

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

The seal of the University of Sonora is a circular emblem. It features a central shield with a sunburst at the top, a banner with the motto "TODO LO LUMINAN", and a central figure holding a staff. The shield is surrounded by a wreath and the text "UNIVERSIDAD DE SONORA" in a circular border.

**PREPARACIÓN DE MEMBRANAS FIBROSAS POR LA TÉCNICA DE
ELECTROHILADO COAXIAL PARA SU USO POTENCIAL EN
INGENIERÍA DE TEJIDO**

Que para obtener el título de
MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES

Presenta

Q.B.C. ANA GABRIELA MONTAÑO FIGUEROA

HERMOSILLO, SONORA

Febrero de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo general	3
1.1.2. Objetivos particulares	3
CAPÍTULO 2	
ANTECEDENTES	5
2.1. Ingeniería de tejidos	5
2.2. Andamios para regeneración de tejidos	7
2.3. Infarto al miocardio, remodelación ventricular y falla cardiaca	12
2.4. Reparación del miocardio	13
2.5. Biomateriales para regeneración de tejido cardiaco	14
2.6. Técnicas para generar andamios	16
2.6.1. Electrohilado	16
2.6.1.1. Variables en el proceso de electrohilado	17
2.6.1.2. Tipos de arreglos	20
2.6.1.3. Epicatequina	23
2.6.2. Lixiviado de partículas (particulate leaching)	25
2.6.3. Gel casting	25
2.6.4. Moldeo con disolvente (solvent casting)	26
2.6.5. Separación de fases	26

2.6.6.	Fabricación de sólidos en forma libre (SFF)	27
2.7.	Sistemas poliméricos	28
2.7.1.	Poli(vinil pirrolidona) (PVP)	28
2.7.2.	Acetato de celulosa (AC)	29
2.7.3.	Poli(ácido láctico) (PLA)	31
2.8.	Técnicas de caracterización	32
2.8.1.	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	32
2.8.2.	Microscopía electrónica de transmisión (MET)	34
2.8.3.	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	36
2.8.4.	Espectroscopia ultravioleta-visible	38
2.8.5.	Análisis térmico	39
2.8.6.	Ángulo de contacto	40
2.8.7.	Tinción histológica con hematoxilina-eosina (H&E)	41
CAPÍTULO 3		
EXPERIMENTAL		
		43
3.1.	Materiales	43
3.2.	Metodología	44
3.2.1.	Preparación de membranas fibrosas poliméricas	44
3.2.2.	Cinética de liberación del flavonoide en agua grado miliQ	47
3.2.3.	Cinética de liberación del flavonoide en el medio de cultivo MesenCult	48
3.3.	Técnicas de caracterización	49
3.3.1.	Microscopía electrónica de barrido	49
3.3.2.	Microscopía electrónica de transmisión	49
3.3.3.	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier	50
3.3.4.	Análisis termogravimétrico	50
3.3.5.	Ángulo de contacto	50

3.4.	Efecto de los andamios fibrosos sobre el corazón de ratas Wistar	51
3.4.1.	Tinción con hematoxilina-eosina	52
CAPÍTULO 4		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		54
4.1.	Condiciones óptimas de preparación del material 1	54
4.2.	Cinética de liberación del material 1 en agua miliQ	55
4.3.	Cinética de liberación del material 1 en medio de cultivo mesenCult	56
4.4.	Caracterización del material 1	57
4.4.1.	Morfología por microscopía electrónica de barrido	57
4.4.2.	Estructura núcleo-coraza por microscopía electrónica de transmisión	59
4.4.3.	Análisis de componentes por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier	61
4.4.4.	Pérdida de peso por termogravimetría	63
4.5.	Análisis histológico por tinción con H&E del material 1 implantado en el miocardio de ratas Wistar	65
4.6.	Condiciones óptimas de preparación del material 2	69
4.7.	Cinética de liberación del material 2 en medio de cultivo mesenCult	70
4.8.	Caracterización del material 2	72
4.8.1.	Morfología por microscopía electrónica de barrido	72
4.8.2.	Estructura núcleo-coraza por microscopía electrónica de transmisión	74
4.8.3.	Análisis de componentes por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier	76
4.8.4.	Pérdida de peso por termogravimetría	78
4.8.5.	Hidrofobicidad por ángulo de contacto del material 2	79
4.9.	Análisis histológico por tinción con H&E del material 1 implantado en el miocardio de ratas Wistar	80

CAPÍTULO 5	
CONCLUSIONES	84
RECOMENDACIONES	85
REFERENCIAS	86
ANEXOS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura		
1	Representación esquemática del proceso de electrohilado	16
2	(a) Esquema de configuración de aguja lado a lado y (b) esquema de configuración de agujas coaxiales	21
3	Estructura de la epicatequina	23
4	Estructura de la poli(vinil pirrolidona)	29
5	Estructura del acetato de celulosa	30
6	Estructura del poli (ácido láctico)	32
7	Diagrama del microscopio electrónico de barrido	34
8	Esquema de los principales componentes de un microscopio electrónico de transmisión	35
9	Representación gráfica de la generación de IAM tras la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior	52
10	Liberación de (-) epicatequina del material 1 en agua miliQ. Porcentaje de liberación contra tiempo	55
11	Liberación de (-)-epicatequina del material 1 en mesenCult. Porcentaje de liberación contra tiempo	56
12	Micrografía de AC/PVP+Epicatequina/AC en a) 500x, b) 5000x y c) 7500x	58
13	Micrografía de AC/PVP+Epicatequina/AC a 5000x	59

14	Micrografía AC/PVP+Epicatequina/AC después del proceso de liberación del flavonoide. 5000x	60
15	Espectros de infrarrojo de a) AC, b) PVP, c) (-) Epicatequina, d) AC/PVP+Epicatequina/AC y e) después de liberar en agua miliQ	62
16	Termograma de la membrana del material 1	63
17	Termograma de AC y PVP	64
18	(a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 1 a los 5 días, a diferentes aumentos. (d) (e) y (f) imágenes del grupo control a los 5 días	66
19	(a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 1 a los 10 días, a diferentes aumentos. (d) (e) y (f) imágenes del grupo control a los 10 días	67
20	(a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 1 a los 15 días, a diferentes aumentos. (d) (e) y (f) imágenes del grupo control a los 15 días	68
21	Liberación de (-)-epicatequina del material 2 en mesenCult. Porcentaje de liberación contra tiempo	71
22	Micrografía de PLA/PVP+Epicatequina/PLA en a) 500x, b) 5000x y c) 5500x	73
23	Micrografía de PLA/PVP+Epicatequina/PLA (a) población de diámetros pequeños y (b) población de diámetros grandes. 4000x	74
24	Microfotografía de una fibra de PLA/PVP+Epicatequina/PLA, después de su liberación en el medio de cultivo mesenCult. 4000x	75
25	Espectros de infrarrojo de a) PLA, b) PVP, c) (-)-Epicatequina y d) PLA/PVP+Epicatequina/PLA y e) después de liberar en mesenCult.	77
26	Termograma de la membrana del material 2	78

27	Termograma de PLA y PVP	79
28	(a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 2 a los 5 días, a diferentes aumentos	81
29	(a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 2 a los 10 días, a diferentes aumentos	82
30	(a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 2, a los 15 días, a diferentes aumentos	83

LISTA DE TABLAS

Tabla

1	Polímeros sintéticos y naturales usados en la producción de nano y microfibras para su uso en ingeniería de tejido	9
2	Efecto de los parámetros del proceso de electrohilado sobre la morfología de la fibra	19
3	Condiciones usadas en la preparación de membranas con estructura AC/PVP+Epicatequina/AC	46
4	Condiciones usadas en la preparación de membranas con estructura PLA/PVP+Epicatequina/PLA	47
5	Condiciones óptimas para la formación de fibras de AC/PVP+Epicatequina/AC	54
6	Condiciones óptimas para la formación de fibras de PLA/PVP+Epicatequina/PLA	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ECV	Enfermedad cardiovascular
OMS	Organización Mundial de la Salud
IT	Ingeniería de tejidos
MEC	Matriz extracelular
3D	Tridimensional
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poliácido (D-L- láctico-co-glicólico)
PVA	Poli (vinil alcohol)
PCL	Policaprolactona
NTCs	Nanotubos de carbono
FDA	Food and Drug Administration
IAM	Infarto agudo al miocardio
VI	Ventrículo izquierdo
CMM	Células madre mesenquimales
AC	Acetato de celulosa
PVP	Poli (vinil pirrolidona)
NO	Oxido nítrico
eNOS	Oxido nítrico sintasa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
NaCl	Cloruro de Sodio
SFF	Solid freeform fabrication
DAC	Diseño asistido por computadora
TC	Tomografía computarizada
RMD	Resonancia magnética de datos
SL	Estereolitografía
MOL	Manufactura de objetos laminados
SSL	Sinterización selectiva por láser
MDF	Modelado por deposición fundida
3DP	Impresión en 3 dimensiones
DMF	Dimetilformamida
MEB	Microscopio electrónico de barrido
MET	Microscopio electrónico de transmisión
PD	Patrón de difracción

IR	Infrarrojo
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier
UV-VIS	Ultravioleta visible
TGA	Análisis termogravimétrico
H&E	Hematoxilina-eosina
TFE	Trifluoretanol
KBr	Bromuro de potasio
HE	Hematoxilina
EO	Eosina

RESUMEN

Durante los pasados treinta años, las enfermedades cardiovasculares (ECV) han aumentado sustancialmente en los países en desarrollo, el infarto al miocardio es la enfermedad más común de las ECV. Debido a la limitada capacidad de auto renovación de los cardiomiocitos adultos, y al escaso número de progenitores cardiacos, el corazón humano después de sufrir una ECV, muestra una habilidad insuficiente para restaurar la función y estructura cardiaca. Para encontrar un reemplazo calificado, sin herir otras partes del cuerpo del paciente, surge el tema de la ingeniería de tejido (IT). El campo de IT cardiovascular ha recibido recientemente mucha atención, como una nueva modalidad terapéutica para tratar los daños al corazón.

En este trabajo se muestra la factibilidad de preparar andamios para el área de ingeniería de tejidos, a través de la técnica de electrohilado coaxial. Para lo cual se prepararon andamios fibrosos de estructura núcleo coraza con epicatequina incorporada dentro de la fibra, a partir de acetato de celulosa (AC), poli(vinil pirrolidona) (PVP) y poli(ácido láctico) (PLA), los cuales fueron posteriormente caracterizados por microscopia electrónica de barrido, (MEB), espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico y medición del ángulo de contacto. Se encontraron las condiciones óptimas para la preparación de dos tipos de materiales, el primero de ellos compuesto por AC/PVP+Epicatequina/AC, donde el diámetro de las fibras obtenidas fue de aproximadamente 1 μm . Adicionalmente se midió la tasa de liberación del flavonoide

en agua alcanzando un porcentaje de liberación final de 80.74%, mientras que en un medio de cultivo, este porcentaje se redujo hasta el 31%. La formación de la estructura núcleo-coraza fue corroborada por el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) para este material, y también para el conformado por PLA/PVP+Epicatequina/PLA, el cual tuvo un porcentaje de liberación final en el medio de cultivo mesenCult de 88%. Las fibras obtenidas en esta ocasión aumentaron hasta casi los 2 μm de diámetro. Ambos materiales fueron probados en el corazón infartado de ratas Wistar, encontrándose una buena respuesta regenerativa por parte del tejido cardiaco hacia el material 2, lo cual lo hace un mejor candidato para su aplicación en el campo de la ingeniería de tejido cardiaco.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Durante los pasados treinta años, las enfermedades cardiovasculares (ECV) han aumentado sustancialmente en los países en desarrollo, el infarto al miocardio es la enfermedad más común de las ECV. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad y el accidente cerebrovascular, cobran 17.5 millones de vidas al año en el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa.¹

Debido a la limitada capacidad de auto renovación de los cardiomiocitos adultos, y al escaso número de progenitores cardiacos, el corazón humano después de sufrir una ECV, muestra una habilidad insuficiente para restaurar la función y estructura cardiaca. En los últimos años, los ensayos clínicos para el tratamiento de las lesiones graves del corazón, se han centrado principalmente en el trasplante de células. Dicho enfoque, ha mostrado un éxito moderado, debido a una serie de limitaciones, entre las cuales se incluyen, por ejemplo, una baja eficiencia del injerto cardiaco, reacción del sistema inmunitario, una escasa penetración y viabilidad celular, y muy importantemente, una deficiencia en la retención de las células en el sitio del daño, costos exorbitantes, y falta de control del destino de las células injertadas. Por lo que existe una necesidad imperiosa para el desarrollo de nuevos enfoques alternativos de regeneración cardíaca.^{2,3,4}

Para encontrar un reemplazo calificado, sin herir otras partes del cuerpo del paciente, surge el tema de la ingeniería de tejido (IT). El campo de IT cardiovascular ha recibido recientemente mucha atención, como una nueva modalidad terapéutica para tratar los daños al corazón.^{5,2}

El gran reto en el diseño de andamios para el área de IT, es precisamente el de fabricar matrices biodegradables que sean adaptables y puedan imitar los aspectos estructurales de la matriz extracelular (MEC).^{5,6}

Una técnica prometedora es el uso de andamios en tercera dimensión, a base de polímeros naturales o sintéticos. Existen muchas técnicas usadas para la preparación de este tipo de estructuras fibrosas, de las cuales, el electrohilado ha sido reconocido como la técnica más simple que puede producir fibras ultra finas continuas a partir de diversos materiales, incluyendo polímeros en solución o en estado fundido.^{5,7}

Algunas de las propiedades físicas antes mencionadas -diámetro de la fibra, área superficial y porosidad- se asemejan a las características de la MEC. Esta estructura proporciona soporte y anclaje para las células, separa unos tejidos de otros, e influye sobre el comportamiento celular en varios aspectos, como el aumento de la adherencia y el crecimiento de las células, así como la regulación de la diferenciación celular.^{8,4,1}

Otra ventaja que ofrecen estos tipos de materiales, es que algunos agentes farmacológicos pueden ser convenientemente añadidos en las fibras, para lograr una liberación controlada de los mismos. Es por ello que en la búsqueda de nuevas

alternativas terapéuticas, actualmente se estudian diferentes compuestos fitoquímicos, presentes en comidas y bebidas. En particular se ha estudiado una clase de compuestos denominados flavonoides. Algunos estudios epidemiológicos indican que el consumo de alimentos y bebidas ricas en flavonoides está inversamente relacionado con la incidencia de enfermedades cardiovasculares. El consumo regular de productos derivados del cacao con alto contenido de flavonoides ha demostrado proporcionar efectos cardiovasculares benéficos.⁹

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Diseñar un material que pueda reparar efectivamente el músculo cardíaco lesionado, y por tanto sea considerado un buen andamio para el área de ingeniería de tejido cardiovascular.

1.1.2 Objetivos particulares

- Encontrar las condiciones óptimas para la preparación de membranas fibrosas de acetato de celulosa/ poli(vinil pirrolidona) + Epicatequina/ acetato de celulosa y poli(ácido láctico)/ poli(vinil pirrolidona) + Epicatequina/ poli(ácido láctico).
- Caracterizar morfológica, térmica y estructuralmente a las membranas fibrosas obtenidas.
- Evaluar el grado de hidrofobicidad/hidrofilicidad de ambos materiales.

- Estudiar las cinéticas de liberación de la epicatequina en agua y en medio de cultivo MesenCult.
- Analizar el efecto de ambos tipos de andamios fibrosos, sobre el corazón infartado de ratas Wistar.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1. Ingeniería de tejidos

Como una tecnología incipiente, la IT es un área interdisciplinaria que combina la ingeniería genética de las células con la ingeniería química, la biología celular y terapias clínicas que conllevan a la generación de andamios que mantengan, reemplacen o aumenten la función del tejido enfermo o dañado.⁵

La IT es un área que está creciendo rápidamente, y que tiene como objetivo crear, reparar y/o reemplazar tejidos y órganos usando una combinación de células, biomateriales, y/o moléculas biológicamente activas. Las estrategias de la IT prometen revolucionar las terapias que actualmente existen para tratar el daño irreversible del miocardio, la insuficiencia cardíaca y aumentar significativamente la calidad de vida de millones de pacientes.^{4,10,11}

La estrategia clásica de la IT consiste en aislar células específicas a través de la biopsia de un paciente, para hacerlas crecer en un andamio biomimético tridimensional (3D) bajo condiciones de cultivo controladas, para después colocar el constructo en el sitio deseado en el cuerpo del paciente, y direccionar la formación de nuevo tejido en el andamio, que pueda ser degradado con el tiempo. Para lograr una adecuada regeneración de tejidos u órganos dañados, basados en el concepto de IT, hay varios elementos críticos que deben ser considerados, incluyendo que, el biomaterial o andamio, sirva como un soporte biológico y mecánico para el

crecimiento y diferenciación celular, células progenitoras que puedan ser diferenciadas en tipos celulares específicos, y factores inductores de crecimiento que puedan modular las actividades celulares.⁴

La meta más desafiante en el campo de la IT cardiovascular es la creación de un músculo cardíaco artificial. Hoy en día, a diferencia de las válvulas cardíacas o los vasos sanguíneos, el músculo cardíaco dañado no tiene alternativas de reemplazo, así como cualquier otra enfermedad que conduzca a un deterioro tisular, tampoco pueden ser tratadas con un fármaco en particular, el trasplante se vuelve una alternativa viable para restaurar la salud de estos pacientes. Lamentablemente, el trasplante de un órgano vivo está severamente limitado por la escasez de donantes, y un posible rechazo inmunológico. Los tejidos artificiales actualmente usados incluyen vesículas sanguíneas y articulaciones artificiales que no pueden replicar todas las funciones de un órgano real.^{4,10}

La necesidad de mejorar estos tratamientos ha motivado la investigación en IT, y ahora se ha convertido en una preferencia potencial sobre el trasplante de órganos. Para regenerar nuevos tejidos, los dos componentes más esenciales son las células y los andamios. Las células, que pueden formar parte de un tejido artificial o ser reclutadas *in vivo* con la ayuda de andamios; los andamios proporcionan un ambiente apropiado para facilitar el contacto y la señalización intercelular, y consecuentemente permitir a las células cumplir efectivamente su misión. En algunos casos, las células y los andamios pueden colaborar con factores que inducen la diferenciación, como factores de crecimiento e inductores químicos, que funcionan

como “interruptores” para facilitar y permitir que las células se diferencien a las respectivas líneas celulares.¹⁰

Los nuevos descubrimientos en la biología de las células madre sugieren que éstas son una fuente potencial de células cardíacas y vasos sanguíneos y que pueden ser usadas por los clínicos para reconstruir o reemplazar el tejido cardíaco dañado.⁴

2 .2. Andamios para regeneración de tejidos

En la mayoría de los tejidos nativos, las células se encuentran dentro de un tejido específico, una matriz extracelular tridimensional, que comprende una red compleja de fibras a nanoescala, que forman microambientes locales altamente estructurados. La comunicación celular, el transporte de oxígeno y nutrientes, la eliminación de los desechos y el metabolismo celular, requieren un ambiente tal, donde la orientación celular puede ser polarizada y el movimiento del contenido pueda ser direccional. Por lo tanto, en IT, un marco tridimensional es necesario para organizar las células en un conjunto ordenado, y así lograr se cumpla la función de un tejido deseado. Además, la mayoría de los tejidos/órganos formados necesitan un soporte, llamado “andamio” para su formación a partir de las células. Estos andamios usualmente cumplen el propósito de asistir en la proliferación y diferenciación celular, permitiendo la difusión de nutrientes celulares vitales y la expresión de productos, y ejercen ciertas influencias biológicas y mecánicas sobre las células. En general, se cree que mientras más parecido sea el andamio a la matriz extracelular natural puede

provocar un ambiente más adecuado para la adherencia, migración, proliferación y diferenciación de las células madre.^{4,10}

Muchas propiedades fisicoquímicas de la MEC pueden ejercer efectos sutiles en las señales biológicas de las células que la rodean. Por una parte, se debe notar que la nanoestructura de la MEC natural, afecta numerosos comportamientos celulares incluyendo la adhesión, proliferación, migración y diferenciación en las membranas basales de muchos tejidos, las cuales exhiben enormes nanotopografías, y por otro lado, las moléculas de la MEC como el colágeno, muestran una nanoestructura que hipotéticamente contribuye a la señalización dentro de la matriz celular. Con el fin de imitar mejor la nanoestructura de una MEC natural, los nanomateriales, que están definidos por al menos, una dimensión inferior a los 100 nm, han surgido como prometedores candidatos en la producción de andamios que se asemejen a la MEC, y reemplacen eficientemente los tejidos defectuosos. En la última década los andamios producidos a partir de nanofibras, nanotubos y nanopartículas han sido estudiados para manipular el destino de las células madre.¹⁰

Las nanofibras son los materiales más reportados, que varían desde los polímeros sintéticos biodegradables como el poli(ácido láctico) (PLA), poli(D-L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(vinil alcohol) (PVA) o poli(e-caprolactona) (PCL) hasta materiales naturales como el colágeno, la gelatina y el quitosano (Tabla 1).

Tabla 1. Polímeros sintéticos y naturales usados en la producción de nano y microfibras para su uso en ingeniería de tejido.

Polímero	Referencia
poli(ácido láctico) (PLA)	[12]
poliácido (D-L- láctico-co-glicólico) (PLGA)	[13]
poli(vinil alcohol) (PVA)	[14]
poli(e-caprolactona) (PCL)	[15]
Colágeno	[16]
Gelatina	[17]
Quitosano	[18]

Es importante que al momento de pensar en una aplicación biomédica con membranas fibrosas, el material a utilizar cuente con características biodegradables, biocompatibles y de baja toxicidad para un potencial tratamiento terapéutico exitoso.¹¹

Desafortunadamente existe una brecha nada despreciable entre las actividades del laboratorio y las pruebas clínicas, en lo referente al uso de materiales naturales para andamios, pues la mayoría de ellos son muy frágiles para proporcionar la fuerza mecánica suficiente. Es por ello que actualmente, los investigadores se están

inclinando más por mezclar materiales naturales con polímeros sintéticos en el diseño de matrices para el área de ingeniería de tejidos.⁵

Adicionalmente los nanotubos tipo nanotubos de carbono (NTCs) y de dióxido de titanio (TiO₂), ofrecen buenas opciones para la fabricación de andamios (por ejemplo en la terapia de reemplazo de hueso) en vista de su tremenda fuerza mecánica. Dentro de ellos, sólo unos pocos de estos nanomateriales han sido específicamente aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos.¹⁰

La principal razón detrás de las precauciones en su aplicación, radica en que generalmente las leyes de la física y la química son muy diferentes cuando las partículas se acercan a la nanoescala, por lo que la FDA requiere de estudios más extensivos acerca de la seguridad en su uso.¹⁰

Lo más común para ingeniería de tejidos es el uso de un andamio poroso biorreabsorbible, el cual sirve como un soporte tridimensional para dirigir la adhesión celular y formación de tejido *in vivo* e *in vitro*. La “biorreabsorbibilidad” del andamio es casi siempre necesaria, debido a que éste debe ser reemplazado gradualmente por células y matriz extracelular producida por éstas, de tal forma que, eventualmente, se generen tejidos funcionales; de esta manera, el andamio más adecuado debe tener las siguientes características:

- Porosidad apropiada: el tamaño de poro y la estructura porosa asegura la nutrición de las células, así como su adhesión y crecimiento en el andamio, al mismo tiempo que provee el ambiente para la regeneración de tejido, vascularización y eliminación de productos de desecho.

- Fuerza mecánica suficiente: permite mantener la integridad estructural durante el cultivo. El material debe ser suficientemente fuerte para aguantar las tensiones fisiológicas y transferir cargas después de ser implantado.
- Adecuada degradación: la velocidad de degradación del andamio le permite brindar soporte durante la proliferación celular, pero deja un espacio para el crecimiento de nuevo tejido al degradarse. El andamio ideal debe generar productos de degradación que no sean tóxicos y sean fáciles de excretar por rutas metabólicas, además de que no generen respuestas inmunológicas o químicas, detectables por inflamación en alguna parte del cuerpo.
- Biocompatible: el material empleado para elaborar el andamio no debe generar respuesta inflamatoria o inmune una vez que es implantado, sino que debe integrarse con el tejido huésped, facilitar la infiltración vascular, adhesión y formación de células.
- Proceso apropiado de manufactura: la técnica debe permitir la obtención de andamios con la forma y tamaño deseados, fáciles de manipular y que estén disponibles para su uso en cirugía a corto tiempo. El proceso de manufactura no debe afectar la compatibilidad del material al incluir químicos residuales del proceso y el método de esterilización no debe causar pérdida significativa de las propiedades mecánicas del polímero o cambios en su biocompatibilidad y degradación.¹

2.3. Infarto al miocardio, remodelación ventricular y falla cardíaca

El corazón humano no puede regenerarse, principalmente debido a que los miocitos cardíacos adultos están diferenciados completamente y no pueden replicarse después del daño. La insuficiencia cardíaca que ocurre después del infarto agudo al miocardio (IAM) puede ser resultado de la pérdida progresiva de cardiomiocitos en la zona de infarto pero más a menudo es desencadenada, por la ampliación de la cavidad del ventrículo izquierdo (VI). Cuando el tejido miocárdico se lesiona, el proceso de curación normal es iniciado a través de una serie de eventos complejos que incluyen la inflamación aguda, la formación de un tejido de granulación, y la eventual formación de cicatriz.^{20,4}

Las citocinas y los factores de crecimiento son liberadas para reclutar células blancas sanguíneas, principalmente neutrófilos. Los monocitos también son llamados al sitio de la herida, donde se diferencian en macrófagos. Estos últimos, son responsables de limpiar la zona de infarto y también de reclutar células como los fibroblastos, células endoteliales, y células progenitoras/madre creando un tejido de granulación. La formación de vasos sanguíneos es esencial para la cicatrización del miocardio infartado. El tejido de granulación es subsecuentemente reemplazado por una MEC, depositada principalmente por fibroblastos y el tejido de granulación es remodelado en un tejido cicatrizado. El problema de cómo tratar a los miles de pacientes por año en todo el mundo, que sobreviven a un IM y al desarrollo de insuficiencia cardíaca avanzada, a pesar del tratamiento médico, no se ha resuelto.^{2,20}

El trasplante de corazón es la mejor solución para pacientes con falla cardiaca en estado terminal. Sin embargo, el suministro de donadores es declinante, aumentando la brecha entre la oferta y la demanda en este tipo de terapias. Los aparatos de asistencia ventricular izquierda pueden ser una opción terapéutica importante para los pacientes, pero a lo mucho ellos sirven como un puente para la trasplantación y no llegan a ser una terapia definitiva.²⁰

2.4. Reparación del miocardio

La reparación cardiaca es un nuevo concepto terapéutico. En el corazón, las estrategias de reparación celular pueden incluir:

- 1) Trasplante directo de las células en ambientes dañados.
- 2) Técnicas de IT para el desarrollo del tejido reemplazante.
- 3) Las terapias que induce al corazón a regenerar los tejidos dañados.

El primer enfoque se centra en la repoblación del miocardio dañado por la trasplantación de células saludables. Hay varios tipos celulares, que han sido considerados para poder reemplazar tejido necrótico y/o minimizar las cicatrices. Por ejemplo, los cardiomiocitos fetales, los mioblastos esqueléticos, y las células madre de médula ósea, han demostrado un éxito limitado en la restauración del tejido dañado y en la mejora de la función cardiaca. Un enfoque alternativo diferente incluye la movilización de las células madre o progenitoras hacia el área dañada o la estimulación de un programa regenerativo dentro del órgano. Estudios recientes han sugerido que las células madre que residen dentro la médula ósea o en sangre periférica, pueden ser reclutadas para el corazón herido. Además, existe nueva

evidencia acumulada que el corazón contiene células madre residentes que pueden ser inducidas para desarrollarse en células del músculo cardíaco y tejido vascular. Estos progenitores cardíacos pueden ser reclutados para reparar el miocardio infartado.²⁰

2.5. Biomateriales para regeneración de tejido cardíaco

El biomaterial juega un papel fundamental en la mayoría de las estrategias de IT, Para guiar la organización, crecimiento y diferenciación de las células en el tejido, el andamio hecho de un biomaterial debe de ser capaz de proporcionar no sólo un soporte físico para las células sino también de permitir señales químicas y biológicas necesarias en la formación de un tejido funcional. En esencia el biomaterial debe de ser capaz de entrecruzarse, a un nivel molecular, con las células de una manera precisa y ordenada, de manera similar a las interacciones naturales que existen entre las células y la MEC nativa. Al mismo tiempo, los requerimientos básicos de un biomaterial deben de mantenerse; esto es, que los materiales y los productos de su degradación deben de ser no tóxicos y no inmunogénicos, y su tasa de degradación debe empatar con la tasa de formación del nuevo tejido.^{21,4}

Es por esto que en años recientes, la tendencia ha sido el diseñar materiales bioactivos, que por una parte puedan tener la fuerza mecánica suficiente así como una cinética de degradación de los polímeros sintéticos, y por otro lado puedan tener la especificidad biológica para el colágeno, la fibronectina y la laminina, los componentes principales de la MEC. Estos biomateriales que se asemejan a los

biológicos, son denominados “biomiméticos”, y deben de promover las interacciones célula-matriz, y provocar respuestas celulares específicas y de reconocimiento biomolecular.⁴

Como lo realizado por Hao-Ji Wei y cols, en el 2008, donde hicieron crecer células madre mesenquimales (CMM) sobre un parche cardíaco desarrollado por bioingeniería, el cual fue usado en un modelo de rata; donde los resultados de la ecocardiografía y el cateterismo cardíaco reveló que el grupo del implante del parche y las CMM, tenían una función cardíaca superior a las ratas del grupo de infarto, demostrando así que dicho biomaterial puede restaurar al VI, y preservar las funciones cardíacas después del infarto.²²

Por otra parte, Vahid Serpooshan y cols, en el 2013, demostraron el efecto de un parche de colágeno desarrollado por bioingeniería, en un modelo murino. Los corazones que llevaban los parches, preservaron su contractilidad y fueron protegidos de manera significativa de una lesión en los planos anatómicos y funcionales del tejido cardíaco. Esta mejora se acompañó de una retardada remodelación del VI, una fibrosis disminuida, y la formación de una red de nuevos vasos sanguíneos. Lo cual en resumen, pone de manifiesto la capacidad del biomaterial para promover la capacidad endógena del miocardio infartado para atenuar la remodelación y aumentar la función cardíaca.²

2.6. Técnicas para generar andamios

2.6.1. Electrohilado

El proceso de utilizar fuerzas electrostáticas para formar fibras sintéticas se conoce desde hace más de cien años. Este proceso conocido como electrohilado, utiliza una fuente de alto voltaje para generar una diferencia de potencial eléctrico entre el inyector de una solución polimérica o mezcla de ellas y un colector de fibras, que se esquematiza en la Figura 1.²³

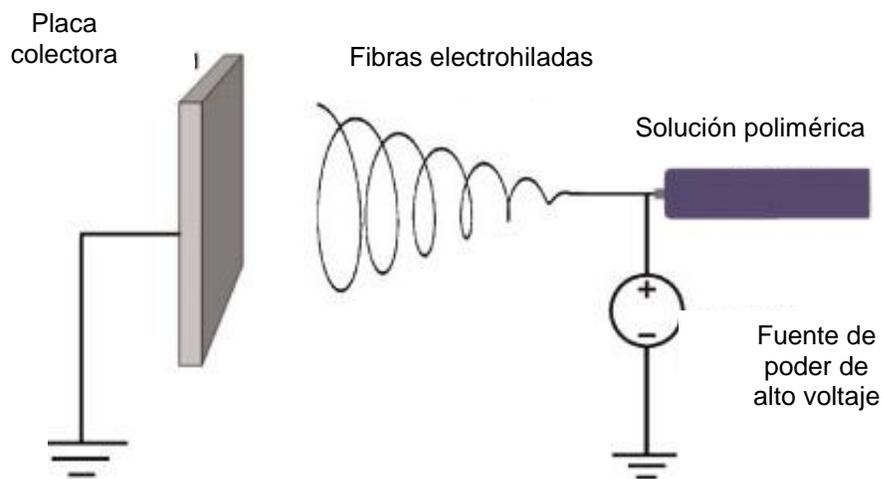


Figura 1. Representación esquemática del proceso de electrohilado.

Tomado de la fuente: [23].

A medida que la atracción electrostática entre las cargas opuestas del líquido y el colector, y las repulsiones electrostáticas entre las cargas en el líquido se vuelven más intensas, conlleva a que el borde de la solución cambie de la forma redonda del menisco a la forma cónica (El cono de Taylor). Un chorro de la fibra es finalmente expulsado del cono de Taylor, cuando la fuerza del campo eléctrico excede la tensión superficial del líquido. Este chorro viaja a través de la atmósfera hasta que el solvente se evapora, permitiendo con ello la deposición de las fibras poliméricas sólidas en el colector.²⁵

El electrohilado es un método que combina dos técnicas llamadas “electrospray” y “spinning”. Este proceso para generar fibras no tejidas generadas de polímeros electrohilados, ofrecen una capacidad única para modificar su diámetro, ajustando el voltaje aplicado, la distancia hacia el colector, la concentración y la tasa de flujo de las soluciones.²⁶

2.6.1.1. Variables en el proceso de electrohilado

Mientras que la técnica de electrohilado ha probado ser un método relativamente simple y versátil para formar esteras fibrosas no tejidas, un número de parámetros del proceso pueden fuertemente influenciar en las propiedades de las fibras generadas.²⁵

En general, la morfología de las membranas nanofibrosas fabricadas a través del proceso de electrohilado están fuertemente influenciadas por tres clases de parámetros que incluyen: a) las propiedades del polímero, como el tipo de polímero,

el peso molecular y su distribución, la concentración de la solución y la tensión superficial del solvente; b) los parámetros de procesamiento como la tasa de flujo de la solución, el voltaje electrostático aplicado, y la distancia entre el colector y la aguja; y c) las condiciones ambientales como la temperatura y la humedad.²⁷

Propiedades del polímero. Dependiendo de un número de parámetros de la solución, pueden ser obtenidos resultados muy diferentes, usando el mismo polímero y otra configuración del proceso de electrohilado. Es por esto que es difícil dar una relación cuantitativa que pueda aplicarse en un amplio intervalo de sistemas polímero-solvente. Sin embargo, hay tendencias generales que son útiles para determinar las condiciones óptimas para cada sistema. La concentración del polímero determina el grado de hilado de la solución, es decir si puede o no formar fibra. La solución debe de tener una concentración suficientemente alta, para que ocurra el desenredo de la cadena, sin embargo, la solución no debe ser muy diluida o muy concentrada. Influye tanto en la viscosidad como en la tensión superficial de la solución, los cuales son parámetros importantes en el proceso. Si la solución es muy diluida entonces la fibra polimérica puede romperse en gotas antes de alcanzar el colector debido a los efectos de la tensión superficial. O si está muy concentrada entonces las fibras no pueden ser formadas debido a su alta viscosidad, pues dificulta el control de la tasa de flujo del capilar. La elección del solvente es también crítica en cuanto a si las fibras son capaces de formarse, además de influir en la porosidad de la fibra. Para que ocurra una evaporación suficiente del solvente entre el capilar y el colector, un solvente volátil debe ser usado.²⁵

Parámetros de procesamiento. Agrupados en orden de impacto, estos parámetros son: el voltaje aplicado, velocidad de flujo del polímero y distancia del capilar al colector. Todos pueden influenciar en la formación de cuentas en las fibras. Su relación con la morfología de la fibra, se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Efectos de los parámetros del proceso de electrohilado en la morfología de la fibra.

Parámetro	Efecto en la morfología de la fibra.
Voltaje aplicado ↑	Diámetro de la fibra ↓ inicialmente, luego ↑
Velocidad de flujo ↑	Diámetro de la fibra ↑ (morfologías con cuentas ocurren si el flujo es muy alto)
Distancia entre el capilar y el colector	Diámetro de la fibra ↓ (morfologías con cuentas ocurren si la distancia es muy corta)

Tomado de la fuente: [25]

Condiciones ambientales. La mayoría de los trabajos de investigación publicados se centran en los parámetros que pertenecen a los primeros dos grupos. Sin embargo, los parámetros ambientales como la humedad y la temperatura influyen en el proceso y por ende en el resultado del proceso.²⁸

Ejemplo de lo anterior, es el estudio de S. De Vrieze y cols., quienes investigaron la influencia de las condiciones ambientales en el proceso de generar nanofibras de Acetato de celulosa (AC) y poli (vinilpirrolidona) (PVP), quienes llegaron a la conclusión que la temperatura y la humedad relativa son dos parámetros que afectan fuertemente el electrohilado. El cambio en el primero de

ellos, provoca dos efectos principales y contrarios que cambian el diámetro promedio de la fibra, mientras que el segundo parámetro provoca fibras más o menos gruesas dependiendo de la naturaleza del polímero.²⁸

2.6.1.2. Tipos de arreglos

Los procesos de electrohilado pueden clasificarse según la configuración de la boquilla (sola, sola en emulsión, lado a lado y coaxial). Tal vez la configuración más simple y más común es la técnica de la aguja sola. Donde existen básicamente tres componentes para completar el proceso: una fuente de alto voltaje, un tubo capilar con una pipeta o aguja de diámetro pequeño, y una pantalla de metal recolectora.²⁹

En las décadas recientes, muchos sistemas polímero/solvente, han sido fabricados a través del electrohilado aguja sencilla, que se ha convertido en un método común para preparar nanofibras para aplicaciones biomédicas. Las nanofibras compuestas también pueden ser fabricadas a través de mezclas de polímeros. Esta capacidad es de significancia debido a que algunas propiedades deseables de múltiples polímeros pueden ser combinadas.¹⁸

Si bien las mezclas de polímeros trabajadas con la técnica de electrohilado son a menudo usadas para lograr la combinación deseada de propiedades, puede que no sea posible en muchos casos utilizando una aguja, si los polímeros de interés no son solubles en un disolvente común. Por lo tanto, puede ser necesario utilizar una configuración lado a lado. En esta configuración dos soluciones poliméricas por

separado, pasan a través de dos diferentes capilares o agujas, que son fijados de lado a lado (Figura 2 (a)).²⁵

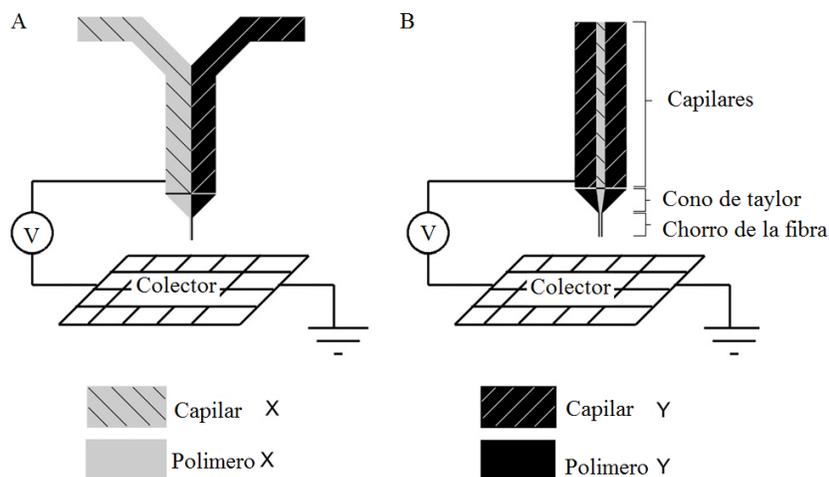


Figura 2. (a) Esquema de configuración de aguja lado a lado y (b) esquema de configuración de agujas coaxiales.

Tomado de la fuente: [25]

Arreglo coaxial. Una modificación de la técnica sencilla de electrohilado ampliamente conocida, es el electrohilado coaxial (Figura 2 (b)), un método de fabricación de fibras con un núcleo coaxial y el componente de vaina, donde cada componente puede tener diferentes solubilidades en solventes orgánicos y acuosos. En ciertos casos, se requiere que el núcleo sea hidrofílico para facilitar la carga y la preservación de la bioactividad de las moléculas biológicas, y que el material que formará la vaina o coraza sea hidrofóbico para permitir la formación de la fibra después de la evaporación del solvente orgánico volátil.³⁰

Un creciente número de intentos se están realizando para determinar los parámetros que controlan la morfología y las dimensiones de las fibras coaxiales. Estos parámetros pueden jugar un papel integral en la tasa de degradación de los andamios de fibras coaxiales así como en la difusión y liberación de los componentes embebidos dentro de ellos. Hasta el momento, ha existido una comprensión razonable detrás del electrohilado coaxial y los factores que pueden controlar la morfología de la fibra. Por ejemplo, numerosos estudios han demostrado que un aumento en la viscosidad del polímero ya sea por el incremento en el peso molecular del polímero o en su concentración, el diámetro promedio de la fibra disminuye y afecta la formación de cuentas dentro de las mismas. Otros factores como la humedad, tasas de flujo, el voltaje, la distancia entre la salida del polímero y la placa colectora y, el diámetro del orificio de expulsión del polímero también juegan un papel significativo en la determinación de la morfología de la fibra. Sin embargo, la información sobre la morfología de las fibras coaxiales sigue siendo limitada.³⁰

Cuando los diámetros de los materiales fibrosos poliméricos son reducidos de micrómetros (por ej. 10-100 μm) a sub micrómetros o nanómetros (por ej. 10×10^3 – 100×10^3 μm) aparecen varias características impresionantes como lo es un área superficial muy grande en proporción al volumen, flexibilidad en funciones superficiales y un funcionamiento mecánico superior (por ejem, rigidez y resistencia a la tracción) comparado con cualquier otra forma conocida del material. Estas excelentes propiedades hacen que las fibras poliméricas sean excelentes candidatos para muchas aplicaciones importantes.⁴³

En particular los fármacos o algún otro compuesto, pueden ser atrapados dentro de un polímero para formar un dispositivo de liberación de fármaco tipo depósito. Por lo tanto, el polímero que forma la coraza puede proveer protección temporal para las moléculas del fármaco, y con ello ofrecer la liberación controlada del mismo.³¹

2.6.1.3. Epicatequina

Recientemente se ha encontrado que el consumo de los flavonoides del cacao conduce a una vasodilatación dependiente de la síntesis de óxido nítrico. Estos también pueden actuar como antioxidantes y pueden inhibir la adhesión de las plaquetas, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, inflamación, generación de especies reactivas del oxígeno, y pueden aumentar la resistencia a la insulina.⁴⁴

La (-)-Epicatequina, (Figura 3) es un tipo de flavonoide proveniente del cacao. Los efectos vasculares del cacao pueden ser reproducidos por la epicatequina sola.⁴⁵

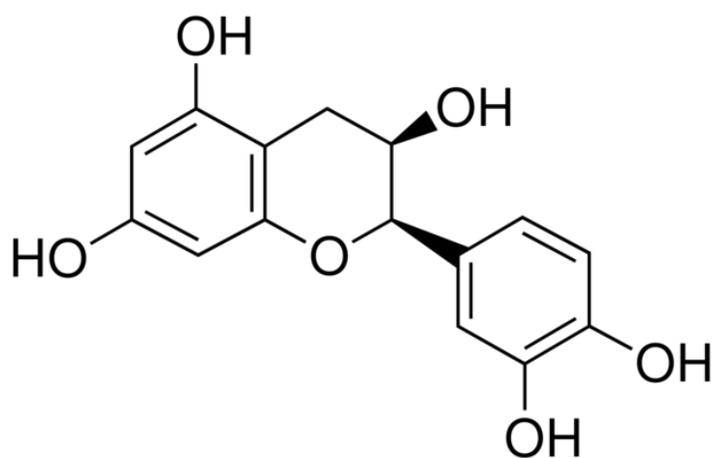


Figura 3. Estructura de la epicatequina

Estudios recientes afirman que la epicatequina induce la relajación de los anillos aórticos y estimula la producción de óxido nítrico (NO), vía la activación de la óxido nítrico sintasa (eNOS). Otras investigaciones han demostrado que la administración oral de epicatequina previene la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación de lípidos.⁴⁵

En un estudio realizado por Yamazaki y cols en el 2010, encontraron que la epicatequina provocó una disminución, aunque pequeña, en la presión sistólica en los grupos con una oclusión coronaria permanente, a los cuales se les suministró el flavonoide, que fueron comparados con los grupos sham, (grupo donde la cirugía fue simulada, pero sin ocluir la arteria coronaria); y por lo contrario no se observaron cambios significativos en la respuesta hemodinámica, es decir en la frecuencia cardiaca, la presión sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo o en la presión media de la aorta en el grupo de las ratas con oclusión coronaria permanente después de 48 horas, que no fueron abastecidos con la epicatequina. En este estudio ellos encontraron que el pre tratamiento con el flavonoide (-)-epicatequina puede reducir sustancialmente el tamaño del infarto 48 horas después de una oclusión coronaria permanente. El efecto es sostenido hasta 3 semanas después y está acompañado de una preservación de la función y estructura del ventrículo izquierdo. Estos resultados demuestran la capacidad única de la epicatequina de conferir cardioprotección en el aspecto de una forma severa de lesión isquémica del miocardio.⁴⁴

2.6.2. Lixiviado de partículas (particulate leaching)

Es probablemente el método más popular para producir andamios porosos. La principal ventaja de esta técnica es la facilidad para controlar la porosidad y el tamaño de poro de los andamios, mientras que la principal desventaja es la dificultad para superar la presencia de poros muy cercanos, lo cual es perjudicial para la neovascularización y el crecimiento de tejido. Actualmente, los porógenos usados comúnmente son partículas solubles en agua tales como cloruro de sodio (NaCl), que se puede eliminar fácilmente por el agua después de la gelificación.³²

2.6.3. Gel casting

Es una técnica de formación de cerámica húmeda, que implica la polimerización de un monómero en un disolvente acuoso o no acuoso, que forma un cuerpo rígido, cargado de cerámica. Es usualmente usada para generar andamios de cerámica con una gran fuerza mecánica, pero usualmente resulta en una estructura de poros pobremente interconectados y una distribución del tamaño de poro no uniforme. La técnica de gel-casting fue primeramente establecida para la preparación de componentes densos, y más recientemente modificada para producir también cerámicas porosas, mediante la combinación con otros métodos como el lixiviado de partículas, o la formación de espuma o incluso los métodos de esponjas. Diferentes monómeros han sido empleados en esta técnica, como los polisacáridos, proteínas.³²

2.6.4. Moldeo con disolvente (solvent casting)

Este método involucra la fundición de una solución polimérica con partículas solubles en agua dentro de un molde. Después de la evaporación del solvente, las partículas son lixiviadas usando agua para formar los poros en el andamio. El proceso es fácil de llevar a cabo, pero funciona sólo para membranas delgadas o especímenes tridimensionales muy delgados. En la preparación de matrices más gruesas, es muy difícil remover todas las partículas solubles de la matriz del polímero.³³

Se basa en la evaporación de un disolvente para formar los andamios por 2 técnicas: en una se sumerge un molde en la solución polimérica y después se deja suficiente tiempo para que se evapore el disolvente, de tal modo que se forme una película y la otra consiste en vaciar solución polimérica en un molde y esperar a que se evapore el disolvente y se forme una película dentro de éste.³⁴

2.6.5. Separación de fases

La técnica de separación de fases utiliza el hecho de que un sistema de varios componentes homogéneos, tales como una emulsión de agua-polímero, puede llegar a ser termodinámicamente inestable y separarse con el fin de reducir la energía libre. Con respecto a la fabricación de andamios, una fase de separación inducida térmicamente puede ser usada para dar lugar a una fase rica en polímero y a otra pobre en polímero. Después de que el solvente es removido (ya sea vía

liofilización o extracción del solvente), el espacio originalmente tomando por el solvente se convierte en poros, y es entonces como es formado un andamio poroso. La arquitectura del andamio puede ser controlada por las condiciones del método. Como esta técnica usa solventes orgánicos para crear los poros dentro de los andamios, la remoción del solvente se vuelve un problema y se convierte en una potencial fuente de toxicidad para las células.³³

2.6.6. Fabricación de sólidos en forma libre (SFF)

La fabricación de sólidos en forma libre o SFF, por sus siglas en inglés (Solid freeform fabrication) es una tecnología en desarrollo que permite la fabricación de productos directamente de los datos informáticos, como el diseño asistido por computadora (DAC), la tomografía computarizada (TC) y la imagenología por resonancia magnética de datos (RMD). La información digital es entonces convertida en un formato de sección transversal específico de la máquina, expresando el modelo como una serie de capas, el archivo es entonces implementado en la máquina SFF, que construye los objetos en 3D diseñados por el cliente, mediante una estrategia de fabricación por capas. Cada capa representa la forma de una sección transversal del modelo a un nivel específico. En los pasados 20 años, más de 20 sistemas SFF han sido desarrollados y comercializados, éstos incluyen la estereolitografía (SL), manufactura de objetos laminados (MOL), sinterización selectiva por láser (SSL), y el modelado por deposición fundida (MDF), entre otros. El SFF permite la fabricación de objetos con materiales únicos, combinaciones y delicadas geometrías, que no pueden ser obtenidas por los métodos tradicionales de

manufactura. El método está siendo usado en la ingeniería biomédica especialmente para la fabricación de andamios para IT, porque puede producir materiales con una delicada arquitectura interna (incluyendo tamaño de poro, forma del poro, interconectividad, geometría y orientación), que puede actuar como un sistema vascular artificial.³³

La impresión en tres dimensiones (3DP) emplea un método llamado “inkjet”, para expulsar un chorro de una solución aglutinante a partir de un cabezal, que se mueve de acuerdo a los datos de la sección transversal de un DAC, sobre una superficie de un polímero en polvo. Los andamios fabricados con esta técnica están hechos de PLLA y PLGA, por la impresión de cloroformo en una cama de estas partículas.³³

2.7. Sistemas poliméricos

2.7.1. Poli(vinil pirrolidona) (PVP)

El poli(vinil pirrolidona) o PVP es un polímero sintético, higroscópico, muy soluble en agua, cuya unidad estructural repetitiva es $(C_6H_9NO)_n$ (Figura 4). Hasta ahora el PVP ha encontrado una amplia variedad de aplicaciones en el campo de la biomedicina, debido a sus propiedades útiles incluyendo la no toxicidad, biocompatibilidad, alta hidrofiliidad, buenas propiedades de formación de complejos, y habilidad para formar películas. Recientemente el PVP ha sido exitosamente electrohilado dentro de fibras de etanol, dimetilformamida (DMF), diclorometano o sus mezclas.³⁵

El PVP es un material ampliamente usado en microencapsulación, para la liberación controlada de fármacos y para sensores biológicos y químicos.³⁷

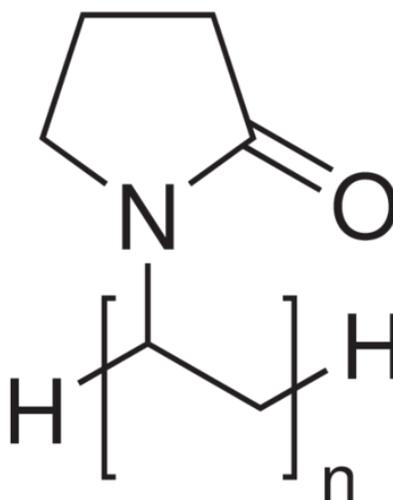


Figura 4. Estructura del poli(vinil pirrolidona).

2.7.2. Acetato de celulosa (AC)

La celulosa es el recurso natural más abundante en la tierra, es clasificada como un polisacárido lineal. Tiene muchas ventajas como su biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedad regenerativa. Por tales razones la celulosa es ampliamente usada en industrias textiles y en áreas de material biomédico. La fabricación de fibras de celulosa ultra finas por electrohilado, ha obtenido mucha atención en años recientes. Entre otras aplicaciones, las fibras de AC se han desarrollado como transportadores para la liberación transdérmica de fármaco.³⁷

La celulosa es un material hidrofílico ampliamente usado en preparación de membranas. Sin embargo, las dificultades para encontrar solventes adecuados para

disolverla, complica un poco preparar directamente nanofibras de celulosa por electrohilado, es por ello que se prefieren las nanofibras de AC, pues este último es más soluble en solventes orgánicos como la acetona.³⁹

El AC tiene aproximadamente 2.4 de 3 grupos hidroxilo por unidad de anhidroglucosa, sustituido con un grupo acetil (Figura 5). El AC comercial es insoluble en agua y es producido por esterificación controlada de la celulosa pura con anhídrido acético. En este proceso, grupos acetilo son sustituidos por todas o una parte de las unidades hidroxilo en la cadena de celulosa.⁴⁰

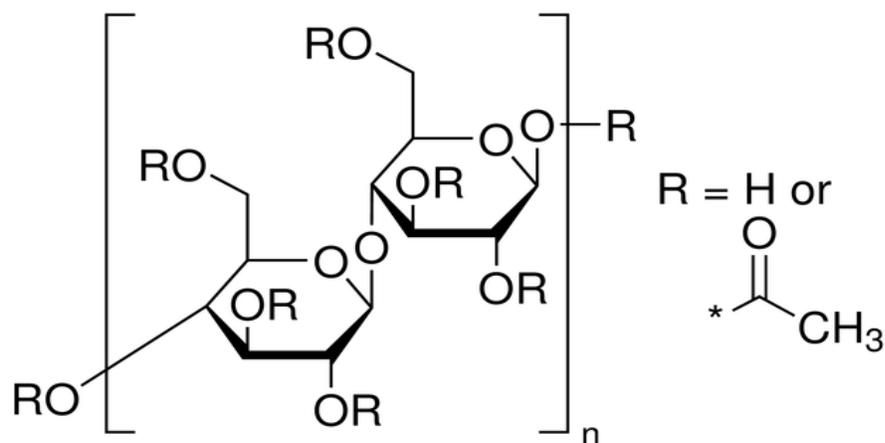


Figura 5. Estructura del acetato de celulosa.

2.7.3. Poli (ácido láctico) (PLA)

El poli (ácido láctico) (PLA) (Figura 6) es un poliéster alifático, que puede ser derivado de fuentes 100% renovables como el maíz. La procesabilidad del PLA es equivalente a la de los materiales sintéticos a base de petróleo. Es una alternativa sustentable de los polímeros convencionales, debido a que los lácticos pueden ser producidos en masa, gracias a la fermentación microbiana de los sub productos agrícolas, principalmente de las sustancias ricas en carbohidratos. Existe evidencia reciente, que muestra que el ácido láctico, se puede convertir en PLA, a través de dos principales rutas, en primer lugar, la ruta indirecta a través de la láctica, y segundo por la polimerización directa por policondensación, Ambos productos son genéricamente llamados PLA.⁴¹

Es un polímero sintético biocompatible que fue aprobado por la FDA para aplicaciones clínicas específicas, como suturas quirúrgicas y algunos aparatos de implantación. Sin embargo, la aplicación de las fibras de PLA en materiales biomédicos es opacado por su hidrofobicidad. El PVP es también un polímero sintético biocompatible e hidrofílico. Por lo que el PVP es un buen candidato para formar un material compuesto con el PLA para aumentar la hidrofiliidad de la fibra. Los poliésteres alifáticos, como el PLA, PLGA y la PCL han sido ampliamente usados como andamios para constructos tridimensionales de IT.^{33,42}

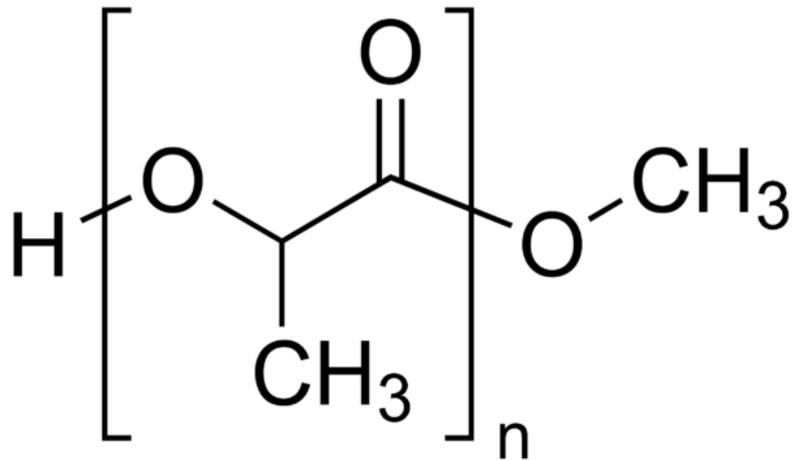


Figura 6. Estructura del poli (ácido láctico).

2.8. Técnicas de caracterización

2.8.1. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Un microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) produce directamente una imagen de la estructura en tercera dimensión de la superficie de una muestra. El MEB usa electrones que se encuentran dispersos o emitidos por la superficie de la muestra. Esta última para ser examinada se fija, se seca y se recubre con una capa delgada de un metal pesado, por ejemplo oro, para facilitar el flujo de electrones. La muestra preparada, es barrida por un haz focalizado de electrones. La cantidad de electrones dispersos o emitidos cuando este haz primario bombardea consecutivamente cada uno de los puntos de la superficie metálica es medida y usada para controlar la intensidad de un segundo haz que se mueva sincrónicamente con el haz primario y forma una imagen en el monitor del equipo. En este punto, se

construye una imagen sumamente ampliada de la superficie de la muestra (Figura 7).⁴⁷

La técnica de MEB proporciona una gran profundidad del campo, es más, gracias a que el grado de dispersión de los electrones depende del ángulo relativo entre el haz y la superficie, la imagen tiene luces y sombras que le confieren una apariencia tridimensional. Sólo características superficiales pueden ser examinadas. El poder de resolución de MEB depende de varios factores, tales como la dimensión del haz de electrones, la difusión del mismo en la muestra antes de la emisión de los electrones secundarios, y la corriente estabilizada de la lente. La dimensión del haz puede reducirse de muchas formas. Por ejemplo a potencia de 1 kV, la resolución es 140 nm, mientras que a 30 Kv, la resolución es 20 nm.⁴⁷

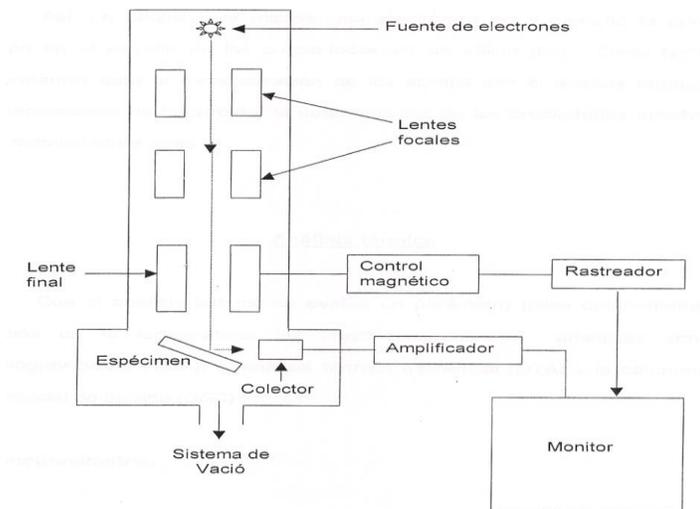


Figura 7. Diagrama del microscopio electrónico de barrido

Tomado de la fuente: [48]

2.8.2. Microscopia electrónica de transmisión (MET)

El microscopio electrónico de transmisión (Figura 8) usa electrones transmitidos por una fina muestra, que fue iluminada por un haz de electrones de alta energía para conseguir una imagen o un patrón de difracción (PD). Para que una muestra sea fina, significa que será “transparente a los electrones”; esto es, que una cantidad suficiente de electrones deben de ser transmitidos de manera que la intensidad que cae sobre la pantalla del tubo de rayos catódicos, o el detector de electrones adecuado, tal como un detector de semiconductores, sean suficiente para dar una imagen interpretable. Este requerimiento es una función de la energía del electrón y del número atómico promedio y del espesor de la muestra. La unidad básica para el desarrollo del MET fue la necesidad de superar la resolución de los microscopios ópticos, que está limitado por la longitud de onda de la luz visible. En términos del clásico criterio de Rayleigh para la microscopia de luz, la resolución, o poder resolutivo, de un microscopio, es definido como la más pequeña distancia entre dos puntos que puede ser resuelta.⁴⁸

Los electrones de alta energía que golpean una muestra son dispersados por los átomos produciendo un amplio intervalo de señales secundarias que pueden clasificarse en la base del tipo de interacciones, elástica o inelástica, que tendrán lugar. Debido a los procesos de dispersión de los electrones que emergen de la superficie de la muestra, no son distribuidos uniformemente. Esta distribución no uniforme contiene toda la información química y estructural acerca de la muestra. La construcción de un microscopio electrónico muestra que esta distribución no

uniforme de dos diferentes maneras: (1) la distribución angular que puede ser vista como un PD y (2) una distribución espacial de la dispersión que genera el contraste en la imagen de la muestra. Todos los antecedentes teóricos relevantes para el MET se basan en la dualidad de los electrones, para actuar como partícula o como onda. Los padres de la microscopia electrónica son Ruska y Knoll (1931), y el primer comercial para MET fue hecho en 1939 por Siemens. Desde entonces, la teoría y la instrumentación han contribuido al desarrollo de modernos METs, que se han convertido en una herramienta fundamental para la ciencia de los materiales.⁴⁸

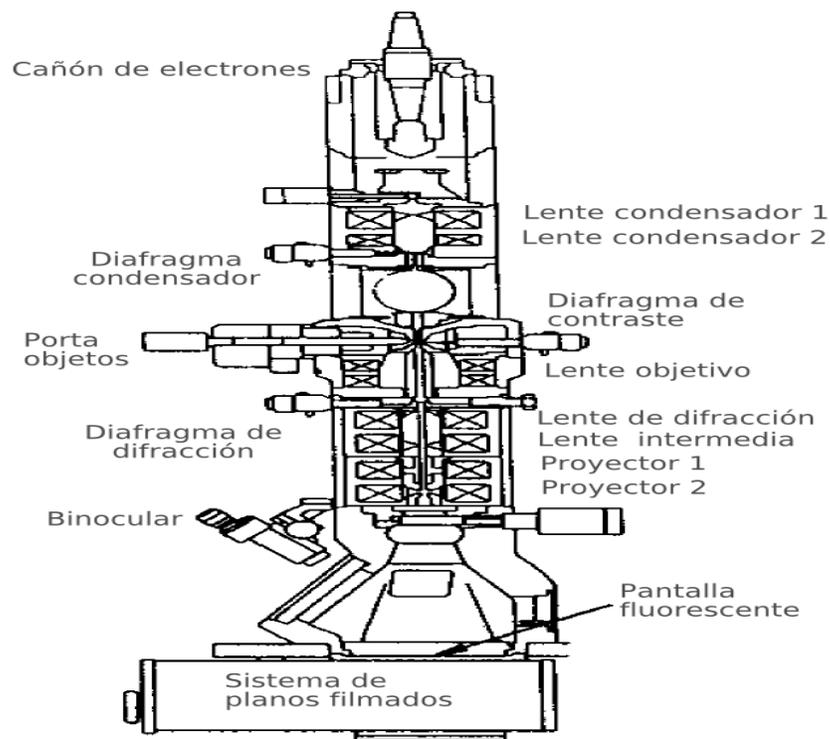


Figura 8. Esquema de los principales componentes de un microscopio electrónico de transmisión.

2.8.3. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

La espectroscopia de absorción infrarroja (IR) es otra de las técnicas que se empleó en la caracterización de las membranas fibrosas. Es muy útil para obtener información cualitativa sobre las moléculas. La absorción de radiación en la región del IR puede dar información acerca de la naturaleza de los compuestos, de la existencia o no de grupos funcionales y de la estructura de las moléculas.^{49,50}

La absorción molecular de la radiación IR lleva a una serie de transiciones entre los niveles de energía de vibración de los estados energéticos electrónicos con la más baja excitación. La forma en la que puede vibrar una molécula está relacionada con el número de sus enlaces y, por tanto, con el número de átomos que la componen. Las vibraciones de una molécula son numerosas inclusive para la más simple. No todas las formas de vibración absorben en el IR, hay dos requisitos para que se dé la absorción de luz en el IR: 1) que existan en la molécula dos estados con una diferencia de energía exactamente igual a la energía que posee el cuanto de radiación electromagnética que pretende interactuar con dicha molécula, y 2) que durante el cambio de estado vibracional se dé un cambio en el momento dipolar de la molécula.⁵⁰

D. Skoog et al, proponen que el espectro IR de un compuesto que abarque un intervalo de longitud de onda de 2.5 a 15 μm (4,000 a 666 cm^{-1}), es una huella dactilar única que se puede distinguir de los espectros de absorción de otros compuestos; sólo los isómeros ópticos tienen espectros idénticos. Mientras que para

G.D. Christian y cols., esta región comprende desde los 6 a 15 μ m (1666- 666), y depende mucho del ambiente molecular, ellos la denominan, de nueva cuenta región dactiloscópica.^{50,49}

La espectrofotometría IR tiene el potencial para determinar un sin número de sustancias en virtud de que casi cualquier especie absorbe en esta región. Con excepción de las moléculas diatómicas mononucleares, como O₂, Cl₂ y N₂, todas las moléculas orgánicas e inorgánicas absorben la radiación infrarroja. Además, la peculiaridad de cada espectro IR proporciona un alto grado de especificidad que sólo es igualado o superado por muy pocos métodos analíticos. En espectroscopia de IR se utilizan dos tipos de espectrómetros: dispersivos y de la variedad de transformación de Fourier. El espectrómetro de IR con transformada de Fourier (FTIR), fue el usado en el presente trabajo, en el se detectan y miden todas las longitudes de onda simultáneamente. Utilizan un interferómetro para producir los patrones de interferencia que contienen la información de los espectros de infrarrojo. Los transductores son comúnmente, sulfato de triglicina, que es un transductor piroeléctrico, o telurio de mercurio y cadmio, que es un transductor fotoconductor. Para obtener la energía radiante como una función de la longitud de onda, el interferómetro modula la señal de la fuente en una forma tal que se pueda decodificar mediante la técnica matemática de transformadas de Fourier. Esta operación requiere una computadora de alta velocidad para realizar los cálculos.⁵⁰

2.8.4. Espectroscopia ultravioleta visible

La espectroscopia de absorción molecular en la región Ultravioleta Visible (UV-VIS) tiene su principal aplicación en el análisis cuantitativo, y es uno de los métodos preferidos en los laboratorios químicos y clínicos, ya que detecta concentraciones extraordinariamente pequeñas de los compuestos que absorben este tipo de energía y, por lo tanto, es posible tener alta precisión y exactitud al medir concentraciones. Muchos tipos de componentes orgánicos e inorgánicos absorben radiación directamente en la región uv-vis, otros pueden ser convertidos para absorber especies por medio de una reacción química.⁵⁰

Cuando la luz uv-vis es absorbida por una molécula produce cambios en los estados electrónicos, es decir, la absorción de energía luminosa por compuestos orgánicos en la región UV-VIS implica la transferencia de los electrones desde el estado fundamental a estados de mayor energía. Esta absorción implica la transferencia de los electrones de los orbitales moleculares sigma (σ), pi (π) y n (orbitales con electrones no enlazantes, como los que existen en el oxígeno) a orbitales antienlace σ^* y π^* . Como el orbital n no forma enlaces, no hay orbital antienlace asociado con él. La longitud de onda en la que absorbe una molécula orgánica va a depender de la fuerza con la que se sujeten sus electrones.⁵⁰

Esta técnica es una de las herramientas principales para estudiar equilibrios químicos y cinéticos. En estos experimentos se seleccionan las longitudes de onda adecuadas para seguir el curso de uno o más de los reactivos, productos o alguna

especie intermedia. Utilizando los valores ya conocidos de absorptividades molares, o determinándolos previamente, se obtienen las concentraciones aplicando la ley de Beer. En los experimentos cinéticos, la espectrofotometría permite seguir la aparición de un producto o de un compuesto intermedio, o también la desaparición de un reactivo.⁵⁰

2.8.5. Análisis térmico

La rápida evolución en polímeros y plásticos, en particular, ha conducido al desarrollo oportuno de técnicas, instrumentos y modificaciones. Mediciones convenientes, exactas y rápidas de cosas tales como la temperatura de fusión, transiciones vítreas, y cristalización, junto con la habilidad para seguir con los procesos de curado, degradación y oxidación de los polímeros y materiales relacionados, han llevado a la amplia aceptación de análisis térmicos.⁵¹

La definición generalmente aceptada de análisis térmico abarca al grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de un sistema (sustancia o un material) en función de la temperatura mientras se le somete a un programa de temperatura controlado.⁵¹

Análisis termogravimétrico (TGA). Mide la cantidad y la tasa de cambio en peso de un material como función de la temperatura o el tiempo en una atmósfera controlada. Las mediciones son usadas principalmente para determinar la composición de materiales y predecir su estabilidad térmica a temperaturas elevadas, inclusive arriba de los 1000°C. La técnica puede caracterizar materiales

que exhiben ganancia o pérdida de peso debido a la descomposición, oxidación o deshidratación.⁵²

2.8.6. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es una propiedad termodinámica y provee una definición inequívoca de la mojabilidad respecto al movimiento de la interfase fluido-fluido. La ecuación de Young para un sólido ideal (perfectamente liso, químicamente homogéneo, rígido, insoluble y de superficie no reactiva) define el ángulo de contacto, en términos de energías superficiales o balance en fuerzas que lo interrelaciona con la tensión interfacial que actúa en la línea de contacto entre las tres fases.⁴⁶

Es un parámetro que se usa en materiales para caracterizar las propiedades de humectabilidad de éstos. Es por ello importante la medida del ángulo de contacto, en especial en biomateriales. Para la medida del ángulo de contacto existen básicamente dos métodos. Uno consiste en la medida del θ por la técnica de la gota en aire (o gota sécil), mientras que el otro realiza la medida del θ por la técnica de la burbuja cautiva. El primero es más general y fácil de usar, siendo más apropiado para materiales con bajo o nulo contenido en agua, mientras que el segundo requiere de un montaje más elaborado y se aplica para materiales con un importante contenido en agua, ya que mantiene las condiciones de hidratación. Por otro lado, la técnica de la gota en aire es más apropiada para la medida del ángulo de contacto de avance, o sobre superficie seca, mientras que la técnica de la burbuja cautiva es más apropiada para la medida del ángulo de retroceso, o sobre una superficie

humectada. Sin embargo, ambas técnicas pueden servir para la medida de ambos valores del θ con las oportunas consideraciones.⁵³

Un ángulo de contacto grande significa que la superficie es hidrofóbica y tiene baja energía superficial, mientras que un ángulo de contacto pequeño entre la superficie del sólido y la gota indica que la superficie es hidrofílica y tiene alta energía superficial. En el caso de que el ángulo formado sea de 180° , la gota es esférica, con un único punto de contacto entre el líquido y el sólido, por lo cual no habrá impregnación. Cuando el ángulo de contacto es de 0° , se produce un impregnado perfecto y, si el ángulo de contacto es mayor de 90° , se considera que el líquido no impregna el sólido. De acuerdo con la geometría y localización de la superficie que se va a analizar, se usan diferentes técnicas para determinar ángulo de contacto, la más común es la estática.⁵⁴

2.8.7. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E)

La tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Método de tinción de rutina en histología y citología. Es una tinción basada en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xanténico ácido (eosina). La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo, la hemateína, formada por oxidación de la hematoxilina. Éste se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro y aportando un buen detalle de los mismos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una coloración entre el rosa, y el rojo a las

estructuras y matrices celulares de carácter catiónico (a las que la hematoxilina no tiñe o lo hace muy débilmente). Se consigue así un buen contraste de las preparaciones microscópicas facilitando su observación.⁵⁵

CAPITULO 3

EXPERIMENTAL

3.1 Materiales

Los materiales utilizados en este trabajo se presentan a continuación, y fueron utilizados sin recibir ningún tratamiento previo:

- Acetato de celulosa, $M_n= 50000$, marca Aldrich
- Poli(vinil pirrolidona), $M_w= 360000$, marca Aldrich
- Poliacido láctico, marca NatureWorks
- Acetona, marca Aldrich
- Etanol, marca Meyer
- 2,2,2- Trifluoroetanol, Marca Sigma-Aldrich
- (-)Epicatequina, marca Aldrich
- Agua destilada
- Agua mili-Q
- Medio de cultivo MesenCult, marca StemCell Technologies
- Formaldehído, marca Golden Bell
- Fosfato de sodio, monobásico, monohidratado, cristal, marca J. T. Baker
- Fosfato de sodio dibásico, heptahidratado, marca Meyer
- Tampón fosfato salino (PBS), marca Sigma-Aldrich
- ketamina (100 mg/kg), marca Rhone Merieux
- Zilaxina (10 mg/kg), marca PiSA agropecuaria

- Xilol, marca Copac
- Etanol absoluto, 90 y 70%
- Ácido acético al 2%

3.2. Metodología

3.2.1. Preparación de membranas fibrosas poliméricas

Se controlaron 2 parámetros del sistema de electrohilado coaxial, que fueron el voltaje aplicado y el flujo de las soluciones poliméricas.

En principio y para la preparación de la solución de AC se utilizó como solvente una mezcla de acetona-agua en proporción 80:20, con una concentración final del 8% en peso. Para lograr lo anterior, se pesaron 1.43 gramos de AC, que se llevaron a un volumen de 16.7 mL de acetona más 3.3 mL de agua destilada. Se dejó en agitación magnética por espacio de 3 horas, a temperatura ambiente.

En el caso de la solución de PVP fue utilizado como solvente una mezcla de etanol-agua en proporción 85:15, a la misma concentración que para el AC, es decir al 8% en peso. En esta ocasión se pesaron 1.6 gramos de PVP, que fueron disueltos en 17 mL de etanol y 3 mL de agua destilada, que de igual manera, esta solución, pasó tres horas en agitación magnética.

Para lograr una solución al 13% P/V de PLA, se pesaron 2.6 gramos de PLA, que se disolvieron en 20 mL de 2,2,2-trifluoretanol (TFE), que de nueva cuenta, se

dejaron en agitación magnética por espacio de 24 horas, para que existiera una completa disolución de los pellets de PLA.

Una vez lista la solución de PVP, se tomaron 5 mL de PVP al 8% en peso, a los que se les añadió directamente 0.05 gramos de (-).epicatequina, esta mezcla se dejó por espacio de 12 horas en agitación magnética, a temperatura ambiente.

Una vez listas las soluciones poliméricas, fueron transferidos 5 mL de la solución de PVP + Epicatequina a una jeringa de plástico de 10 mL de capacidad, la cual estaba conectada con la aguja de menor diámetro (0.8 mm), pues se pretendía que esta mezcla se encontrara en el núcleo de la fibra; y 6 mL de la solución de AC se encontraban en una jeringa de plástico de la misma capacidad que la anterior. El mililitro en exceso que había era porque esta jeringa estaba ligada a la aguja de mayor diámetro (1.5 mm) mediante una manguera de plástico que ocupaba este volumen, a manera tal que esta solución formara la parte de la coraza de la fibra.

El mismo sistema de carga de las jeringas, y configuración de las agujas fue empleado para generar las fibras hechas a partir de PLA y PVP+Epicatequina, donde lo único que varió fue precisamente el polímero que se utilizó para formar la coraza de la fibra que en este caso fue PLA en lugar del AC.

En ambos casos, se utilizó una bomba para jeringa kdsCientific, desde donde se varió el flujo de la solución entre 4.0 y 0.1 mLh⁻¹ a intervalos de 0.1 mLh⁻¹. Una fuente de poder de alto voltaje, marca Spellman, modelo CZE 1000R, se empleó para aplicar un voltaje a la solución polimérica en un intervalo de 14-18 kV. Por

último la distancia entre la aguja y la placa colectora se mantuvo constante a 15 cm.

El colector fue una placa de aluminio (10 cm x 10 cm).

En las Tablas 3 y 4, se resumen los intervalos que se probaron, para reproducir las membranas fibrosas de AC/PVP + Epicatequina/AC y PLA/PVP + Epicatequina/PLA, respectivamente.

Tabla 3. Condiciones usadas en la preparación de membranas con estructura AC/PVP + Epicatequina/AC.

Membrana	Voltaje (kV)	Velocidad de flujo (mL/hr)
AC/PVP + Epicatequina/AC	14	4-0 - 0.1
AC/PVP + Epicatequina/AC	15	4.0 – 0.1
AC/PVP + Epicatequina/AC	16	4-0 – 0.1
AC/PVP + Epicatequina/AC	17	4.0 – 0.1
AC/PVP + Epicatequina/AC	18	4.0 – 0.1

Tabla 4. Condiciones usadas en la preparación de membranas con estructura PLA/PVP + Epicatequina/PLA.

Membrana	Voltaje (kV)	Velocidad de flujo (mL/hr)
PLA/PVP + Epicatequina/PLA	14	4-0 - 0.1
PLA/PVP + Epicatequina/PLA	15	4.0 – 0.1
PLA/PVP + Epicatequina/PLA	16	4-0 – 0.1
PLA/PVP + Epicatequina/PLA	17	4.0 – 0.1
PLA/PVP + Epicatequina/PLA	18	4.0 – 0.1

3.2.2. Cinética de liberación del flavonoide en agua grado miliQ

Para evaluar la capacidad de liberación del flavonoide de la membrana fibrosa de AC/PVP+Epicatequina/AC, que de ahora en adelante la llamaremos como material 1, se colocó el andamio completo y tal como se obtuvo del proceso de electrohilado, en 400 mL de agua grado miliQ, que estaban en un vaso de precipitado de capacidad de 1000 mL, los cuales se encontraban en agitación magnética. Cada 10 minutos, se tomó una muestra de agua de 3 mL, que se colocaron en una celda, para obtener los valores de absorbancia mediante un espectrofotómetro uv-vis (Perkin Elmer Lambda 20). Este procedimiento se repitió hasta que se alcanzó el equilibrio de liberación del

sistema. Para evaluar la cinética de liberación se graficó el tiempo contra la absorbancia, a una longitud de onda de 278.82 nm.

Dichos valores se interpolaron en una curva de calibración de la (-)-epicatequina, previamente elaborada para conocer la cantidad liberada del flavonoide (en mg). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Para el caso de la membrana hecha a partir de PLA/PVP+Epicatequina/PLA, que será nombrada como material 2 a lo largo del texto, fue imposible cuantificar el porcentaje de liberación, puesto que dicho material se disolvía completamente al estar en contacto con el agua.

3.2.3. Cinética de liberación del flavonoide en el medio de cultivo mesenCult

Se cuantificó la cantidad de (-)-epicatequina liberada en 36 mL del medio de cultivo mesenCult, donde fue colocado un cuadrado de la membrana fibrosa de aproximadamente 9 cm²; dicho sistema se mantuvo en una parilla de agitación magnética durante todo el proceso. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo cada 10 minutos, en el espectrofotómetro anteriormente mencionado, a una longitud de onda de 278.82 nm, y tomando una alícuota de 1000 µL del medio de liberación y 2000 µL del medio de cultivo fresco, de nueva cuenta hasta encontrar el equilibrio. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Lo anterior fue repetido paso por paso para el caso del material 2.

3.3. Técnicas de caracterización

3.3.1. Microscopia electrónica de barrido

Una vez obtenidas las condiciones para la obtención de membranas fibrosas, se prosiguió a caracterizarlas, evaluando el tamaño promedio de los diámetros de las fibras y las características morfológicas mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL 5410LV. Se realizaron microfotografías de las membrana del material 1 y 2, antes de ponerla en contacto con el agua y el medio de cultivo, y después de dicho contacto. Se utilizó un haz de electrones de 25 y 20 kV de intensidad a alto vacío y todas las muestras se recubrieron con una película de oro.

3.3.2. Microscopía electrónica de transmisión

También se evaluaron los diámetros de las fibras y las características morfológicas de los dos materiales obtenidos, mediante un microscopio electrónico de transmisión JEOL jem-2010f. Se obtuvieron microfotografías de cada una de las membranas obtenidas, principalmente para poder observar la estructura núcleo-coraza, y si ésta se veía afectada tras la liberación del flavonoide en diferentes medios.

Las muestras de ambos materiales, sin ningún tratamiento previo, fueron colocadas entre dos rejillas de malla de cobre, las cuales cuentan con 50-400 orificios por pulgada para observar los cortes seriados.

3.3.3. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

Para la obtención de los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) fue utilizado un equipo Perkin-Elmer FTIR espectrofotómetro de espectro GX, aplicando la técnica de pastillas de bromuro de potasio (KBr), en el cual las membranas examinadas no tuvieron algún tratamiento previo.

Se obtuvo el espectro de infrarrojo para las membranas de ambos materiales antes y después de liberar en agua y en medio de cultivo, a manera de comprobar la presencia o ausencia de (-)-epicatequina en las fibras.

3.3.4. Análisis termogravimétrico

Se llevó a cabo el análisis termogravimétrico, donde se utilizó un equipo TA Instruments Q500. Se tomaron muestras de aproximadamente 6 mg y fueron sometidas a calentamiento desde 25°C hasta 600°C con una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 10°C min⁻¹ bajo atmósfera de nitrógeno.

3.3.5. Ángulo de contacto

Se empleó un goniómetro Cam-Plus en la medición del ángulo de contacto, para observar la interacción del agua con la superficie de ambos materiales. Para lo cual se depositó una gota de agua desionizada (16 µL) sobre los andamios con una jeringa y, se determinó la curvatura de la gota y el ángulo de contacto en la escala grabada del equipo. Se depositaron 5 gotas en cada muestra.

3.4. Efecto de los andamios fibrosos sobre el corazón de ratas Wistar

Para evaluar el efecto del andamio sobre el tejido cardíaco, se implantó la membrana fibrosa a un grupo de 6 ratas Wistar la membrana fibrosa, a través de una toracotomía, y se evaluó a través de una tinción histológica con hematoxilina-eosina, la influencia de esta última en la respuesta del corazón a los 5, 10 y 15 días después de realizado el implante. Se realizaron 2 condiciones: 1) IAM más membrana con estructura AC/PVP+E/AC (n=6) y 2) IAM más membrana PLA/PVP + E/PLA (n=6). Se tomó como grupo control, ratas con sólo IAM. Se evaluó la respuesta del corazón a través de una tinción histológica a los 5, 10 y 15 días.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité institucional del uso y cuidado animal y de acuerdo a las guías de salud publicadas por el instituto nacional para la investigación animal. Para lograr este propósito, ratas adultas Wistar entre 350- 400 gramos fueron anestesiadas vía inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) y zilaxina (10 mg/kg). El infarto agudo al miocardio fue generado tras la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior, lo cual se consiguió a través de una intubación endotraqueal usando un catéter, el cual estaba conectado a un ventilador para animales. Una toracotomía izquierda fue desarrollada vía el cuarto espacio intercostal y los pulmones fueron retraídos para exponer el corazón. Una vez que el pericardio estuvo abierto, una sutura 7-0 fue colocada para ligar la arteria coronaria descendente anterior izquierda aproximadamente entre 2 y 3 mm por debajo del borde de la aurícula izquierda. El criterio utilizado para determinar una oclusión exitosa fue el cambio de color inmediato en la pared ventricular izquierda

(de rojo a pálido) (Figura 9). Para los grupos experimentales tratados con los materiales fibrosos, el parche del material de AC/PVP + Epicatequina/AC fue suturado (2 puntos) sobre la superficie del miocardio isquémico, mientras que el material de PLA/PVP + Epicatequina/PLA sólo fue suturado en 1 punto. El pecho fue cerrado y los animales mantenidos bajo la luz hasta su recuperación.



Figura 9. Representación gráfica de la generación de IAM tras la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior.

3.4.1. Tinción con hematoxilina-eosina

Una vez extraído el corazón implantado con los materiales, se colocó el órgano en frascos que contenían formol buferado al 10%. De esta manera el análisis histológico fue llevado a cabo siguiendo los protocolos estándares para la inclusión

en parafina. Las muestras de los corazones montados fueron teñidos con hematoxilina (HE) y eosina (EO) (HE para visualizar el núcleo en azul y EO para el citoplasma y tejido conectivo en rosa).

Primero se desparafinó en Xilol, para su posterior deshidratación en concentraciones aumentadas de etanol, por un espacio de 7 minutos cada una. Seguido de esto, se tiñó con hematoxilina por otros 7 minutos, y una vez pasado este tiempo, se realizó el primer lavado bajo la corriente del agua. Posterior a ello se agregó una solución de ácido acético al 2%, para realizar un segundo lavado. Y luego se tiño con eosina aproximadamente 5 minutos, se volvió a deshidratar el espécimen en etanol, y se montó en la laminilla correspondiente, para su posterior observación.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Condiciones óptimas de preparación del material 1

Las condiciones óptimas para la preparación de membranas fibrosas con estructura núcleo coraza de acetato de celulosa y poli (vinil pirrolidona) con (-) epicatequina embebida en el centro de la fibra (material 1) fueron encontradas. El flujo idóneo para ambos polímeros fue de 3.5 mL h^{-1} en el sistema coaxial de electrohilado. Se utilizó un voltaje y una distancia entre la aguja y la placa colectora, de 15 kV y 15 cm respectivamente, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones óptimas para la formación de fibras de AC/PVP+Epicatequina/AC

Parámetro	Valor óptimo
Cantidad de (-) epicatequina	0.05 gr
Flujo de la solución	3.5 mL h^{-1}
Voltaje aplicado	15 kV
Distancia entre la punta de la aguja y el colector	15 centímetros
Volumen final de cada solución polimérica	2 mL

4.2. Cinética de liberación del material 1 en agua miliQ

En la Figura 10 se muestra el porcentaje de liberación de la (-) epicatequina del material 1, monitoreado a una longitud de onda de 278 nm. El estudio mostró el siguiente comportamiento, al ir transcurriendo el tiempo aumentó gradualmente la absorbancia hasta llegar a un valor constante en un tiempo de 300 minutos, lo cual significa una liberación final de 0.0215 gr (21.5 mg) de (-) epicatequina por membrana. Estos resultados indican, que dicho valor representa el 80.74% de la cantidad total incorporada en una membrana de 10x10 cm.

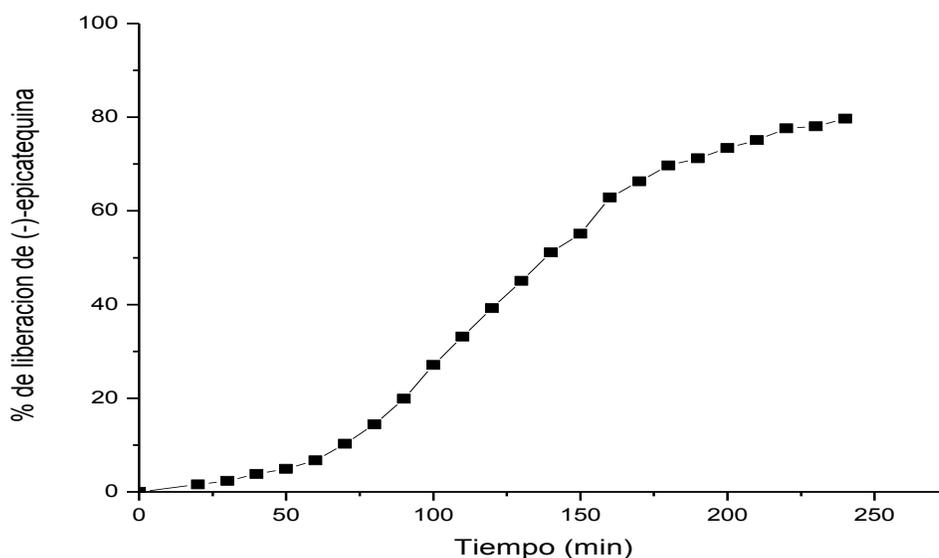


Figura 10. Liberación de (-) epicatequina del material 1 en agua miliQ.

Porcentaje contra tiempo.

Este resultado sugiere que el uso potencial de las membranas para el tejido dañado es viable, puesto que un estudio realizado por Yamazaki y cols., mostró que

la (-) epicatequina tiene muy buenos efectos a nivel cardiaco (Yamazaki y cols., 2010).

4.3. Cinética de liberación del material 1 en medio de cultivo mesenCult

Para observar el comportamiento del flavonoide en un medio diferente al agua, se realizó a través de espectroscopia uv-vis, el monitoreo de la liberación de la (-)-epicatequina, en el medio mesenCult, el cual es usado en el crecimiento y expansión de CMM. En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos, como se puede observar en este medio la liberación de la epicatequina es muy diferente a la que ocurre en agua, en este medio se observó que al minuto 10 se alcanzó una liberación del 31% y a partir de este tiempo la liberación de la molécula se mantuvo constante.

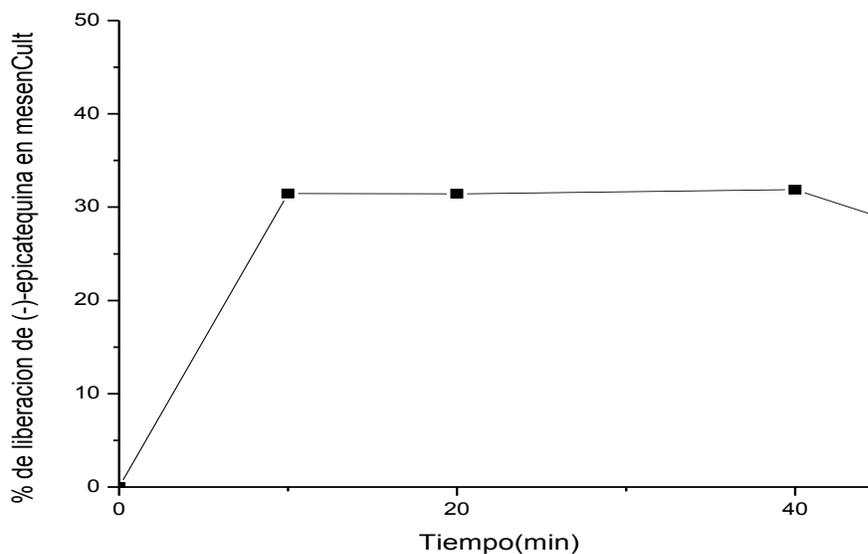


Figura 11. Liberación de (-)-epicatequina del material 1 en mesenCult. Porcentaje de liberación contra tiempo.

Este comportamiento se puede atribuir a la presencia de varios compuestos en el medio de cultivo que pueden alterar la liberación, a través de procesos como la adherencia de los componentes del medio a los extremos de las fibras, impidiendo que se libere el flavonoide.

4.4. Caracterización del material 1

4.4.1. Morfología por microscopía electrónica de barrido

Para caracterizar la morfología de las fibras del material 1, se llevó a cabo un estudio por MEB. En la Figura 12 se muestran las microfotografías a diferentes ampliaciones. Las imágenes indican una apariencia uniforme y suave, sin aparición de perlas o gotas en la estera formada (inciso a). Las microfotografías de 5000 y 7500 aumentos (inciso b y c respectivamente), muestran de un modo más claro, la forma que adquirieron las fibras de una manera tridimensional, poniendo de manifiesto una estructura cilíndrica y no porosa de cada una, además de un tamaño aproximado de poco menos de 1 micrómetro.

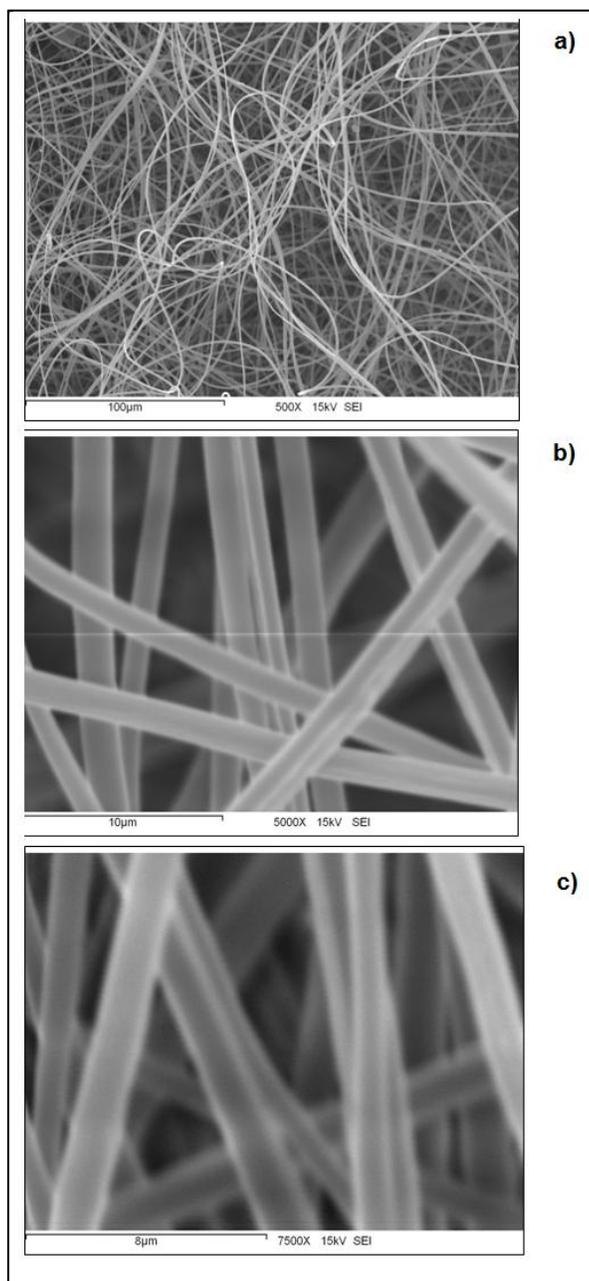


Figura 12. Micrografías de AC/PVP+Epicatequina/AC en a) 500x, b) 5000x y c) 7500x

4.4.2. Estructura núcleo coraza por microscopía electrónica de transmisión

La Figura 13 muestra las imágenes obtenidas por MET para la membrana del material 1. La cual da a conocer que la fibra adquirió, al formarse, una estructura núcleo-coraza cuyo diámetro total es de $0.70\mu\text{m}$, por otro lado, la parte central de la fibra constituida por PVP y (-) epicatequina, al ser una región con dos componentes impide el flujo de electrones fácilmente, presentándose una imagen más densa con grosor de $0.48\mu\text{m}$.

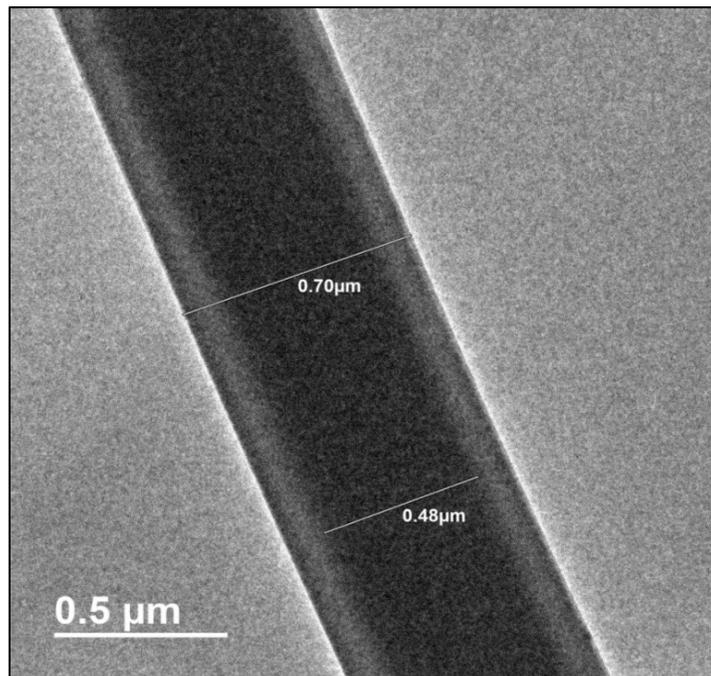


Figura 13. Micrografía de AC/PVP+Epicatequina/AC a 5000x.

Con la finalidad de evaluar si las fibras mantienen su forma o cambian después de haber liberado a la epicatequina, se llevó a cabo un estudio por MET de las fibras del material 1. En la figura 14 se muestra la micrografía de una fibra después de la liberación del flavonoide en agua, como indica la figura, su estructura sigue siendo cilíndrica lo que significa que la pérdida de la epicatequina en condiciones neutras no afecta la morfología, ni la integridad de las fibras, sin embargo, el diámetro tanto de la fibra completa como la del núcleo se vio afectado, se observó una reducción en su diámetro total de $0.70\ \mu\text{m}$ a $0.62\ \mu\text{m}$, además en el núcleo el grosor pasó de $0.48\ \mu\text{m}$ a $0.24\ \mu\text{m}$, esto se puede atribuir a la liberación de (-) epicatequina, debido a que no se libera el flavonoide en su totalidad en un periodo de 4 horas.

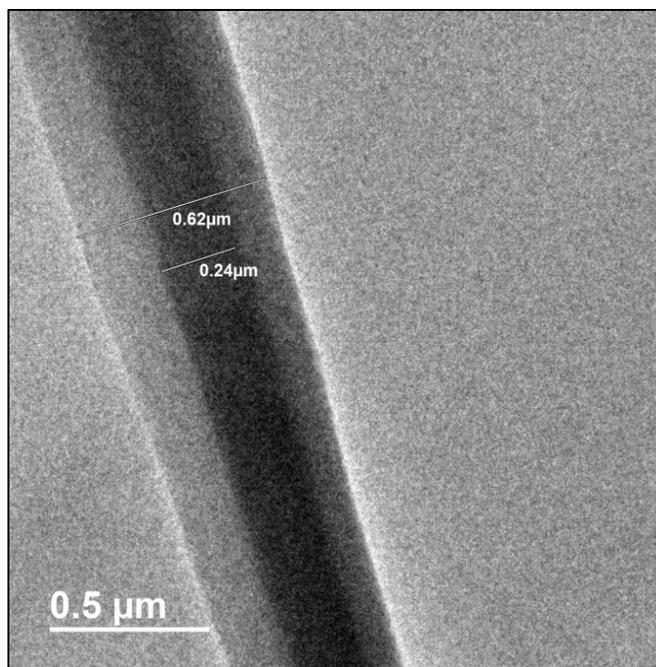


Figura 14. Micrografía AC/PVP+Epicatequina/AC, después de la liberación del flavonoide. 5000x.

4.4.3. Análisis de componentes por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

La espectroscopia FTIR de las fibras fue llevada a cabo para corroborar la existencia de los tres componentes en la fibra. En la Figura 15 se muestran los espectros de IR, de los diferentes componentes de las fibras AC, PVP y epicatequina, además de las fibras compuestas por AC/PVP+Epicatequina/AC antes y después de realizar el estudio de liberación. El espectro A corresponde al AC, donde se puede observar las bandas características del grupo éster, vibración del grupo C=O a los 1751 cm^{-1} y de C-O a 1235 cm^{-1} . El espectro b corresponde al PVP y la señal que destaca es la del grupo C=O que aparece a 1662 cm^{-1} . En el inciso c se muestra el espectro de la epicatequina sola, donde sobresalen las señales a 3500 y 3450 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos de O-H presentes en la molécula, en 1627 cm^{-1} , se presenta la señal de estiramiento del C=C y en 1144 la señal correspondiente al C-O del grupo éter.

En la Figura 15 (d) se muestra el espectro de la membrana de AC/PVP+Epic/AC, donde los picos característicos del AC, PVP y epicatequina fueron observados, demostrando la existencia del flavonoide en la fibra. En el inciso (e) de la figura, se muestra el espectro del material 1, después de haber liberado la (-)-epicatequina en agua, lo cual se vio reflejado en la disminución sustancial del pico representativo del PVP y la intensidad de la banda que

representa al flavonoide, corroborando, de nueva cuenta, la liberación efectiva del flavonoide de las fibras.

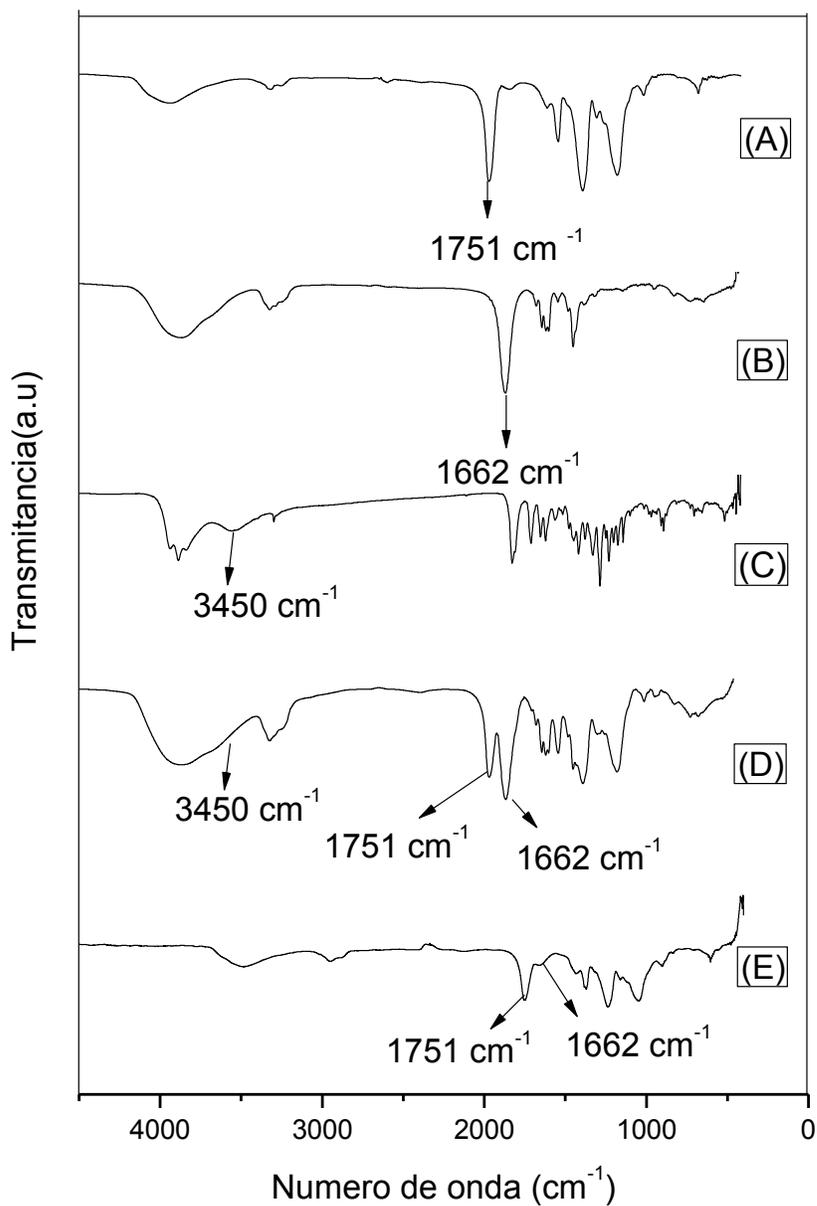


Figura 15. Espectros de infrarrojo de a) AC, b) PVP, c) (-) Epicatequina, d) AC/PVP+Epicatequina/AC y e) después de liberar en agua miliQ.

4.4.4. Pérdida de peso por termogravimetría

Una manera de evaluar la estabilidad de un material es realizando un estudio de análisis térmico. En el análisis termogravimétrico se registra la pérdida de peso de una muestra en la medida en que se incrementa la temperatura bajo condiciones controladas de velocidad de calentamiento. En la Figura 16 se muestra el termograma del material 1. Este gráfico presenta tres caídas, que a continuación se describen con más detalle.

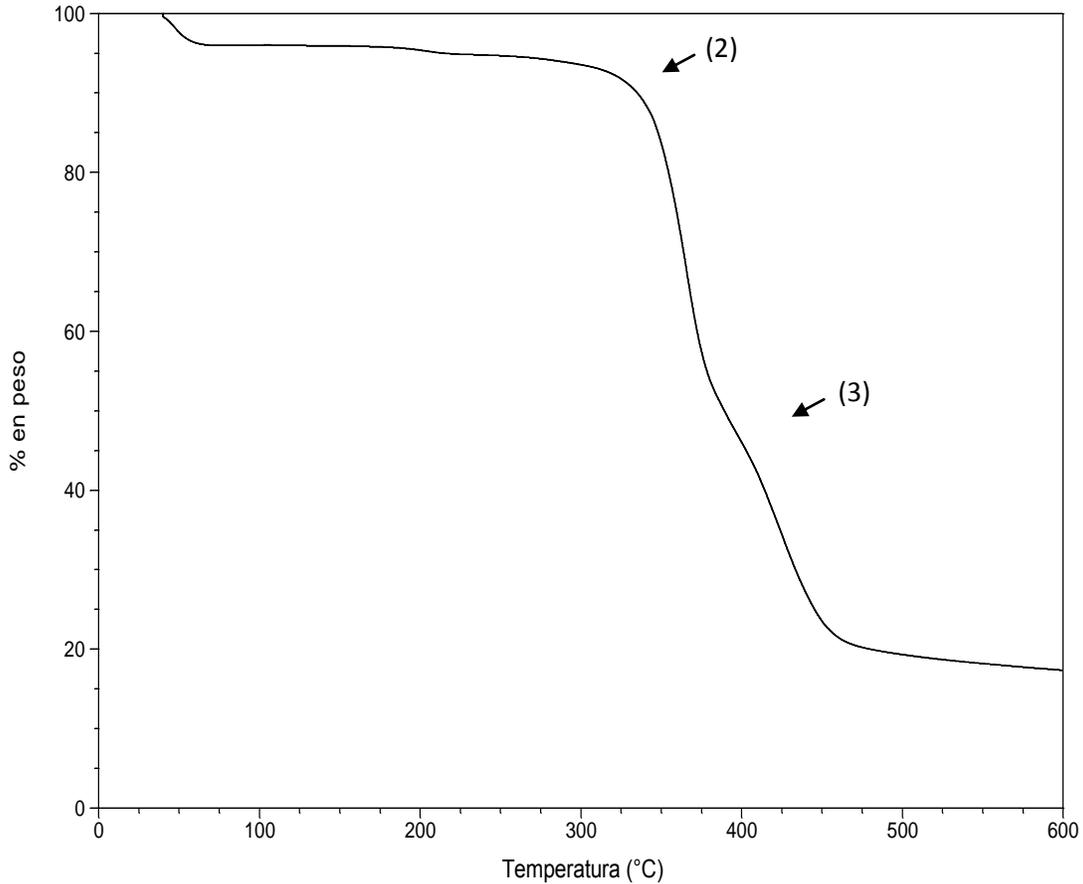


Figura 16. Termograma de la membrana del material 1.

La primera pérdida de peso significativa, de alrededor del 10%, se registró alcanzando la temperatura de los 100°C, que se debe principalmente a la pérdida de humedad y solvente adsorbido en las fibras. Las pérdidas más significativas ocurren en el intervalo de 350 y 450 °C. Estas son atribuidas al AC (2) y al PVP (3) respectivamente; dichas asignaciones están basadas en el análisis individual de las pérdidas de peso de los polvos de AC y PVP mostrados en la Figura 17, donde para las fibras de AC y PVP, las pérdidas de peso están alrededor de los 320°C y 420°C respectivamente.

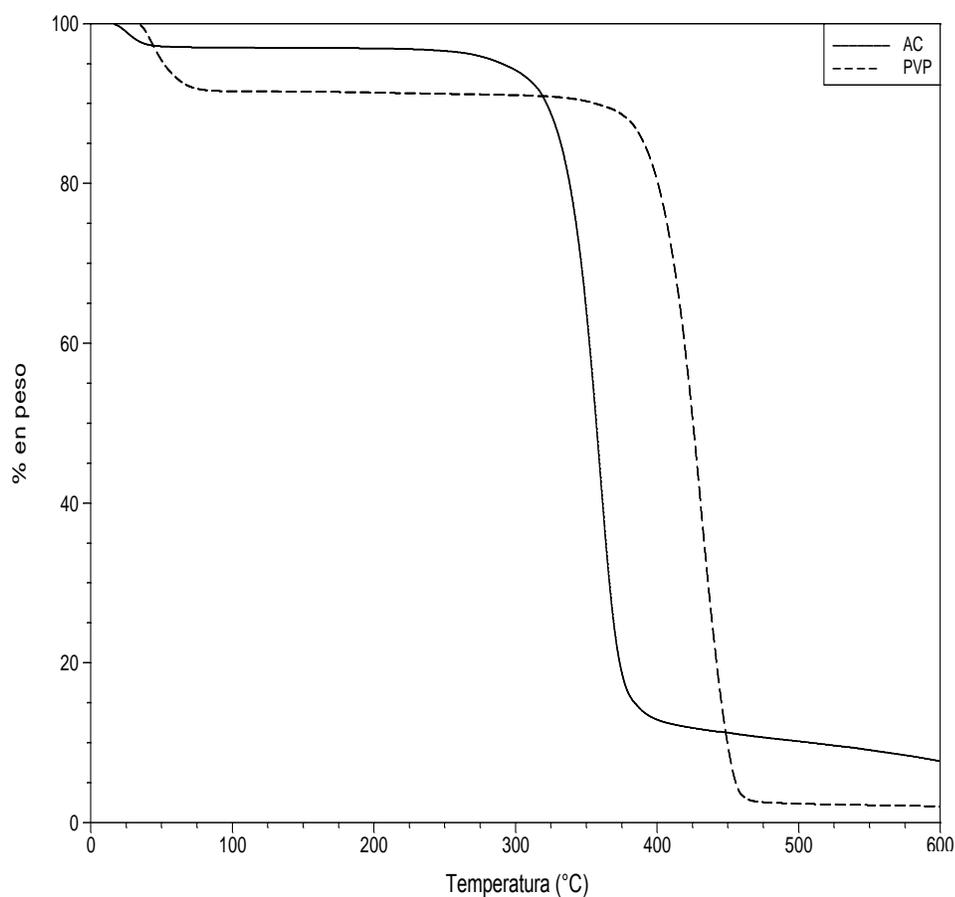


Figura 17. Termograma de AC y PVP.

Lo anteriormente descrito, indica que la presencia de (-)-epicatequina en las fibras, no afecta de manera significativa las propiedades térmicas del material 1, pues la señal atribuida al AC enmascara la presencia de (-)-epicatequina, debido a que su degradación ocurre entre los 200 y 400°C, según lo reportado por Carol López de Dicastillo y cols, en el 2013. Como se puede observar en la Figura 16, no se alcanzó una degradación completa del material a los 600°C.

4.5. Análisis histológico por tinción con H&E del material 1 implantado en el miocardio de ratas Wistar

Para evaluar la integración de los materiales con el tejido del huésped, determinar si existió una migración celular y/o la formación de nuevos vasos, se llevó a cabo una tinción histológica con H&E. La histología de cortes del corazón, obtenidos a los 5, 10 y 15 días después del injerto se muestran en las Figuras 18, 19 y 20 respectivamente.

Como se observa en la Figura 18, en el inciso (a) y (b) la parte del endocardio y miocardio respectivamente, con un área de regeneración a los 5 días de haber colocado el implante, que en los grupos control (d), (e) y (f) esta área se observa isquémica. Algo que hay que destacar es la presencia de cúmulos de miocitos y de fibrocitos, depositando colágeno, en la figura 18 (c). Por su parte en las imágenes del grupo control, inciso (d) se puede observar la presencia de tres capas, bien definidas, dos externas basofílicas y una interna eosinofílica, la cual muestra un aspecto de necrosis isquémica, como se mencionó anteriormente, ocasionada por la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior del corazón de la rata. En el

inciso (e) se muestra una imagen ampliada de la zona isquémica, donde se pueden observar capilares congestivos con diámetros diferentes, al igual que en el inciso (f), donde se pueden llegar a observar algunas células intersticiales.

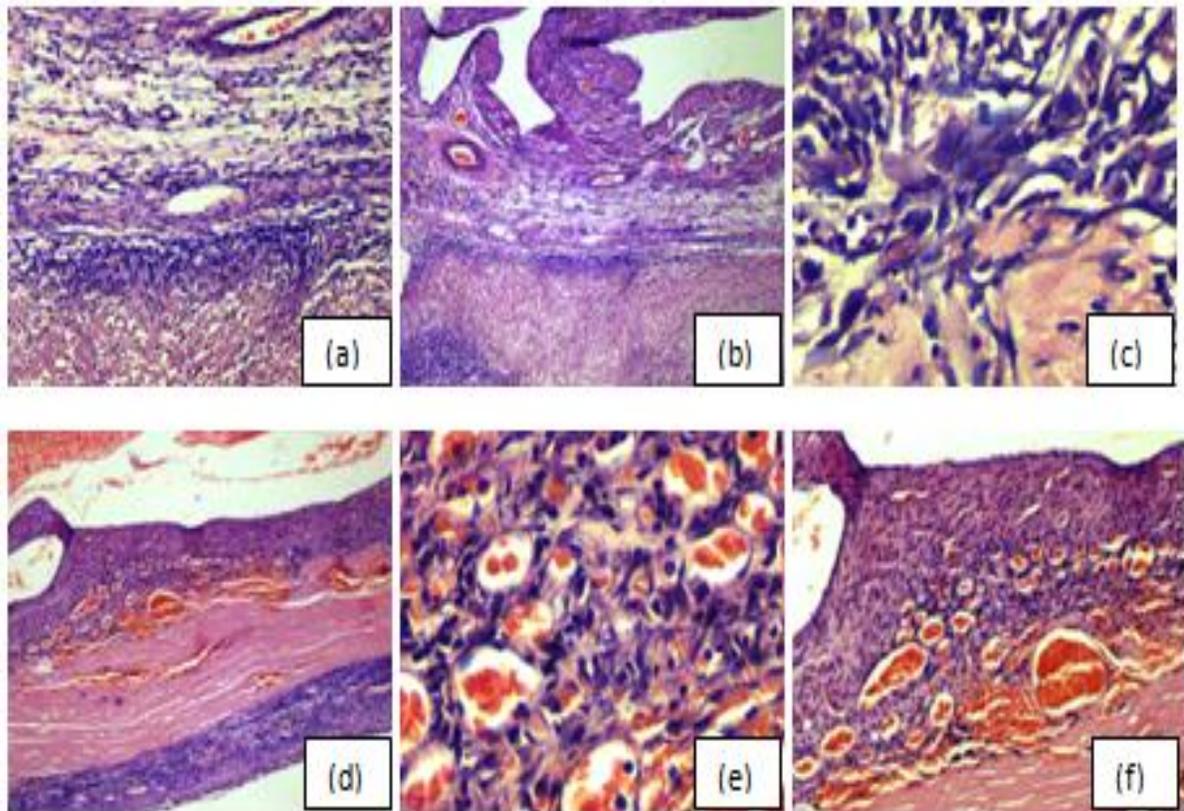


Figura 18. (a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 1 a los 5 días, a diferentes aumentos; (d), (e) y (f) imágenes del grupo control a los 5 días.

En la Figura 19, se muestra la respuesta del tejido cardiaco a los 10 días después de haber implantado el material 1. En el inciso (b) se observa en la parte inferior de la imagen, la presencia de un material extraño teñido de color negro, lo cual atribuimos a la presencia del material 1 en el miocardio. Se puede afirmar que

hay un daño miocárdico, que también pudiera ser daño reparativo o fibroblástico, pues en el inciso (a) y en el (c) está demostrada la presencia de fibroblastos con colágeno.

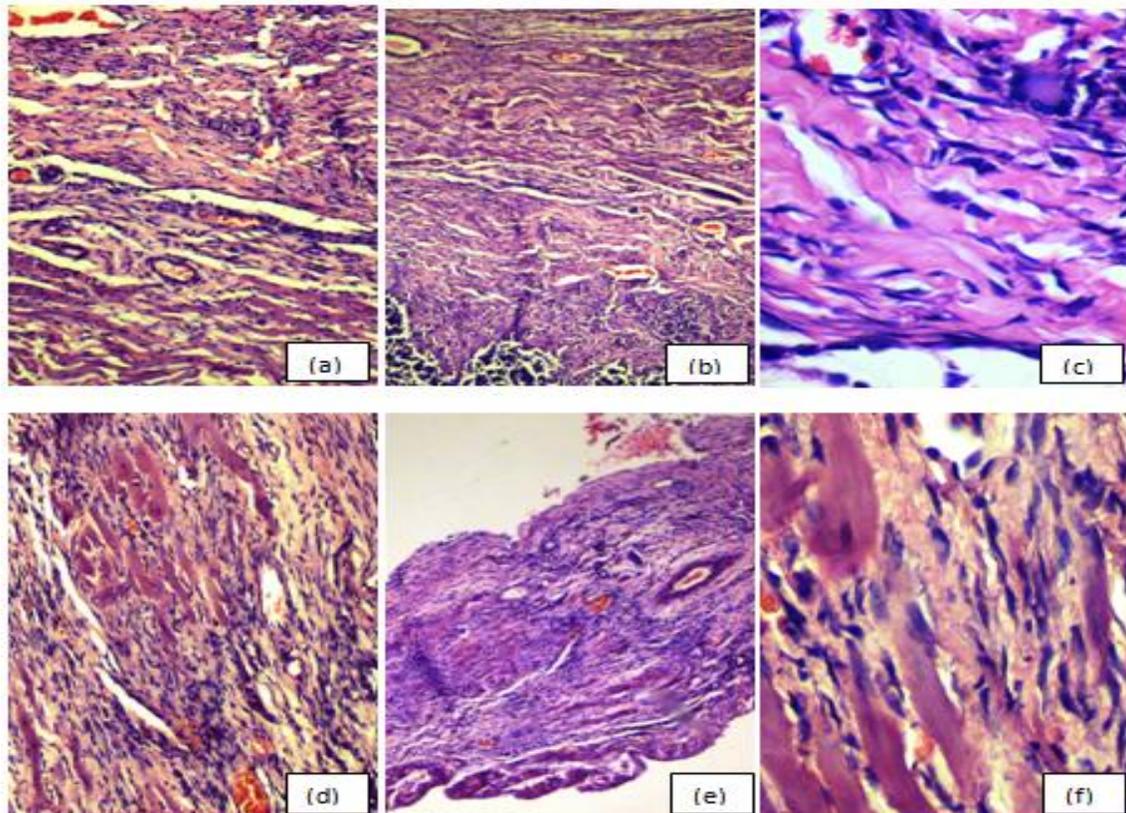


Figura 19. (a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 1 a los 10 días, a diferentes aumentos; (d) (e) y (f) imágenes del grupo control a los 10 días.

Al compararlo con los grupos control que sufrieron un IAM sin el implante, se puede afirmar que no hubo una disminución en la presencia de los fibroblastos, como se observa en la Figura 19 (d), donde se notan algunos miocitos que pudieran ser residuales, inclusive existe una aparente proliferación de núcleos, lo que indica que

el tejido cardiaco después de haber sufrido el infarto, trata de subsanar la pérdida de funcionalidad del mismo, lo que ocurre en menor intensidad en las imágenes donde se implantó el material.

Por último se midió la respuesta del tejido hacia el andamio fibroso, a los 15 días después de haber implantado el material 1 sobre la zona isquémica del corazón, cuyos resultados se muestran en la Figura 20.

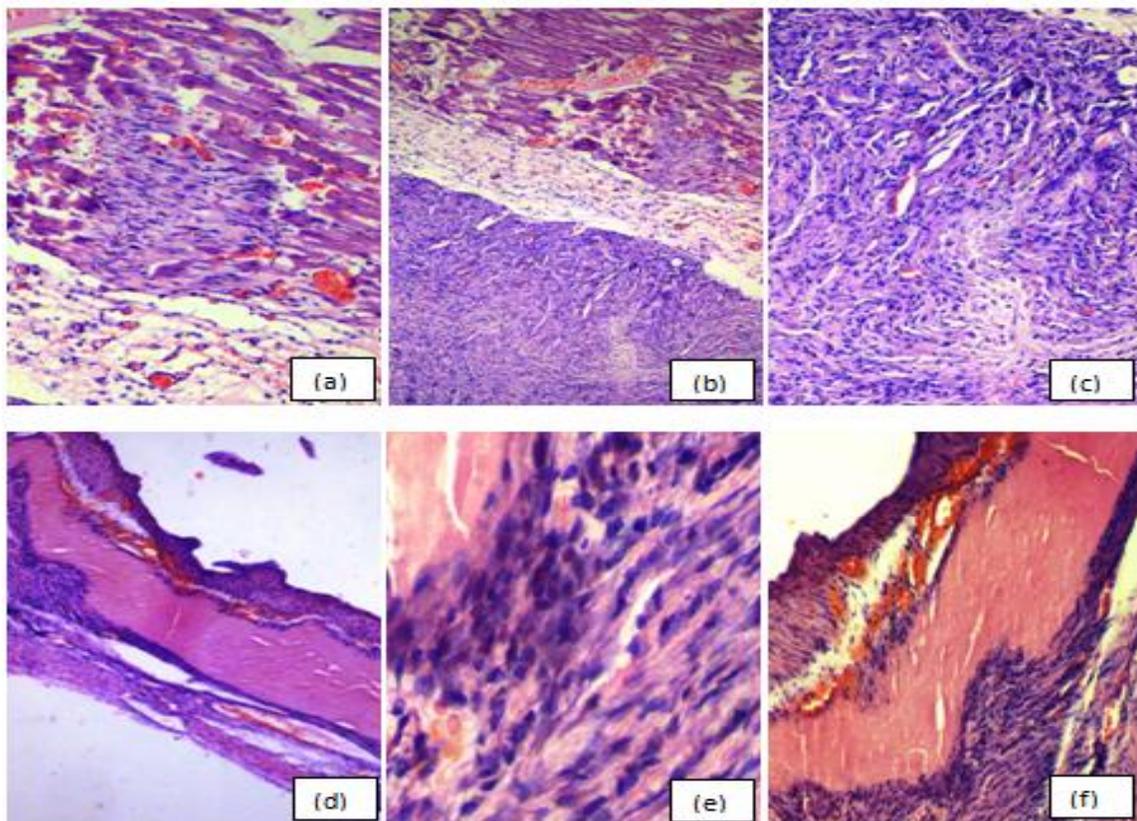


Figura 20. (a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 1 a los 15 días, a diferentes aumentos. (d) (e) y (f) imágenes del grupo control a los 15 días.

El grupo implantado se muestra en los incisos (a) hasta el (c). Donde se puede corroborar que el miocardio efectivamente estuvo en agonía (a), también desarrolló una reacción a cuerpo extraño, pues se perciben células gigantes multinucleadas, con granulación en (b), y por último se observa un tejido cicatrizante que al parecer sustituyó al implante en el inciso (c). Mientras que las imágenes correspondientes al grupo control de 15 días, se muestran desde el inciso (d) hasta el (f), donde de nueva cuenta se observa proliferación celular, pero con aparente necrosis isquémica, que se puede seguir observando en el inciso (f), mientras que en el inciso (e) se muestran algunos miocitos residuales y otros tantos fibrocitos que estuvieron depositando colágeno, lo cual es un indicativo que el tejido que estuvo en contacto con el implante sufrió más daño.

4.6. Condiciones óptimas de preparación del material 2

Se obtuvieron las condiciones óptimas para la preparación de membranas fibrosas hechas a partir de poli (ácido láctico), con estructura coaxial PLA/PVP+Epicatequina/PLA, que llamaremos material 2, de aquí en adelante, y las cuales se resumen en la Tabla 6. Cabe destacar que sólo se varió la elección del material que forma la coraza en la estructura de la fibra en este material, y se seleccionó al PLA, entre otras cosas, principalmente por sus propiedades de biocompatibilidad.

Tabla 6. Condiciones óptimas para la formación de fibras de PLA/PVP+Epicatequina/PLA.

Parámetro	Valor óptimo
Cantidad de (-) epicatequina	0.05 gr
Flujo de la solución	2.2 mL h ⁻¹
Voltaje aplicado	15 kV
Distancia entre la punta de la aguja y el colector	15 centímetros
Volumen final de las soluciones poliméricas	2 mL

4.7. Cinética de liberación del material 2 en medio de cultivo mesenCult

En el estudio de liberación de epicatequina en el material 2, compuesto por PLA/PVP+Epicatequina/PLA, no fue posible medir la liberación en agua grado miliQ, debido a que la membrana se desintegraba completamente luego de ponerla en contacto con el sistema de liberación, por lo que en esta sección sólo se presenta la liberación del material 2 en el medio de cultivo mesenCult. En la Figura 21, se muestran los resultados obtenidos, donde la liberación máxima alcanzó un 88% a los 20 minutos, lo cual indica que la epicatequina no se encontraba tan fuertemente unida a la estructura de la fibra como en el caso del material 1, pues en mucho menor tiempo libera una gran cantidad del flavonoide similar a la alcanzada a los 300 minutos de liberación en agua del material 1, probablemente debido a las

interacciones que existen entre los componentes del medio cultivo y las fibras. Esto pone de manifiesto que la elección del polímero que forma la coraza de las fibras, influye de manera significativa en el tipo de interacciones que puedan darse entre éste último y la (-)-epicatequina, que de cualquier manera son menos fuertes que para el otro material.

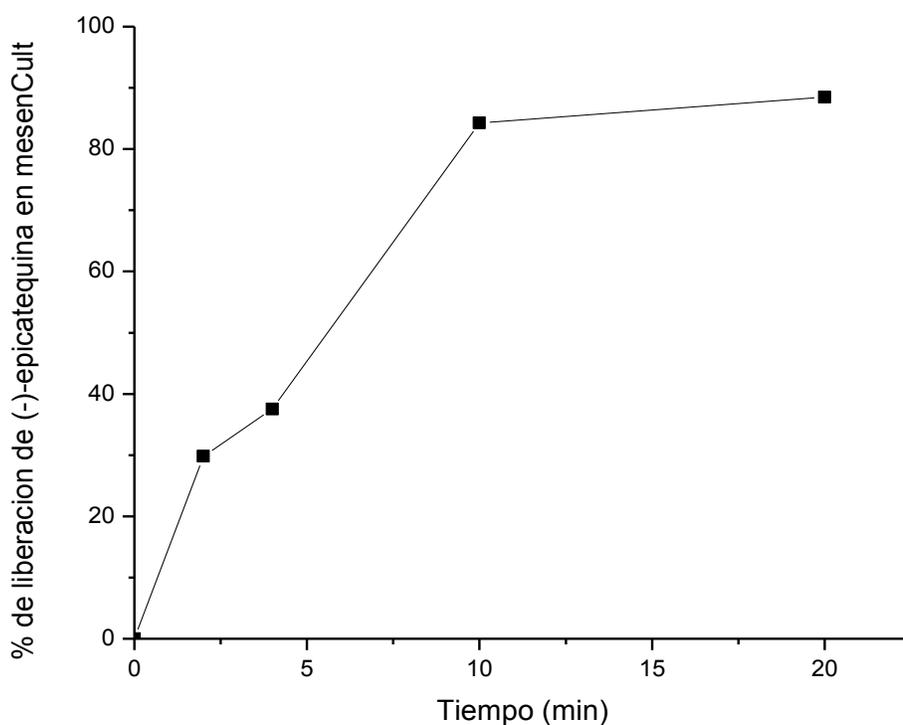


Figura 21. Liberación de (-)-epicatequina del material 2 en mesenCult. Porcentaje de liberación contra tiempo.

4.8. Caracterización del material 2

4.8.1. Morfología por microscopía electrónica de barrido

Con el fin de corroborar que se habían obtenido las membranas del material 2 exitosamente, se llevó a cabo una microscopía electrónica de barrido sobre las mismas, donde los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22.

Fibras suaves y de diámetros homogéneos fueron obtenidas, como se corrobora en la Figura 22 en los incisos (a) y (b). Mientras que en el inciso (c) se pueden apreciar fibras planas, caso contrario al material 1 donde las fibras tienen una forma cilíndrica. El diámetro promedio es cerca de los 2 μm , lo que nos indica que el cambio en el material que forma la coraza, influye directamente en el diámetro y forma de las fibras. Lo cual también afecta en la interacción de la epicatequina cargada en la parte nuclear de la misma, con el material de la coraza, que se vio reflejado en el porcentaje tan alto de liberación alcanzado en tan poco tiempo.

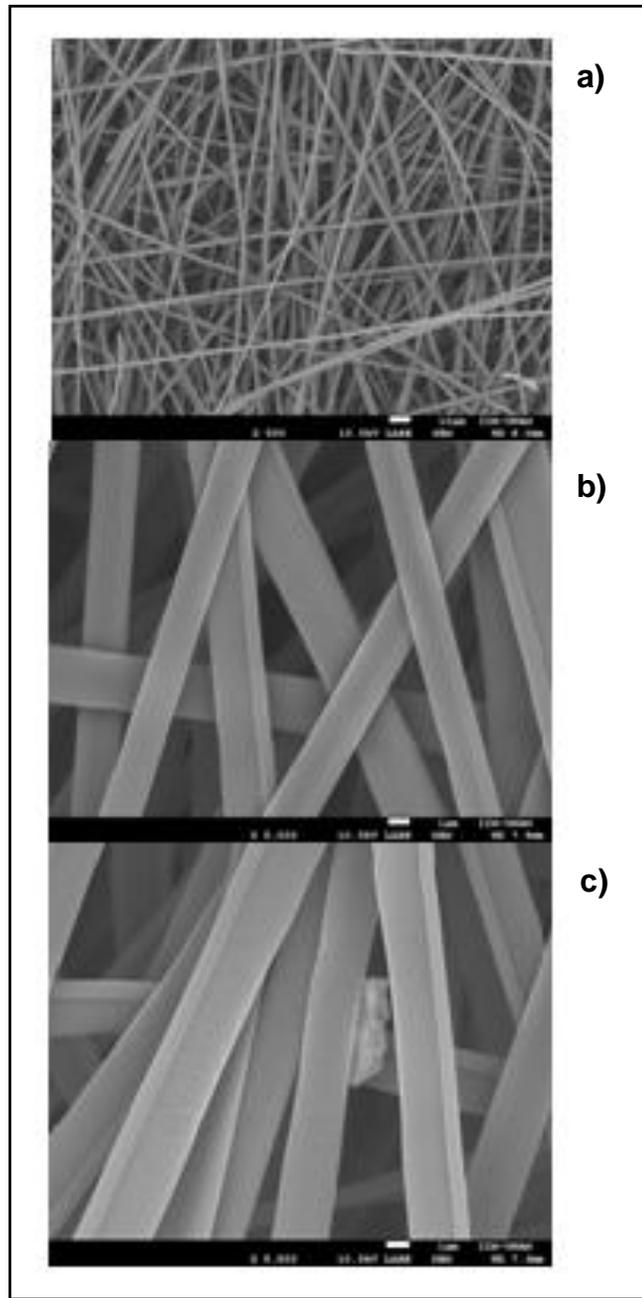


Figura 22. Micrografías de PLA/PVP+Epicatequina/PLA en a) 500x, b) 5000x y c) 5500x

4.8.2. Estructura núcleo coraza por microscopía electrónica de transmisión

Se investigó la morfología de las membranas del material 2 y se evaluaron los diámetros de las fibras. En la Figura 23 se puede observar una fibra con la estructura núcleo coraza, demostrando que se logró con éxito la formación de este tipo de estructuras, mediante la configuración del electrohilado coaxial. En el análisis por MET, se encontró la existencia de dos poblaciones en el material, en lo que al diámetro de las fibras concierne, una de ellas de diámetros pequeños, aproximadamente de 0.20-0.30 μm de diámetro externo, y de 0.14-0.18 μm de diámetro interno (Figura 23 (a)) y la otra de diámetros más grandes, de aproximadamente 0.4-1 μm de diámetro externo y de 0.29-0.40 μm de diámetro interno (Figura 23 (b)).

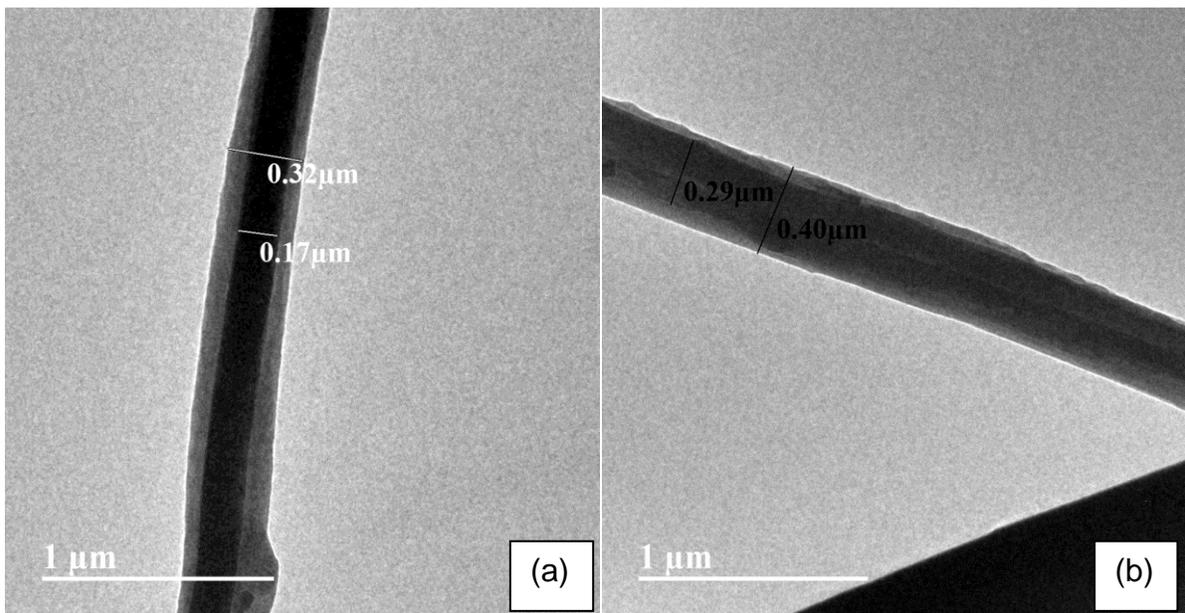


Figura 23. Micrografías de PLA/PVP+Epicatequina/PLA (a) población de diámetros pequeños y (b) población de diámetros grandes. 4000x.

Con el fin de analizar el efecto de la liberación del flavonoide, se le tomaron microfotografías a la membrana del material 2, después de haber liberado en el medio de cultivo mesenCult. En la figura 24, se puede observar que se alteró la integridad del material, presentándose deformación y un mayor deterioro de las fibras. No hubo una disminución aparente en el diámetro interno, pues éste se conserva antes y después de haber liberado, como fue el caso del material 1, donde la reducción del diámetro interno es muy evidente.

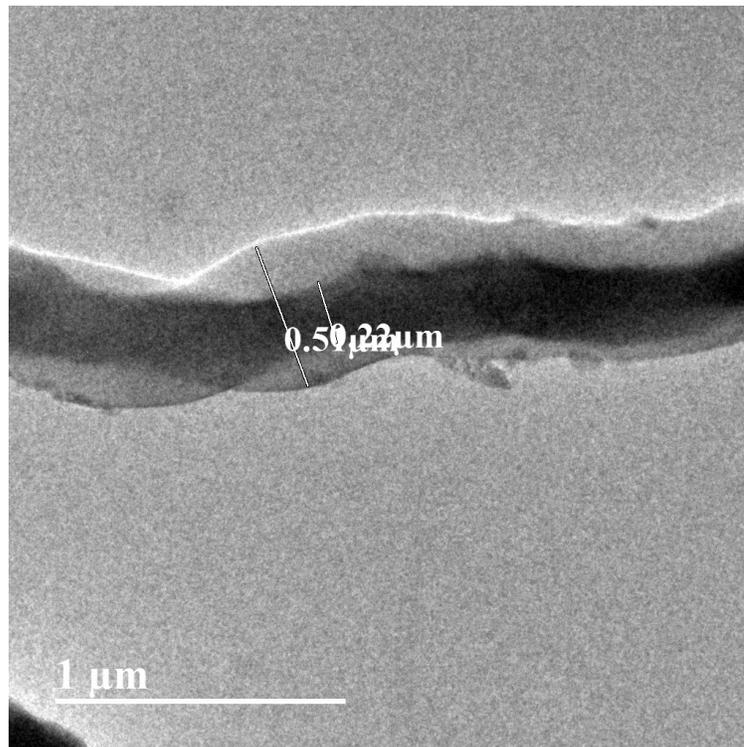


Figura 24. Micrografía de una fibra de PLA/PVP+Epicatequina/PLA, después de su liberación en el medio de cultivo mesenCult. 4000x.

4.8.3. Análisis de componentes por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

Este nuevo material también fue caracterizado por FTIR. En la Figura 25 se presentan los espectros de los componentes individuales, en los incisos a, b y c. En el espectro (a) se muestra el IR del PLA, donde destaca el pico a los 1757 cm^{-1} , que se le atribuye a la tensión del enlace C=O en la cadena polimérica. Como ya se describió con anterioridad, el espectro (b) corresponde a el PVP donde se observa un pico a los 1662 cm^{-1} que se debe a la vibración de estiramiento del enlace C=O del grupo amida; en el caso de la epicatequina, inciso(c), vuelven a destacar las señales alrededor de los 3500 y 3450 cm^{-1} , que evidencian un estiramiento de los grupos O-H de la molécula.

En el inciso (d), se presenta el espectro del material 2, donde el pico correspondiente a la presencia de PLA en la fibra se muestra claramente en el número de onda anteriormente mencionado, e inclusive éste se muestra más ensanchado que en el inciso (a), por lo que no permite una observación directa del pico característico del PVP, sin embargo es muy claro la banda característica del estiramiento de los grupos O-H de la epicatequina a los 3500 y 3450 cm^{-1} .

En el inciso (e) se muestra el espectro de la membrana después de haber liberado en el medio de cultivo mesencult, la presencia de (-)-epicatequina aún es notoria, lo que indica que aún existe una cantidad del flavonoide que no se ha liberado, correspondiente con el porcentaje de liberación anteriormente reportado. El pico del PLA sigue presente, pero no se observa que exista tanta humedad presente

en la muestra como en el inciso (d), por lo que el pico del PVP tampoco es muy visible en este caso.

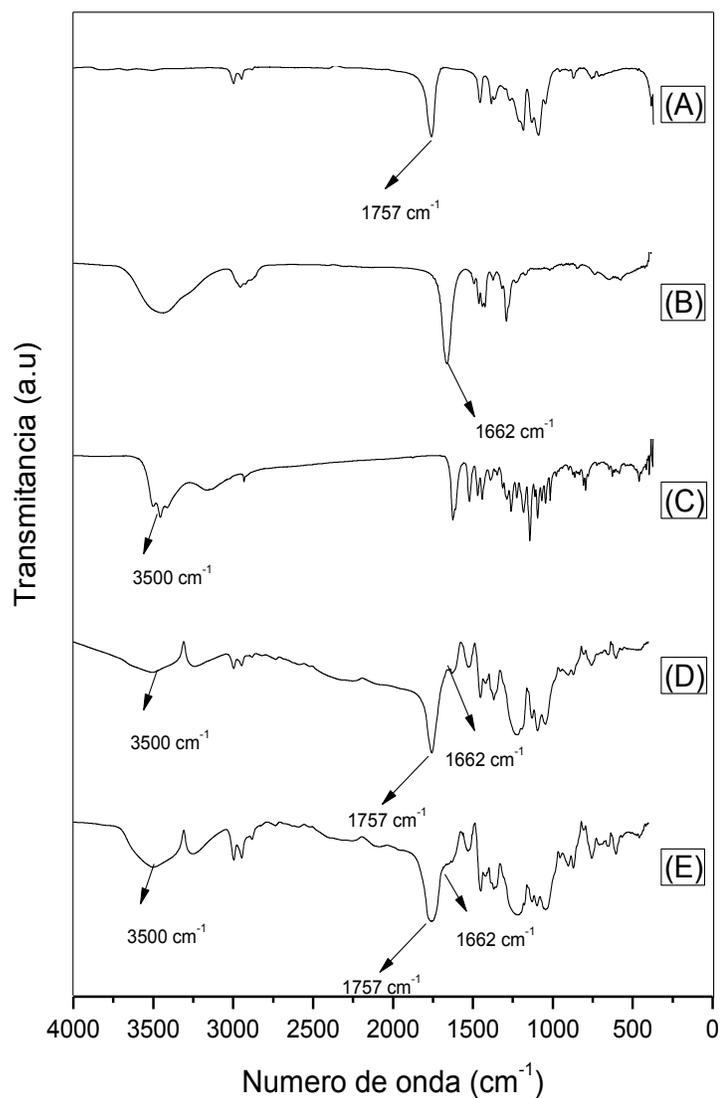


Figura 25. Espectros de infrarrojo de a) PLA, b) PVP, c) (-) epicatequina, d) PLA/PVP+Epicatequina/PLA y e) después de liberar en mesenCult.

4.8.4. Pérdida de peso por termogravimetría

En la Figura 26 se muestra el termograma del material 2, donde se registran las pérdidas más significativas en el intervalo de los 300 a los 380 °C. Estas caídas son atribuidas al PLA (1) y al PVP (2) respectivamente, esto es por comparación con los termogramas de los materiales individuales (Figura 27), con lo que se puede afirmar que el material efectivamente está formado de estos dos polímeros. De nueva cuenta se observa un enmascaramiento de la (-)-epicatequina por el material formador de la coraza, pues en el termograma del material 1 (Figura 16) también se presenta dicho fenómeno.

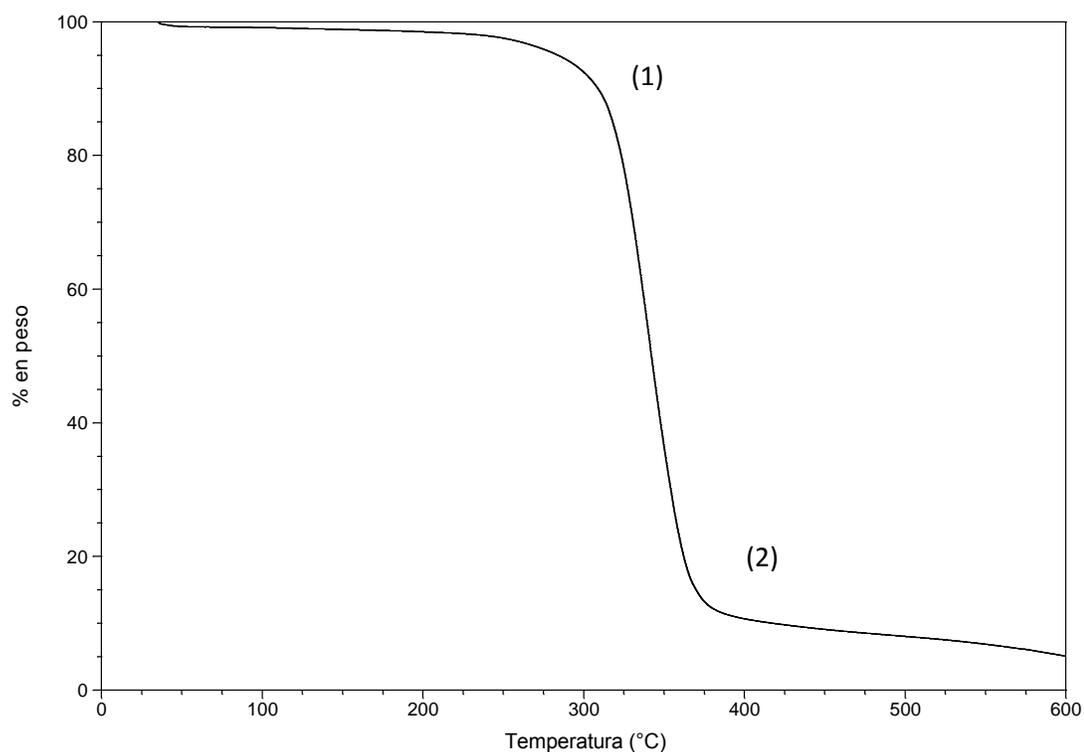


Figura 26. Termograma de la membrana del material 2.

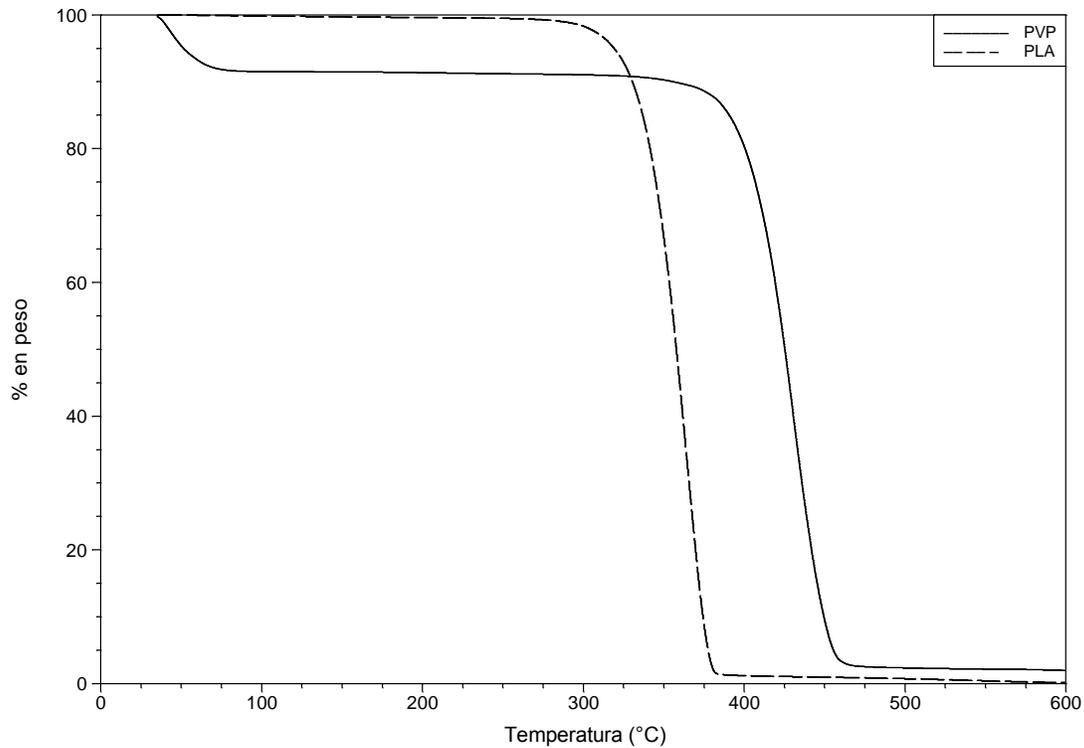


Figura 27. Termograma de PLA y PVP.

4.8.5. Hidrofobicidad por ángulo de contacto del material 2

La determinación del ángulo de contacto de los materiales, arroja información acerca del carácter hidrofóbico o hidrofílico de la superficie de los mismos.

La medición del ángulo de contacto del material 1, no se pudo llevar a cabo, porque una vez que la gota era formada y entraba en contacto con el material, penetraba la superficie de la membrana por completo, imposibilitando llevar a cabo una medición.

Sin embargo para el material 2, la medición se realizó con éxito, y el valor promedio del ángulo de contacto, fue de $104.6^{\circ} \pm 6.72$, con lo que podemos confirmar el carácter hidrofóbico del material 2, pues el ángulo de contacto reportado para el PLA sólo es de 75.97° , según Y. Huang y cols. en el 2013. La desviación estándar tan grande, puede deberse a una distribución poco homogénea del flavonoide en las cadenas poliméricas, lo que ocasiona que las diferentes zonas del andamio presenten comportamientos diversos, ya que las mediciones se realizan en diferentes partes de la muestra.

4.9. Análisis histológico por tinción con H&E del material 2 implantado en el miocardio de ratas Wistar

El efecto del material 2 sobre el corazón infartado de ratas Wistar fue determinado. En la Figura 28 se muestran las imágenes del grupo del implante a los 5 días, dónde se puede observar en el inciso (b) que existen de nueva cuenta tres capas, las externas basófilas y la interna eosinófila, aunque aún se muestra la zona interna isquémica, con lo que se pone de manifiesto la existencia del infarto provocado en la rata, pero también y muy importantemente hay evidencia de una regeneración en las capas externas con la formación de nuevos capilares, que se encuentran más amplificados en el inciso (a), donde también se observan aparentes fibroblastos que se encuentran depositando colágeno, lo cual es compatible con el inciso (c). Al parecer el material se fragmenta, pues no se observan restos de este en

las imágenes. Comparando con el grupo control a los 5 días (Figura 18) existe mayor deposición de fibroblastos en el grupo con el material 2 implantado.

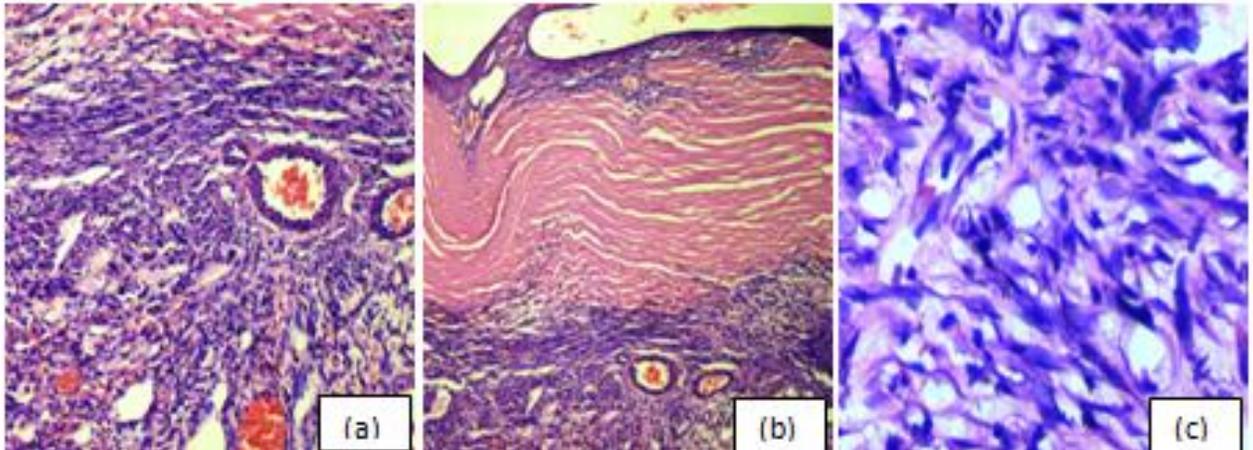


Figura 28. (a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 2 a los 5 días, a diferentes aumentos.

La respuesta a los 10 días después del implante, se muestra en la figura 29. Es clara la existencia de una hemorragia difusa en el inciso (b), que pudo haber sido causada por el rompimiento de los nuevos capilares que pudieran haberse formado. Siguen apareciendo indicios de regeneración por parte del miocardio, por debajo de la zona infartada. En los incisos (a) y (c) vuelven a estar presentes los fibrocitos, pues se ve una cantidad aumentada de colágeno, además de la presencia de varios núcleos, lo cual indica procesos proliferativos, después de la colocación del andamio fibroso, lo cual no se observa de manera tan aumentada en las imágenes de los grupos controles de la Figura 19, inciso (d) (e) y (f).

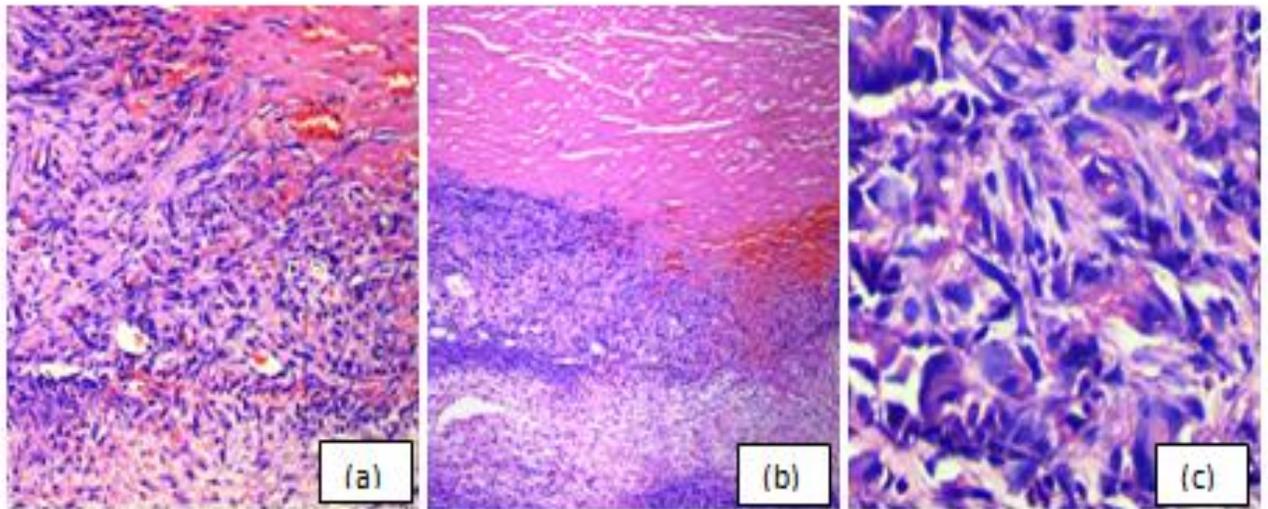


Figura 29. (a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 2 a los 10 días, a diferentes aumentos.

Por último se presenta en la Figura 30, la respuesta del tejido cardíaco hacia el andamio llamado material 2, a los 15 días, donde principalmente se pueden observar muchas células en el endocardio, de nuevo indicando proliferación, hay una presencia de tejido laxo y formación de capilares en el inciso (a), mientras que en el (b) y (c) se observan fibroblastos depositando colágeno.

Lo anterior es prueba que la presencia del material 2, fue mejor recibida por el tejido cardíaco que el material 1, pues se ve muchísima más proliferación, que inclusive en los grupos control.

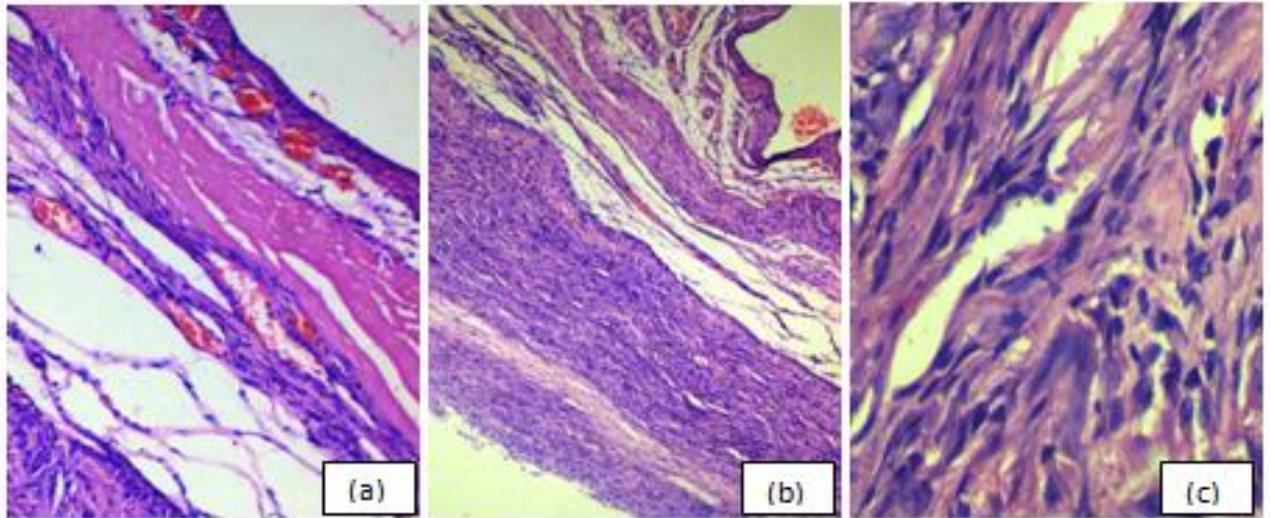


Figura 30. (a), (b) y (c) imágenes de la tinción con H&E del grupo con el implante del material 2 a los 15 días, a diferentes aumentos.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Se determinaron las condiciones óptimas para la preparación de membranas fibrosas de AC/PVC+Epicatequina/AC y PLA/PVP+Epicatequina/PLA por electrohilado.

Se logró obtener fibras con estructura núcleo coraza en ambos materiales. Para el caso del material 1, las fibras fueron de diámetros homogéneos, mientras que para el material 2, se encontraron dos tipos de poblaciones respecto al diámetro.

En ambos casos la incorporación de la (-)-epicatequina no afecta de manera significativa al material, pues no se afectan las temperaturas de degradación de sus componentes individuales.

El análisis histológico demuestra que efectivamente, hay una respuesta del tejido cardiaco cuando se implanta el material, pero la reacción con el material 2 es mucho menos agresiva que con el material 1, aunado a lo anterior, el porcentaje de liberación fue aceptable para los dos materiales, haciéndose específicamente más bueno el material 1 en agua, y el material 2 en el medio de cultivo, alcanzando porcentajes de liberación muy elevados; estas características hacen factible su utilización en el área de ingeniería de tejido cardiaco.

RECOMENDACIONES

Realizar la caracterización mecánica de ambos materiales, para observar el efecto de la carga de la (-)-epicatequina en los andamios.

Se recomienda probar ambos materiales como sustrato para el cultivo de células madre mesenquimales, obtenidas de sangre de cordón umbilical, y medir aspectos como la viabilidad, adhesión, proliferación y diferenciación celular, para convertir al material en un andamio útil en ingeniería de tejido cardiovascular.

REFERENCIAS

1. **E. Fernandes, V. Zucolotto, A. de Queiroz**, Electrospinning of Hyperbranched Poly-L-Lysine/Polyaniline Nanofibers for Application in Cardiac Tissue Engineering, *J. of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* (2010), 47, 1203–1207.
2. **V. Serpooshan, M. Zhao, S. Metzler, K. Wei, P. Shah, A. Wang, M. Mahmoudi, A. Malkovskiy, J. Rajadas, M. Butte, D. Bernstein, P. Lozano**, The Effect of Bioengineered Acellular Collagen Patch on Cardiac Remodeling and Ventricular Function Post Myocardial Infarction, *J of Biomaterials* (2013), 1-8.
3. **K. Hong, X. Ming, Y. Long, Y. Sheng, Z. Chao**, Stem Cells for Tissue Engineering of Myocardial Constructs, *J of Ageing Research Reviews* (2007), 289-301.
4. **J. Leor, Y. Amsalem, S. Cohen**, Cells, Scaffolds, and Molecules for Myocardial Tissue Engineering, *J of Pharmacology & Therapeutics* (2005), 105, 151-163.
5. **D. Khadka, D. Haynie**, Protein- and Peptide-Based Electrospun Nanofibers in Medical Biomaterials, *J. Nanomedicine Nanotechnology Biology and Medicine* (2012), 8, 1242–1262.
6. **D. Rubenstein, S. Venkitachalam, D. Zamfir, F. Wang, H. Lu, M. Frame, W. Yin**, In Vitro Biocompatibility of Sheath–Core Cellulose-Acetate-Based

- Electrospun Scaffolds Towards Endothelial Cells and Platelets, *J. of Biomaterials Science*, (2010), 21, 1713–1736.
7. **P. Supaphol, O. Suwantong, P. Sangsanoh, S. Srinivasan, R. Jayakumar, S. Nair**, Electrospinning of Biocompatible Polymers and Their Potentials in Biomedical Applications, *J. Advances in Polymer Science*, (2012), 246, 213–240.
 8. **A. Meinel, O. Germershaus, T. Luhmann, H. Merkle, L. Meinel**, Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications *European J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2012) , 81, 1–13.
 9. **I. Ramírez, L. Maya, G. Ceballos, F. Villarreal**, (-)-Epicatechin Activation of Endothelial Cell Endothelial Nitric Oxide Synthase, Nitric Oxide, and Related Signaling Pathways, *J. of Hypertension*, (2010), 55, 1398-1405.
 10. **Ch. Zhao, A. Tan, G. Pastorin, H. Kiat**, Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering, *J of Biotechnology Advances* (2013), 31, 654-668.
 11. **D. Williams**. On the nature of biomaterials, *Journal of Biomaterials* (2009), 30, 5897–909.
 12. **L. Smith, X. Liu, J. Hu, P. Ma**, The Enhancement of Human Embryonic Stem Cell Osteogenic Differentiation with Nano-fibrous Scaffolding, *J of Biomaterials* (2010), 31, 5526 – 5535.

13. **Jose MV, Thomas V, Xu Y, Bellis S, Nyairo E, Dean D**, Aligned Bioactive Multi-Component Nanofibrous Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *J of Macromolecular Science*, (2010),10, 433-44.
14. **S. Perumcherry, K. Chennazhi, S. Nair, D. Menon, R. Afeesh**, A Novel Method for the Fabrication of Fibrin-Based Electrospun Nanofibrous Scaffold for Tissue-Engineering Applications, *J of Tissue Engineering Part C: Methods*, (2011), 17, 1121-30.
15. **Chen JP, Chang YS**. Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *J Colloids and Surfaces B*, (2011), 86, 169-75.
16. **N. Hild, O. Schneider, D. Mohn, N. Luechinger, F. Koehler, S. Hofmann, J. Vetsch, B. Thimm, R. Müller, W. Stark**, Two-layer membranes of calcium phosphate / collagen / PLGA nanofibres: *in vitro* biomineralisation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J of Nanoscale*, (2011),3, 401-409.
17. **S. Panzavolta, M. Giofrè, M. Focarete, C. Gualandi, L. Foroni, A. Bigi**, Electrospun Gelatin Nanofibers: Optimization of Genipin Cross-linking to Preserve Fiber Morphology after exposure to wáter, *J of Acta Biomaterialia* (2011), 7, 1702–1709.
18. **R. Jayakumar, R. Ramachandran, V. Divyarani, K.Chennazhi, H. Tamura, S. Nair**, Fabrication of Chitin–Chitosan/Nano TiO₂-Composite

- Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *International J of Biological Macromolecules* (2011), 48, 336–344.
19. **C. Choong, J. Triffitt, Z. Cui**, Polycaprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering Effects of a Calcium Phosphate Coating Layer on Osteogenic Cells, *J of Food and Bioproducts Processing*, (2004), 82, 117–125
20. **H. Wei, Ch. Chen, W. Lee, I. Chiu, Sh. Hwang, W. Lin, C. Huang, Y. Yeh, Y. Chang, H. Sung**, Bioengineered cardiac patch constructed from multilayered mesenchymal stem cells for myocardial repair, *J of Biomaterials* (2008), 29, 3547–3556
21. **M. Davis, P. Hsieh, A. Grodzinsky, R. Lee**, Custom Design of the Cardiac Microenvironment with Biomaterials, *J of Circulation Research*, (2005), 97, 8-15.
22. **H. Wei, C. Chen, W. Lee, I. Chiu, S. Hwang, W. Lin, Ch. Huang, Y. Yeh, Y. Chang, H. Sung**, Bioengineered Cardiac Patch Constructed from Multilayered Mesenchymal Stem Cells for Myocardial Repair, *J Biomaterials* (2008), 29, 3547–3556.
23. **T. Sill, H. Recum**, Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, *J of Biomaterials Applications*, (2008) 29, 1989 – 2006.
24. **V. Leung, F. Ko**, Biomedical applications of nanofibers, *J of Polymers for Advanced Technologies*, (2011), 22, 350–365.
25. **X. Mo, C. Xu, M. Kotaki, S. Ramakrishna**, Electrospun P (LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation, *J of Biomaterials*, (2005), 25, 1883-1890.

26. **Z. Jingxin, Z. Yaopeng, X. Huili**, Electrospinning and rheology of regenerated Bombyx mori silk fibroin aqueous solutions: The effects of pH and concentration, *J Polymer*, (2008) 49, 2880-2885.
27. **M. Castillo, J. Romero, F. Rodríguez, A. Nájera, P. Herrera**, Fibrous Membranes of Cellulose Acetate and Poly(vinylpyrrolidone) by Electrospinning Method: Preparation and Characterization, *J of Applied Polymer Science*, (2010), 116, 1873–1878.
28. **M. Zamani, M. Morshed, J. Varshosaz, M. Jannesari**, Controlled release of metronidazol benzoate from poly ϵ -caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases, *J of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2010), 75, 179 -185.
29. **J. Li, A. He, J. Zheng, C. Han**, Gelatin and Gelatin- Hyaluronic Acid Nanofibrous Membranes Produced by Electrospinning of their Aqueous solutions, *J Biomacromolecules*, (2006), 7, 2243–2247.
30. **E. Kenawy, F. Abdel-Hay, M. El-Newehy, G. Wnek**, Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems, *J Materials Chemistry and Physics*, (2009), 113, 296–302.
31. **C. Ai-Fu, H. Xiao-Jun, W. Zhen-Gang**, Preparation and surface modification of poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) electrospun nanofibers membranes, *Australian J of Chemistry*, (2008), 61, 446-454.
32. **J. Zhao, K. Duan, J. Zhang , L. Guo, J. Weng**, Preparation of Highly Interconnected Porous Hydroxyapatite Scaffolds by Chitin Gel-Casting, *J of Materials Science and Engineering C* (2011), 31, 697–701.

33. **C. Liu, Z. Xia, J. Czernuszka**, Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering, *J of Chemical Engineering Research And Design*, (2007), 85, 1051-1064.
34. **D. Hutmacher**, Scaffold Design And Fabrication Technologies For Engineering Tissues - State of the Art And Future Perspectives, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*,12, 107–124, 2001.
35. **M. Ignatova, N. Manolova, I. Rashkov**, Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning, *J European Polymer* (2007), 43, 1112–1122.
36. **E.ENZ, U. Baumeister, J. Lagerwall**, Coaxial electrospinning of liquid crystal-containing poly(vinylpyrrolidone) microfibers, *J of Organic Chemistry*, (2009),5, 50-58.
37. **X. Mei, Ch. Branford, L. Zhu, N. Chatterton , D. Yu**. Ester prodrug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats as transdermal drug delivery systems, *J of Materials Science: Materials in Medicine*, (2010), 21, 2403–2411.
38. **M. Zuwei, S. Kotaki**, Electrospun cellulose nanofiber as affinity membrane, *J of Membrane Science*, (2005), 265, 115-123.
39. **T. Wheatley**, Water Soluble Cellulose Acetate: A Versatile Polymer for Film Coating, *J Drug Development and Industrial Pharmacy*, (2007), 33, 281–290.
40. **L. Vahdat**, The Influence of Potassium Clavulanate on the Rate of Amoxicillin Sodium Degradation in Phosphate and Acetate Buffers in the Liquid State, *J Drug Development and Industrial Pharmacy*, (2009), 35, 471–479.

41. **S. Papong, P. Malakul, R. Trungkavashirakun, P. Wenunun, T. Chom, M. Nithitanakul, E. Sarobol**, Comparative Assessment of the Environmental Profile of PLA and PET Drinking Water Bottles from a Life Cycle Perspective, *J of Cleaner Production* (2014), 65, 539-550.
42. **J. Xu, J. Wang, X. Dong, G. Liu, W. Yu**, Preparation of PVP/PLLA Ultrafine Blend Fibers by Electrospinning, *International J of Chemistry*, (2011), 3, 57-60.
43. **Z. Huang, Y. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna**, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *J. Composites Science and Technology*, (2003) 63, 2223–2253
44. **K. Yamazaki, P. Taub, M. Barraza, M. Rivas, A. Zambon, G. Ceballos, F. Villarreal**, Effects of (-)-Epicatechin on Myocardial Infarct Size and Left Ventricular Remodeling After Permanent Coronary Occlusion, *J of the American College of Cardiology*, (2010), 25, 2869-76.
45. **D. Limón, A. Díaz, L. Mendieta, F. Luna, E. Zenteno, J. Guevara**, Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos, *Mensaje Bioquímico*, (2010), XXXIV, 143-154.
46. **S. Yang, G. Hirasaki, S. Basu, R. Vaidya**, Mechanisms for Contact Angle Hysteresis and Advancing Contact Angles, *J of Petroleum Science and Engineering* (1999), 24, 63–73.
47. **B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter**, Molecular Biology of the Cell, Ed. Garland Science, (2008), 5a edición, 607-609.
48. **R. Marassi, F. Nobili**, Structural and Chemical Properties: Transmission Electron Microscopy, *Measurement Methods*, (2009), 769-789.

49. **G. Christian**. Química Analítica, *Ed. McGraw-Hill*, 6a edición, (2009) pp 469
50. **D. Skoog, D. West, F. Holler, S. Crouch**. Química Analítica, *Ed. McGraw-Hill*, 7a edición, (2001) 614-633.
51. **E. Turi**, Thermal Characterization of Polymeric Materials, *Ed. Academic Press*, (1997) 12-14.
52. **P. Shah, A. Puntel, S. Lopina, Y. Yun**, Development and in vitro Cytotoxicity of Microparticle Drug Delivery System for Proteins using L-tyrosine Polyphosphate, *J Colloid and Polymer Science*, (2009), 287, 1195–1205
53. **J. Torrent**, Report: Medida del ángulo de contacto, Depto Ingeniería Química, FOOT-UPC, Terrassa.
54. **F. Li, O. Castano, Y. Wu, B. Ong**, Organic Thin Film Transistor Integration, *J John Wiley & Sons*, 2011, 268.
55. **Panreac**, Tinción Hematoxilina-Eosina, *ITW Company*, 1-5.
56. **C. López, M. Castro, J. López, M. González**, Immobilization of Green Tea Extract on Polypropylene Films to Control the Antioxidant Activity in Food Packaging, *J of Food Research International* (2013), 53, 522–528.
57. **Y. Huang, C. Zhang, Y. Pan, Y. Zhou, L. Jiang, Y. Dan**, Effect of NR on the Hydrolytic Degradation of PLA, *J of Polymer Degradation and Stability* (2013), 98, 943- 950.

ANEXOS

Presentaciones en congresos, relacionadas con el trabajo de tesis.

1. Ana Gabriela Montaña Figueroa, Mónica Castillo Ortega, Guillermo Prado Villegas, Karla Pino Ocaño, Michelle Valencia Córdova. Propiedades de liberación de (-)-epicatequina de membranas fibrosas poliméricas obtenidas por electrohilado coaxial para su uso potencial en ingeniería de tejido. Congreso Nacional de Membranas: Ciencia, Tecnología y Aplicaciones. Zacatecas, Zacatecas, del 24-26 de Junio, 2013.
2. María Mónica Castillo Ortega, Ana Gabriela Montaña Figueroa, Guillermo Prado Villegas, Karla Pino Ocaño, Michelle Valencia Córdova, preparación por electrohilado coaxial y caracterización de membranas de acetato de celulosa-poli (vinil pirrolidona)-epicatequina con aplicación en ingeniería de tejidos. XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México, SPM, Coatzacoalcos, Veracruz, del 6 al 9 de Noviembre, 2013.