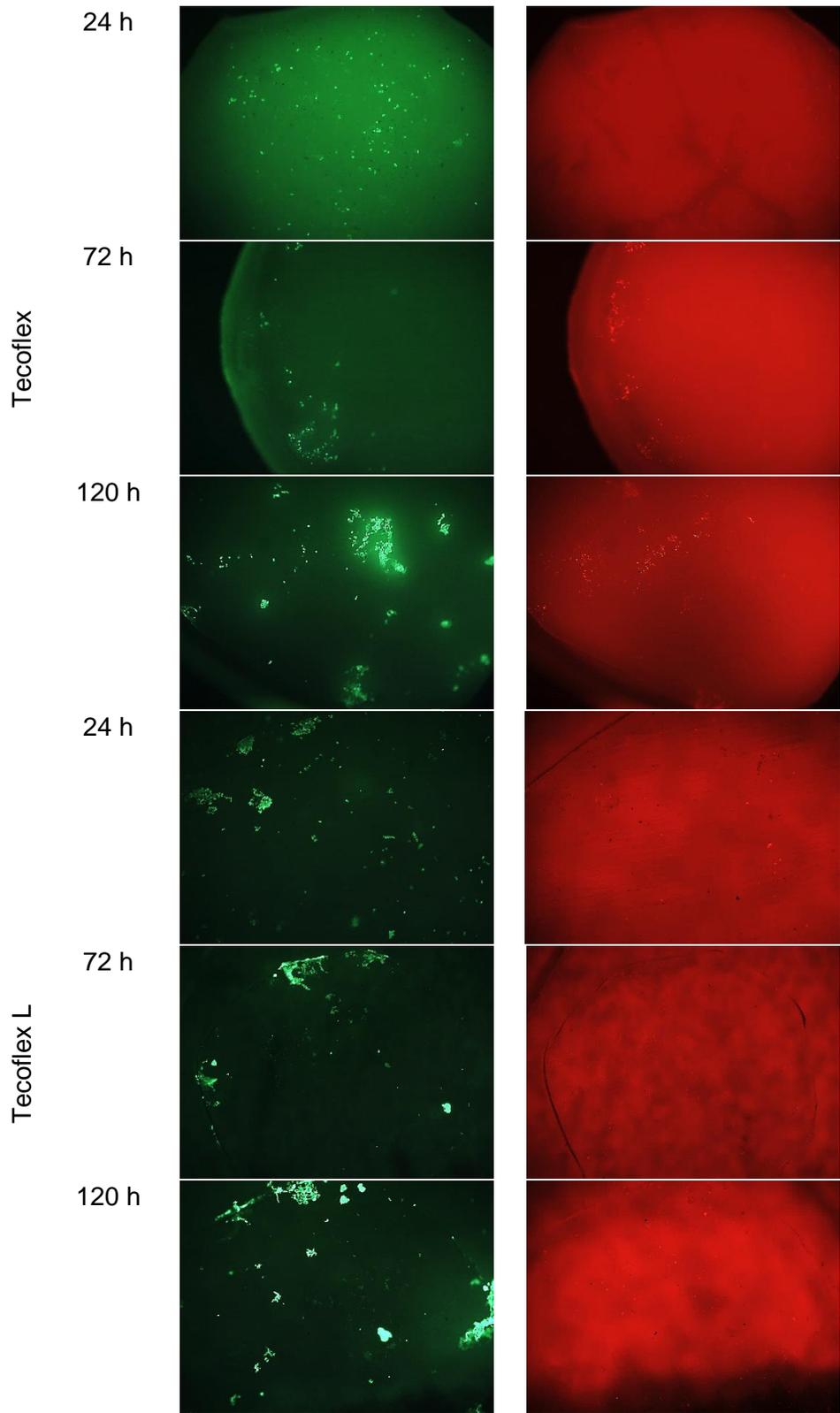
A las 72 h Tecoflex L, PUUR A y PUUR B tuvieron los valores más altos de área superficial fluorescente. Finalmente, al quinto día Tecoflex tuvo la mayor fluorescencia seguido por Tecoflex liso, PUUE L, PUUR B, PUUR C y PUUR A, los cuales no presentaron diferencia significativa entre sí. De estas membranas una de las más destacadas fue Tecoflex L, seguido de PUUR A y PUUR B, las cuales no tienen diferencia significativa entre sí mismas a lo largo del tiempo, por lo que se puede decir que se mantiene la cantidad de área en fluorescencia. A su vez, en la figura 15 se observa que hay mayor cantidad de células muertas en las membranas electrohiladas, por lo que se concluye que conforme las células proliferan una parte muere y la proliferación es baja para aumentar significativamente el área superficial, esto puede deberse a problemas con el disolvente o la desuniformidad de las membranas obtenidas.

Fue hasta el quinto día que el valor correspondiente para Tecoflex electrohilado aumentó significativamente. En general, la formación de fibras genera un aumento en el área superficial específica de un material y contribuye a una mayor adsorción de proteínas adhesivas, y por lo tanto contribuye a la adhesión de células en el polímero,<sup>102</sup> esto va de relacionado con los diámetros de fibra y demás. Se ha estipulado que el diámetro de poro ejerce una acción en la proliferación celular debido a que debe permitir la comunicación adecuada entre las células, diámetros mayores disminuyen la proliferación.<sup>62</sup> En cuanto al diámetro de fibra, fibroblastos decrecen su proliferación a diámetros mayores, siendo un rango de proliferación de 428 a 1,051 nm.<sup>61</sup> En el caso de materiales con beads, las células son capaces de adherirse y proliferar a menor escala debido a la menor cantidad de puntos focales de adhesión por desuniformidad del material.<sup>61</sup>

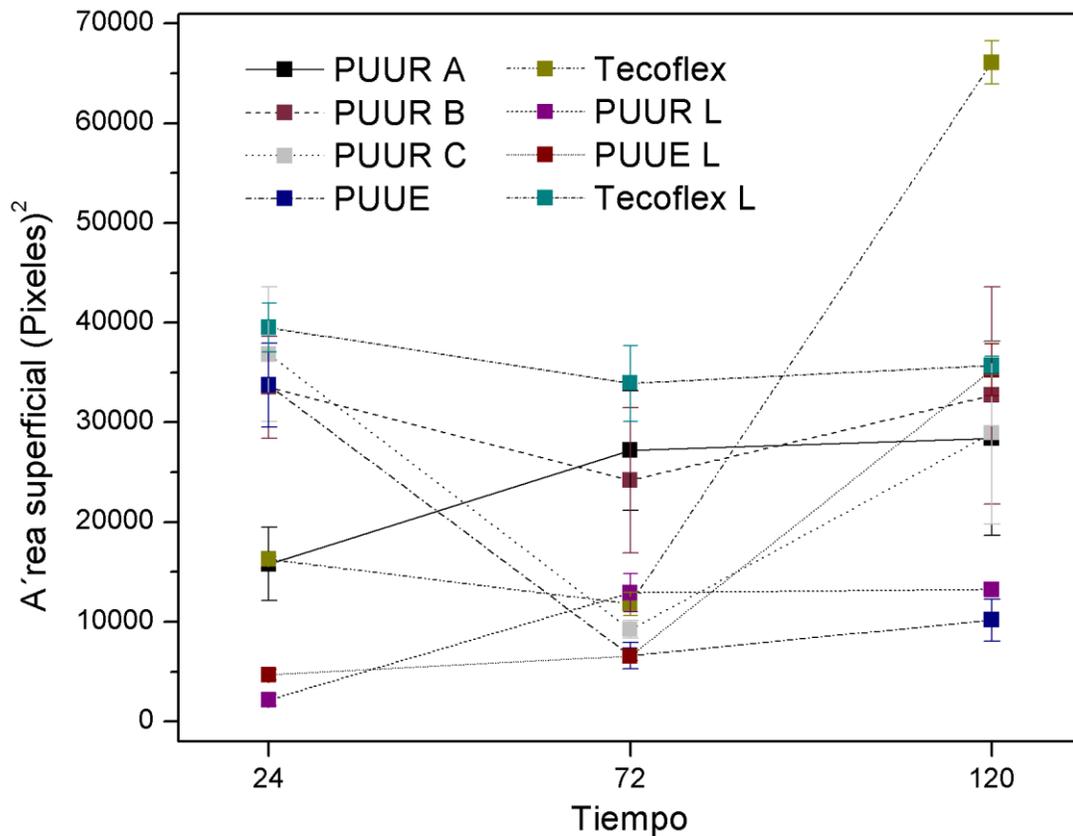








**Figura 16.-** Ensayo de proliferación con LIVE/DEAD de hFB a las 24, 72 y 120 h de incubación en membranas de poli(urea-uretano) con arginina (PUUR) a diferentes parámetros de electrohilado (A, B y C), poli(urea-uretano) con etilendiamina (PUUE) y Tecoflex, electrohiladas y lisas (L) lisas y electrohiladas.



**Figura 17.-** Área celular ocupada por células de fibroblastos vivas sobre membranas electrohiladas y lisas (L) de poli(urea-uretano) con arginina (PUUR) a diferentes parámetros de electrohilado (A, B y C), poli(urea-uretano) con etilendiamina (PUUE) y Tecoflex, a tres tiempos de incubación, 24, 72 y 120 h.

## CONCLUSIONES

Se caracterizó fisicoquímicamente el poli(urea-uretano) de arginina y se evidenció la incorporación del extensor arginina en su estructura.

Los parámetros de voltaje, concentración y flujo del electrohilado de PUUR A (20%, 18 kV, 1.2 mL h<sup>-1</sup>), PUUR B (15%, 20 kV, 0.8 mL h<sup>-1</sup>) y PUUR C (15%, 20 kV, 1.6 mL h<sup>-1</sup>) no favorecieron la formación homogénea de fibras, obteniéndose membranas aplanadas (PUUR A) o con aglomerados (PUUR B y PUUR C).

Las membranas poliméricas no son citotóxicas para hFB después de un tratamiento de lavado.

La adhesión celular, expresada como área superficial fluorescente, fue mayor en membrana de Tecoflex L que en membranas electrohiladas de PUUR A, B y C, debido a la formación de aglomerados en la superficie de estos últimos. Sin embargo, la proliferación celular al quinto día fue mayor en Tecoflex electrohilado, debido a la morfología de las fibras.

Las morfologías de las células sobre las membranas sugieren buena interacción célula-polímero. En Tecoflex L la morfología redonda de las células indica una menor interacción, mientras que la morfología y el recubrimiento encontrado en Tecoflex electrohilado indica una mayor interacción, lo cual sugiere una relación entre la formación de andamios fibrosos y su uso como andamiaje celular.

La incorporación de arginina como extendedor de cadena no demostró mejorar las capacidades de andamio celular de las membranas PUUR A, B y C, pero si mantuvo la viabilidad de hFB, por cinco días.

Se concluyó que la formación de membranas electrohiladas es un método eficaz para mejorar la respuesta celular de adhesión y proliferación de hFB. Siendo una morfología de fibras y sin aglomerados un factor determinante en la respuesta celular, que la composición del material con arginina.

## REFERENCIAS

- (1) Rassner, G. *Manual Y Atlas de Dermatología*, 5a ed.; Harcourt: Madrid, 1999; pp 5-9.
- (2) El-Serafi, A. T.; El-Serafi, I. T.; Elmasry, M.; Steinvall, I.; Sjöberg, F. Skin Regeneration in Three Dimensions, Current Status, Challenges and Opportunities. *Differentiation* **2017**, *96*, 26-29.
- (3) Zhong, S. P.; Zhang, Y. Z.; Lim, C. T. Tissue Scaffolds for Skin Wound Healing and Dermal Reconstruction. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 5, 510-525.
- (4) Vig, K.; Chaudhari, A.; Tripathi, S.; Dixit, S.; Sahu, R.; Pillai, S.; Dennis, V. A.; Singh, S. R. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 4, 789.
- (5) Liao, S.; Li, B.; Ma, Z.; Wei, H.; Chan, C.; Ramakrishna, S. Biomimetic Electrospun Nanofibers for Tissue Regeneration. *Biomed. Mater.* **2006**, *1*, 3, R45-53.
- (6) Hasan, A.; Pattanayek, S. K.; Pandey, L. M. Effect of Functional Groups of Self-Assembled Monolayers on Protein Adsorption and Initial Cell Adhesion. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 9, 3224-3233.
- (7) Perales-Alcacio, J. L. A.; Santa-Olalla Tapia, J.; Mojica-Cardoso, C.; Vargas-Coronado, R. F.; Chan-Chan, L. H.; Headen, D. M.; García, A. J.; Cervantes-Uc, J. M.; Cauich-Rodríguez, J. V. HUVEC Biocompatibility and Platelet Activation of Segmented Polyurethanes Prepared with Either Glutathione or Its Amino Acids as Chain Extenders. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2013**, *24*, 14, 1601-1617.
- (8) Haider, A.; Haider, S.; Kang, I. K. A Comprehensive Review Summarizing the Effect of Electrospinning Parameters and Potential Applications of Nanofibers in Biomedical and Biotechnology. *Arab. J. Chem.* **2015**, *11*, 8, 1165-1188.
- (9) Xu, Y.; Guan, J. Interaction of Cells with Polyurethane Scaffolds. En *Advances in Polyurethane Biomaterials*; Cooper, S. L., Guan, J., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridgeshire, 2016; pp 523-542.
- (10) Lorden, E. R.; Miller, K. J.; Ibrahim, M. M.; Bashirov, L.; Hammett, E.; Chakraborty, S.; Quiles-Torres, C.; Selim, M. A.; Leong, K. W.; Levinson, H. Biostable Electrospun Microfibrous Scaffolds Mitigate Hypertrophic Scar Contraction in an Immune-Competent Murine Model. *Acta Biomater.* **2016**, *1*, 32, 100-109.
- (11) Kim, S. E.; Heo, D. N.; Lee, J. B.; Kim, J. R.; Park, S. H.; Jeon, S. H.; Kwon, I. K. Electrospun Gelatin/polyurethane Blended Nanofibers for Wound Healing. *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 4, 44106.
- (12) Heo, D. N.; Yang, D. H.; Lee, J. B.; Bae, M. S.; Kim, J. H.; Moon, S. H.; Chun, H. J.; Kim, C. H.; Lim, H. N.; Kwon, I. K. Burn-Wound Healing Effect of Gelatin/polyurethane Nanofiber Scaffold Containing Silver-Sulfadiazine. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2013**, *9*, 3, 511-515.
- (13) Unnithan, A. R.; Barakat, N. A. M.; Tirupathi Pichiah, P. B.; Gnanasekaran, G.; Nirmala, R.; Cha, Y. S.; Jung, C. H.; El-Newehy, M.; Kim, H. Y. Wound-Dressing Materials with Antibacterial Activity from Electrospun Polyurethane-Dextran Nanofiber Mats Containing Ciprofloxacin HCl. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 4, 1786-1793.
- (14) Chen, J. P.; Chiang, Y. Bioactive Electrospun Silver Nanoparticles-Containing Polyurethane Nanofibers as Wound Dressings. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**,

- 10, 11, 7560-7564.
- (15) Chan-Chan, L. H. Síntesis, Caracterización, Degradación y Evaluación Biológica de Poli(uretano Urea)s Segmentados Biodegradables a Base de Aminoácidos. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Yucatán, Julio 2012.
  - (16) Wang, J.; Zheng, Z.; Chen, L.; Tu, X.; Wang, X. Glutathione-Responsive Biodegradable Poly(urea-Urethane)s Containing L-Cystine-Based Chain Extender. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2013**, *24*, 7, 831-848.
  - (17) Strong, A. L.; Neumeister, M. W.; Levi, B. Stem Cells and Tissue Engineering: Regeneration of the Skin and Its Contents. *Clin. Plast. Surg.* **2017**, *44*, 3, 635-650.
  - (18) Juárez-Moreno, J. A. Preparación de Un Material Compuesto Polidimetilsiloxano-Colágeno Con Uso Potencial Como Sustituto de Piel. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Yucatán, 2005.
  - (19) Wang, J.; Windbergs, M. Functional Electrospun Fibers for the Treatment of Human Skin Wounds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *119*, 283-299.
  - (20) Gantwerker, E. A.; Hom, D. B. Skin : Histology and Physiology of Wound Healing. *Clin. Plast. Surg.* **2012**, *39*, 1, 85-97.
  - (21) Singer, A. J.; Simon, M. Wound Healing and Skin Substitutes. En *Stem Cell and Gene-Based Therapy*; Battler, A., Leor, J., Eds.; Springer: London, 2006; pp 375-393.
  - (22) Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston, G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 8, 2892-2923.
  - (23) Abrigo, M.; McArthur, S. L.; Kingshott, P. Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 6, 772-792.
  - (24) Vyas, K.; Vasconez, H. Wound Healing: Biologics, Skin Substitutes, Biomembranes and Scaffolds. *Healthcare* **2014**, *2*, 3, 356-400.
  - (25) Gabriel, L. P.; Rodrigues, A. A.; Jardim, A. L.; Filho, M. From Biodegradable to Long-Term Polyurethanes : In Vitro Fibroblasts Adhesion and Degradation Study of Electrospun Polyurethane Membranes. **2016**, *6*, 7, 13-19.
  - (26) Xu, C.; Huang, Y.; Wu, J.; Tang, L.; Hong, Y. Triggerable Degradation of Polyurethanes for Tissue Engineering Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 36, 20377-20388.
  - (27) Fong, P. H.; Wong, K. L. Opsite, a Synthetic Burns Dressing. *Ann. Acad. Med. Singapore* **1985**, *14*, 2, 387-390.
  - (28) Caracciolo, P. C.; Abraham, G. A. Poliuretanos Biomédicos: Síntesis, Propiedades, Procesamiento Y Aplicaciones. En *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados*; Sousa, H., Braga, M. E. M., Sosnik, A., Eds.; Imprensa da Universidade de Coimbra: Coimbra, 2017; pp 147–181.
  - (29) Szycher, M. *Szycher's Handbook of Polyurethanes*, 2a ed.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2012; pp 13-36.
  - (30) Vilar, W. Livro química e tecnologia dos poliuretanos <http://www.poliuretanos.com.br/Ingles/Chapter2/21Additives.htm> (consultado Diciembre 2017)
  - (31) Shah, P. N.; Smolen, J. A.; Gupta, A. S.; Yun, Y. H. Electrospun Pseudo Poly (Amino Acids) for Tissue Engineering Applications. En *Nanotechnology in Tissue*

- Engineering and Regenerative Medicine*; Popat, K., Ed.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2010; pp 1-3.
- (32) Chan-Chan, L. H.; Solis-Correa, R.; Vargas-Coronado, R. F.; Cervantes-Uc, J. M.; Cauch-Rodríguez, J. V.; Quintana, P.; Bartolo-Pérez, P. Degradation Studies on Segmented Polyurethanes Prepared with HMDI, PCL and Different Chain Extenders. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 6, 2035-2044.
  - (33) Chan-Chan, L. H.; Tkaczyk, C.; Vargas-Coronado, R. F.; Cervantes-Uc, J. M.; Tabrizian, M.; Cauch-Rodríguez, J. V. Characterization and Biocompatibility Studies of New Degradable Poly(urea)urethanes Prepared with Arginine, Glycine or Aspartic Acid as Chain Extenders. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 7, 1733-1744.
  - (34) Touchet, T. J.; Cosgriff-Hernandez, E. M. Hierarchal Structure-Property Relationships of Segmented Polyurethanes. In *Advances in Polyurethane Biomaterials*; Cooper, S. L., Guan, J., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridgeshire, 2016; pp 11-22.
  - (35) Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. RGD Modified Polymers: Biomaterials for Stimulated Cell Adhesion and beyond. *Biomaterials* **2003**, *24*, 24, 4385-4415.
  - (36) Shin, H.; Jo, S.; Mikos, A. G. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. *Biomaterials* **2003**, *24*, 24, 4353-4364.
  - (37) Chen, S.; Liu, B.; Carlson, M. A.; Gombart, A. F.; Reilly, D. A.; Xie, J. Recent Advances in Electrospun Nanofibers for Wound Healing. *Nanomedicine* **2017**, *12*, 11, 1335-1352.
  - (38) Baynes, J. E.; Dominiczac, M. H. *Bioquímica Médica*, 4a ed; Elsevier, 2015; pp 385-391.
  - (39) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 5a ed; Omega, 2005; pp 388.
  - (40) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. Cell Attachment Activity of Fibronectin Can Be Duplicated by Small Synthetic Fragments of the Molecule. *Nature* **1984**.
  - (41) Humphries, J. D. Integrin Ligands at a Glance. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 3901-3903.
  - (42) Skarja, G. A.; Woodhouse, K. A. Synthesis and Characterization of Degradable Polyurethane Elastomers Containing an Amino Acid-Based Chain Extender. *J. Biomater. Sci. Ed.* **1998**, *9*, 3, 271-295.
  - (43) Parrag, I. C.; Woodhouse, K. A. Development of Biodegradable Polyurethane Scaffolds Using Amino Acid and Dipeptide-Based Chain Extenders for Soft Tissue Engineering. *J. Biomater. Sci.* **2010**, *21*, 843-862.
  - (44) Wang, D.-A.; Feng, L.-X.; Ji, J.; Sun, Y.-H.; Zheng, X.-X.; Elisseeff, J. H. Novel Human Endothelial Cell-Engineered Polyurethane Biomaterials for Cardiovascular Biomedical Applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *65*, 4, 498-510.
  - (45) Hong, Y. Electrospun Fibrous Polyurethane Scaffolds in Tissue Engineering. En *Advances in Polyurethane Biomaterials*; Cooper, S. L., Guan, J., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridgeshire, 2016; pp 543-559.
  - (46) Khajavi, R.; Abbasipour, M. Controlling Nanofiber Morphology by the Electrospinning Process. En *Electrospun Nanofibers*; 2016; pp 109-123.
  - (47) Akduman, C.; Kumbasar, E. P. A. Electrospun Polyurethane Nanofibers. En *Aspects of Polyurethanes*; Yilmaz, F., Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2017; pp 17-52
  - (48) Gabriel, L. P.; Rodrigues, A. A.; Macedo, M.; Jardini, A. L.; Maciel Filho, R. Electrospun Polyurethane Membranes for Tissue Engineering Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *72*, 113-117.
  - (49) Subbiah, T.; Bhat, G. S.; Tock, R. W.; Parameswaran, S.; Ramkumar, S. S.

- Electrospinning of Nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, 96, 2, 557-569.
- (50) Haghi, A. K.; Akbari, M. Trends in Electrospinning of Natural Nanofibers. *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.* **2007**, 204, 6, 1830-1834.
- (51) Kijeńska, E.; Swieszkowski, W. General Requirements of Electrospun Materials for Tissue Engineering: Setups and Strategy for Successful Electrospinning in Laboratory and Industry. En *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications: Research, Design and Commercialization*; Uyar, T., Kny, E., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridgeshire, 2017; pp 43-56.
- (52) Pillay, V.; Dott, C.; Choonara, Y. E.; Tyagi, C.; Tomar, L.; Kumar, P.; Du Toit, L. C.; Ndesendo, V. M. K. A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *J. Nanomater.* **2013**, 2013, 1-22.
- (53) Carlberg, B.; Axell, M. Z.; Nannmark, U.; Liu, J.; Kuhn, H. G. Electrospun Polyurethane Scaffolds for Proliferation and Neuronal Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Biomed. Mater.* **2009**, 4, 4, 045004.
- (54) Mi, H. Y.; Jing, X.; Salick, M. R.; Cordie, T. M.; Peng, X. F.; Turng, L. S. Properties and Fibroblast Cellular Response of Soft and Hard Thermoplastic Polyurethane Electrospun Nanofibrous Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2015**, 103, 5, 960-970.
- (55) Khil, M. S.; Cha, D. I.; Kim, H.-Y.; Kim, I.-S.; Bhattarai, N. Electrospun Nanofibrous Polyurethane Membrane as Wound Dressing. *J. Biomed. Mater. Res Part B Appl. Biomater.* **2003**, 67, 2, 675-679.
- (56) Grasl, C.; Bergmeister, H.; Stoiber, M.; Schima, H.; Weigel, G. Electrospun Polyurethane Vascular Grafts: In Vitro Mechanical Behavior and Endothelial Adhesion Molecule Expression. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, 93, 2, 716-723.
- (57) Han, J.; Cao, R. W.; Chen, B.; Ye, L.; Zhang, A. Y.; Zhang, J.; Feng, Z. G. Electrospinning and Biocompatibility Evaluation of Biodegradable Polyurethanes Based on L-Lysine Diisocyanate and L-Lysine Chain Extender. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, 96, 4, 705-714.
- (58) Soletti, L.; Hong, Y.; Guan, J.; Stankus, J. J.; El-Kurdi, M. S.; Wagner, W. R.; Vorp, D. A. A Bilayered Elastomeric Scaffold for Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts. *Acta Biomater.* **2010**, 6, 1, 110-22.
- (59) Zhuo, H.; Hu, J.; Chen, S.; Yeung, L. Preparation of Polyurethane Nanofibers by Electrospinning. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, 109, 1, 406-411.
- (60) Mondal, S. Influence of Solvents Properties on Morphology of Electrospun Polyurethane Nano Fiber Mats. *Polym. Adv. Technol.* **2014**, 25, 179-183.
- (61) Chen, M.; Patra, P. K.; Warner, S. B.; Bhowmick, S. Role of Fiber Diameter in Adhesion and Proliferation of NIH 3T3 Fibroblast on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds. *Tissue Eng.* **2007**, 13, 3, 579-587.
- (62) Lowery, J. L.; Datta, N.; Rutledge, G. C. Effect of Fiber Diameter, Pore Size and Seeding Method on Growth of Human Dermal Fibroblasts in Electrospun Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Fibrous Mats. *Biomaterials* **2010**, 31, 3, 491-504.
- (63) Schneider, G. B.; English, A.; Abraham, M.; Zaharias, R.; Stanford, C.; Keller, J. The Effect of Hydrogel Charge Density on Cell Attachment. *Biomaterials* **2004**, 25, 15, 3023-3028.
- (64) Wee-Eong. ElectrospinTech. Wound Dressing from Electrospinning <http://electrospintech.com/wounddressing.html#WjEJSUqWbIU> (consultado enero 2018)

- (65) Whang, K.; Thomas, C. H.; Healy, K. E.; Nuber, G. A Novel Method to Fabricate Bioabsorbable Scaffolds. *Polymer (Guildf)*. **1995**, *36*, 4, 837-842.
- (66) Chen, H.; Peng, Y.; Wu, S.; Tan, L. Electrospun 3D Fibrous Scaffolds for Chronic Wound Repair. *Materials (Basel)*. **2016**, *9*, 4, 272.
- (67) Huang, A.; Jiang, Y.; Napiwocki, B.; Mi, H.; Peng, X.; Turng, L. S. Fabrication of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Tissue Engineering Scaffolds with Fibrillated and Interconnected Pores Utilizing Microcellular Injection Molding and Polymer Leaching. *RSC Adv*. **2017**, *7*, 69, 43432-43444.
- (68) Wendorff, J. H.; Agarwal, S.; Greiner, A. *Electrospinning: Materials, Processing, and Applications*; Wiley: Weinheim, 2012; pp 103-124.
- (69) Yekrang, J.; Semnani, D.; Beigi, M. H.; Karbasi, S. Electrospinning of Aligned Medical Grade Polyurethane Nanofibers and Evaluation of Cell-Scaffold Interaction Using SHED Stem Cells. *Micro Nano Lett*. **2017**, *12*, 6, 1-6.
- (70) Kumbar, S. G.; Nukavarapu, S. P.; James, R.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Electrospun Poly(lactic Acid-Co-Glycolic Acid) Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Biomaterials* **2008**, *29*, 30, 4100-4107.
- (71) Bashur, C. A.; Shaffer, R. D.; Dahlgren, L. A.; Guelcher, S. A.; Goldstein, A. S. Effect of Fiber Diameter and Alignment of Electrospun Polyurethane Meshes on Mesenchymal Progenitor Cells. *Tissue Eng. Part A* **2009**, *15*, 9, 2435-2445.
- (72) Menzies, K. L.; Jones, L. The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials. *Optom. Vis. Sci*. **2010**, *87*, 6, 387-399.
- (73) Lotfi, M.; Nejib, M.; Naceur, M. Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility. En *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*; Pignatello, R., Ed.; InTechOpen: Rijeka, 2013; pp 207-240.
- (74) Szewczyk, P. K.; Ura, D. P.; Metwally, S.; Knapczyk-Korczak, J.; Gajek, M.; Marzec, M. M.; Bernasik, A.; Stachewicz, U. Roughness and Fiber Fraction Dominated Wetting of Electrospun Fiber-Based Porous Meshes. *Polymers (Basel)*. **2018**, *11*, 1, 34.
- (75) Augustine, R.; Dominic, E. A.; Reju, I.; Kaimal, B.; Kalarikkal, N.; Thomas, S. Electrospun Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)-Based Skin Substitutes: In Vivo Evaluation of Wound Healing and the Mechanism of Cell Proliferation. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater*. **2015**, *103*, 7, 1445-1454.
- (76) Tamada, Y.; Ikada, Y. Cell Adhesion to Plasma-Treated Polymer Surfaces. *Polymer*. **1993**, *34*, 10, 2208-2212.
- (77) Chandrasekaran, A. R.; Venugopal, J.; Sundarajan, S.; Ramakrishna, S. Fabrication of a Nanofibrous Scaffold with Improved Bioactivity for Culture of Human Dermal Fibroblasts for Skin Regeneration. *Biomed. Mater*. **2011**, *6*, 1, 015001.
- (78) Bastidas, O. *Cell Counting with Neubauer Chamber Basic Hemocytometer*; Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting; 2011.
- (79) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 1-2, 55-63.
- (80) Escobar M., L.; Rivera, A.; Aristizábal G., F. A. Estudio Comparativo de Los Métodos de Resazurina Y MTT En Estudios de Citotoxicidad En Líneas Celulares TumORAles Humanas. *Vitae* **2010**, *17*, 1, 67-74.
- (81) Invitrogen Molecular Probes; LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for Mammalian Cells (consultado Mayo 2018), *número Cat. MP 03224*.
- (82) Vocetkova, K.; Buzgo, M.; Sovkova, V.; Rampichova, M.; Staffa, A.; Filova, E.;

- Lukasova, V.; Doupnik, M.; Fiori, F.; Amler, E. A Comparison of High Throughput Core-shell 2D Electrospinning and 3D Centrifugal Spinning Techniques to Produce Platelet Lyophilisate-Loaded Fibrous Scaffolds and Their Effects on Skin Cells. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 85, 53706-53719.
- (83) Behera, P. K.; Mondal, P.; Singha, N. K. Polyurethane with an Ionic Liquid Crosslinker: A New Class of Super Shape Memory-like Polymers. *Polym. Chem.* **2018**, *9*, 31, 4205-4217.
- (84) Kavanaugh, T. E.; Clark, A. Y.; Herna, M. C. F.; Cauich-rodri, J. V. Human Mesenchymal Stem Cell Behavior on Segmented Polyurethanes Prepared with Biologically Active Chain Extenders. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, *27*, 2, 1-11.
- (85) Günzler, H.; Gremlich, H. U. *IR Spectroscopy: An Introduction*, 1a ed.; Wiley: Reino Unido, 2002.
- (86) Cetina-Diaz, S. M.; Chan-Chan, L. H.; Vargas-Coronado, R. F.; Cervantes-Uc, J. M.; Quintana-Owen, P.; Paakinaho, K.; Kellomaki, M.; Di Silvio, L.; Deb, S.; Cauich-Rodríguez, J. V. Physicochemical Characterization of Segmented Polyurethanes Prepared with Glutamine or Ascorbic Acid as Chain Extenders and Their Hydroxyapatite Composites. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 14, 1966-1976.
- (87) Pergal, M. V.; Dzunuzovic, J. V.; Kicanovic, M.; Vodnik, V. V.; Pergal, M. M.; Jovanovic, S. Thermal Properties of Poly ( Urethane Ester Siloxane ) S Based on Hyperbranched Polyester 1. *Russ. J. Phys. Chem.* **2011**, *85*, 13, 2251-2256.
- (88) Kloss, J.; Munaro, M.; De Souza, G. P.; Gulmine, J. V.; Wang, S. H.; Zawadzki, S.; Akcelrud, L. Poly(ester Urethane)s with Polycaprolactone Soft Segments: A Morphological Study. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2002**, *40*, 23, 4117-4130.
- (89) Barrera-Rivera, K. A.; Flores-Carreón, A.; Martínez-Richa, A. Enzymatic Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone by a New Lipase from *Yarrowia Lipolytica*. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *109*, 2, 708-719.
- (90) Sang, L.; Wei, Z.; Liu, K.; Wang, X.; Song, K.; Wang, H.; Qi, M. Biodegradable Radiopaque Iodinated Poly(ester Urethane)s Containing Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Blocks: Synthesis, Characterization, and Biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2014**, *102*, 4, 1121-1130.
- (91) Yamashita, Y.; Tanaka, A.; Ko, F. Characteristics of Elastomeric Nanofiber Membranes Produced by Electrospinning. *J. Text. Eng.* **2004**, *53*, 4, 137-142.
- (92) Wang, C.; Wang, M. Dual-Source Dual-Power Electrospinning and Characteristics of Multifunctional Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 10, 2381-2397.
- (93) Truong, J. B.; Glattauer, V.; Lang, G.; Hands, K.; Kyratzis, I. L.; Werkmeister, J. A.; Ramshaw, J. A. M. A Comparison of the Effects of Fibre Alignment of Smooth and Textured Fibres in Electrospun Membranes on Fibroblast Cell Adhesion. *Biomed. Mater.* **2010**, *5*, 2, 1-7.
- (94) M., P.; M., H.; Y.L., S.; J., K.; H., B. Use of Human Keratinocyte and Fibroblast Cultures for Toxicity Studies of Topically Applied Compounds. *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79*, 4, 312-316.
- (95) Boyle, C. C.; Hickman, J. A. Toxin-Induced Increase in Survival Factor Receptors: Modulation of the Threshold for Apoptosis. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 12, 2404-2409.
- (96) Phenomenex; Solvent miscibility table/ Solvent polarity chart (consultado Mayo 2019).
- (97) Safaei, R.; Divsalar, A.; Eidi, A.; Ardeshiryajimi, A. Biological Behavior Study of Gelatin Coated PCL Nanofibrous Electrospun Scaffolds Using Fibroblasts. *J. Paramed. Sci.* **2013**, *5*, 1, 67-73.

- (98) Hiep, N. T.; Lee, B. T. Electro-Spinning of PLGA/PCL Blends for Tissue Engineering and Their Biocompatibility. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21*, 6, 1969-1978.
- (99) Wang, H.; Han, A.; Cai, Y.; Xie, Y.; Zhou, H.; Long, J.; Yang, Z. Multifunctional Biohybrid Hydrogels for Cell Culture and Controlled Drug Release. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7448-7450.
- (100) Sarker, B.; Singh, R.; Silva, R.; Roether, J. A.; Kaschta, J.; Detsch, R.; Schubert, D. W.; Cicha, I.; Boccaccini, A. R. Evaluation of Fibroblasts Adhesion and Proliferation on Alginate-Gelatin Crosslinked Hydrogel. *PLoS One* **2014**, *9*, 9, e107952.
- (101) Kim, S. H.; Ha, H. J.; Ko, Y. K.; Yoon, S. J.; Rhee, J. M.; Kim, M. S.; Lee, H. B.; Khang, G. Correlation of Proliferation, Morphology and Biological Responses of Fibroblasts on LDPE with Different Surface Wettability. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, *18*, 5, 609-622.
- (102) Chen, X.; Wang, L.; Wang, H. The Convergence of Biomimetic Nanofibers and Cells for Functional Tissue Formation. En *Tissue Regeneration: Where Nano-Structure Meets Biology*; World Scientific Pub Co Inc: Singapore, 2014; pp 435-462.
- (103) Karp, G. *Biologia Celular Y Molecular: Conceptos Y Experimentos*, 6 ed.; McGraw Hill: México, 2011; pp 248.
- (104) Chowdhury, A. K. M. R. H.; Tavangar, A.; Tan, B.; Venkatakrisnan, K. Biofunctionalized 3-D Carbon Nano-Network Platform for Enhanced Fibroblast Cell Adhesion. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1, 44250.
- (105) Mi, H.-Y.; Palumbo, S.; Jing, X.; Turng, L.-S.; Li, W.-J.; Peng, X.-F. Thermoplastic Polyurethane/hydroxyapatite Electrospun Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Effects of Polymer Properties and Particle Size. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2014**, *102*, 7, 1434-1444.
- (106) Chen, S.; Hao, Y.; Cui, W.; Chang, J.; Zhou, Y. Biodegradable Electrospun PLLA/chitosan Membrane as Guided Tissue Regeneration Membrane for Treating Periodontitis. *J. Mater. Sci.* **2013**, *48*, 19, 6567-6577.
- (107) Fuchs, A.; Youssef, A.; Seher, A.; Hochleitner, G.; Dalton, P. D.; Hartmann, S.; Brands, R. C.; Müller-Richter, U. D. A.; Linz, C. Medical-Grade Polycaprolactone Scaffolds Made by Melt Electrospinning Writing for Oral Bone Regeneration – a Pilot Study in Vitro. *BMC Oral Health* **2019**, *19*, 1, 28.



