

EFECTO HEMOLÍTICO, BIOCOMPATIBLE Y FUNCIONAL DE MEMBRANAS  
ELECTROHILADAS DE POLICAPROLACTONA-COLÁGENO CELULARIZADAS CON  
FIBROBLASTOS COMO POSIBLE USO PARA IMPLANTES VASCULARES

JUAN CAMILO ATEHORTÚA JIMÉNEZ

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA  
ESCUELA DE INGENIERÍAS  
FACULTAD DE INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA  
INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA  
MEDELLÍN  
2020

EFFECTO HEMOLÍTICO, BIOCOMPATIBLE Y FUNCIONAL DE MEMBRANAS  
ELECTROHILADAS DE POLICAPROLACTONA-COLÁGENO CELULARIZADAS CON  
FIBROBLASTOS COMO POSIBLE USO PARA IMPLANTES VASCULARES

JUAN CAMILO ATEHORTÚA JIMÉNEZ

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero en Nanotecnología

Directora

YULIET MONTOYA OSORIO, IBM, MSc, PhD

Doctora en Ciencias Médicas

Asesor

JOHN BUSTAMANTE OSORNO, MD, PhD

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA

INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA

MEDELLÍN

2020

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la capacidad de terminar mi proceso de formación.

Al Director del Grupo de Dinámica Cardiovascular, Dr. John Bustamante por permitirme pertenecer al grupo de investigación y recibir su apoyo y asesoría durante la ejecución del proyecto de investigación.

A mi Directora de trabajo de grado, mi mentora, Dra. Yuliet Montoya, quien ha sido un apoyo personal y académico. Quien apoyó, direccionó, asesoró y compartió sus conocimientos para el desarrollo de la investigación. Por enseñarme el valor de la perseverancia y la disciplina.

A Wilson Agudelo y Paola Orozco por su disposición y ayuda en los diferentes temas afines a su experticia y por los momentos de dispersión.

A la Dra. Alejandra García por abrirme las puertas del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) en Monterrey, México. Por su apoyo y atención durante mi pasantía de investigación.

A mi familia, especialmente a mi madre y abuela, por el apoyo, el amor, la solidaridad y la paciencia en este proceso de formación.

A mi compañera de madrugadas, trasnochadas y hasta amanecidas para finalizar este propósito de vida académica. Ella, mi amiga de viaje, María Camila Oviedo.

A mis amigos por ser una voz de aliento.

A la beca Ser Pilo Paga, a la Universidad Pontificia Bolivariana y al Programa de Ingeniería en Nanotecnología.

En general a todas aquellas personas que hicieron posible la finalización de este proceso y a los técnicos de los equipos.

## TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	12
Abstract.....	14
Capítulo 1.....	16
Planteamiento del problema .....	16
Justificación .....	18
Marco teórico.....	19
Estado del arte .....	26
Hipótesis.....	31
Objetivos .....	32
Capítulo 2.....	33
2.1 Materiales .....	33
2.2 Metodología.....	34
Capítulo 3.....	43
Fase I: Desarrollo de membranas electrohiladas compuestas de Policaprolactona/Colágeno con diferentes porosidades.....	43
Fase II: Evaluación de la actividad hemolítica de las membranas electrohiladas compuestas de Policaprolactona/Colágeno con diferentes porosidades.....	58
Fase III: Características biocompatibles de las membranas electrohiladas compuestas de Policaprolactona/Colágeno con diferentes porosidades en interacción con un modelo <i>in vitro</i> de fibroblastos. ....	63
Fase IV: Evaluación de la permeabilidad estática de membranas electrohiladas compuestas de Policaprolactona/Colágeno con y sin deposición celular.....	74
Capítulo 4.....	78
Trabajos futuros .....	81
Producción científica .....	82
Anexo I.....	83
Referencias.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico	ID: Diámetro interno
AFM: Microscopía de fuerza atómica	IPD: Índice de polidispersidad
ATCC: American Type Culture Collection	mGLT: Gelatina metacrilada
ATR: Reflectancia total atenuada	min: Minutos
C1-0 y C2-0: Membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H sin tratar.	MSCs: Células madre mesenquimales óseas
C1-C2: Membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H tratadas	MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
CN: Control negativo	N: Newton
CO <sub>2</sub> : Dióxido de carbono	NaCl: Cloruro de sodio
Col-H: Colágeno hidrolizado	NHS: N-hidroxisuccinimida
CP: Control positivo	nm: nanómetros
DMA: Análisis dinámico-mecánico	O <sub>2</sub> : Oxígeno
DMEM: Medio de cultivo modificado Eagle Dulbecco	p: Peso
DPF: Diámetro promedio de fibra	PBS: Tampón fosfato salino
EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida)	PCL: Policaprolactona
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	pNSR32: Proteína de seda recombinante
FDA: Food and drug administration	PVA: Poli (alcohol vinílico)
FE-SEM: Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo	rpm: Revoluciones por minuto
FTIR: Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier	s: Segundos
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> : Agua destilada	SBF: Suero bovino fetal
hASCs: Células madre de tejido adiposo humano	DS: Desviación estándar
HDF: Fibroblastos dérmicos humanos	SDRAECs: Células endoteliales aórticas de rata Spague Dawley
HFIP: Hexafluoro-2-propanol	SEM: Microscopía electrónica de barrido
	TFE: Tetrafluoretanol
	v: Volumen

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de <i>electrospinning</i> para la fabricación de materiales fibrilares.....	19
<b>Figura 2.</b> Interacciones entre los electrones y el material en SEM. ....	20
<b>Figura 3.</b> Composición anatómica de los vasos sanguíneos. ....	22
<b>Figura 4.</b> Mecanismos celulares para la determinación de la viabilidad celular. ....	24
<b>Figura 5.</b> Esquema de la preparación de las soluciones de trabajo de PCL y Col-H para el proceso de electrohilatura en colector rotatorio. ....	34
<b>Figura 6.</b> Esquema del proceso de postratamiento y esterilización de membranas electrohiladas de PCL/Col-H con etanol al 70 % y radiación UV.....	35
<b>Figura 7.</b> Protocolo del ensayo hemolítico, A) controles, B) membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H. ....	38
<b>Figura 8.</b> Esquema del modelo <i>in vitro</i> de fibroblastos y del preacondicionamiento de las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H para las tinciones con hematoxilina y eosina después de la interacción célula-material. ....	40
<b>Figura 9.</b> Proceso de la preparación de los tratamientos para ensayo de MTT en membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H, A) interacción indirecta a partir de excipientes, B) interacción directa. ....	41
<b>Figura 10.</b> Micrografías de membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H variando la velocidad de colección y la distancia entre la aguja y el colector. Escala 5 $\mu$ m. ....	43
<b>Figura 11.</b> Membranas electrohiladas de PCL/Col-H. Donde, A) micrografía C1-0, B) histograma de distribución diámetro de fibra C1-0, C) micrografía C2-0, D) histograma de distribución diámetro de fibra C2-0. ....	47
<b>Figura 12.</b> Micrografías de membranas electrohiladas después del tratamiento con etanol durante 30 min, A) micrografía C1, B) histograma de distribución diámetro de fibra C1, C) micrografía C2, D) histograma de distribución diámetro de fibra C2. ....	49
<b>Figura 13.</b> Espectros de absorbancia de membranas electrohiladas. Donde A) C1-0, B) C2-0. ....	52
<b>Figura 14.</b> Imágenes de AFM, A) C1-0, B) perfil de altura de C1-0, C) C1, D) perfil de altura de C1.....	54
<b>Figura 15.</b> Imágenes de AFM, A) C2-0, B) perfil de altura de C2-0, C) C2, D) perfil de altura de C2.....	55
<b>Figura 16.</b> Curva esfuerzo - deformación para los andamios electrohilados.....	56
<b>Figura 17.</b> Pérdida de masa en el tiempo para C1-0 y C2-0 con NaCl y etanol.....	58
<b>Figura 18.</b> Micrografías de membranas electrohiladas de PCL/Col-H después de la interacción con solución salina. C1-0 a las 24 (A), 48 (B) y 72 h (C). C2-0 a las 24 (D), 48 (E) y 72 h (F). ....	59
<b>Figura 19.</b> Micrografías de membranas electrohiladas de PCL/Col-H después de la interacción con etanol. C1-0 a las 24 (A), 48 (B) y 72 h (C). C2-0 a las 24 (D), 48 (E) y 72 h (F).....	60
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de hemólisis, A) Controles, C1 y C2, B) Aumento de porcentaje de hemólisis para las membranas electrohiladas.....	61

<b>Figura 21.</b> Tinción con hematoxilina y eosina de fibroblastos 3T3 en controles, C1 y C2 a periodos de incubación de 24, 48 y 72 h.....	63
<b>Figura 22.</b> Proliferación celular de fibroblastos 3T3 con C1 y C2 a 24, 48 y 72 h de interacción. ....	64
<b>Figura 23.</b> Micrografías de la interacción celular de fibroblastos 3T3 con andamios C1 y C2 a 24, 48 y 72 h.....	65
<b>Figura 24.</b> Imágenes topográficas de C1 y C2 en interacción con fibroblastos 3T3 a las 72 h de incubación. ....	66
<b>Figura 25.</b> FTIR para C1 y C2 después de la interacción con fibroblastos 3T3 a las 24, 48 y 72 h.....	67
<b>Figura 26.</b> Viabilidad celular en función de los tratamientos.....	69
<b>Figura 27.</b> Viabilidad celular respecto al tiempo en interacción directa.....	71
<b>Figura 28.</b> Tinción fluorescente de núcleos celulares mediada por Hoechst de las células control y fibroblastos en interacción con C1 y C2 a 24, 48 y 72 h.....	72
<b>Figura 29.</b> Índice de circunferencialidad del núcleo para los controles celulares, C1 y C2 a las 24, 48 y 72 h de interacción. ....	73
<b>Figura 30.</b> Gráficas de permeabilidad estática al agua a 50, 80,120 y 150 mmHg durante 48, 96, 168 y 240 h de interacción celular, A) C1 y B) C2.....	74
<b>Figura 31.</b> Micrografías de los controles y las membranas celularizadas a 48, 96, 168 y 240 h para C1 y C2.....	76
<b>Figura 32.</b> Gráfico de medias de diámetro de fibra respecto a, A) variación de las rpm, B) variación de la distancia entre la aguja y el colector. ....	83
<b>Figura 33.</b> Gráfico de interacción del ángulo de contacto con H <sub>2</sub> Od respecto al material y al tiempo.....	83
<b>Figura 34.</b> Gráfico de medias del ángulo de contacto con H <sub>2</sub> Od respecto al, A) material, B) tiempo.....	84
<b>Figura 35.</b> Gráfico de interacción del ángulo de contacto con plasma sanguíneo respecto al material y al tiempo.....	85
<b>Figura 36.</b> Gráfico de medias del ángulo de contacto con plasma sanguíneo respecto al, A) material, B) tiempo.....	85
<b>Figura 37.</b> Gráfico de interacción del módulo de Young respecto al material. ....	86
<b>Figura 38.</b> Gráfico de interacción de pérdida de masa con NaCl respecto al material y al tiempo.....	86
<b>Figura 39.</b> Gráfico de medias de pérdida de masa con NaCl respecto al, A) material, B) tiempo.....	87
<b>Figura 40.</b> Gráfico de interacción de pérdida de masa con etanol respecto al material y al tiempo.....	87
<b>Figura 41.</b> Gráfico de medias de pérdida de masa con etanol respecto al, A) material, B) tiempo.....	88
<b>Figura 42.</b> Gráfico de interacción de hemólisis respecto al material y a la longitud de onda. ....	88
<b>Figura 43.</b> Gráfico de medias de hemólisis respecto al, A) material, B) longitud de onda.....	89
<b>Figura 44.</b> Gráfico de interacción de proliferación celular respecto al material y al tiempo. ....	89

<b>Figura 45.</b> Gráfico de medias de proliferación celular respecto al, A) material, B) tiempo. ....	90
<b>Figura 46.</b> Gráfico de interacción de viabilidad celular respecto al material (excipiente) y a las diluciones. ....	91
<b>Figura 47.</b> Gráfico de medias de viabilidad celular respecto al, A) material (excipiente), B) diluciones.....	91
<b>Figura 48.</b> Gráfico de interacción de viabilidad celular respecto al material y al tiempo... ..	92
<b>Figura 49.</b> Gráfico de medias de viabilidad celular respecto al, A) material, B) tiempo....	92
<b>Figura 50.</b> Gráfico de circunferencialidad nuclear respecto al material y al tiempo.....	93
<b>Figura 51.</b> Gráfico de medias de circunferencialidad nuclear respecto al, A) material, B) tiempo.....	93
<b>Figura 52.</b> Gráfico de permeabilidad estática respecto al material y al tiempo. ....	94
<b>Figura 53.</b> Gráfico de medias de permeabilidad estática respecto al, A) material, B) tiempo, C) presión.....	95



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diámetro promedio de fibra, desviación estándar e índice de polidispersidad para membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H variando velocidad y distancia de colección. ....	44
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de electrohilatura para las membranas seleccionadas, C1-0 y C2-0. ....	46
<b>Tabla 3.</b> Porosidad, área de poro promedio y diámetro de poro para C1-0 y C2-0. ....	48
<b>Tabla 4.</b> Ángulo de contacto dinámico con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> a 0, 50 y 100 s. ....	50
<b>Tabla 5.</b> Ángulo de contacto dinámico con plasma sanguíneo a 0, 50 y 100 s. ....	51
<b>Tabla 6.</b> Longitudes de onda características de la PCL y Col-H con su respectiva banda asociada. ....	52
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de estructuras secundarias en la amida I antes y después del tratamiento con etanol para membranas electrohiladas de PCL/Col-H. ....	53
<b>Tabla 8.</b> Altura promedio y rugosidad para C1-0 y C2-0 antes y después del tratamiento con etanol. ....	56
<b>Tabla 9.</b> Módulo de Young para cada material electrohilado y tratado con etanol. ....	57
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de estructuras secundarias en la amida I después de la interacción celular a 24, 48 y 72 h de incubación para C1 y C2. ....	67
<b>Tabla 11.</b> Concentración de las diluciones de los tratamientos en el ensayo de MTT indirecto. ....	68
<b>Tabla 12.</b> Prueba de múltiples rangos para ángulo de contacto con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> respecto al material. ....	84
<b>Tabla 13.</b> Prueba de múltiples rangos para ángulo de contacto con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> respecto al tiempo. ....	84
<b>Tabla 14.</b> Prueba de múltiples rangos para ángulo de contacto con plasma sanguíneo respecto al material. ....	85
<b>Tabla 15.</b> Prueba de múltiples rangos para ángulo de contacto con plasma sanguíneo respecto al tiempo. ....	86
<b>Tabla 16.</b> Prueba de múltiples rangos para pérdida de masa con NaCl respecto al material. ....	87
<b>Tabla 17.</b> Prueba de múltiples rangos para pérdida de masa con NaCl respecto al tiempo. ....	87
<b>Tabla 18.</b> Prueba de múltiples rangos para pérdida de masa con etanol respecto al material. ....	88
<b>Tabla 19.</b> Prueba de múltiples rangos para pérdida de masa con etanol respecto al tiempo. ....	88
<b>Tabla 20.</b> Prueba de múltiples rangos para hemólisis respecto al material. ....	89
<b>Tabla 21.</b> Prueba de múltiples rangos para hemólisis respecto a la longitud de onda. ....	89
<b>Tabla 22.</b> Prueba de múltiples rangos para proliferación celular respecto al material. ....	90
<b>Tabla 23.</b> Prueba de múltiples rangos para proliferación celular respecto al tiempo. ....	90
<b>Tabla 24.</b> Prueba de múltiples rangos para viabilidad celular respecto al material (excipiente). ....	91
<b>Tabla 25.</b> Prueba de múltiples rangos para viabilidad celular respecto a la dilución. ....	92

**Tabla 26.** Prueba de múltiples rangos para viabilidad celular respecto al material. .... 93

**Tabla 27.** Prueba de múltiples rangos para viabilidad celular respecto al tiempo. .... 93

**Tabla 28.** Prueba de múltiples rangos para circunferencialidad nuclear respecto al material.  
..... 94

**Tabla 29.** Prueba de múltiples rangos para circunferencialidad nuclear respecto al tiempo.  
..... 94

**Tabla 30.** Prueba de múltiples rangos para permeabilidad estática respecto al material. 95

**Tabla 31.** Prueba de múltiples rangos para permeabilidad estática respecto al tiempo. .. 96

**Tabla 32.** Prueba de múltiples rangos para permeabilidad estática respecto a la presión.  
..... 96

## LISTA DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Porcentaje pérdida de masa.....	37
<b>Ecuación 2.</b> Porcentaje de hemólisis. ....	37
<b>Ecuación 3.</b> Permeabilidad estática. ....	42

## RESUMEN

**Introducción:** La ingeniería de tejidos desde una perspectiva biomimética, ha permitido el desarrollo de prótesis vasculares a partir de polímeros sintéticos y naturales como la policaprolactona (PCL) y el colágeno hidrolizado (Col-H), respectivamente. Técnicas como la electrohilatura, permiten la obtención de membranas que emulan la microarquitectura de la matriz extracelular nativa. Por lo cual, el propósito de esta investigación se orientó en el desarrollo de andamios electrohilados de PCL/Col-H y la determinación del efecto hemolítico, biocompatible y funcional de estos en interacción con un modelo *in vitro* de fibroblastos como posible uso para implantes vasculares.

**Metodología:** Se desarrollaron membranas electrohiladas compuestas a partir de una solución de PCL y Col-H disueltos en tetrafluoroetanol (TFE). Posteriormente, la solución fue electrohilada a una distancia entre 10-25 cm y a velocidades de colección entre 50-250 rpm. Además, se realizaron caracterizaciones fisicoquímicas mediante SEM, ángulo de contacto, FTIR-ATR, AFM y DMA. Así mismo, se determinó el porcentaje de pérdida de masa en el tiempo y de hemólisis con sangre bovina. Finalmente, las características biocompatibles fueron evaluadas en función de la adhesión, proliferación y viabilidad celular, cambios estructurales del núcleo, AFM y FTIR-ATR y la funcionalidad se validó a través de la prueba de permeabilidad estática.

**Resultados y Discusión:** Las micrografías de las membranas C1-0 y C2-0 exhibieron fibras con una apariencia uniforme, continua y sin defectos con diámetros de filamento de  $323 \pm 1.56$  nm (fibras heterogéneas) y  $773.86 \pm 1.46$  nm (fibras homogéneas), respectivamente. Después del tratamiento con etanol los andamios, C1 y C2 evidenciaron una humectabilidad y absorción lenta, debido al incremento de estructuras secundarias que aportan a la fase cristalina del Col-H, donde para C1 fue de 33.64 % y C2 de 9.47 %, este resultado podría determinar un menor porcentaje de pérdida de masa para C1-0 en interacción con solución salina y etanol. Además, la inclusión de Col-H y el tratamiento incrementó las propiedades elásticas del andamio. En cuanto a la hemocompatibilidad, los andamios desarrollados no son hemolíticos, ya que presentaron porcentajes de hemólisis inferiores al 1 %. En las características biocompatibles, los andamios evidenciaron adhesión, proliferación y viabilidad celular, con cambios no significativos en la circunferencialidad del núcleo celular. Sin embargo, en C2 después de 48 h se presentaron aglomerados celulares. De otro lado, la permeabilidad disminuyó a medida que el periodo de incubación aumentó debido a la celularización de los andamios electrohilados.

**Conclusiones:** Se obtuvieron membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H con estructuras fibrilares sin defectos, que emulan la microarquitectura de la matriz extracelular nativa, incluyendo fibras en la micro y nanoescala, esta última promueve puntos de anclaje celular y una distribución homogénea de las células en el andamio. Además, el porcentaje de pérdida de masa para C1-0 y C2-0 con etanol presentan una baja reducción del material, lo cual indica que este tipo de método puede emplearse para postratar y esterilizar los andamios. Por otro lado, los resultados de hemólisis indicaron que los andamios no generan

hemólisis y cuentan con potencial uso como implantes vasculares, así mismo, las características biocompatibles indicaron que C1 presentó una mejor microarquitectura, puesto que favorece la actividad biológica y la funcionalidad de la pared del vaso sin ocasionar aglomeraciones celulares.

**Palabras clave:** Electrohilatura; prótesis vascular; biocompatibilidad; policaprolactona; colágeno.

## ABSTRACT

**Introduction:** Tissue engineering from a biomimetic perspective, has allowed the development of vascular prostheses from synthetic and natural polymers such as polycaprolactone (PCL) and hydrolyzed collagen (Col-H), respectively. Techniques such as electrospinning, allow obtaining scaffolds that emulate the microarchitecture of native extracellular matrix. Therefore, the purpose of this research was focused on the development of PCL/Col-H electrospun scaffolds and the determination of the hemolytic, biocompatible and functional effect of these in interaction with an *in vitro* model of fibroblasts as a possible use for vascular implants

**Methodology:** Electrospun scaffolds composite were developed from a solution of PCL and Col-H dissolved in tetrafluoroethanol (TFE). Subsequently, the solution was electrospun at a distance between 10-25 cm and to collection speeds between 50-250 rpm. Further, physicochemical characterizations were performed by SEM, contact angle, FTIR-ATR, AFM and DMA. In addition, the percentage of weight loss over time and hemolysis with bovine blood was determined. Finally, the biocompatible characteristics were evaluated according to adhesion, proliferation and cell viability, structural changes of the nucleus, AFM and FTIR-ATR and the functionality was validated through the static permeability test.

**Results and Discussion:** Micrographs electrospun C1-0 and C2-0 exhibited fibers with a uniform, continuous appearance and without defects with filaments diameters of  $323 \pm 1.56$  nm (heterogeneous fibers) and  $773.86 \pm 1.46$  nm (homogeneous fibers), respectively. After the ethanol treatment, the scaffolds, C1 and C2 showed a slow wettability and absorption, due to the increase of secondary structures that contribute to the crystalline phase of Col-H, where for C1 it was 33.64 % and C2 of 9.47 %, this result could determine a lower percentage of weight loss for C1-0 in interaction with saline solution and ethanol. In addition, the inclusion of Col-H and the treatment increased the elastic properties of the scaffold. Regarding hemocompatibility, the scaffolds developed are not hemolytic, since they have hemolysis percentages below 1 %. In the biocompatible characteristics, the scaffolds showed adhesion, proliferation and cell viability, with no significant changes in the circumferentiality of the cell nucleus. However, in C2 after 48 h cell agglomerates were presented. On the other side, permeability decreased as the incubation period increased due to the cellularization of electrospun scaffolds.

**Conclusions:** PCL/Colh electrospun scaffolds with fibrillar structures were obtained, which emulate the microarchitecture of native extracellular matrix, including micro and nanoscale fibers, the latter promoting cell anchor points and a homogeneous distribution of cells in the scaffold. In addition, the percentage of weight loss for C1-0 and C2-0 with ethanol has a low material reduction, which indicates this type of method can be used to cross-link and sterilize scaffolds. On the other hand, hemolysis results indicated that scaffolds do not generate hemolysis and have potential use as vascular implants and also, biocompatible characteristics indicated that C1 presented a better microarchitecture, since it favors the

biological activity and functionality of the wall of the vessel without causing cell agglomerations.

**Key words:** Electrospinning; vascular prosthesis; biocompatibility; polycaprolactone; collagen.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema cardiovascular es el encargado de la circulación del flujo sanguíneo a los diferentes tejidos del cuerpo, en el cual se transporta oxígeno y nutrientes y se elimina el dióxido de carbono y los productos de desecho [1][2]. En cuanto a las enfermedades cardiovasculares, estas representan la principal causa de muerte a nivel mundial [3], dentro de ellas se encuentran las asociadas a lesiones de lechos vasculares, los cuales obstruyen el lumen y por ende se compromete el flujo sanguíneo [4].

Los vasos sanguíneos son estructuras tubulares compuestas de proteínas que favorecen las propiedades viscoelásticas en el árbol vascular, permitiendo que el flujo sanguíneo circule por la macro y microcirculación. Sin embargo, cuando estos presentan alguna patología, se requiere intervención quirúrgica para el reemplazo del tramo vascular afectado. Uno de los tratamientos de las angiopatías consiste en el reemplazo del tramo afectado por prótesis vasculares, estas pueden ser de tres tipos de injertos: autoinjertos (proviene del mismo paciente), xenoinjertos (proviene de una especie diferente) y aloinjertos (proviene de la misma especie) [5][6]. Actualmente, los autoinjertos son los más empleados para las intervenciones quirúrgicas de revascularización de vasos sanguíneos de pequeño diámetro (<6 mm) [7][8]. Aunque este tipo de injertos en algunas ocasiones no presentan las características necesarias para la implantación, debido a que pueden estar ocluidos, presentar infecciones o no cuentan con disponibilidad de tejido para el trasplante [7][9][10].

Con este fin, se han realizado diversos desarrollos de implantes vasculares, tanto con materiales sintéticos como naturales, por ejemplo, polímeros degradables y biopolímeros naturales [4]. No obstante, estos presentan una serie de deficiencias como lo es la endotelialización lenta, lo que conlleva a aumentar el riesgo de formación de hiperplasia de la capa íntima, trombosis y fallas mecánicas [4][7][8][9][11]; igualmente estos implantes son propensos a la formación de aneurisma y estenosis, focos infecciosos y durabilidad limitada [12][13]. Los implantes comerciales sintéticos como el Dacrón® y Teflón® a largo plazo disminuyen la permeabilidad del implante, ocasionando aumento en la trombogenicidad y formación excesiva de neoíntima, debido a la retención de células endoteliales [4][9][10]. Además, han presentado baja hemo y biocompatibilidad, esta última estimula la reestenosis y la trombosis, siendo estas complicaciones las más frecuentes postimplantación [4][14][15]. Por otro lado, los injertos biológicos presentan deficiencias a causa del proceso complejo para almacenarlos, siendo su uso limitado en comparación con los implantes sintéticos. De la misma manera, estos injertos son una potencial fuente de infecciones puesto que son explantados de otros pacientes o especies.



Basado en lo anterior, la ingeniería de tejidos y protésica cardiovascular busca mediante la biomimética de la matriz extracelular dar respuesta a sus principales retos con el desarrollo de implantes con características similares a la de los vasos nativos, tanto estructurales en relación con la alta resistencia a la tracción, elasticidad y resistencia a la fatiga; como biológicas en función de la adhesión, proliferación, viabilidad celular y hemocompatibilidad, evitando la formación de trombos, no toxicidad y la capacidad de dar respuesta a diversos estímulos bioquímicos [4][16]. El implante de pequeño diámetro también debe garantizar hemocompatibilidad, durabilidad, resistencia a las infecciones y facilidad al momento de realizar la sutura [13]. Además, debe permitir el intercambio de nutrientes que aumenta la interrelación celular, la síntesis de colágeno y la actividad de los macrófagos, lo que a su vez disminuye la posibilidad de la aparición de una infección [17].

Técnicas como la electrohilatura permiten la obtención de membranas electrohiladas compuestas a partir de polímeros sintéticos y naturales con estructuras fibrilares en la micro y nanoescala, que emulan las características morfológicas de la matriz extracelular [8][16]. Además, los andamios desarrollados mediante electrohilatura presentan un potencial uso en la ingeniería de tejidos debido a su gran área superficial, lo que permitiría la unión directa de ligandos de la matriz extracelular, factores de crecimiento y otras biomoléculas en la superficie de las fibras para favorecer la regeneración de tejido [18][19].

En este contexto, el objetivo de esta investigación fue desarrollar membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona (PCL) y colágeno hidrolizado (Col-H) para determinar la influencia de la microarquitectura de la pared del andamio, basado en la biomimética de la matriz extracelular como posible uso para implantes vasculares celularizados, para este fin se determinaron las propiedades fisicoquímicas, la bio y hemocompatibilidad y la funcionalidad de las membranas electrohiladas. En el primer aspecto, se determinó el diámetro promedio de fibra, el porcentaje de pérdida de masa, el ángulo de contacto, composición química, módulo de Young y la rugosidad. En segundo lugar, se estableció la proliferación y adhesión celular mediada por tinciones a campo claro y fluorescente de estructuras celulares específicas, así mismo se observó la biointegración del modelo biológico con el material a través de microscopía electrónica de barrido (SEM), mientras que la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico mediado por bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Finalmente, se determinó la hemocompatibilidad y la funcionalidad de las membranas electrohiladas compuestas a partir del ensayo de hemólisis y la prueba de permeabilidad estática, respectivamente.

#### *Pregunta de investigación*

¿Cuál es el efecto en el comportamiento biocompatible, la actividad hemolítica y la funcionalidad de membranas electrohiladas de PCL/Col-H evaluado en un modelo *in vitro* de fibroblastos?

## JUSTIFICACIÓN

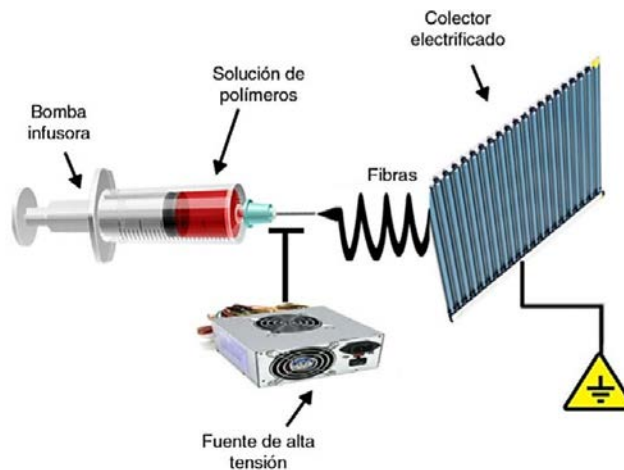
La presente investigación se centró en desarrollar membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H, con el objetivo de determinar el efecto biocompatible, hemolítico y funcional del biomaterial al interactuar con un modelo *in vitro* de fibroblastos, variando la microarquitectura de la pared del andamio a partir del diámetro de fibra y la porosidad de la estructura fibrilar debido a que los implantes vasculares comerciales implementados en la actualidad en las intervenciones quirúrgicas de revascularización presentan bajas características de biocompatibilidad, lo que generaría la reaparición de la angiopatía preexistente o una nueva, a causa de la inactividad biológica del mismo. Por lo tanto, esta investigación aporta información relevante en cuanto a la influencia de la microarquitectura de las membranas electrohiladas compuestas en las propiedades fisicoquímicas y características bio y hemocompatibles.

Así mismo, para el Grupo de Investigación de Dinámica Cardiovascular - GDC, permitirá establecer las condiciones necesarias de trabajo para obtener microarquitecturas en membranas electrohiladas que promuevan la bio y hemocompatibilidad para favorecer la regeneración tisular y así fortalecer el área protésica para futuras investigaciones y desarrollos de biomateriales con potencial uso como implantes vasculares.

## MARCO TEÓRICO

### ***Electrospinning***

La electrohilatura es una técnica versátil de producción de fibras con diámetros controlables entre los nanómetros y los micrómetros a partir de diversos materiales orgánicos o inorgánicos, como polímeros sintéticos, polímeros naturales, semiconductores, cerámicas o combinaciones entre estos [20][21]. El sistema o equipo de este proceso está conformado principalmente por cuatro componentes: unidad o conjunto de agujas metálicas, una bomba de jeringas, una fuente de alimentación de alto voltaje y un colector conectado a tierra para la deposición de las fibras, como se muestra en la Figura 1 .



**Figura 1.** Esquema de *electrospinning* para la fabricación de materiales fibrilares [22].

El *electrospinning* emplea un campo eléctrico para romper la tensión superficial entre la solución polimérica y la punta de la aguja, con el fin de generar un flujo cargado y a medida que este se dirige hacia el colector se genera el cono de Taylor, donde el solvente del polímero se evapora y la fibra al estar cargada eléctricamente, es dirigida hacia el colector metálico [23]. La producción a través de este método, le otorga a las fibras múltiples características como lo es una gran área superficial, alta porosidad, la capacidad de simular la microarquitectura de la matriz extracelular, un tamaño de poro controlable, homogéneo y la interconectividad entre ellos, lo que permite el transporte de nutrientes y la comunicación celular [20][21][24]. Cuando estas fibras son de tamaño nanométrico, presentan una mayor área superficial y una estructura porosa, lo que favorece la adhesión, la proliferación, la migración y la diferenciación celular [21].

Por otro lado, el diámetro y la morfología de las fibras producidas mediante la técnica de electrohilado depende de diversos parámetros como las propiedades de la solución, condiciones del proceso de producción y de las condiciones circundantes. Dentro de las propiedades de la solución a electrohilarse se encuentra el peso molecular, la conformación

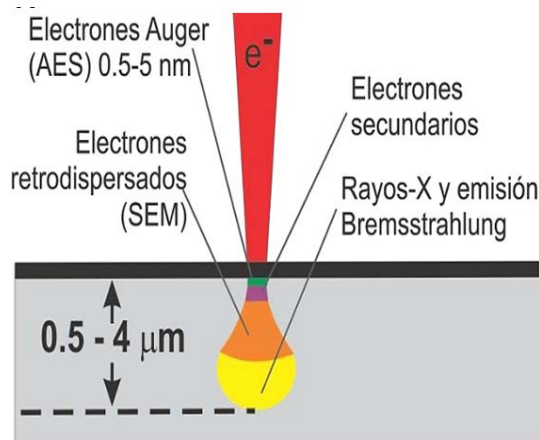
de las cadenas poliméricas, la viscosidad que depende de la concentración del material, la tensión superficial, la conductividad eléctrica, el solvente a implementar y el valor de pH. En las condiciones de procesado está la intensidad del campo eléctrico (voltaje aplicado), la distancia entre la aguja y el colector, la velocidad de rotación del colector, la velocidad del flujo de la solución. Finalmente, dentro de las condiciones circundantes se encuentra la humedad relativa, la temperatura y la velocidad de evaporación del disolvente [24].

### Caracterización morfológica: microscopía electrónica de barrido.

La SEM es una técnica de caracterización que permite obtener información de la superficie de la muestra. Su funcionamiento se basa en realizar un barrido de haz de electrones generados por un filamento, generalmente de tungsteno, sobre un área determinada del material. Para lograr el barrido punto a punto, es necesario de un sistema de condensadores y lentes que permiten localizar los electrones en la zona a analizar, donde se dan una serie de interacciones entre los electrones y el material. Finalmente, es a través de detectores específicos y de la transformación de estas señales que se genera la imagen que refleja las características superficiales de la muestra, lo que proporciona información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes [25][26][27].

Al incidir el haz de electrones sobre la muestra, este interactúa con ella y se producen diversos fenómenos que serán captados y visualizados en función de los detectores [26], como se muestra en la Figura 2.

- Electrones secundarios: Información topográfica de la muestra
- Electrones retrodispersados: obtener un mapa con información sobre la composición superficial de la muestra
- Electrones Auger: información sobre la composición de pequeñas partes de la superficie de la muestra
- Rayos-X: información analítica de un volumen considerable de la muestra



**Figura 2.** Interacciones entre los electrones y el material en SEM [28].

El equipo requiere principalmente de tres componentes: la columna del microscopio, esta incluye el cañón de electrones en la parte superior en la cual se desplaza el haz de electrones; la cámara de muestras en la base; y el computador que conduce el microscopio

con los controles de banco y los equipos auxiliares [26]. Esta técnica de caracterización permite visualizar la microarquitectura de las fibras sintetizadas mediante *electrospinning* y la adhesión y proliferación celular de manera cualitativa en el material. Además, con cortes micrótomos del área transversal de las membranas se puede observar la migración de las células a través del espesor del material.

### **Propiedades mecánicas**

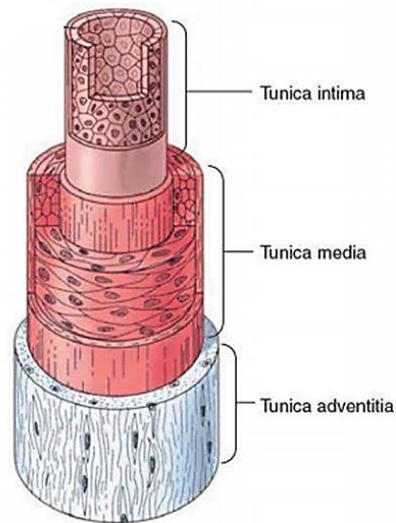
Los implantes comerciales utilizados en intervenciones quirúrgicas para el reemplazo de un tramo sanguíneo afectado cumplen las propiedades mecánicas de un vaso nativo, sin embargo, en relación con las características biocompatibles estos implantes no presentan bioactividad. Es por este motivo que las membranas electrohiladas deben promover las propiedades mecánicas adecuadas para dicha aplicación de implantes vasculares [29]. De acuerdo con el estado del arte, las propiedades mecánicas de los materiales sintéticos son mejoradas cuando estos son mezclados con polímeros naturales [30]. Los vasos sanguíneos se encuentran constantemente sometidos bajo un esfuerzo de expansión y compresión a medida que la sangre fluye por el torrente sanguíneo, esta capacidad es conocida como compliancia.

Las propiedades mecánicas, en específico el módulo de Young es una de las más importantes, debido a que mide la rigidez del material y determinándose en la zona de deformación elástica. De acuerdo con la aplicación de implantes vasculares, este debe garantizar la no deformación temporal del andamio a medida que este es sometido a un esfuerzo.

### **Vasos sanguíneos**

Los vasos sanguíneos son los conductos por los que la sangre circula, transportando nutrientes, electrolitos, hormonas, vitaminas, anticuerpos, oxígeno y células inmunológicas de una parte del organismo a otra, logrando así preservar un entorno adecuado para la supervivencia y la funcionalidad de las células; estos se clasifican principalmente en tres tipos: arterias, venas y capilares [31].

La composición de los vasos sanguíneos varía según el tipo que sea. De manera general, estos están compuestos por tres capas: la capa endotelial (íntima), la capa media intermedia y la capa adventicia externa como se evidencia en la Figura 3 [9][32]. La íntima es la que se encuentra en contacto directo con el flujo sanguíneo, esta consiste en una monocapa de células endoteliales que tienen como función prevenir la agregación plaquetaria espontánea, evitando la aparición de una angiopatía; además, regula la permeabilidad de los vasos, el comportamiento de las células del músculo liso vascular y la homeostasis. La capa media, es la más gruesa conformada por células del músculo liso que contribuye a la resistencia mecánica del vaso. Finalmente, la capa adventicia está conformada por tejido conectivo, especialmente por células tipo fibroblastos, secretoras de fibras de elastina y colágeno, proporcionando resistencia a la estructura [9].



**Figura 3.** Composición anatómica de los vasos sanguíneos [32].

### **Implantes vasculares**

Los implantes vasculares son dispositivos médicos que son implementados como una alternativa de solución para el reemplazo de un tramo de vaso afectado. Estos deben proporcionar un microambiente apropiado para el desarrollo morfológico y funcional de los tejidos, promoviendo la adhesión y proliferación celular [33]. Se destacan dos tipos de implantes vasculares: los bioimplantes (implantes autólogos, los homoimplantes y heteroimplantes) y los implantes sintéticos (fabricados con técnicas textiles, recubrimientos, liofilización, entre otras) [34].

Una de las principales desventajas de los implantes vasculares es la dificultad para obtener un endotelio confluyente sobre la superficie luminal. Las células endoteliales ligeramente unidas se separan fácilmente de la pared del vaso cuando se exponen al sistema vascular *in vivo*. Por lo tanto, cualquier área desnuda en la superficie luminal de los implantes vasculares puede conducir a la formación de trombos a través de la deposición y activación de plaquetas [18].

La respuesta biológica y funcional de un implante vascular está determinada principalmente por el material con el que ha sido elaborado y con la microarquitectura porosa de la pared del andamio [35]. La regeneración de tejido vascular o angiogénesis y el transporte celular en los soportes electrohilados es fundamental para garantizar una adecuada biocompatibilidad y funcionalidad de los implantes vasculares [36][37].

### **Modelo *in vitro*: fibroblastos NIH 3T3**

La línea celular presenta una morfología tipo fibroblastos, son procedentes de tejido embrionario de ratón albino suizo, tiene como nomenclatura NIH 3T3, esta última designación (3T3) es una abreviatura de transferencia de cada 3 días con un inóculo de  $3 \times 10^5$  células [38]. Fue aislada en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York en 1962 por George Todaro y Howard Green

[39]. Desde entonces esta línea ha sido implementada en diversos estudios e investigaciones biológicas [38][39].

Además, este tipo de células crecen en adhesión [40], y deben ser cultivadas en frascos de cultivo de plástico, debido a que no se adhieren bien en ciertos tipos de vidrio. Las condiciones óptimas de cultivo consisten en proporcionar medio modificado Eagle Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (SBF) que proporciona factores de crecimiento y antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano. Por otro lado, el ambiente de incubación debe presentar un 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), una temperatura de 37 °C, oxígeno (O<sub>2</sub>) y humedad relativa de 95 % [38][40].

### **Hemólisis**

Un material hemocompatible es aquel que genera escasos o nulos efectos adversos en los glóbulos rojos (hemólisis), en la activación de la cascada de coagulación y en la respuesta plaquetaria. Por lo tanto, la activación de las plaquetas (adhesión y agregación) y de la cascada de coagulación (activación y desactivación) y la deposición y absorción de proteínas plasmáticas es mínimamente activa al estar en contacto el fluido sanguíneo con el material. De este modo, la hemocompatibilidad es una propiedad significativa para el desarrollo de membranas electrohiladas con potencial uso en implantes vasculares, debido a que estos estarán durante un tiempo determinado en contacto directo con la sangre [41][42][30].

Los ensayos de hemólisis se pueden implementar como un índice de hemocompatibilidad para biomateriales, ya que esta se define como el grado de lisis de los eritrocitos y por ende la liberación de hemoglobina [42]. Para la realización del ensayo se emplea la norma ISO 10993-4 (ISO 10993: Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 4: Selección de pruebas de interacciones con sangre) [30][43] y la norma ASTM F756-17 (Práctica estándar para la evaluación de las propiedades hemolíticas de los materiales) [44].

El porcentaje de hemólisis se analiza mediante la lectura de la absorbancia del fluido después de interactuar con el material a través de espectroscopía, el cual permite determinar la cantidad de hemoglobina libre en el plasma. De acuerdo con ISO10993-4, los materiales que evidencien valores de hemólisis inferiores al 5 % son seguros y se pueden usar como materiales para el contacto directo con la sangre [30][44].

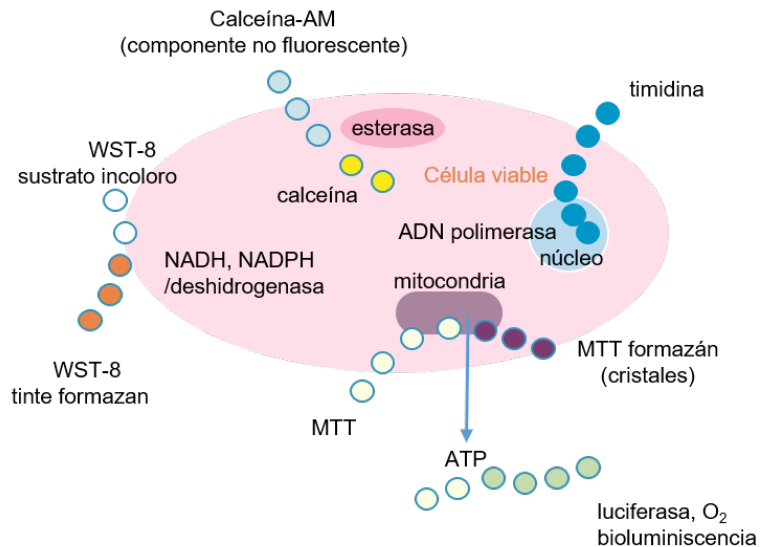
### **Inmunofluorescencia**

Las técnicas de inmunofluorescencia son implementadas para la detección de un antígeno o un anticuerpo en células o tejidos a través de fluorocromos, los cuales son sustancias fluorescentes que presentan un espectro de emisión y excitación característico [45].

Para esta técnica es necesario emplear anticuerpos para la posterior visualización de la unión con el antígeno mediante un enlace químico estable que no se rompe durante la reacción inmunológica, esta unión se evidencia debido a la fluorescencia emitida, que se observa bajo el microscopio [46][47]. De otro lado, esta técnica permite determinar la interacción de un modelo biológico con un material, mediante la relación antígeno-anticuerpo. Esta relación a su vez logra ofrecer información acerca de la proliferación celular o estado morfológico-funcional de subestructuras celulares [48].

## Viabilidad celular

La viabilidad celular hace referencia al porcentaje de células que sobreviven al exponerse a un tratamiento o un evento en específico, y de otro lado, la citotoxicidad es una alteración de las funciones básicas celulares [49]. Son diversos los métodos implementados para determinar la viabilidad celular, la Figura 4 muestra los diferentes mecanismos de identificación de la actividad celular, los cuales funcionan mediante la detección de algunas funciones celulares como la actividad enzimática, la permeabilidad de la membrana celular, la adhesión celular, la producción de adenosina trifosfato (ATP), la producción de coenzimas y la captación de nucleótidos [45][50]. Entre los diversos mecanismos se resalta el ensayo de MTT, el cual mediante la reducción del colorante de tetrazolio a formazán insoluble se logra obtener un valor relacionado con la viabilidad celular, este ha sido ampliamente implementado debido a la facilidad de uso y la alta reproducibilidad del mismo [51][50].



**Figura 4.** Mecanismos celulares para la determinación de la viabilidad celular [50].

## Permeabilidad y porosidad

La funcionalidad de un implante vascular está determinada por diferentes propiedades, dentro de ellas se encuentra la permeabilidad y la porosidad del material. La permeabilidad de acuerdo con la norma ISO 7198 es definida como el volumen de líquido que pasa a través de la pared de las prótesis en un tiempo específico bajo una presión determinada, dicha presión se elige de acuerdo con las características de flujo a las que se someten los vasos sanguíneos, la cual en condiciones fisiológicas es 80 y 120 mmHg y bajo condiciones fisiopatológicas es 50 y 150 mmHg. La importancia de valorar la propiedad permeable de la pared de las prótesis vasculares, se centra en el estudio de las características del transporte de nutrientes y oxígeno [52]. Además, la permeabilidad del material se ve afectada dependiendo del tipo de compuesto que pretende ser transportado a través de esta [53].



Por otro lado, la porosidad es la relación entre el volumen vacío y el volumen total de un objeto, teniendo en cuenta los espacios vacíos. La porosidad está íntimamente relacionada con el tamaño de poro de la estructura de la prótesis vascular y a su vez favorece la biointegración célula-material permitiendo la endotelización de la capa íntima del implante. Del mismo modo, es un parámetro que influye en la respuesta del material en cuanto a la permeabilidad [53].

## ESTADO DEL ARTE

Las membranas electrohiladas compuestas son de gran relevancia en la ingeniería de tejidos debido a que están bioinspiradas en la microarquitectura de la matriz extracelular, en el caso de matrices de PCL y Col-H, el primero es un polímero sintético biocompatible, sin embargo, no posee sitios bioactivos. Teniendo en cuenta lo anterior, han implementado proteínas naturales como lo es el Col-H para promover la bioactividad de andamios electrohilados ya que presenta secuencias de aminoácidos que favorece la adhesión, migración y diferenciación celular [54][55]. A partir de esto, en esta sección se reportan resultados de investigaciones de andamios electrohilados de PCL y Col-H

Y. Jiang y su grupo fabricaron mediante electrohilatura andamios fibrosos de PCL y gelatina usando como disolventes tetrafluoroetanol (TFE) y ácido acético (1 % con respecto al TFE) en cuatro relaciones de peso, PCL-C (100: 0), P7G3 -C (70:30), P5G5-C (50:50) y P3G7-C (30:70); y luego fueron reticulados con genipina. La incorporación de gelatina imparte bioactividad, esta es importante para la adhesión y proliferación celular. Realizaron caracterización morfológica mediada por SEM, indicando fibras lisas, homogéneas y la relación directamente proporcional de la concentración de gelatina con respecto al diámetro. Así mismo, la adición de gelatina modificó la humectabilidad de las membranas, otorgándoles características hidrofílicas. Por otra parte, los andamios PCL-C y P7G3-C presentaron propiedades mecánicas similares a la de las arterias coronarias humanas. En cuanto a las pruebas biológicas, implementaron células madre mesenquimales humanas (hMSC); mediante *ActinRed™ 555 ReadyProbes™* y DAPI tiñeron las células con el fin de determinar la presencia de filamentos de actina y núcleos respectivamente, estas tinciones y los ensayos de proliferación demostraron la presencia de sitios de unión con el material, en especial el híbrido P7G3-C y la interacción célula-célula. Además, la cantidad total de ADN bicatenario en cada muestra se determinó fluorimétricamente mediante el ensayo *Picogreen*, donde el compuesto 70:30 fue la que mayor proliferación presentó [55].

Por su parte, R. Yao y demás integrantes examinaron las propiedades mecánicas y las respuestas celulares de membranas electrohiladas de PCL y gelatina con diferentes relaciones de peso, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 respectivamente en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) y fueron reticuladas mediante genipina y la mezcla de Clorhidrato de N, N-(3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida (EDC y NHS). Las pruebas mecánicas indicaron que la relación 2:1 presentaba una mayor resistencia a la tracción y un mayor porcentaje de elongación. En la caracterización morfológica, las fibras se formaron sin defectos y la relación 4:1 y 2:1 tenían una distribución de diámetro mayor en comparación con las demás relaciones (1:1, 1:2 y 1:4). Antes de proceder con los ensayos biológicos realizaron la reticulación con los dos agentes anteriormente mencionados, los resultados mostraron ciertas diferencias en el tamaño y morfología de las fibras. Sin embargo, la membrana reticulada con EDC/NHS mostró un engrosamiento de fibra menos significativo y para decidir el tipo de agente reticulante, analizaron la morfología de las células madre mesenquimales óseas (MSCs) en un microscopio confocal, en el que hubo más adhesión en la superficie de la muestra reticulada con EDC/NHS, lo que indica

una mejor biocompatibilidad. Posteriormente, evaluaron la proliferación celular a través del ensayo de conteo de células 8 (CCK-8) mediante la densidad óptica a 2, 4 y 6 días de incubación, donde los resultados revelaron que la relación 2:1 presentaba la mejor respuesta celular en términos de adhesión, proliferación y organización del citoesqueleto [56].

Adicionalmente G. Yang y demás investigadores desarrollaron una membrana compuesta mediante co-electrohilatura de PCL y gelatina metacrilada (mGLT) y para favorecer la retención y la distribución uniforme de esta última en el andamio fue implementado el método de fotorreticulación. Además, esto permitió la construcción de múltiples capas del material compuesto. Para los ensayos *in vitro* fueron aisladas células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASCs), las cuales se sometieron a ensayo 3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio (MTS) para evaluar la proliferación celular y el ensayo *Picogreen* con el fin de determinar el contenido de ADN bicatenario y tinción nuclear con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y para la obtención de imágenes usaron microscopía confocal. Estudios previos determinaron la biocompatibilidad de la fotorreticulación, donde se evidenció menos del 6 % de muerte celular. Además, la reticulación no taponó los poros, esto se evidenció en la sensibilidad que presentaron las células para recibir señales bioquímicas exógenas. Las células sembradas se alinearon respecto a la orientación de las fibras y adoptaron el fenotipo de células tendinosas después de ser expuestas al tratamiento de factor tenogénico exógeno, TGF- $\beta$ 3 [54].

Del mismo modo, O. Hartman y su grupo desarrollaron dos tipos membranas electrohiladas de PCL y gelatina variando el disolvente, HFIP y TFE. Inicialmente, disolvieron por aparte la PCL y la gelatina al 10 % p/v en cada disolvente, seguidamente procedieron a realizar una mezcla en una relación 1:1 de cada material disuelto previamente. Para las membranas PCL/gelatina/HFIP obtuvieron un diámetro promedio de fibra de  $1.48 \pm 0.39 \mu\text{m}$  y para PCL/gelatina/TFE  $4.00 \pm 1.53 \mu\text{m}$ . Cada membrana pasó por dos procesos, el primero fue por hidrólisis con el fin de anclar a las fibras grupos carboxílicos y en el segundo cada membrana fue funcionalizada con el complejo bioactivo biotina-PInDIV-BSA con el objetivo de recrear el microambiente nativo de la médula ósea a nivel *in vitro*, en este caso con células C4-2B (células cancerígenas de próstata), y para la caracterización celular implementaron tinción con Draq-5 y Alexa Fluor® 488 para ensayos inmunohistoquímicos. El motivo por el cual fue incluido el péptido PInDIV a las membranas electrohiladas es la capacidad que este presenta en la señalización que promueve la proliferación, supervivencia y migración de células cancerosas. De este modo, la proliferación fue determinada mediante el ensayo 4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]- 1,3-disulfonato de benceno (WST), este es un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica para estimar el número total de células viables en ambas membranas. Finalmente, el andamio de PCL/gelatina/HFIP permitió a las células exhibir su morfología tradicional alargada, mientras que las células en PCL/gelatina/TFE modificadas con PInDIV mejoró la penetración celular; sin embargo, la matriz de PCL/gelatina/HFIP fue más propicia para la adhesión celular y la proliferación [57].

Además, K. Sisson y su grupo desarrollaron matrices electrohiladas de gelatina entre 6 y 11 % (p/p) disuelta en una solución de ácido acético, acetato de etilo y agua destilada en

una relación 50:30:20. Posteriormente, reticularon las muestras mediante glutaraldehído en fase de vapor, especies reactivas de oxígeno, gliceraldehído y genipina. Inicialmente, analizaron el efecto de la concentración en la formación de fibras, para esto caracterizaron las muestras mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM), con el fin de determinar el diámetro y la morfología de fibra junto con la distribución de tamaño. En la concentración de 6-7 % las fibras presentaban imperfecciones superficiales, entre 8-10 % eran uniformes y sin defectos y al 11 % no presentaba irregularidades, pero si una baja uniformidad de diámetro. De este modo, la concentración implementaba para los posteriores ensayos fue de 10 % (p/p) con un diámetro promedio de 300 nm. Para determinar la viabilidad y la proliferación celular de la línea osteoblástica MG63 en la membrana seleccionada con los diferentes métodos de reticulación fue implementado el ensayo WST, el cual determina la actividad metabólica de las células; este ensayo fue realizado en cuatro periodos de incubación: 3, 5, 7 y 9 días, dando como resultado una proliferación y viabilidad celular igual o mejor que las células control debido a la conformación tridimensional de los andamios, este es similar al entorno de la matriz extracelular. El resultado del proceso de reticulación determinó que el gliceraldehído y el genipina fueron los agentes que más baja toxicidad presentaron, por lo tanto, las fibras fueron resistentes a la disolución en presencia del medio de cultivo celular a 37 °C [58].

Posteriormente, E. Chong y su grupo fabricaron un andamio fibroso de PCL y gelatina depositado directamente en un poliuretano (Tegaderm™, 3M Medical). La solución de cada material fue preparada por aparte a una concentración 10 % (p/v) en TFE, después cada solución se mezcló en una relación 1:1. La caracterización morfológica la realizaron mediante FE-SEM, las micrografías evidenciaron la estructura interconectada y mediante un procesador de imágenes determinaron que las fibras se encontraban en un rango de 300-600 nm, dando lugar a un diámetro promedio de  $470 \pm 120$  nm y reportaron una porosidad entre 62–75 %, esta es importante para la infiltración y proliferación celular. Para los ensayos biológicos usaron fibroblastos dérmicos humanos (HDF) con el fin de determinar y analizar la adhesión, proliferación y migración celular realizando cultivos en ambos lados del andamio compuesto de PCL/gelatina y poliuretano para determinar la posibilidad de la implementación de este como implante dérmico. Ejecutaron el ensayo MTS para la viabilidad y la proliferación celular en tres periodos de incubación para cada lado del andamio: 3, 5 y 7 días, complementariamente realizaron FE-SEM para evaluar la adhesión y la morfología de los HDF en el andamio fibroso. Los resultados mostraron que los fibroblastos presentaban una adhesión y proliferación significativa, esto fue obtenido a través de FE-SEM, evidenciando la forma característica de huso de los HDF y el ensayo MTS evidenció el aumento de la densidad óptica y el número de células viables a lo largo de los 7 días de incubación. De este modo, el andamio construido es un sustrato no tóxico y por su estructura porosa beneficia la infiltración y proliferación celular [59].

Así mismo, P. Xiang y demás investigadores, desarrollaron un andamio tubular compuesto de PCL, gelatina y proteína de seda recombinante (pNSR32) con un diámetro interno de 3 mm, un espesor de 0.3 mm y una longitud de 3 cm. Las soluciones de polímero con una concentración del 30 % (p/v) fueron ejecutadas a diferentes relaciones másicas de pNSR32, PCL y gelatina, 0:100:0 (PCL), 5: 95: 0 (pNSR32/ PCL), 5:85:10 (pNSR32/ PCL/gelatina) en ácido fórmico al 98 % (v/v). Para cada tipo de andamio realizaron la caracterización

morfológica a través de SEM, dando como resultado diámetros promedios de  $111 \pm 32$  nm (PCL),  $113 \pm 55$  nm (pNSR32/ PCL) y  $166 \pm 85$  nm (pNSR32/ PCL/gelatina), cabe señalar que el diámetro promedio del tamaño de poro fue respectivamente de  $1.308 \pm 0.42$   $\mu\text{m}$ ,  $1.632 \pm 0.84$   $\mu\text{m}$  y  $2.423 \pm 0.97$   $\mu\text{m}$ . En los ensayos biológicos fueron implementadas células endoteliales aórticas de rata *Sprague Dawley* (SDRAECs), estas fueron sometidas a pruebas de adhesión, proliferación, migración y citotoxicidad en tres periodos de incubación: 1, 3 y 7 días. Las SDRAECs fueron sembradas en los andamios y los resultados del ensayo MTT evidenciaron un aumento en la proliferación a medida que el tiempo pasaba; sin embargo, el compuesto pNSR32/PCL/gelatina exhibió la mayor proliferación celular después de 7 días, seguido por pNSR32/PCL y luego por PCL. Además, la adición de gelatina favoreció que el material fuera más hidrofílico, por lo tanto, la adhesión mejoró notablemente, preservando el fenotipo celular típico de polígonos o husos cortos en el andamio pNSR32/PCL/gelatina. Con respecto a los andamios de pNSR32/PCL y PCL la adhesión disminuyó debido a la falta de sitios activos para la adhesión celular. Sin embargo, las SDRAECs no pudieron migrar a gran profundidad en los andamios, esto pudo haber sido causado por el tamaño de poro pequeño de los andamios. Finalmente, el andamio pNSR32/PCL/gelatina evidenció características de adhesión, proliferación y buena citocompatibilidad, por lo cual presenta un potencial uso en el área protésica para vasos sanguíneos de pequeño diámetro [60].

Por otra parte, L. Ghasemi y su grupo desarrollaron andamios biocompuestos de PCL y gelatina al 6 % en peso, disueltos en hexafluoro-2-propanol (HFP), estos se fabricaron obteniendo dos organizaciones de las fibras, una aleatoria y otra alineada; además variaron la relación másica entre los dos materiales, 50:50, 70:30 y 100:0 PCL/gelatina respectivamente. Mediante SEM determinaron el diámetro promedio de las fibras, dando como resultado  $113 \pm 33$  nm (50:50),  $189 \pm 56$  nm (70:30) y  $431 \pm 118$  nm (100:0), evidenciado una relación inversamente proporcional entre el contenido de gelatina y el diámetro de fibra. Con el fin de determinar la degradación y el cambio morfológico de las fibras, estas fueron sometidas a incubación durante 3, 7, 10 y 14 días en 1 ml de tampón fosfato salino, donde posteriormente las micrográficas de SEM evidenciaron los cambios morfológicos de las mismas, en el caso de PCL/gelatina-50:50, los cambios morfológicos fueron significativos mientras que PCL/gelatina-70:30 preservó su morfología presentando únicamente hinchazón y para PCL 100:0 no se observaron cambios significativos durante los 14 días de incubación. Así mismo, los ensayos biológicos fueron realizados con células madre de cerebelo de ratón neonatal (C17.2), estas fueron sembradas en las membranas para el estudio de la proliferación celular a través del ensayo MTS, este último junto con SEM mostraron que la membrana 70:30 favorecía la adhesión, proliferación y diferenciación celular en comparación con las demás relaciones másicas, esto se debe principalmente al contenido de gelatina que favorece puntos de adhesión celular. Por otro lado, la microestructura de PCL/gelatina promovió el crecimiento y la extensión de neuritas, mientras que el andamio de PCL las neuritas presentaron una menor longitud [61].

Adicionalmente, Ke Ren y su grupo investigador desarrollaron andamios de PCL y gelatina por medio de electrohilatura con diferentes relaciones de peso de gelatina (0, 30, 50 y 70 %), las soluciones de trabajo fueron preparadas en TFE al 10 % (p/v) para cada material, donde posteriormente realizaron la mezcla de estos en las proporciones mencionadas de

gelatina, después las membranas fueron reticuladas con genipina. La caracterización morfológica de las muestras fue realizada a través de SEM y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), el cual demostraron estructuras uniformes y lisas con diámetros promedio en los cuatro tipos de materiales compuestos entre los 200 y 600 nm. Además, la incorporación de gelatina promovió la hidrofiliidad y el proceso de reticulación no afectó esta propiedad de los andamios, favoreciendo el comportamiento celular. A partir de estos primeros resultados, procedieron a realizar los ensayos biológicos *in vitro* con la línea celular MC3T3-e1 (células osteoblásticas de ratón) para determinar la adhesión, proliferación y la capacidad de inducción osteogénica, en este último implementaron colorimetría a través del tinte Alizarina Red S para cuantificar la presencia de calcio. Como resultado obtuvieron que las células se expresaron morfológicamente en cada una de las muestras evaluadas con contenido de gelatina, dando lugar a la adhesión al material mediada por la proteína. Así mismo, los resultados del ensayo CCK-8 reveló una viabilidad celular superior al 80 % y la tinción con Alizarina Red S demostró la deposición de calcio en mayor contenido en los andamios compuestos debido a la presencia de gelatina, la cual aumentó significativamente la capacidad osteogénica [19].

Finalmente, Sneh Gautam y su grupo fabricaron andamios de PCL y gelatina. La PCL al 20 % en peso fue disuelta en una mezcla de cloroformo y metanol en una relación 3:1 y la gelatina al 8 % en peso en ácido acético al 80 % (v/v). Seguidamente, estas fueron mezcladas en diferentes relaciones volumétricas de PCL/gelatina en 20:80, 40:60, 60:40 y 80:20, respectivamente. Mediante la caracterización de la microestructura por FE-SEM, determinaron implementar en los ensayos posteriores la mezcla 80:20 de PCL/gelatina debido a la morfología lisa, sin defectos y con diámetros más uniformes en las fibras con una media de  $782 \pm 145$  nm. Además, realizaron pruebas de pérdida de masa sumergiendo la muestra en agua destilada durante dos días y no encontraron pérdidas de masa significativas debido a la interacción entre la PCL y la gelatina. Por otro lado, la adhesión, proliferación y viabilidad de las células fibroblásticas de ratón (L929) fueron evaluadas a través de FE-SEM, cuantificación de ADN y ensayo de MTT, respectivamente. Las micrografías de FE-SEM mostraron que el andamio de PCL/gelatina promovió la adhesión de los fibroblastos, donde estos expresaron su morfología como husos. El ensayo de proliferación por medio de cuantificación de ADN fue realizado por el método de lisis alcalina durante 24, 48 y 72 h de incubación, evidenciando mayor cantidad de ADN en la membrana compuesta de PCL/gelatina que en los andamios PCL o el control de células sin interactuar con el material, esto se debió a la presencia de la gelatina que exhibe propiedades de proliferación y adhesión. Respecto a la citotoxicidad, el ensayo de MTT dio como resultados viabilidades del 96.8%, 97.1% y 98.4% a 24, 48 y 72 h de incubación, respectivamente. Teniendo en cuenta los anterior resultados, el andamio compuesto es considerado biocompatible ya que no induce efectos citotóxicos significativos sobre los fibroblastos L929 y promueve la adhesión y proliferación celular [62].

## HIPÓTESIS

La implementación de materiales que presentan características biocompatibles en el área protésica cardiovascular es de suma importancia, debido a que podrían favorecer el comportamiento nativo del microambiente de la pared del vaso sanguíneo. Mediante el uso de polímeros sintéticos y naturales como la PCL y el Col-H, respectivamente, se podría desarrollar un biomaterial que permita la revascularización de tramos que presentan una angiopatía y requieran de intervención quirúrgica, por lo tanto, al implementar estos polímeros en conjunto con la técnica de electrohilatura, se podría emular la microarquitectura de la matriz extracelular y a partir de la porosidad, el tamaño de poro y la permeabilidad se podrían favorecer las características biocompatibles (adhesión, proliferación y viabilidad celular) y a su vez, promover las propiedades mecánicas de membranas electrohiladas compuestas. Del mismo modo, los andamios compuestos de PCL/Col-H podrían exhibir una baja actividad hemolítica por lo que presentan un potencial uso como estrategias terapéuticas para enfermedades vasculares periféricas que comprometan la afectación de vasos de pequeño diámetro.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar el efecto hemolítico, biocompatible y funcional de membranas electrohiladas de policaprolactona/colágeno hidrolizado en interacción con un modelo *in vitro* de fibroblastos.

### Objetivos específicos

1. Desarrollar membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona/colágeno hidrolizado con diferentes porosidades.
2. Evaluar la actividad hemolítica de las membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona/colágeno hidrolizado con diferentes porosidades.
3. Determinar las características biocompatibles de las membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona/colágeno hidrolizado con diferentes porosidades en interacción con un modelo *in vitro* de fibroblastos.
4. Evaluar la permeabilidad estática de membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona/colágeno hidrolizado con y sin deposición celular.



## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MATERIALES

Para el desarrollo y tratamiento de las membranas electrohiladas compuestas se empleó policaprolactona con peso molecular de 80.000 (PCL) y colágeno hidrolizado bovino tipo B (Col-H) adquiridos de Sigma Aldrich®; así mismo, 2,2,2-tetrafluoroetanol (TFE) y etanol obtenidos de Merck.

De otro lado, para el ensayo de hemólisis se utilizó sangre bovina donada por la Central de Faenado Municipal de Medellín de especímenes sanos que fueron utilizados en la industria alimenticia y para la recolección y preparación del material de estudio se emplearon tubos BD Vacutainer® con EDTA K3 adquiridos de Precision Care y cloruro de sodio (NaCl) adquiridos de PancReac Applichem.

Finalmente, para la evaluación biológica se empleó cultivos celulares de la línea comercial de fibroblastos NIH/3T3 adquirida de la *American Type Culture Collection (ATCC)*, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y tampón fosfato salino (PBS) adquiridos de Lonza, suero fetal bovino (SFB) obtenido de Microgen, azul de tripano obtenido de Loba Chemie y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) obtenido de Alfa Aesar. Además, se empleó penicilina/estreptomicina, tripsina EDTA y hoechst 33258 adquirido de Sigma Aldrich®, hematoxilina por Thermo Fisher Scientific, eosina, isopropanol, albumina fracción V de suero bovino de Merck y formaldehído y tritón X-100 comercializados por PancReac Applichem.

## 2.2 METODOLOGÍA

En el siguiente apartado se enuncian cada una de las metodologías implementadas para dar cumplimiento a los objetivos específicos planteados en esta investigación.

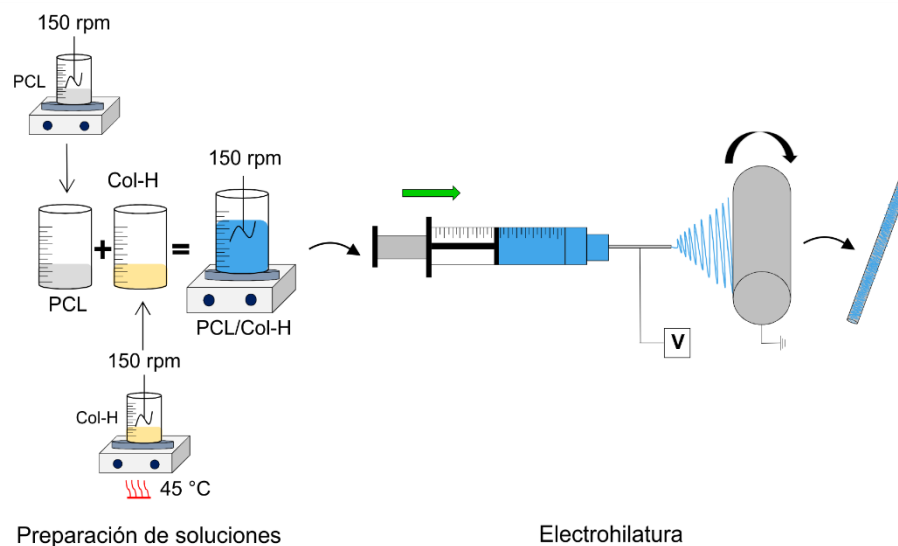
### 2.2.1 Desarrollo de membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona/colágeno con diferentes porosidades.

#### 2.2.1.1. Preparación de soluciones

Las soluciones de trabajo para llevar a electrohilar se realizaron a partir de una solución de PCL al 10 % (p/v) y Col-H al 10 % (p/v) disueltos en TFE en agitación a 150 rpm a temperatura ambiente para la PCL y a 45 °C el Col-H. Posteriormente, se mezclaron ambas soluciones a una relación volumétrica de 1:1 y permaneció en agitación a 150 rpm durante 24 h a temperatura ambiente (ver Figura 5).

#### 2.2.1.2. Proceso de electrohilatura

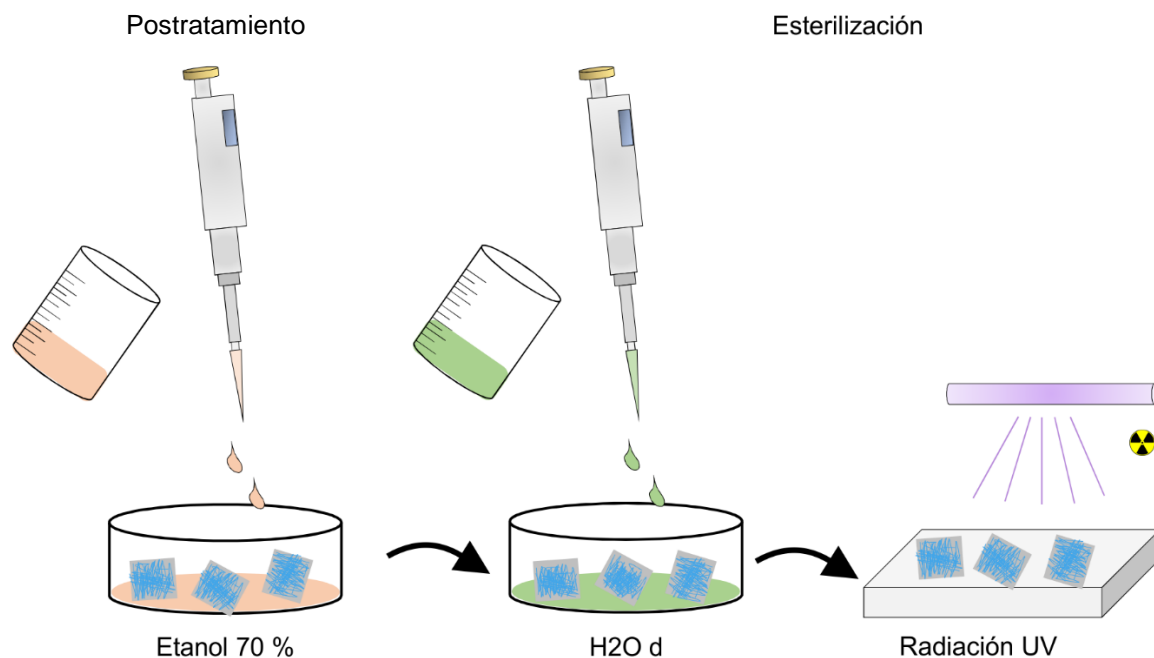
La solución de PCL/Col-H se depositó en una jeringa Bec Dic de plástico 21G (ID: 11.99 mm), para el desarrollo de las membranas electrohiladas se llevó a cabo un diseño experimental donde se modificó las condiciones de trabajo de la siguiente manera, variación del flujo entre 0.6 - 1.2 ml/h, un rango de voltaje entre 6 - 12 kV, distancia entre la aguja y el colector de 10, 15, 18, 20 y 25 cm, velocidades del colector cilíndrico rotatorio (ID: 1.1 cm) entre 50 - 250 rpm con incrementos de 50 rpm y una humedad relativa menor al 50 % (ver Figura 5)



**Figura 5.** Esquema de la preparación de las soluciones de trabajo de PCL y Col-H para el proceso de electrohilatura en colector rotatorio.

### 2.2.1.3. Postratamiento y esterilización

Las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H permanecieron en inmersión en etanol frío al 70 % (v/v) durante 30 min, seguidamente se retiró el etanol y se lavaron con agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). Después, las membranas fueron expuestas a radiación ultravioleta durante un periodo de 30 min (ver Figura 6).



**Figura 6.** Esquema del proceso de postratamiento y esterilización de membranas electrohiladas de PCL/Col-H con etanol al 70 % y radiación UV.

### 2.2.1.4. Caracterización morfológica y físico-química de las membranas

#### *i. Microscopia electrónica de barrido*

Las características morfológicas de la superficie y tamaño de fibra de las membranas sin y con tratamiento fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido Jeol Neoscope JCM-6000 Plus y un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Nova 200 NanoSEM (Centro de Investigación en Materiales Avanzados – CIMAV, sede Monterrey – México). Previamente las muestras fueron recortadas y fijadas en cinta de carbono para realizar el recubrimiento con oro mediante pulverización catódica y proceder a su lectura. El procesamiento de las micrografías se realizó mediante el software ImageJ<sup>®</sup> empleando el complemento *Diameter J* y el análisis estadístico se llevó a cabo en el software Origin<sup>®</sup>, utilizando tres micrografías de tres lotes diferentes para la obtención del diámetro promedio, desviación estándar e índice de polidispersidad y así obtener un n=3.

#### *ii. Ángulo de contacto*

El ángulo de contacto de las membranas electrohiladas de PCL y PCL/Col-H sin y con tratamiento con etanol (30 min etanol) fue determinado mediante un tensiómetro modelo OCA 15 plus Dataphysics empleando como solución de trabajo H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y plasma sanguíneo.

Dicho ensayo consistió en depositar una gota de cada uno de los fluidos de trabajo sobre las membranas electrohiladas y mediante el software Dataphysics SCA 20 OCA se realizó la medición del ángulo de contacto dinámico. Posteriormente, se llevó a cabo el registro fotográfico para determinar el ángulo de contacto a 0, 50 y 100 s. La prueba se realizó en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados – CIMAV, sede Monterrey – México.

### ***iii. Espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR-ATR)***

Se usó un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet iS 50 FTIR con módulo de reflectancia total atenuada (ATR) a un barrido entre los 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  para determinar los cambios de los grupos funcionales de las membranas electrohiladas de PCL y PCL/Col-H sin y con tratamiento. Mediante el software OriginLab®, se realizó la deconvolución de Fourier (FSD) de los espectros infrarrojos que cubren la región de la amida I (1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ ), lo cual permitió determinar el efecto del postratamiento en las estructuras secundarias del Col-H después del tratamiento con etanol durante 30 min. La caracterización se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados – CIMAV (Monterrey – México).

### ***iv. Microscopía de fuerza atómica (AFM)***

Con el fin de determinar los perfiles de rugosidad de las membranas electrohiladas sin y con tratamiento se realizó AFM en un microscopio de fuerza atómica modelo MFP-3D-SA marca ASYLUM RESEARCH en modo *tapping* con un cantiléver modelo AC240TS-R3. Mediante el software ARgyle Light se procesaron los resultados para generar imágenes 3D y para la obtención de los perfiles de rugosidad se implementó el software WSxM 4.0. La caracterización se realizó en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados – CIMAV (Monterrey – México).

### ***v. Prueba de tracción***

Se realizaron pruebas de tensión mecánica estática uniaxial en un plano a las membranas electrohiladas de PCL, PCL/Col-H y PCL/Col-H 30 min etanol utilizando un analizador mecánico dinámico Q800 TA Instruments New Castle (DMA). Para dichas pruebas, las muestras fueron cortadas en rectángulos de 5.3 mm de ancho por 10 mm de longitud y se ubicaron en el equipo usando abrazaderas de tensión de películas. Todas las pruebas de tensión se llevaron a cabo a una temperatura ambiente de 28 °C en modo de fuerza controlada, con una precarga de 0.001 N y una fuerza cargada a velocidad constante de 0.2 N/min. El análisis de los resultados se llevó a cabo con el software TA Universal Analysis. La prueba se realizó en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados – CIMAV (Monterrey – México).

## **2.2.2 Evaluación de la actividad hemolítica de las membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona/colágeno con diferentes porosidades.**

### **2.2.2.1. Pérdida de masa**

Las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H fueron recortadas con una dimensión de 1.5 x 1.5 cm, con el fin de determinar la pérdida de masa respecto al peso de las membranas antes y después de interactuar con los fluidos de trabajo. Para esto, se

utilizó etanol al 70 % (v/v) y solución salina al 0.9 % (p/v) y se procedió a la inmersión de las membranas en los fluidos de trabajo durante 24, 48 y 72 h en incubación a 37 °C. Para determinar el porcentaje de pérdida de masa se implementó la Ecuación 1.

$$\%PM = \frac{Peso_{seco\ 1} - Peso_{seco\ 2}}{Peso_{seco\ 1}} \times 100 \%$$

**Ecuación 1.** Porcentaje pérdida de masa.

Donde, %PM es el porcentaje de pérdida de masa,  $Peso_{seco\ 1}$  corresponde al peso de la membrana antes de interactuar con el fluido y  $Peso_{seco\ 2}$  es el peso seco después de la interacción.

Después de la interacción con los fluidos de trabajo y los períodos de incubación, las membranas fueron caracterizadas en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Nova 200 NanoSEM.

#### **2.2.2.2. Ensayo de hemólisis**

Para este procedimiento se empleó sangre bovina obtenida de la Central de Faenado Municipal de Medellín de especímenes sanos, para la recolección de esta se usaron tubos BD Vacutainer® con EDTA. Para este ensayo se empleó como control negativo solución salina y sangre a una relación 3:6 (CN) y control positivo H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (CP) y sangre a una relación 4:5. Los controles fueron incubados a 37 °C durante 60 min y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min, luego el plasma fue analizado en un espectrofotómetro Lambda Bio 10 a una longitud de onda de 540 y 545 nm (ver Figura 7-A).

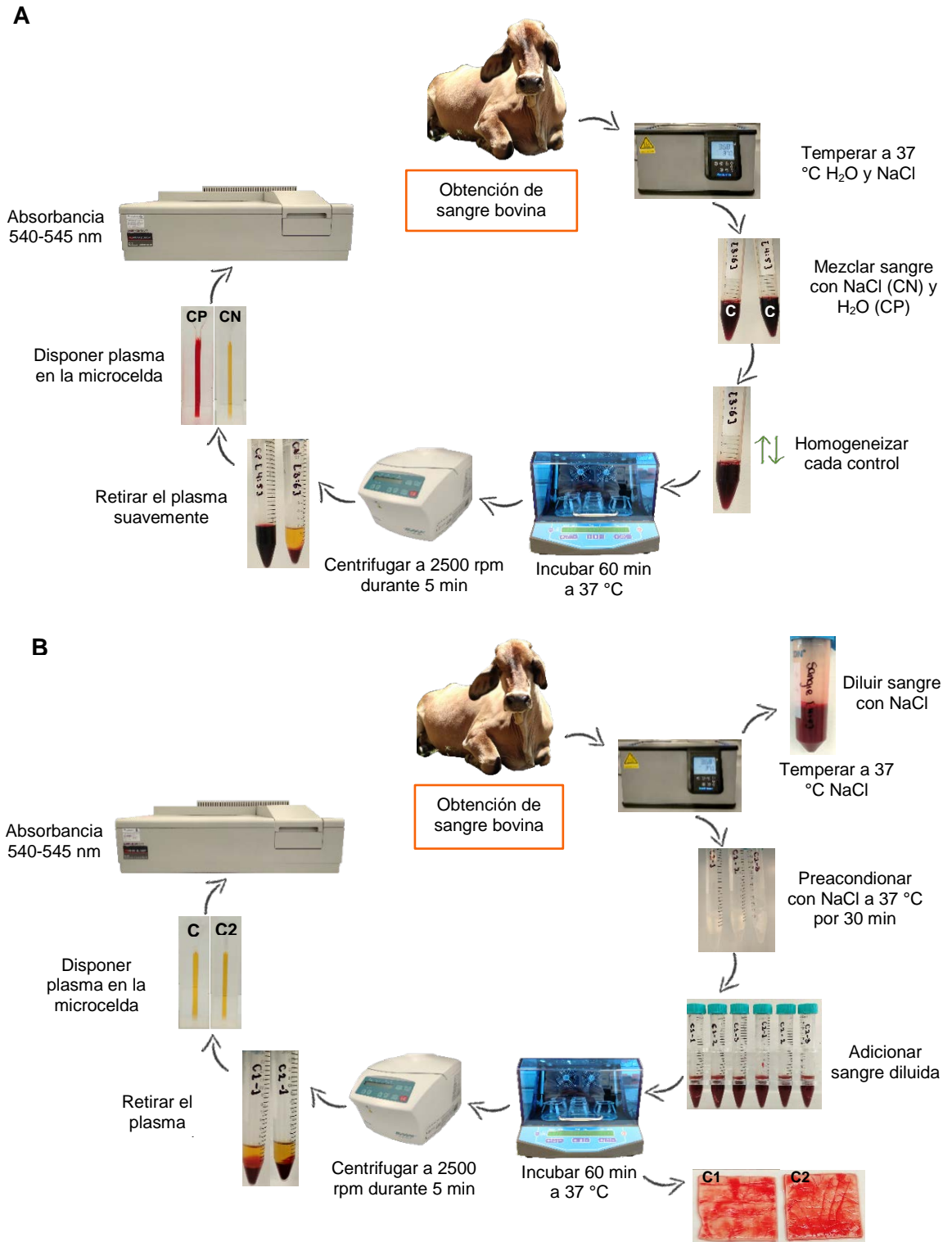
Para el caso de las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H inicialmente fueron esterilizadas y se acondicionaron con solución salina durante 30 min a 37 °C. Seguidamente, se agregó sangre en solución salina a una relación 4:5 y se incubó por 60 min a 37 °C. Finalmente, se retiró las membranas y la sangre se centrifugó a 2500 rpm por 5 min, luego el plasma fue analizado en un espectrofotómetro Lambda Bio 10 a una longitud de onda de 540 y 545 nm (ver Figura 7-B).

El ensayo de la actividad hemolítica se realizó de acuerdo con la norma ISO10993-4. El porcentaje de hemólisis se calculó empleando la Ecuación 2.

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{A_S - A_N}{A_P - A_N} \times 100 \%$$

**Ecuación 2.** Porcentaje de hemólisis.

Donde  $A_S$  representa la absorbancia de la muestra,  $A_N$  es la absorbancia del CN y  $A_P$  es la absorbancia del CP.



**Figura 7.** Protocolo del ensayo hemolítico, A) controles, B) membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H.

### **2.2.3 Determinación de las características biocompatibles de las membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona/colágeno con diferentes porosidades en interacción con un modelo *in vitro* de fibroblastos.**

#### *Preacondicionamiento de las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H*

Para todos los ensayos de biocompatibilidad, las membranas electrohiladas fueron esterilizadas y pretratadas con DMEM no suplementado por un periodo de 24 h a 37 °C.

#### **2.2.3.1 Modelo *in vitro* de fibroblastos 3T3**

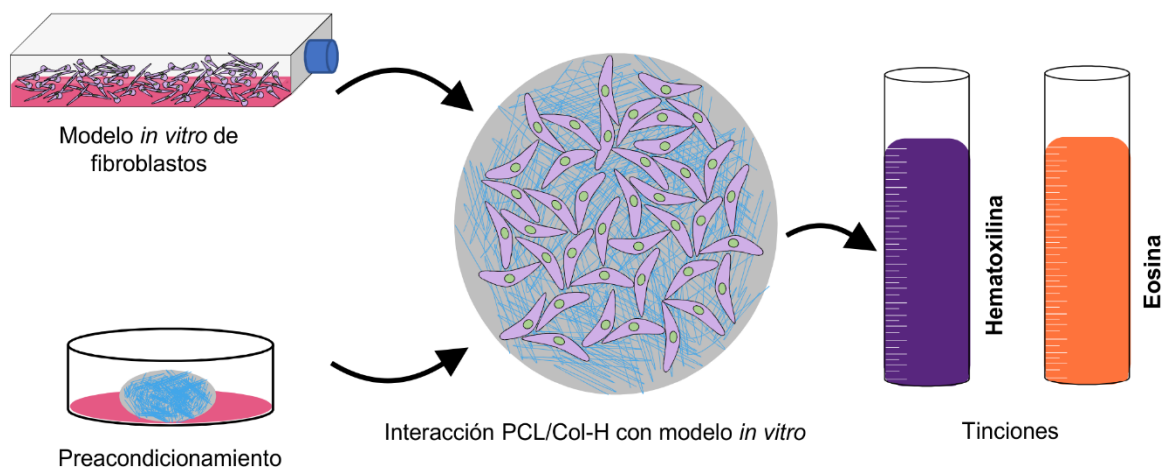
El cultivo celular de fibroblastos 3T3 se mantuvo en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SBF y penicilina/estreptomina (100 unidades/100 µg), a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad relativa. El proceso de subcultivo se llevó a cabo desprendiendo las células con tripsina EDTA al 0.05 % y neutralizando su efecto con DMEM, el porcentaje de viabilidad celular se realizó con azul de tripano y el conteo se llevó a cabo en un hematocitómetro. Finalmente, las células se dejaron en incubación bajo condiciones controladas y se les cambio medio cada tres días.

#### **2.2.3.2 Ensayo de adhesión y proliferación celular**

Para el ensayo de adhesión y proliferación celular se sembraron 8000 células/pozo de fibroblastos 3T3 con una viabilidad superior al 90 % sobre las membranas en condiciones de 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad relativa durante un periodo de incubación de 24, 48 y 72 h.

Luego de cada periodo de incubación, las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H fueron retiradas y fijadas con formaldehído al 10 % durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se adicionó hematoxilina/eosina para teñir las membranas plasmáticas y los núcleos celulares (ver Figura 8). Finalmente, se realizó registro fotográfico con el software Optika Vision Pro y se determinó la proliferación celular a partir del procesamiento de las imágenes con el software ImageJ®.

Para validar la adhesión celular, las muestras fijadas con formaldehído fueron deshidratadas con inmersiones sucesivas de etanol y secadas al vacío. Después, las membranas fueron caracterizadas en un microscopio electrónico de barrido Jeol modelo Neoscope JCM-6000 Plus y en un microscopio de emisión de campo Nova 200 NanoSEM.



**Figura 8.** Esquema del modelo *in vitro* de fibroblastos y del precondicionamiento de las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H para las tinciones con hematoxilina y eosina después de la interacción célula-material.

### ***i. Microscopia de fuerza atómica (AFM)***

La topografía de las membranas electrohiladas celularizadas fueron analizadas en un microscopio de fuerza atómica modelo MFP-3D-SA marca ASYLUM RESEARCH en modo *tapping* con un cantiléver modelo AC240TS-R3. Mediante el software ARgyle Light se procesaron los resultados para generar imágenes 3D.

### ***ii. Espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR-ATR)***

Para determinar los cambios en las estructuras secundarias del material luego de interactuar con el modelo *in vitro* de fibroblastos, las muestras fueron caracterizadas en un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet iS 50 FTIR-ATR en un barrido entre los 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

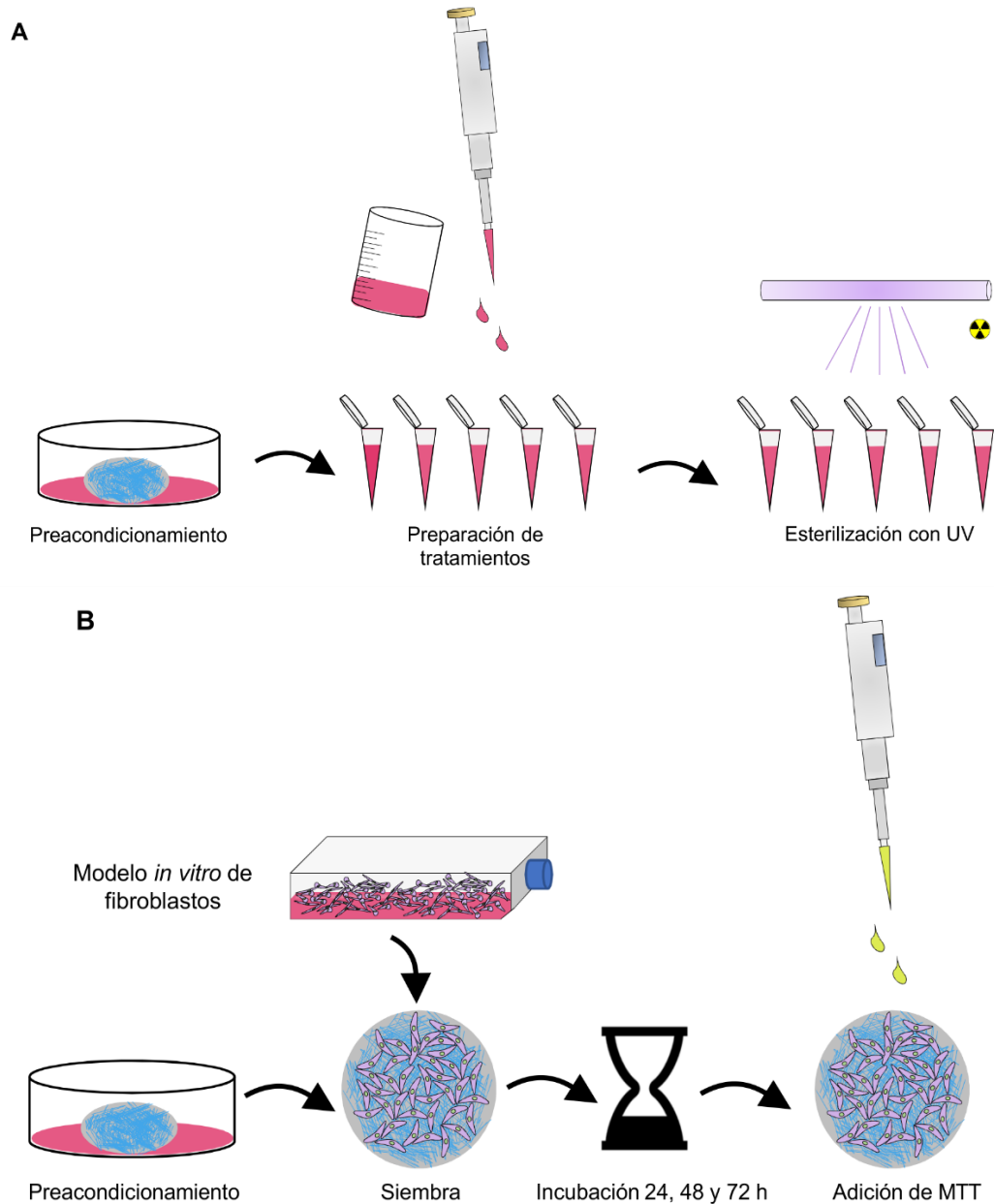
### **2.2.3.3 Ensayo de viabilidad celular**

Se realizó el ensayo de reducción metabólica por medio de Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2- ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el cual permitió determinar la viabilidad celular en función de la actividad mitocondrial de las células a partir de dos métodos.

El primero, fue un método indirecto determinando la viabilidad celular a partir de los excipientes generados de las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H, estos fueron obtenidos del proceso de precondicionamiento de las membranas, de la solución resultante se prepararon cinco tratamientos con diluciones del DMEM desde 0 % hasta 100 % con incrementos de 25 % y se esterizaron con radiación UV (ver Figura 9-A). Seguidamente, se sembraron 3900 células/pozo y al tercer día se adicionaron los tratamientos, los cuales interactuaron 24 h con el modelo *in vitro* de fibroblastos. Después, se adicionó MTT y pasadas entre 4-5 h se detuvo su actividad con isopropanol, luego se dejaron en incubación a 37 °C en agitación durante 15-16 h. Finalmente, se realizó la lectura en un fotómetro de microplacas Multiskan FC a una longitud de onda de 570 nm.



Mientras que, el segundo fue un método directo, para esto las membranas fueron esterilizadas, precondicionadas y se sembraron 3900 células/pozo, luego se dejaron a 37 °C durante un periodo de incubación de 24, 48 y 72 h ( ver Figura 9-B). Una vez pasado dicho tiempo, se adicionó MTT, se detuvo su actividad con isopropanol y se dejaron en incubación a 37 °C en agitación. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm en un fotómetro de microplacas Multiskan FC Thermo Fisher Scientific mediante el software Skanlt RE 4.1.



**Figura 9.** Proceso de la preparación de los tratamientos para ensayo de MTT en membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H, A) interacción indirecta a partir de excipientes, B) interacción directa.

#### 2.2.3.4 Determinación de cambios estructurales celulares: tinción fluorescente.

Las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H fueron esterilizadas, preacondicionadas y se sembraron 3300 células/pozo durante un período de incubación de 24, 48 y 72 h. Posterior a cada uno de los periodos de incubación, las membranas fueron lavadas con PBS y se fijaron las células con formaldehído al 4 %. Seguidamente, se adicionó tritón al 0.1 % durante 10 min y albumina por 30 min, luego se adicionó Hoechst por 20 min, se retiró y se lavó con PBS. Finalmente, se realizó la lectura de las estructuras marcadas con la molécula específica de detección de ADN en un microscopio invertido Optika modelo IM-3FL-IM-3FL4 a través del software Optika Vision Pro y para el procesamiento de las imágenes se implementó ImageJ.

#### 2.2.4 Evaluación de la permeabilidad estática de membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona/colágeno con y sin celularización.

##### 2.2.4 Ensayo de permeabilidad

La permeabilidad estática de las membranas fue evaluada antes y después del tapizado celular basado en la norma ISO7198, implementando H<sub>2</sub>O como fluido de trabajo.

La prueba consistió en una columna de presión hidrostática con una altura de fluido equivalente a 50, 80, 120 y 150 mmHg, donde se midió la masa de H<sub>2</sub>O que logró permear la membrana electrohilada compuesta de PCL/Col-H con y sin celularización. Estas fueron ubicadas en un porta muestra con 1.1 cm de diámetro y el tiempo de prueba fue de un minuto. La permeabilidad se obtuvo a partir de la Ecuación 3.

$$k = \frac{m_{H_2O}}{\rho_{fluido} * \text{área} * t}$$

**Ecuación 3.** Permeabilidad estática.

Donde,  $k$  es la permeabilidad [ml/min\*cm<sup>2</sup>],  $m_{H_2O}$  es la masa del fluido de trabajo [g],  $\rho_{fluido}$  es la densidad del fluido de trabajo [g/ml],  $\text{área}$  la del porta-muestra [cm<sup>2</sup>] y  $t$  es el tiempo de recolección [min].

##### 2.2.5 Análisis estadístico

Los ensayos se realizarán por triplicado (n=3) y los resultados experimentales se representan como los valores medios con  $\pm$  las desviaciones estándares (DS). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba ANOVA con un valor  $p < 0.05$  considerada como estadísticamente significativo.

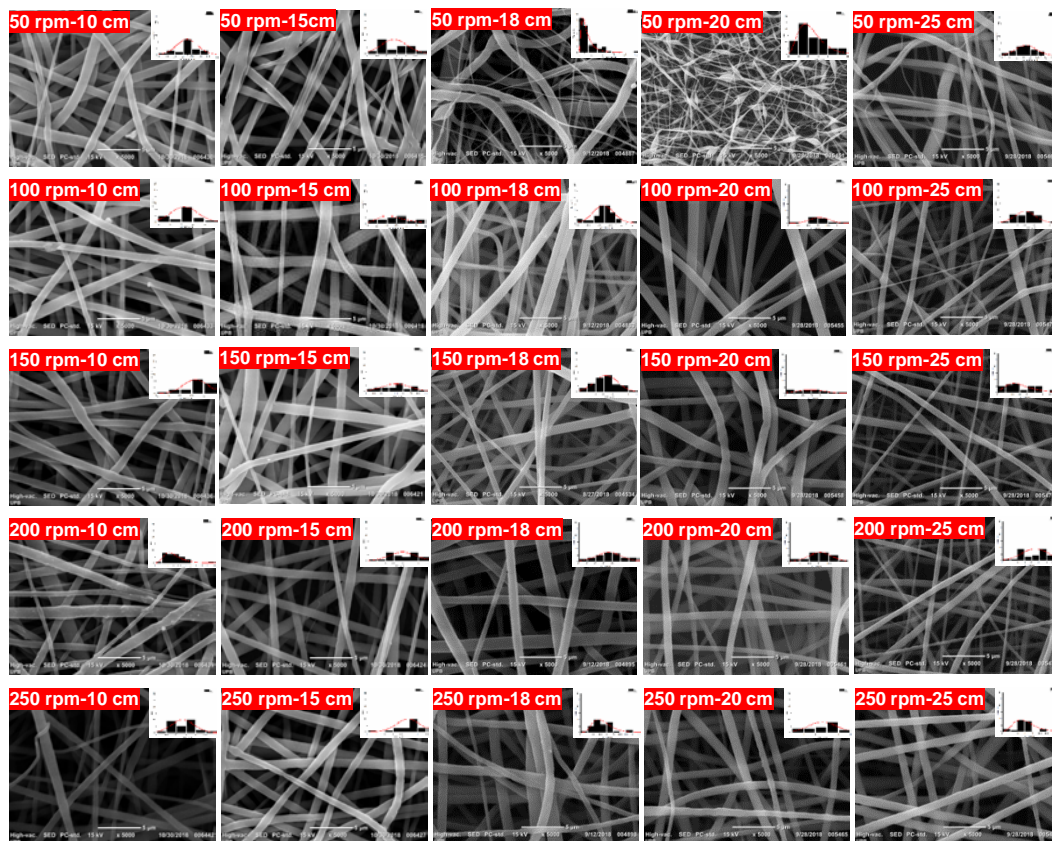
Para determinar la influencia de los factores sobre la variable de respuesta se tuvo en cuenta el valor  $p$  obtenido a través de la suma de cuadrados Tipo III. Adicionalmente, se realizó la hipótesis de normalidad y homocedasticidad, esta última con la verificación de varianza mediante el modelo de Barlett. Seguidamente, se procedió con la prueba de múltiples rangos entre la variable de respuesta y cada uno de los factores analizados con el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### FASE I: DESARROLLO DE MEMBRANAS ELECTROHILADAS COMPUESTAS DE POLICAPROLACTONA/COLÁGENO CON DIFERENTES POROSIDADES.

#### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La característica morfológica de las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H se evidencia en la Figura 10 en la cual se evidencia los cambios en la morfología en relación con la modificación de los parámetros de estudio de velocidad del colector rotatorio y la distancia entre la aguja y el colector con un voltaje y flujo entre 6 - 12 kV y 0.6 - 1.2 ml/h, respectivamente (ver Tabla 1). Además, se puede observar que los andamios electrohilados presentan fibras con una apariencia uniforme, continua y sin defectos, excepto a una velocidad de 50 rpm y una distancia de 20 cm, donde se muestra ensanchamiento y disrupción de las fibras.



**Figura 10.** Micrografías de membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H variando la velocidad de colección y la distancia entre la aguja y el colector. Escala 5  $\mu$ m.

El *electrospinning* es una técnica versátil que permite obtener estructuras fibrilares que emulan la matriz extracelular nativa, desde diámetros en la microescala hasta menos de 100 nanómetros. En el caso de las fibras de colágeno nativo, uno de los principales componentes de la matriz extracelular, el diámetro de estas puede variar entre 20 nm y 40  $\mu\text{m}$  [63][64]. De este modo, un andamio electrohilado biomimético con fibras en la micro y nanoescala favorece la adhesión, proliferación y regula la diferenciación celular [57][63]. En Tabla 1, se reportan los diámetros promedios de fibra (DPF), los cuales se encuentran en un rango entre 155 - 1033 nm, dichos rangos de diámetro son similares a los presentados por fibrillas de colágeno en condiciones nativas de la matriz extracelular [65]. Las mediciones de los diámetros fueron procesadas en el software Origin® para el análisis estadístico, en el que se determinó el tipo de distribución de las micrografías de las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H y de acuerdo a esta se obtuvo el DPF, la desviación estándar (DS) y el índice de polidispersidad (IPD), de manera que se obtuvieron distribuciones normales; con DS en un rango de 259.91 - 299.58 para 50 rpm, 187.86 - 253.79 para 100 rpm, 169.06 - 400.37 para 150 rpm, 189.23 - 320.88 para 200 rpm y 144.02 - 255.44 para 250 rpm. Así mismo, se obtuvo distribuciones normales logarítmicas con DS un rango de 1.48 - 1.56 para 50 rpm, 1.43 para 100 rpm, 1.46 para 150 rpm, 1.49 para 200 rpm y 1.35 - 1.42 para 250 rpm (ver Tabla 1).

**Tabla 1.** Diámetro promedio de fibra, desviación estándar e índice de polidispersidad para membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H variando velocidad y distancia de colección.

Velocidad (rpm)	Distancia (cm)	Voltaje (kV)	Flujo (ml/h)	DPF (nm)	DS (nm)	IPD
50	10	8.3	0.9	891.56	259.91	0.085
	15	7	0.9	748.97	273.86	0.134
	18	8.3	0.6	323.01	1.56	0.003
	20	7	0.7	155.99	1.48	0.006
	25	7	0.7	674.23	299.58	0.197
100	10	7	1.4	853.52	232.63	0.074
	15	7	0.8	922.37	1.43	0.003
	18	9	0.9	677.47	187.86	0.077
	20	9	0.9	1033.5	210.87	0.042
	25	9	0.9	593.2	253.79	0.183
150	10	6	1	866.81	214.61	0.061
	15	7	0.9	1002.42	400.37	0.159
	18	9	0.9	650.61	283.59	0.190
	20	9	1.2	1087.2	169.06	0.024
	25	12	0.9	773.87	1.46	0.006
200	10	6	0.9	771.57	1.49	0.004
	15	7	0.9	808.85	320.88	0.157
	18	8.3	0.7	915	314.69	0.118
	20	8.3	0.7	821.71	243.53	0.088
	25	8.3	0.7	544.97	189.23	0.120

<b>250</b>	10	6	0.9	734.75	237.47	0.104
	15	7	0.95	983.62	144.02	0.021
	18	7	0.7	841.05	1.42	0.003
	20	7	0.7	925.95	255.44	0.076
	25	7	0.7	976.85	1.35	0.002

La microarquitectura de estructuras fibrilares obtenidas mediante electrohilatura es afectada por los parámetros relacionados con la concentración de la solución a electrohilar, voltaje aplicado, distancia entre la aguja y el colector, velocidad del colector rotatorio, flujo, temperatura, humedad relativa, entre otros, influyendo así en la forma, el diámetro, la aparición de defectos y la continuidad de las fibras [57][63][66][67][68][69][70][71][72]. En este caso, una relación volumétrica de 1:1 de PCL/Col-H no generó defectos en las fibras, dicho resultado también fue reportado por [66]. La inclusión de la velocidad rotatoria al sistema está relacionada con la alineación de las fibras, sin embargo en el rango de trabajo (50 - 250 rpm) no se observó alineación, ya que dicho comportamiento está relacionado con el uso de velocidades superiores a 2000 rpm para obtener andamios electrohilados con fibras alineadas verticales, horizontales o diagonales [68][69]. Además, en función de garantizar un flujo constante, continuidad en las fibras y evitar la mayor cantidad de pérdidas del material se varió el voltaje y flujo entre 6 - 12 kV y 0.6 - 1.2 ml/h, respectivamente, a partir de esto se encontró que la relación del diámetro de fibra con la velocidad, la distancia entre la aguja y el colector, el flujo y el voltaje no exhiben una tendencia directamente proporcional ocasionada por la variación de los parámetros.

Sin embargo, para determinar la influencia estadística de las rpm y la distancia se realizó un análisis Anova simple con un intervalo de confianza del 95 %. Donde, al variar las rpm, se obtuvo un valor p de 0,0061 y para la hipótesis de normalidad y homocedasticidad, de 0.2045 y 0.00073 respectivamente, por lo cual se determinó que las velocidades empleadas en el diseño experimental no influyeron en el diámetro de fibra. No obstante, en el gráfico de medias (Figura 32-A en el Anexo I) se puede observar que a 50 y 200 rpm se obtienen fibras con menor diámetro y con 100, 150 y 250 no se presentan diferencias entre sí y se obtiene un diámetro de fibra mayor. En cuanto a la influencia de la distancia entre la aguja y el colector se obtuvo un valor p de 0.002, por lo cual este factor afecta significativamente el diámetro de fibra, aunque, al corroborar el valor p en la hipótesis de normalidad (0.0301) y homocedasticidad (0.0093), se evidencia que la distancia no influye en el diámetro de fibra, debido a que las hipótesis no se cumplen. Sin embargo, para el desarrollo de membranas a una velocidad de 250 rpm con variación de la distancia, se evidencia que en la menor distancia (10 cm) se obtienen menores diámetros de fibra (ver Figura 32-B, Anexo I).

En cuanto al IPD, este representa la distribución de la población de los diámetros de fibra y está determinado en un rango entre 0.0 (muestras perfectamente uniformes) y 1.0 (muestras altamente polidispersas) [73]. Para cada una de las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H se obtuvo el IPD reportado en la Tabla 1, en el que se evidencia monodispersidad de los diámetros de fibra al compararlos con el rango entre 0 y 1. Sin embargo, entre los IPD de las muestras se presentan diferencias entre sí, confirmando la

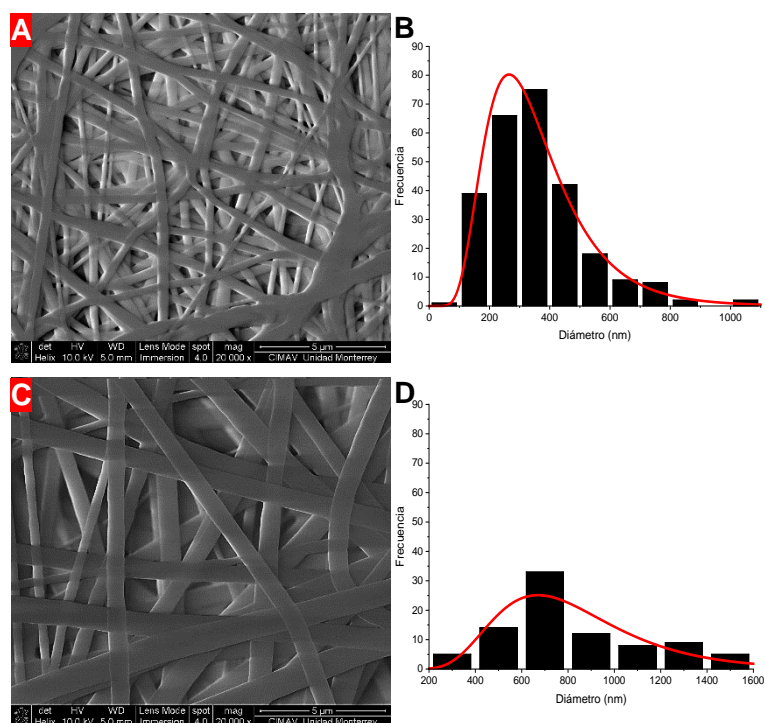
dispersidad de los diámetros de fibra de la muestra a 50 rpm-18 cm, comparada con la muestra a 150 rpm-25 cm, donde se encontró que la primera membrana electrohilada presenta un diámetro de fibra entre 96 nm-1.07  $\mu\text{m}$  (escala heterogénea) y la segunda en un rango de 281 nm-1.58  $\mu\text{m}$  (escala homogénea).

A partir de los resultados anteriores del diseño de experimentos (ver Tabla 1), se seleccionaron dos tipos de membranas denominadas C1-0 y C2-0, las cuales presentan fibras heterogéneas y homogéneas, respectivamente. De otro lado, el IPD de las dos muestras seleccionadas aunque son monodispersas por tener valores cercanos a 0, al comparlas entre ellas se evidencia la dispersidad del DPF y la diferencia entre ambas, en la que C1-0 presenta un IPD 2 veces mayor que C2-0. En la Tabla 2, se reportan las condiciones de trabajo y el índice de polidispersidad de las membranas electrohiladas C1-0 y C2-0.

**Tabla 2.** Condiciones de electrohilatura para las membranas seleccionadas, C1-0 y C2-0.

<b>Muestra</b>	<b>Relación volumétrica PCL/Col-H</b>	<b>Distancia (cm)</b>	<b>Velocidad (rpm)</b>	<b>Voltaje (kV)</b>	<b>Flujo (ml/h)</b>	<b>IPD</b>
C1-0	1:1	18	50	8.3	0.6	0.006
C2-0	1:1	25	150	12	0.9	0.003

De otro lado, la Figura 11 muestra las micrografías y sus respectivos histogramas de distribución del DPF para C1-0 y C2-0. En el caso de C1-0 (Figura 11-A,B) se observa la variación del DPF, presentando fibras en la micro y nanoescala y en la Figura 11-C,D correspondiente a C2-0, muestra la monodispersidad de la misma y el aumento del diámetro de fibra en comparación con C1-0.



**Figura 11.** Membranas electrohiladas de PCL/Col-H. Donde, A) micrografía C1-0, B) histograma de distribución diámetro de fibra C1-0, C) micrografía C2-0, D) histograma de distribución diámetro de fibra C2-0.

A partir de los resultados se encontró que los comportamientos para C1-0 y C2-0 relacionados con la estructura y morfología de las fibras se deben principalmente a los parámetros de las condiciones de trabajo de electrohilatura, en la que un incremento del voltaje o del flujo genera una disminución en el diámetro de la fibra o un incremento del diámetro de filamento, respectivamente [63][67][72]. Además, la distancia entre la aguja y el colector es un factor determinante, ya que esta depende del tiempo de deposición de las fibras y del tiempo de evaporación del solvente [71]. En este caso, la distancia entre la aguja y el colector no afectó la aparición de defectos en las fibras, esto pudo deberse al solvente implementado, TFE, puesto que este es altamente volátil.

Adicionalmente, las micrografías evidencian una microarquitectura con estructuras interconectadas al azar, generando así andamios porosos. El tamaño de poro y la porosidad son factores determinantes en la ingeniería de tejidos debido a que estos alteran la adhesión y penetración celular, la neovascularización, la funcionalidad mecánica del andamio electrohilado como implante vascular y el intercambio de nutrientes y gases [59][65]. En la Tabla 3 se reportan los valores correspondientes a la porosidad aparente, al área de poro promedio y al diámetro de poro, dichos datos fueron obtenidos con el procesador de imagen ImageJ® y el complemento *Diameter J*, en el que se evidencia que C1-0 presenta un 21.86 % más de porosidad y un incremento del 111.11 % en el área de poro en comparación con C2-0.

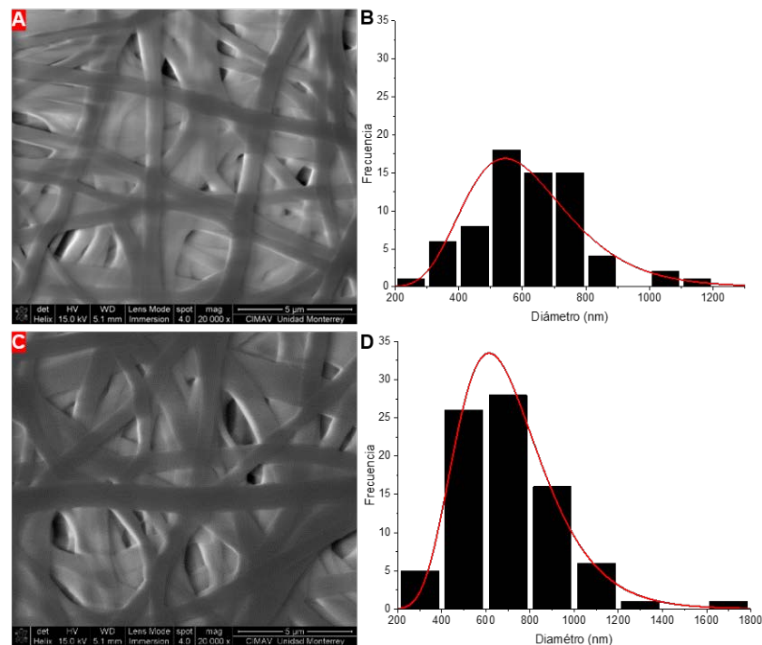
**Tabla 3.** Porosidad, área de poro promedio y diámetro de poro para C1-0 y C2-0.

<b>Muestra</b>	<b>Porosidad aparente (%)</b>	<b>Área de poro promedio (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Diámetro de poro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
C1-0	38.85 $\pm$ 3.74	1.14 $\pm$ 0.15	0.87 $\pm$ 0.07
C2-0	16.99 $\pm$ 1.06	0.54 $\pm$ 0.16	0.58 $\pm$ 0.10

A partir de lo reportado por [65], dependiendo del tamaño del poro la respuesta celular puede variar, por lo cual un diámetro de poro mayor a 20  $\mu\text{m}$  permite que las células penetren al andamio mientras que a poros menores a 12.5  $\mu\text{m}$ , las células pueden biointegrarse a la estructura a través de los espacios vacíos y mejorar la comunicación celular aumentando la secreción de componentes de la matriz extracelular. Del mismo modo, cuando el tamaño de poro no posee las mejores condiciones para que las células migren a través de él, se ha descrito que estas pueden infiltrar el andamio mediante movimientos ameboides, en el que deforman el citoesqueleto y migran por la estructura porosa. A partir de los resultados encontrados en esta investigación se tiene que el diámetro de poro de las membranas C1-0 es 0.5 veces mayor que C2-0, por lo cual C1-0 podría favorecer la infiltración celular, promoviendo la biointegración con el modelo biológico.

Con el propósito de implementar las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H como posibles implantes vasculares celularizados, estas antes de ser implementadas en procesos quirúrgicos deben someterse a procesos de esterilización. Por lo cual, cada membrana electrohilada fue tratada con etanol para reducir los focos de contaminación [74], favorecer cambios en las estructuras secundarias del colágeno y permitir la reorganización de la microarquitectura [75]. En la Figura 12 se muestran las micrografías correspondientes a las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H después del tratamiento con etanol durante 30 min (C1 Figura 12-A, B y C2 Figura 12-C,D), en la cual se puede observar un ensanchamiento de las fibras ocasionado por el postratamiento con el solvente orgánico, donde C1 presentó un diámetro entre 295 nm – 1.90  $\mu\text{m}$ , mientras que, C2 exhibió un diámetro en un rango de 300 nm – 1.65  $\mu\text{m}$ . Al comparar el rango de diámetro de fibra entre las membranas sin tratar versus las tratadas se encontró un aumento del diámetro y se conservó la tendencia de mayor polidispersidad de C1 que en C2.





**Figura 12.** Micrografías de membranas electrohiladas después del tratamiento con etanol durante 30 min, A) micrografía C1, B) histograma de distribución diámetro de fibra C1, C) micrografía C2, D) histograma de distribución diámetro de fibra C2.

El ensanchamiento de fibras derivadas de andamios proteicos ha sido reportado por [75][74], los cuales afirman que los tratamientos con etanol en membranas electrohiladas que contiene proteínas como el Col-H o gelatina generan modificaciones en la morfología de las fibras, esto se debe a que el solvente causa que las fibras se hinchen para proporcionar suficiente espacio para el reorganizamiento de las cadenas moleculares, atacando los grupo funcionales disponibles con el fin de reducir las estructuras secundarias amorfas, que a su vez están relacionadas con la solubilidad de la misma en medios acuosos [76][74].

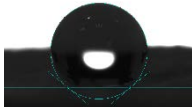
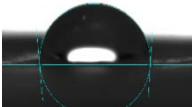

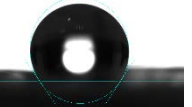
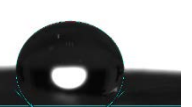
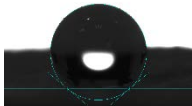



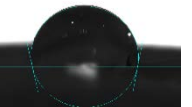
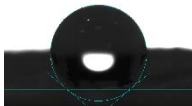
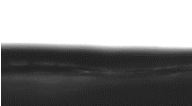

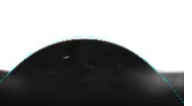
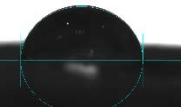
### Ángulo de contacto

El ángulo de contacto de membranas electrohiladas fue determinado con el fin de describir la humectabilidad en presencia de H<sub>2</sub>O y plasma sanguíneo en el tiempo (0, 50, 100 s). En la Tabla 4 se muestran las imágenes obtenidas del ángulo en cada periodo para la PCL, C1-0, C2-0 y sus respectivos tratamientos con etanol, C1 y C2. En el caso de la PCL esta presentó un ángulo de  $143.4 \pm 0.32^\circ$  manteniéndose constante en el tiempo debido a su característica hidrofóbica, lo que refleja una baja humectabilidad y por ende no permitiría la absorción de proteínas y nutrientes en la pared del vaso, pudiendo afectar las funciones celulares [59][66][77][78].

Por otro lado, el ángulo de contacto de las membranas compuestas de PCL/Col-H, C1-0 y C2-0, disminuyeron en comparación con la PCL (ver Tabla 4) presentando estadísticamente una diferencia significativa como lo muestra la Tabla 12 del Anexo I. Este comportamiento se atribuye a la inclusión del Col-H, ya que este mejora la afinidad y la capacidad de absorción del agua a través de la estructura porosa. De acuerdo con [59][66][77][78][79][80],

este cambio de comportamiento en la humectabilidad de las membranas electrohiladas se debe a la disponibilidad de los grupos funcionales amina y carboxilo en la estructura del Col-H, estos al interactuar con medios acuosos forman puentes de hidrógeno favoreciendo la hidrofiliidad del andamio. Sin embargo, en las muestras C1-0 y C2-0 después de depositar la gota de agua, esta inmediatamente se absorbió y por ende no se presentó ángulo de contacto en 50 y 100 s, estos cambios en la humectabilidad podrían ser un factor deseable en los procesos de adhesión e infiltración celular en el andamio electrohilado [55][78].

**Tabla 4.** Ángulo de contacto dinámico con H<sub>2</sub>O a 0, 50 y 100 s.

		PCL	C1-0	C2-0	C1	C2
Tiempo (s)	0	 143.4 ± 0.32°	 90.8 ± 0.31°	 103.8 ± 1.10 °	 123.7 ± 0.99°	 125.3 ± 0.11°
	50	 143.4 ± 0.32°	 0°	 0°	 74.9 ± 0.11°	 95.4 ± 0.32°
	100	 143.4 ± 0.32°	 0°	 0°	 50 ± 0.67°	 84.4 ± 0.11°

Después del tratamiento con etanol, el comportamiento dinámico del ángulo de contacto de C1 y C2 se modificó, incrementando su valor en el tiempo 0 s y a medida que el tiempo transcurrió este disminuyó gradualmente (ver Tabla 4), debido a que el etanol generó modificaciones en las estructuras secundarias de la proteína y por ende en la humectabilidad de la misma, lo que indica que las membranas tratadas con etanol para posible aplicación como implante vascular permitirían la absorción controlada de metabolitos y proteínas, reduciendo así el estrés en la pared del vaso y disminuyendo la turbulencia del flujo sanguíneo e imposibilitando la formación de coágulos.

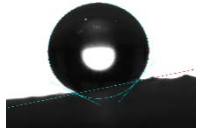
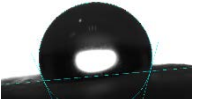
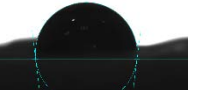
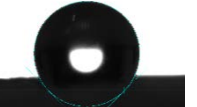
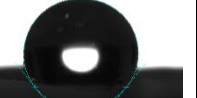
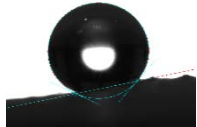


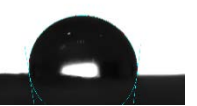
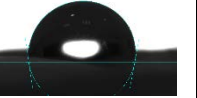
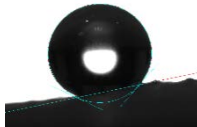


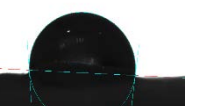
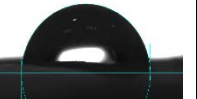
Para determinar la influencia del material electrohilado y del tiempo de evaluación en el ángulo de contacto, se realizó un análisis ANOVA multifactorial, obteniendo el valor p para el tiempo (0.0083) y el material (0.0025), con los que se determinó que estos dos factores presentaron un efecto estadísticamente significativo en el ángulo de contacto. Sin embargo, con las gráficas de medias se evidencia que el comportamiento de C1-0 y C2-0 son similares y difieren del resultado de la PCL, mientras que las membranas tratadas presentaron semejanzas con la PCL (ver Figura 34-A del Anexo I), así mismo, en la Figura 34-B del Anexo I se observó que a medida que el tiempo trascurre el ángulo disminuye. De otro lado, las membranas C1 y C2 estadísticamente presentan un comportamiento similar con respecto al ángulo de contacto con H<sub>2</sub>O, favoreciendo la humectabilidad controlada.

En cuanto a la interacción entre el ángulo de contacto, el material y el tiempo, la Figura 33 en el Anexo I muestra que el ángulo en todas las membranas disminuye con el tiempo a excepción de la PCL, aunque se resalta que C1 presentó un menor ángulo en el tiempo final de evaluación (100 s).

Por otro parte, para determinar el efecto estadístico del material y del tiempo en la humectabilidad en relación con el plasma sanguíneo, el valor p fue de 0.0031 y 0.0231, respectivamente. De este modo, estos dos factores presentaron un efecto estadísticamente significativo en el ángulo de contacto confirmado por la prueba de hipótesis de normalidad y homocedasticidad. Además, en la Figura 36-A del Anexo I se observa que C1-0 y C2-0 presentan un comportamiento similar, mientras que las membranas tratadas (C1 y C2) presenta una humectabilidad semejante a la PCL y así mismo lo corrobora la Tabla 14 del Anexo I, aunque con el tiempo esta disminuye gradualmente (ver Figura 35 del Anexo I)

Basado en lo anterior, el ángulo de contacto con plasma sanguíneo presentó diferencias en comparación con los valores obtenidos con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, ya que el plasma es un 90 % agua y un 10 % de componentes proteicos, iones, nutrientes, desechos y gases, lo que incrementa la densidad del fluido en comparación con el agua. En la Tabla 5, se reportan los resultados para cada material con plasma sanguíneo, en la que la PCL con su característica hidrofóbica presentó un valor de  $142 \pm 0.16^\circ$ , C1-0 y C2-0 evidenciaron una absorción de la gota rápidamente debido a la afinidad del Col-H a los medios acuosos. Después del tratamiento con etanol el ángulo de contacto incrementó y así mismo la humectabilidad de la estructura, sin embargo, en comparación con el H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> los valores fueron más estables después de 50 s debido a la presencia de solutos en el plasma.

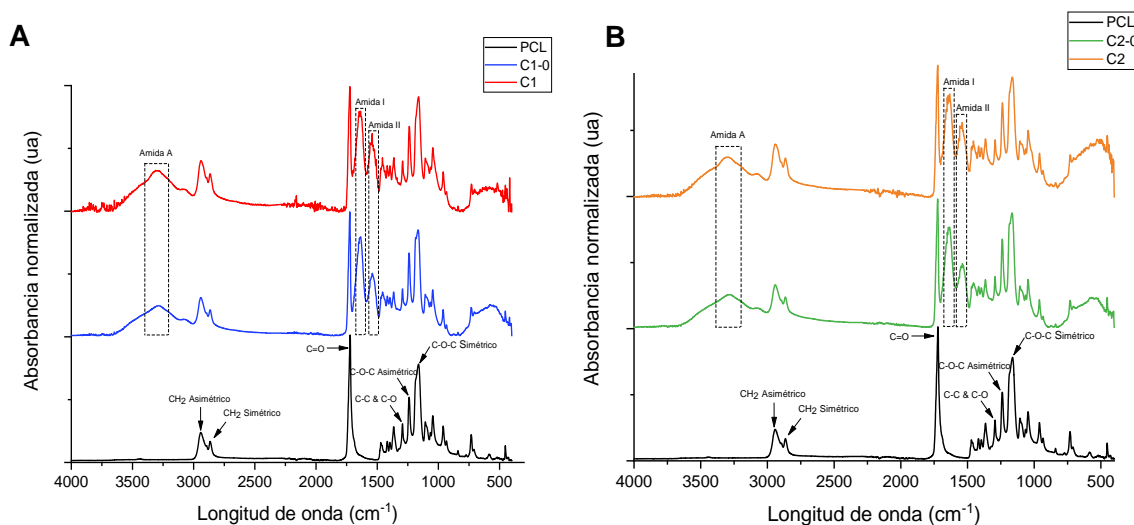
**Tabla 5.** Ángulo de contacto dinámico con plasma sanguíneo a 0, 50 y 100 s.

		PCL	C1-0	C2-0	C1	C2
Tiempo (s)	0	 $142 \pm 0.16^\circ$	 $99.3 \pm 1.20^\circ$	 $100.3 \pm 0.21^\circ$	 $124 \pm 0.32^\circ$	 $128.1 \pm 0.21^\circ$
	50	 $142 \pm 0.16^\circ$	 $0^\circ$	 $0^\circ$	 $99.3 \pm 0.64^\circ$	 $103.5 \pm 0.56^\circ$
	100	 $142 \pm 0.16^\circ$	 $0^\circ$	 $0^\circ$	 $92.6 \pm 0.67^\circ$	 $94.8 \pm 0.14^\circ$

En la medición del ángulo de contacto con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y plasma sanguíneo, C2-0 presentó un ángulo mayor en comparación con C1-0, debido a su baja porosidad actuando como una red que presenta menos espacios por los que los fluidos puedan infiltrarse por medio de la microarquitectura de la membrana electrohilada.

## Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Con el propósito de validar los grupos funcionales característicos de la PCL, del Col-H y de determinar la formación del material compuesto, se realizó FTIR-ATR. En la Figura 13 se muestran los espectros de absorbancia normalizados para la PCL, C1-0, C2-0 y sus respectivos tratamientos con etanol. Al comparar los espectros de PCL con C1-0 y C2-0 se puede observar la presencia de las bandas asociadas de la amida I, II y A del Col-H, garantizando así la obtención de membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H.



**Figura 13.** Espectros de absorbancia de membranas electrohiladas. Donde A) C1-0, B) C2-0.

De acuerdo con los espectros FTIR-ATR de la Figura 13, las longitudes de onda características y las bandas asociadas de la PCL y del Col-H se reportan en la Tabla 6 de acuerdo con diversas investigaciones de membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H [82][83][84][85][86][87][88].

**Tabla 6.** Longitudes de onda características de la PCL y Col-H con su respectiva banda asociada.

Material	Rango longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )	Banda asociada
PCL	2940-2942	Estiramiento asimétrico CH <sub>2</sub>
	2865-2866	Estiramiento simétrico CH <sub>2</sub>
	1721-1724	Estiramiento C=O
	1292-1293	Estiramiento C-O y C-C
	1237-1239	Estiramiento asimétrico C-O-C
	1161-1166	Estiramiento simétrico C-O-C
Col-H	1634-1635	Amida I (estiramiento C=O)

1537-1541	Amida II (vibración, flexión N-H y estiramiento, vibración C-N)
3284-3307	Amida A (estiramiento N-H)

Debido a que la amida I es la más susceptible a cambios en las estructuras secundarias se deconvolucionó el espectro de absorbancia entre los 1600 y 1700  $\text{cm}^{-1}$  para determinar el cambio en el porcentaje de estructuras amorfa y cristalinas después del tratamiento con etanol [75][89][90][91]. Para esto, se implementó la segunda derivada bajo el perfil Gaussiano y se calculó el área bajo la curva de cada pico relacionado con las estructuras secundarias como lo reportan [92][93], determinando el porcentaje de estructuras cristalinas (giros  $\beta$  y hojas  $\beta$  inter-intramoleculares, fuertes y débiles) y amorfas (cadenas laterales, espirales al azar, hélices  $\alpha$  y giros).

En la Tabla 7, se reportan los porcentajes de las estructuras secundarias para C1-0, C2-0, C1 y C2. En el caso de C1-0 el porcentaje de estructuras que aportan a la fase cristalina de la proteína fue de 44.02 %, después del tratamiento con etanol, C1 presentó un porcentaje de estructuras cristalinas de 77.66 %, evidenciando un incremento del 33.64 %, mientras que C2-0 presentó inicialmente 36.26 % y luego del proceso de postratamiento el aumento fue del 9.47 % obteniendo finalmente un 45.73 % de estructuras que aportan a la fase cristalina, dicho resultado concuerda con [75], en el que el tratamiento de andamios de obtenidos a partir de proteínas con etanol incrementan las estructuras secundarias que aportan a la cristalinidad. La diferencia del comportamiento evidenciado entre C1 y C2 se debe a que C1 presenta una microarquitectura con fibras nanométricas y como se ha reportado en la literatura [94], las nanoestructuras exhiben un área superficial mayor, incrementan la reactividad química de la superficie. De este modo, en la superficie de las fibras se puede presentar una mayor cantidad de grupos amino y carboxilo disponibles del Col-H que pueden reaccionar con las moléculas del etanol y así generar un reorganizamiento en las estructuras secundarias para favorecer la fase cristalina de la proteína. El aporte de estas estructuras a la cristalinidad del andamio es un aspecto fundamental para las prótesis vasculares, ya que esta se encuentra relacionada con la solubilidad del material, por lo que con el tratamiento de etanol se podría disminuir la tasa de degradabilidad en el tiempo del andamio electrohilado.

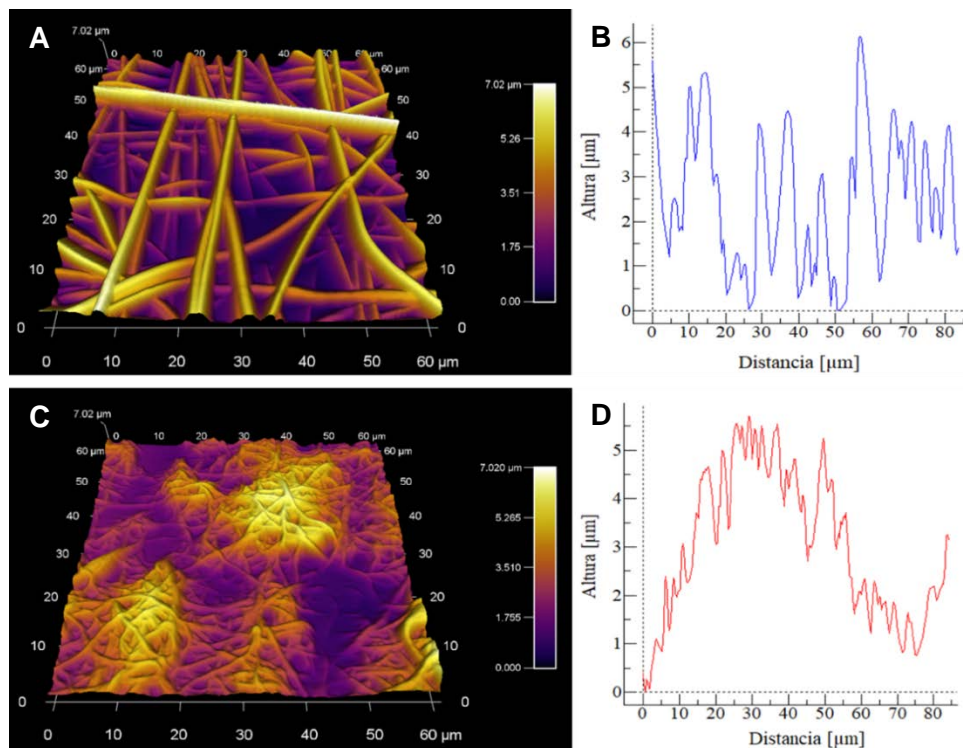
**Tabla 7.** Porcentaje de estructuras secundarias en la amida I antes y después del tratamiento con etanol para membranas electrohiladas de PCL/Col-H.

Tipo de estructura secundaria	C1-0	C1	C2-0	C2
	Aporte (%)			
<b>Cadenas laterales</b>	0.95	3.45	2.39	4.46
<b>Hojas <math>\beta</math> (inter-intramoleculares, fuertes y débiles)</b>	43.43	33.74	35.39	43.95

<b>Espirales al azar</b>	1.01	-	5.41	11.95
<b>Giros <math>\beta</math></b>	0.59	43.93	0.87	1.78
<b>Hélices <math>\alpha</math></b>	50.83	-	50.33	2.85
<b>Giros</b>	3.19	18.89	5.61	35

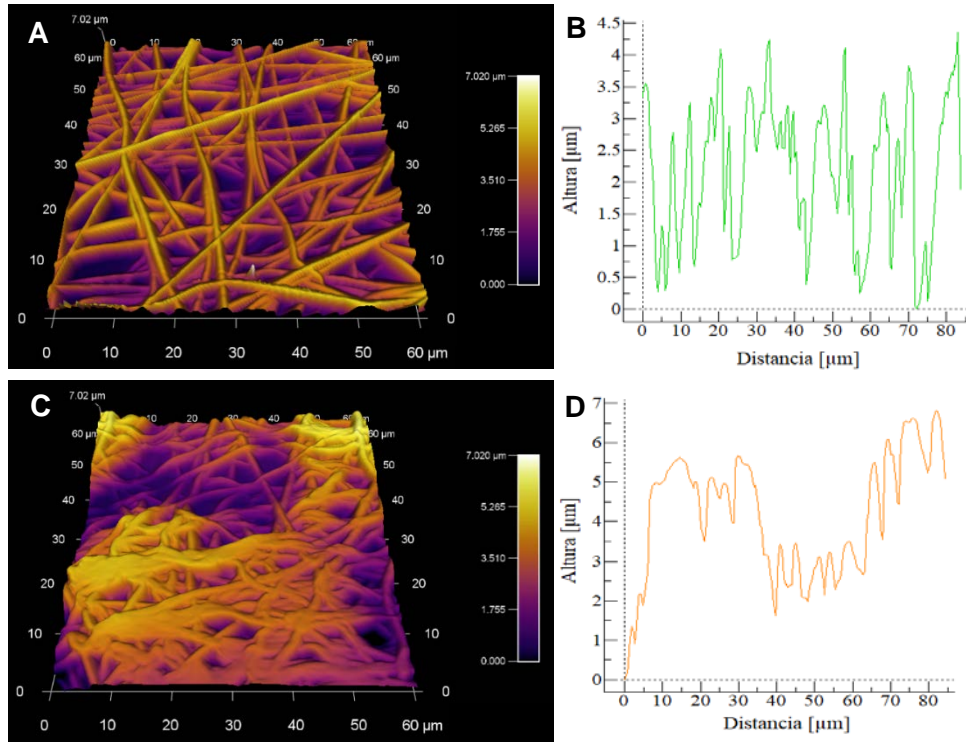
### Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se empleó AFM para observar la topografía de la superficie de las fibras en 3D y así obtener el perfil de altura, de este último se extrajo la altura promedio y la rugosidad del material antes y después del tratamiento con etanol. En la Figura 14-A se muestra la topografía de C1-0, en la que se evidencia la heterogeneidad de la muestra en relación con el diámetro de fibra y la interconectividad de los poros en la microarquitectura del andamio electrohilado. De otro lado, el perfil de altura en la Figura 14-B demuestra los cambios de altura en la red fibrilar, en la que hay crestas y valles definidos debido a los poros y a la disposición de las fibras en la estructura. Sin embargo, la morfología (ver Figura 14-C) de las fibras se ve afectada por el tratamiento con etanol como se mencionó anteriormente, en el que los solventes orgánicos generan un postratamiento y por ende un ensanchamiento en las fibras [75][74]. De este modo, se generó una modificación en el perfil de altura (ver Figura 14-D) en el que las crestas y valles se encuentran menos definidas debido a la hinchazón, unión o fusión de las fibras.



**Figura 14.** Imágenes de AFM, A) C1-0, B) perfil de altura de C1-0, C) C1, D) perfil de altura de C1.

Para C2-0, la Figura 15-A evidencia la topografía del andamio electrohilado en la que se puede observar la homogeneidad de las fibras y la interconexión de los poros, este último aspecto se observa en la Figura 15-B, en el que el perfil de altura exhibe crestas y valles concretos y diferenciados. Al comparar la topografía y el perfil de altura de C2-0 después del tratamiento (ver Figura 15-C,D) con C1-0, se observa que C2-0 presenta una mayor agregación y conectividad de las fibras, disminuyendo los espacios vacíos en la estructura, lo que genera en el perfil de altura crestas más anchas y un aumento en la altura del material electrohilado en comparación con la membrana sin tratar.



**Figura 15.** Imágenes de AFM, A) C2-0, B) perfil de altura de C2-0, C) C2, D) perfil de altura de C2.

De los perfiles de altura se extrajo la altura promedio y la rugosidad del material reportados en la Tabla 8. En el caso de C1-0 el tratamiento con etanol disminuyó la altura promedio y la rugosidad de la estructura fibrilar, mientras que en C2-0 aumentaron, estos cambios se atribuyen al diámetro de las fibras, ya que en C1-0 al presentar estructuras en la nanoescala presentan una mayor capacidad de reaccionar con las moléculas del etanol debido al área superficial, por lo que el postratamiento es más efectiva en el caso de C1-0, como se presentó en la deconvolución de los espectros de FTIR-ATR. Además, estos cambios se deben a las condiciones de operación del *electrospinning*, ya que estos conllevaron a modificaciones en la microarquitectura de los andamios y en la recolección de fibras como se puede evidenciar en las micrografías y en las imágenes topográficas de AFM.

La altura promedio y la rugosidad son factores significativos en la topografía de la superficie, ya que afectan la absorción de nutrientes a través de la estructura porosa, la adhesión y proliferación celular como ha sido reportado en el estado del arte por [95][96][98][99]. De

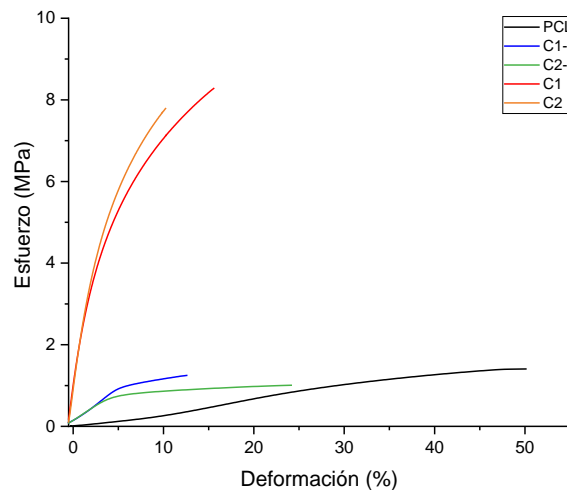
este modo, los andamios electrohilados para implantes vasculares deben garantizar la rugosidad del mismo con el fin de favorecer la respuesta celular al momento de la interacción célula-material y por ende promover la angiogénesis, debido a que se ha reportado que la adhesión y proliferación celular es más efectiva en superficies más rugosas como se ha reportado en fibras de poli (alcohol vinílico) (PVA) tratadas con etanol, encontrando modificaciones en la rugosidad y en los perfiles de altura [97][99].

**Tabla 8.** Altura promedio y rugosidad para C1-0 y C2-0 antes y después del tratamiento con etanol.

Muestra	Altura promedio ( $\mu\text{m}$ )	Rugosidad ( $\mu\text{m}$ )
C1-0	3.03	1.28
C1	2.35	0.95
C2-0	2.84	0.90
C2	3.89	0.99

### Prueba de tracción

El análisis de las propiedades mecánicas de las membranas electrohiladas de PCL, compuestas de PCL/Col-H y con tratamientos de etanol se centró en el comportamiento elástico del material, determinando el módulo de Young. En la Figura 16, se muestra las curvas de esfuerzo – deformación para cada material electrohilado, en la que se evidencian que la incorporación del Col-H en el andamio compuesto modifica el comportamiento mecánico de la PCL, incrementando la rigidez y la elasticidad del material como ha sido estudiado por varios autores [57][100][101].



**Figura 16.** Curva esfuerzo - deformación para los andamios electrohilados.



En la Tabla 9, se reportan los módulos de Young en la que se observa como la inclusión del Col-H y del tratamiento posterior, modifican el comportamiento mecánico del material. De acuerdo con [79], la PCL presenta un módulo de Young cercano al reportado en la Tabla 9, sin embargo, el módulo del material compuesto de PCL/Col-H varía entre las investigaciones, ya que este es altamente dependiente de la microarquitectura del andamio [57][79]. Este comportamiento está relacionado con el diámetro de fibra, ya que según [65] las fibras electrohiladas de menor diámetro presentan más cristalinidad, lo que implica un módulo elástico superior debido a la estabilidad de la estructura, mientras que en fibras de mayor diámetro, estas exhiben una estructura molecular menos organizada manifestada en un mayor porcentaje de estructuras secundarias amorfas, generando un módulo menor [57].

Adicionalmente, mediante un Anova simple se determinó la influencia del material en el módulo de Young, obteniendo un valor p de 0.00. De acuerdo con la verificación de la hipótesis de homocedasticidad, se evidencia que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las membranas tratadas (C1 y C2) y las no tratadas (C1-0 y C2-0) y el control (PCL). Así mismo, en la Figura 37 del Anexo I se muestra que las membranas sin tratar y el control presentan un comportamiento similar, mientras que las tratadas cuentan con un módulo de Young superior y semejante entre sí.

**Tabla 9.** Módulo de Young para cada material electrohilado y tratado con etanol.

<b>Muestra</b>	<b>Módulo de Young (MPa)</b>
PCL	4.12 ± 0.33
C1-0	16.32 ± 4.43
C1	162 ± 0.71
C2-0	15.51 ± 5.54
C2	174.30 ± 3.53

El incremento en el módulo de Young para C1 y C2 fue del 892.65 y 1123.79 %, respectivamente. Estos incrementos se deben a que el postratamiento indujo modificaciones significativas en las propiedades mecánicas [102][103]. De este modo, los andamios electrohilados compuestos de PCL/Col-H tratados se asemejan al comportamiento mecánico de vasos sanguíneos nativos, que de acuerdo con [29] el módulo de Young longitudinalmente de la vena safena se encuentra en un rango entre 16.8 – 130 MPa, por lo que evitarían la ruptura de su estructura y promoverían la recuperación bajo deformaciones pulsátiles [104].

## FASE II: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LAS MEMBRANAS ELECTROHILADAS COMPUESTAS DE POLICAPROLACTONA/COLÁGENO CON DIFERENTES POROSIDADES.

### Pérdida de masa

En la Figura 17 se evidencian los porcentajes de pérdida de masa para las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H al interactuar con solución salina y etanol. Respecto a la solución salina se evidenció un comportamiento estable en el tiempo para C1-0 y C2-0, en el que a las 24 h de incubación C2-0 presentó un 2.47 % de pérdida de masa mayor que C1-0. Sin embargo, esta diferencia entre los materiales y los tiempos no fueron estadísticamente significativos debido al valor p obtenido de 0.135 y 0.432, respectivamente. Además, como se puede observar en los gráficos de medias, Figura 39-A,B del anexo I, el comportamiento de la pérdida de masa en relación con el tiempo y las membranas fueron similares y los niveles de cada factor fueron categorizados como grupos homogéneos sin diferencias significativas (ver Tabla 16 y Tabla 17 en el Anexo I). Esta semejanza se debe a que tanto C1-0 y C2-0 presentan la misma relación de PCL y Col-H, por ende, la disponibilidad de estructuras solubles en medios acuosos depende de la microarquitectura del andamio y del porcentaje de estructuras secundarias. Como se reportó en la deconvolución del espectro de FTIR, C2-0 presentó un menor porcentaje de estructuras que aportan a la cristalinidad de la proteína. De este modo, en el gráfico de interacciones (ver Figura 38 del anexo I) C1-0 fue la que presentó menor pérdida de masa a las 24 y 48 h, mientras que a las 72 h el resultado fue el mismo para C1-0 y C2-0 de 36.46 %.

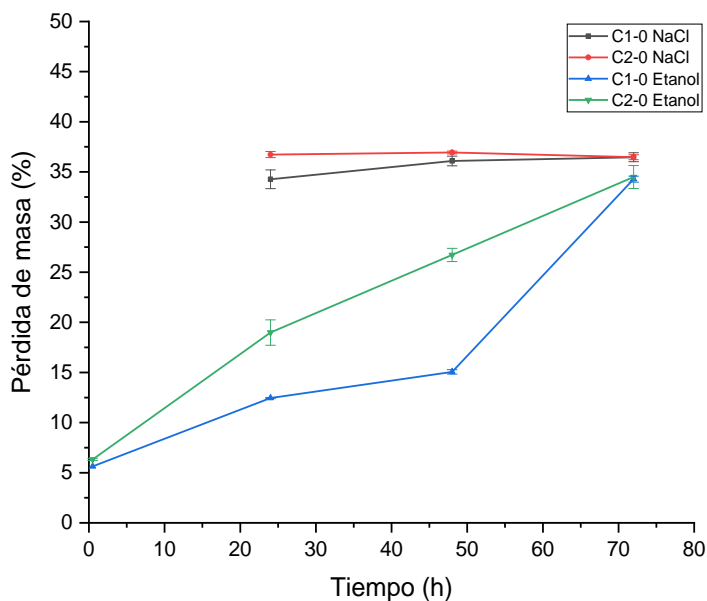
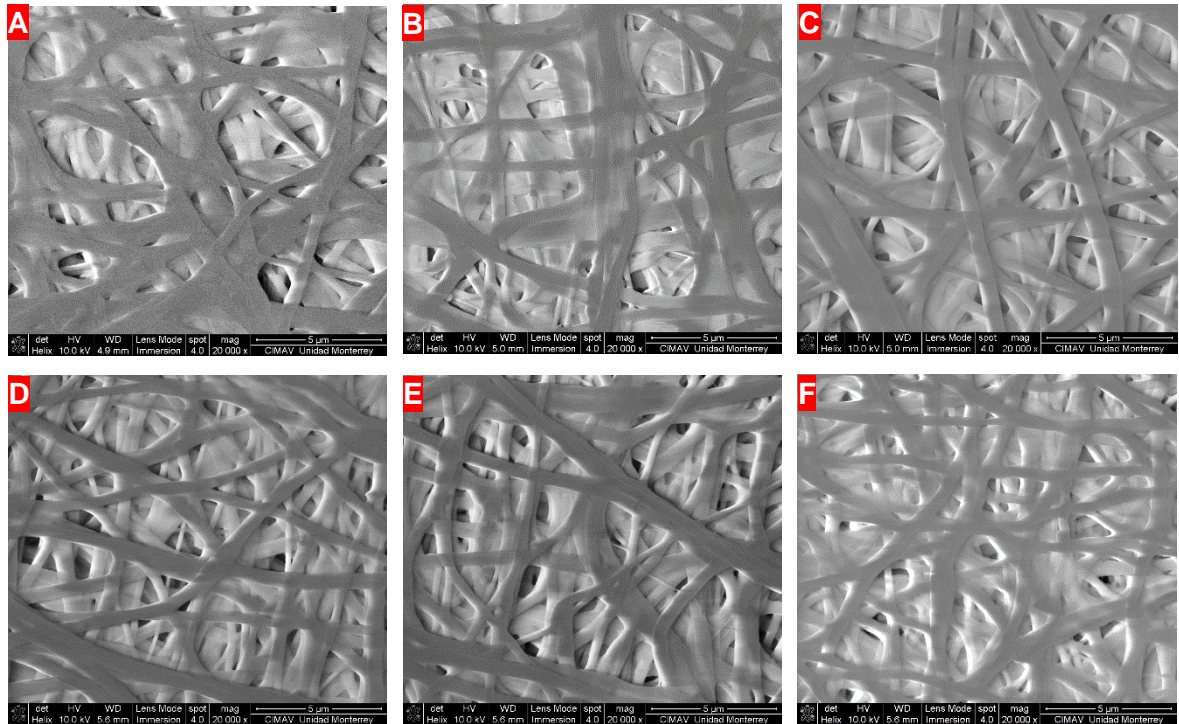


Figura 17. Pérdida de masa en el tiempo para C1-0 y C2-0 con NaCl y etanol.

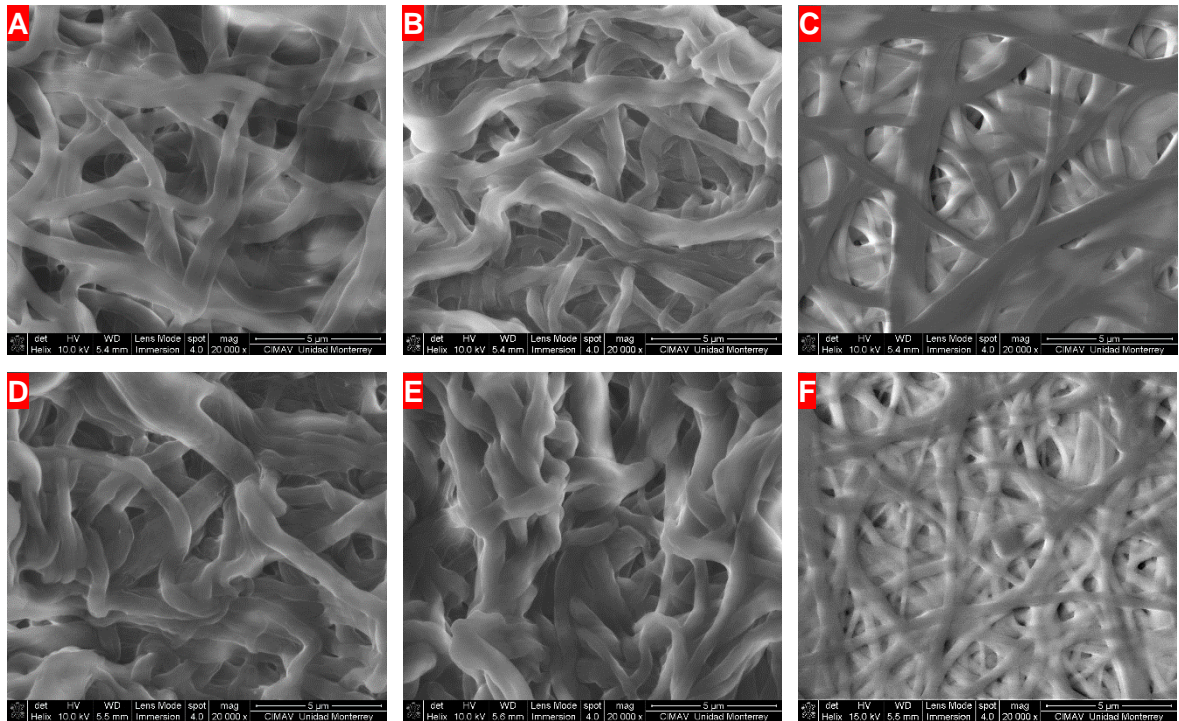
Adicionalmente, en la Figura 18 se muestran las micrografías de C1-0 (A-C) y C2-0 (D-F) después de cada período de incubación, en las cuales no se evidencian cambios en la morfología de las fibras, esto se debe a la estabilidad del porcentaje de pérdida de masa en el tiempo, por lo que después de las 24 h el proceso de degradación del material podría llevarse a cabo de una manera controlada. Como resultado de una tasa de degradación lenta del material, el tamaño de poro podría incrementarse en el tiempo y así mejorar el intercambio de nutrientes, la proliferación e infiltración celular con el fin de promover la angiogénesis en la pared del vaso como lo ha reportado [57][66][105].



**Figura 18.** Micrografías de membranas electrohiladas de PCL/Col-H después de la interacción con solución salina. C1-0 a las 24 (A), 48 (B) y 72 h (C). C2-0 a las 24 (D), 48 (E) y 72 h (F).

Por otro lado, se calculó el porcentaje de pérdida de masa con etanol con el fin de determinar las pérdidas y la estabilidad de las fibras en presencia de dicho solvente orgánico en caso de realizar postratamientos de mayor tiempo, como podría ser durante 24, 48 y 72 h de interacción. El postratamiento por 30 min corresponde al periodo en el que las membranas fueron tratadas para los ensayos biológicos, con el fin de reducir los focos de contaminación, ya que el etanol genera lisis en los microorganismos. Además, el etanol genera cambios morfológicos en las fibras a causa del reorganizamiento de las cadenas moleculares en el que se aumentan las estructuras secundarias del Col-H que aportan a la fase cristalina, estos cambios se evidencian en la Figura 19, en el que las fibras se ensanchan y se pueden observar con una apariencia rugosa [74][75][76]. Sin embargo, después de las 72 h la morfología de las fibras es similar a las micrografías de la Figura 18 en el mismo periodo de incubación. Así mismo, este resultado se asemeja al porcentaje de pérdida de masa en la Figura 17, puesto que a medida que el periodo de incubación

aumenta la pérdida de masa incrementa, ocasionando un incremento del porcentaje de estructuras secundarias de la proteína, por lo tanto, los cambios en la morfología de las fibras en las micrografías de la Figura 19-C, F a las 72 h de interacción con el etanol, podrían indicar que en dicho período la proteína alcanzó la estabilidad en presencia del solvente orgánico.

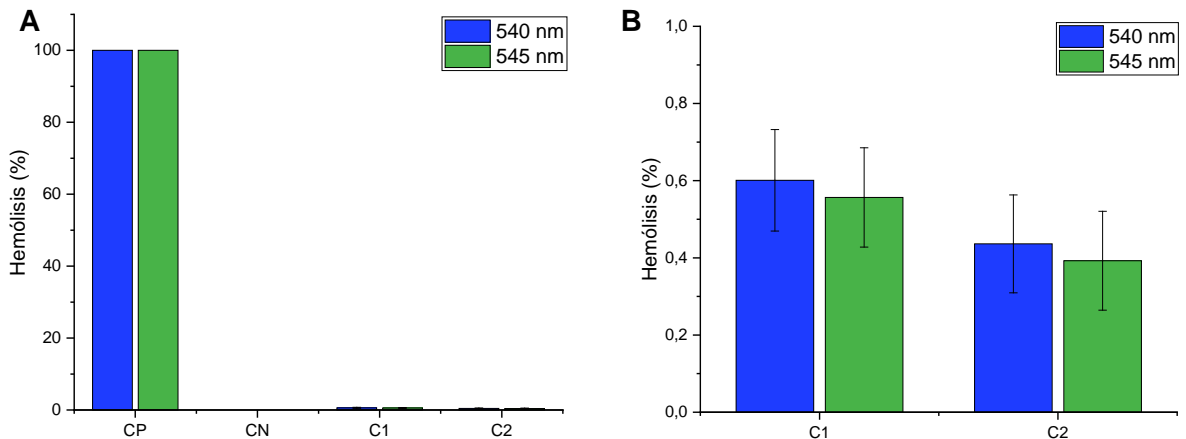


**Figura 19.** Micrografías de membranas electrohiladas de PCL/Col-H después de la interacción con etanol. C1-0 a las 24 (A), 48 (B) y 72 h (C). C2-0 a las 24 (D), 48 (E) y 72 h (F).

Basado en los resultados anteriores, se llevó a cabo el análisis Anova multifactorial para validar la influencia del material y del tiempo en la pérdida de masa de las membranas electrohiladas al interactuar con etanol. En este caso el valor p del tiempo y el material fue de 0.00 y 0.003, respectivamente, y al comprobar la hipótesis de normalidad y homocedasticidad se comprobó que el tiempo es influyente únicamente entre los grupos de 24 - 48 h y 24 - 72 h. Sin embargo, en la Figura 41-B y la Tabla 19 del Anexo I se puede observar que el comportamiento de pérdida de masa entre cada periodo es diferente y entre sí no son homogéneos, por lo que presentaron diferencias significativas. Mientras que, respecto al material, su comportamiento es similar y no se evidenciaron diferencias en la tabla de grupos homogéneos (ver Tabla 18 del Anexo I) y por ende en el gráfico de medias (ver Figura 41-A del Anexo I) la pérdida de masa es semejante entre C1-0 y C2-0. No obstante, en la Figura 40 en el Anexo I, en el gráfico de interacciones, se observa que C1-0 en los cuatro periodos de incubación fue la que menos pérdida de masa presentó, dicho comportamiento se podría atribuir a que la microarquitectura de C1-0 presenta un mayor porcentaje de estructuras secundarias después del tratamiento con etanol y estaría sucediendo lo mismo en las 24, 48 y 72 h.

## Hemólisis

De acuerdo con la norma ISO 10993-4, los materiales que se vayan a implementar en interacciones directas con sangre como los implantes vasculares deben de garantizar un porcentaje de hemólisis inferior al 5 % [106][107]. En la Figura 20-A se evidencia el comportamiento hemolítico de los controles implementados, en el que el control positivo, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, generó un 100 % de hemólisis debido a que los glóbulos rojos captan el agua y adoptan una forma esférica hasta el punto que se genera lisis y la hemoglobina es liberada al medio. Para observar con detalle el comportamiento de las membranas electrohiladas se muestra la Figura 20-B, en la que se puede observar que ambos materiales, C1 y C2, se encuentran por debajo del 1 % de hemólisis, por lo que se podrían implementar como implantes vasculares, este resultado ha sido reportado por [105], en el que fibras de PCL/Col-H/proteína de seda de araña presentaron un porcentaje de hemólisis inferior al 1 %. De acuerdo con [106][107][108], cuando se genera lisis en los eritrocitos, se libera la hemoglobina y el difosfato de adenosina, este último puede incrementar la adhesión de plaquetas a los andamios, promoviendo la formación de coágulos sanguíneos y desencadenar una trombosis. A partir de los resultados obtenidos se puede indicar que las membranas C1 y C2 podrían emplearse como posibles prótesis vasculares.



**Figura 20.** Porcentaje de hemólisis, A) Controles, C1 y C2, B) Aumento de porcentaje de hemólisis para las membranas electrohiladas.

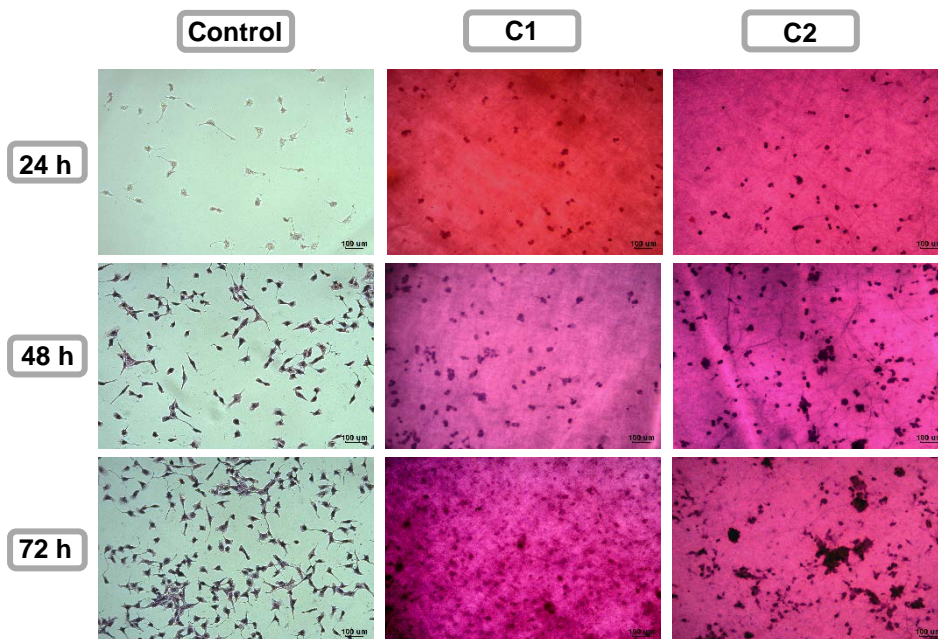
Además, en la Figura 20-B se observa que en las dos longitudes de onda, C1 presentó aproximadamente un 0.2 % más de hemólisis en comparación de C2, esto puede deberse a que la hemocompatibilidad es dependiente de la rugosidad del material, la humectabilidad y el diámetro de fibra [109][110][111]. Aunque en el último factor, [112] sugiere que los andamios con fibras por debajo de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro desencadenan una coagulación y deposición de plaquetas baja en comparación con materiales con diámetros superiores a 2  $\mu\text{m}$ , ya que estos últimos promueven la formación de trombos y la adhesión de plaquetas. Por lo tanto, los implantes vasculares desarrollados con fibras micro y nanométricas podrían disminuir la trombogenicidad, la adhesión plaquetaria y la activación de la cascada de coagulación.

Además, se realizó un Anova multifactorial para determinar si el comportamiento hemolítico es diferente estadísticamente entre C1 y C2 y si implementar una longitud de onda de 540 o 545 nm altera significativamente el resultado. En este caso, el valor p para el material fue de 0.45 y para la longitud de 0.84, por lo que estos factores no son influyentes en el porcentaje de hemólisis. Así mismo, en la Figura 43-A y en la Tabla 20 del Anexo I, se puede observar que el resultado obtenido para C1 y C2 son similares dentro de un intervalo de confianza del 95 %, lo que sucede del mismo modo con la longitud de onda en la Figura 43-B y en la Tabla 21 en dicho anexo. Adicionalmente, en el gráfico de interacciones (ver Figura 42 del anexo I) se puede evidenciar que a las dos longitudes de onda implementadas, C1 siempre presentó un mayor porcentaje de hemólisis, aunque no es significativamente diferente respecto a C2.

### FASE III: CARACTERÍSTICAS BIOCOMPATIBLES DE LAS MEMBRANAS ELECTROHILADAS COMPUESTAS DE POLICAPROLACTONA/COLÁGENO CON DIFERENTES POROSIDADES EN INTERACCIÓN CON UN MODELO *IN VITRO* DE FIBROBLASTOS.

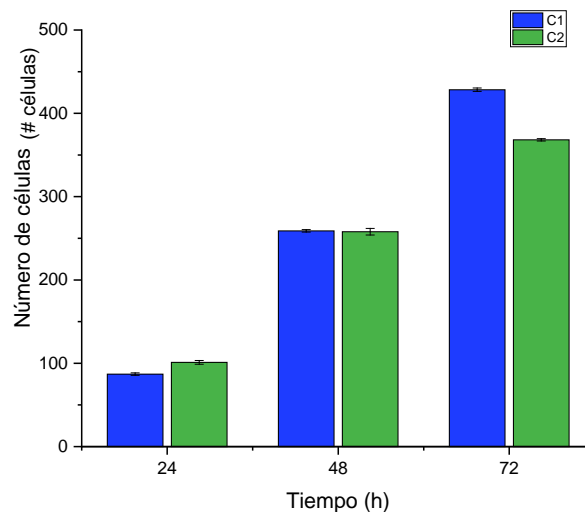
#### Adhesión y proliferación celular

Las características de adhesión y proliferación se determinaron mediante la tinción con hematoxilina – eosina y SEM durante 24, 48 y 72 h de interacción. En la Figura 21, se observan las imágenes de las tinciones en las cuales se puede evidenciar que en ambos materiales electrohilados, C1 y C2, los fibroblastos 3T3 se adhirieron a los andamios, esto se debe a las condiciones fisicoquímicas del material. Dentro de estas se encuentran los diámetros de filamento que están en el rango de las fibras de la matriz extracelular nativa, la microarquitectura porosa que permite el intercambio de nutrientes, la humectabilidad hidrofílica del material y la rugosidad de la superficie [100]. Por otro lado, se ha reportado que los polímeros sintéticos como la PCL incorporan propiedades hidrofóbicas por lo que presentan pocos puntos de anclaje celular afectando la adhesión entre la célula y el material [100]. Es por este motivo que se incorporó el Col-H en la estructura del andamio electrohilado debido a que esta proteína natural presenta la secuencia RGD, un tripéptido formado por arginina, glicina y ácido aspártico, fundamental en la mediación de las interacciones de adhesión celular, ya que esta secuencia es reconocida por las integrinas, un grupo de glucoproteínas que promueven la unión de las células con la matriz extracelular [61][100][102].



**Figura 21.** Tinción con hematoxilina y eosina de fibroblastos 3T3 en controles, C1 y C2 a periodos de incubación de 24, 48 y 72 h.

Adicionalmente, en la Figura 21 se muestra un comportamiento similar en cuanto a la distribución homogénea de las células en el andamio C1 respecto al control durante los periodos de incubación, mientras que en C2 a partir de las 48 h comienza a formarse aglomerados o fusiones celulares de modo que a las 72 h este fenómeno es más evidente, dicho comportamiento de C2 no es deseado en los implantes vasculares puesto que conlleva a riesgos de desarrollar una trombosis y con el tiempo una embolia. También, a medida que el tiempo transcurre, los aglomerados de células pueden disminuir la tasa de proliferación como se muestra en la Figura 22, en la que el comportamiento entre C1 y C2 es semejante pero a las 72 h se presenta un decrecimiento en la proliferación celular.



**Figura 22.** Proliferación celular de fibroblastos 3T3 con C1 y C2 a 24, 48 y 72 h de interacción.

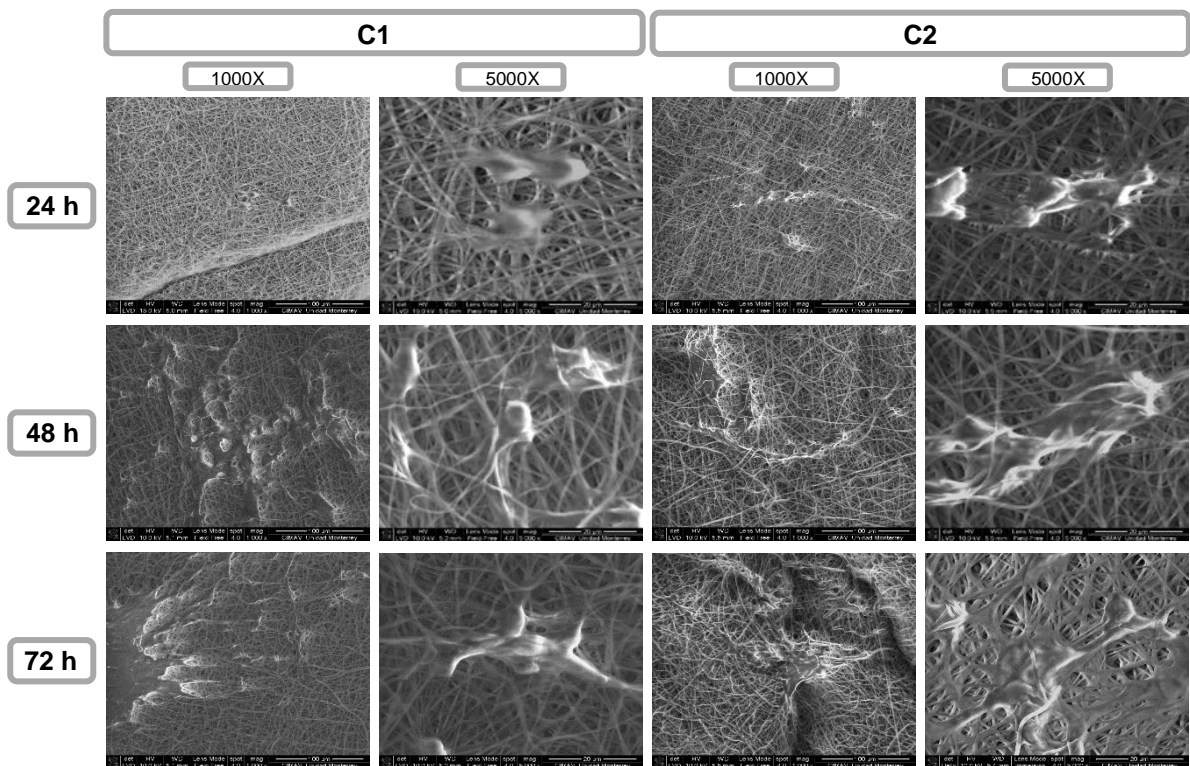
La adhesión celular y la cinética de crecimiento es afectada por el diámetro de fibra como se observó en C1 y C2. De acuerdo con [113], en andamios electrohilados con fibras uniformes, sin defectos y con diámetros inferiores a 1  $\mu\text{m}$ , la adhesión y proliferación celular disminuye en función del aumento del diámetro, este resultado es comparado con el obtenido en este trabajo, puesto que en las muestras con menor diámetro la proliferación fue mayor en el tiempo, además, este fenómeno se podría atribuir a que C1 presentaba áreas de poro promedio mayores a C2, de tal manera que su desempeño en el tiempo fue menor en relación con la adhesión y proliferación. Lo mismo sucedió en [114][107], en el cual se describe que en andamios de PCL/gelatina con poros grandes se mejora la adhesión y migración celular, ya que este tipo de microarquitecturas presentan poros interconectados, los cuales podrían promover el transporte de nutrientes y la eliminación de desechos metabólicos.

Es necesario resaltar que C1 presenta una microarquitectura con fibras en la micro y nanoescala y C2 con fibras micrométricas. Esto es un factor determinante en el comportamiento relacionado con la adhesión y proliferación celular, dado que se ha reportado que andamios multiescala podrían incrementar la motilidad, supervivencia y proliferación celular a causa de una mayor área superficial comparado con estructuras con nanofibras, y a su vez proporcionan más puntos de anclaje celular [107]. Así mismo, se ha reportado ampliamente el desarrollo de andamios electrohilados nanoestructuras, sin



embargo, materiales conformados únicamente por nanofibras conlleva a una reducción del tamaño de poro y por ende la adhesión se lleva a cabo en forma de monocapa y la penetración celular es afectada por el tamaño de poro pequeño, el cual no permite la infiltración celular. Es por este motivo que la combinación de micro y nanofibras cooperan a la adhesión, proliferación, migración e infiltración celular en la pared del vaso y de este modo favorecer la biointegración célula-material y célula-célula [94][99][107].

Además, se realizó SEM con el fin de validar la interacción entre la matriz y las células como se muestra en la Figura 23, en la que se evidencia la morfología de los fibroblastos 3T3 y como la densidad celular incrementa a medida que el periodo de incubación transcurre, dando lugar a la formación de sincitios celulares, los cuales permiten la proliferación y migración celular con el fin de favorecer la angiogénesis [107]. Por lo que a las 72 h la superficie del andamio presentaba una monocapa de células que se encontraban adheridas, lo que confirma la capacidad del material tanto en C1 como en C2 para que las células proliferen y se expresen morfológicamente [115]. Sin embargo, la morfología de las células en la Figura 23 se debe a la deshidratación con etanol de las células, ya que las membranas celulares colapsadas se acumularon unas sobre otras [116].



**Figura 23.** Micrografías de la interacción celular de fibroblastos 3T3 con andamios C1 y C2 a 24, 48 y 72 h.

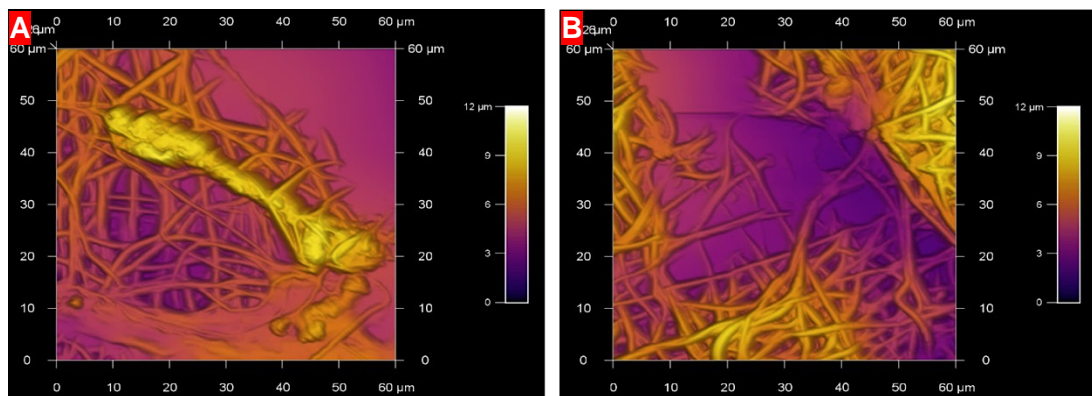
Por otro lado, se implementó un Anova multifactorial en el que se determinó un valor p para el tiempo de 0.00 y para el material de 0.09, por lo que este último no es un factor influyente en la proliferación celular (ver Tabla 22 del Anexo I) y no presentaron diferencias

significativas como se observó en la Figura 45-A en el Anexo I, mientras que el tiempo si lo es como se puede evidenciar en la Figura 45-B y en la

Tabla 23 en el Anexo I, en la que cada uno de los periodos de incubación no son homogéneos y por ende presentan diferencias significativas en la proliferación celular. Además, en la Figura 44 en el Anexo I se muestra que a las 48 h los dos materiales presentan un comportamiento similar y a las 72 h se presentó un decrecimiento de la cantidad de células en C2, posiblemente debido a las aglomeraciones celulares.

### Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las estructuras fibrosas de PCL/Col-H emulan la microarquitectura de la matriz extracelular nativa a partir de las condiciones físicas del material como los poros y la rugosidad en un amplio espectro de la escala métrica [115], por lo cual andamios que contengan micro y nanofibras promueven la biointegración de las células con el medio circundante. De este modo, en la Figura 24 se puede observar como los fibroblastos se expandieron en la superficie del andamio y como estos interactúan y se integran con las fibras, este comportamiento se ha evidenciado en materiales electrohilados de colágeno y quitosano [117], en el que se reporta que la alta relación superficie-volumen de fibras promueve la adhesión y proliferación celular, lo que indica que el andamio electrohilado permite la función biológica de las células en la pared del vaso. Sin embargo, factores como el tipo de célula y el tamaño de poro influyen en la capacidad de las células de expandirse en la superficie del material [118].



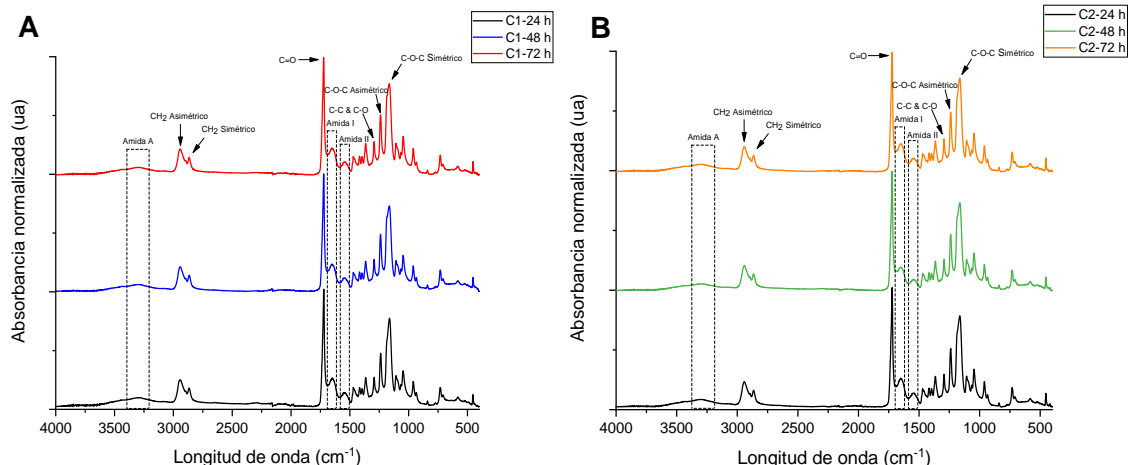
**Figura 24.** Imágenes topográficas de C1 y C2 en interacción con fibroblastos 3T3 a las 72 h de incubación.

Las imágenes en la Figura 24 corresponden a las 72 h de incubación en C1 (Figura 24-A) y C2 (Figura 24-B), y se puede observar la morfología de los fibroblastos, aunque como se describió anteriormente, C1 favorece una distribución homogénea de las células mientras que C2 genera aglomerados celulares, por lo que la obtención de una zona en la que se pudiera encontrar células con su estructura definida fue más compleja.

### Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR-ATR)

En la Figura 25 se muestran los espectros de absorbancia normalizada durante los tres periodos de incubación celular, 24, 48 y 72 h para C1 (Figura 25-A) y C2 (Figura 25-B). A

simple vista en los espectros no se evidencia un cambio en los picos asociados a la PCL y al Col-H, es por este motivo que se procedió a deconvolucionar la zona de la amida I, ya que esta es la más sensible a cambios en las estructuras secundarias que aportan a la fase amorfa o cristalina de la proteína natural.



**Figura 25.** FTIR para C1 y C2 después de la interacción con fibroblastos 3T3 a las 24, 48 y 72 h.

Las estructuras que aportan a la fase cristalina son las hojas y giros  $\beta$ , mientras que las cadenas laterales, espirales al azar, hélices  $\alpha$  y giros corresponden a la fase amorfa de la proteína. En la Tabla 10, se reportan los porcentajes de cada una de las estructuras secundarias mencionadas anteriormente en cada uno de los periodos de incubación celular con las membranas C1 y C2.

**Tabla 10.** Porcentaje de estructuras secundarias en la amida I después de la interacción celular a 24, 48 y 72 h de incubación para C1 y C2.

Tipo de estructura secundaria	C1-24 h	C1-48 h	C1-72 h	C2-24 h	C2-48 h	C2-72 h
	Aporte (%)					
<b>Cadenas laterales</b>	-	-	2.33	3.46	3	-
<b>Hojas <math>\beta</math> (inter-intramoleculares, fuertes y débiles)</b>	48.09	61.74	23.87	27.25	34.04	31
<b>Espirales al azar</b>	3.86	3.31	37.75	36.21	-	34.9
<b>Giros <math>\beta</math></b>	1.03	0.89	1.34	0.97	47.38	0.33
<b>Hélice <math>\alpha</math></b>	46.37	28.68	15.88	31.44	11.36	33.76
<b>Giros</b>	0.64	5.37	18.83	0.65	4.21	0.02

A partir de los resultados de la Tabla 10, se observó que a las 24, 48 y 72 h C1 presentó un 49.13, 62.63 y 25.21 % de estructuras que aportan a la fase cristalina, respectivamente. Mientras que los porcentajes para C2 fueron de 28.23, 81.42 y 31.33 % para 24, 48 y 72 h, respectivamente. Este comportamiento de que los porcentajes incrementan y vuelven a disminuir se podría atribuir a que antes de interactuar las membranas electrohiladas con las células tuvieron un proceso de preacondicionamiento con DMEM por 24 h, por lo que los espectros de absorbancia normalizados y los porcentajes de las estructuras secundarias no pueden ser comparados con los de la Figura 13. De otro lado, la composición del DMEM es abundante en proteínas y es un medio acuoso, por lo cual durante el periodo de preacondicionamiento los andamios electrohilados pudieron haber presentado pérdidas del material o anclaje de proteínas en los sitios activos en la estructura fibrilar del material, por lo tanto, podrían inducir cambios en las estructuras secundarias del Col-H. Además, a las 24 h de interacción con el modelo in vitro las células se encuentran en la fase de adhesión al material, el medio circundante es rico en sales, proteínas, y los puntos de anclaje celular del Col-H debido a la secuencia RGD están activos, por lo que aún se pueden encontrar espacios no celularizados. Después, a las 48 h las células se encuentran en un estado activo, lo que les permite realizar procesos de división celular, una mayor actividad biológica manifestada en la secreción de proteínas a la matriz extracelular, en este caso, al andamio electrohilado, por lo que la captación de la señal al momento de realizar el barrido de FTIR-ATR es mayor debido a las demás proteínas que se anclaron a las fibras de PCL/Col-H. Mientras que, a las 72 h, el porcentaje de estructuras secundarias que favorecen la cristalinidad disminuyó, esto se podría atribuir a que las membranas electrohiladas como promueven la biointegración, la señal de FTIR pudo haber captado una zona con presencia de células y no de la superficie del andamio compuesto de PCL/Col-H.

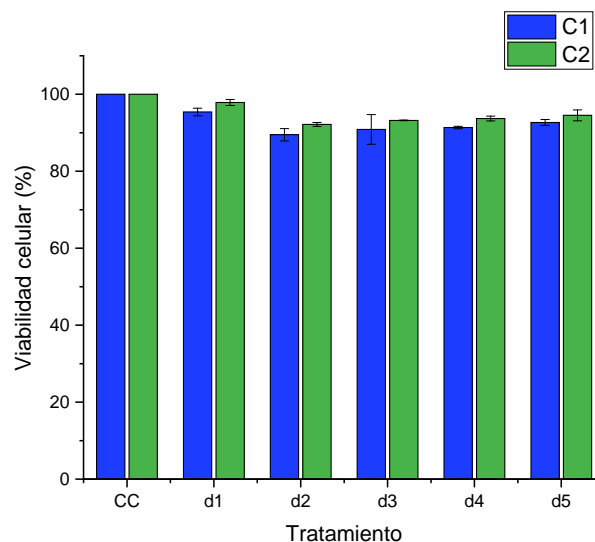
### Viabilidad celular

Para determinar la citotoxicidad del material electrohilado compuesto de PCL/Col-H se realizó el ensayo colorimétrico MTT indirecta y directamente, el primero a partir de los excipientes generados por los andamios y el segundo con la siembra directa de los fibroblastos 3T3 en el material durante 24, 48 y 72 h. En cuanto al ensayo indirecto, en la Tabla 11 se denota la nomenclatura implementada para cada dilución con su respectiva concentración volumétrica utilizando DMEM sin suplementar como solvente.

**Tabla 11.** Concentración de las diluciones de los tratamientos en el ensayo de MTT indirecto.

Nomenclatura	Concentración v/v (%)
d1	0
d2	25
d3	50
d4	75
d5	100

La viabilidad celular respecto a las diluciones se determinó a 24 h de exposición al modelo *in vitro*. La Figura 26 muestra que ninguna de las diluciones de los excipientes generadas es citotóxica ya que la viabilidad está por encima del 89 %, con un resultado ligeramente mayor para la membrana C2 aproximadamente del 2 % como se puede evidenciar en la gráfica de interacciones (ver Figura 46 del Anexo I), en la cual se presenta una relación directamente proporcional entre la concentración de la dilución y la viabilidad celular, a excepción de la dilución d1 debido a que esta estaba conformada únicamente por DMEM sin suplementar, esto se puede deber a que el Col-H en su estructura presenta la secuencia RGD y al ser soluble en medios acuosos estas pueden quedar libres en el medio circundante. Además, con el análisis Anova multifactorial se determinó la influencia de las diluciones y del material en la viabilidad celular obteniendo un valor p de 0.00 y 0.0502, respectivamente. De este modo, el material no presentó diferencias significativas entre C1 y C2 y como se muestra en la Tabla 24 del Anexo I, los dos materiales son considerados como un grupo homogéneo y que dentro de un intervalo del 95 % de confianza su comportamiento es similar (ver Figura 47-A en el Anexo I). Por otro lado, la influencia de las diluciones fue corroborada a través de la hipótesis de normalidad y homocedasticidad, y con la Tabla 25 del Anexo I se determinó que de la concentración d2 a la d5 eran un grupo homogéneo y no habían diferencias significativas pero entre el grupo homogéneo de d1 y el control células (CC) con respecto a las demás diluciones se presentaron diferencias significativas, aunque con d5 no se presentó diferencias. El comportamiento de este factor respecto a la viabilidad se puede observar en la Figura 47-B del Anexo I.



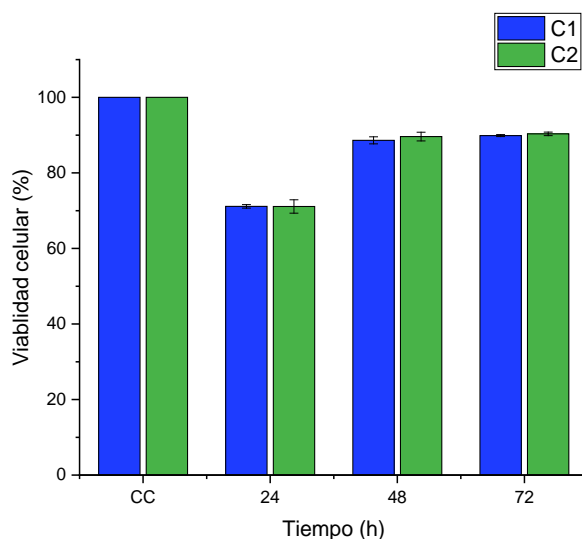
**Figura 26.** Viabilidad celular en función de los tratamientos

Por lo tanto, los excipientes producidos por las membranas electrohiladas compuestas de PCL/Col-H (C1 y C2), no generan alteraciones ni efectos citotóxicos en los fibroblastos 3T3, por el contrario, el incremento de la concentración volumétrica conlleva a una mayor citocompatibilidad. Estos resultados han sido similares con [78], en el que extractos generados por andamios de PCL, gelatina y colágeno no generaron citotoxicidad y en membranas electrohiladas que contenían los polipéptidos evidenciaron un incremento en la viabilidad celular. Por otro lado, extractos de andamios de gelatina y polítrimetileno

mostraron viabilidades superiores al 70 % y de acuerdo con la norma ISO-10993-5/12, la viabilidad metabólica de los tratamientos por encima del 70 % del control células se considera no tóxica [119].

Así mismo, en la Figura 27 se reportó la viabilidad celular en función del tiempo de incubación de los fibroblastos directamente en C1 y C2, observando que a las 24 h se presentó una viabilidad superior al 70 % mientras que en los demás periodos el resultado fue aproximadamente del 90 %, lo que indica que en 48 y 72 h, los andamios promovieron que el modelo *in vitro* llegara a una fase de crecimiento transitoria-estacionaria, ya que la diferencia entre ambos periodos fue alrededor del 1 %, a lo que se le podría atribuir una alta confluencia celular. Además, el incremento de la viabilidad con el tiempo es fundamental en la citocompatibilidad, ya que esto indica que los andamios electrohilados compuestos promueven la adhesión, proliferación y división celular, por consiguiente, los andamios fibrosos de PCL/Col-H no generaron citotoxicidad.

La viabilidad en los andamios está respaldada porque la PCL y el Col-H están aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) como polímeros seguros sin evidenciar peligros en la salud de los seres humanos. Basado en lo anterior, [120] desarrollaron andamios de PCL/Gelatina y encontraron que las células crecieron y proliferaron en ambos materiales. Los andamios de PCL/Gelatina emulan la microarquitectura de la matriz extracelular y proporcionan una alta área superficial, por lo que promueve más puntos de anclaje celular y la humectabilidad de la superficie está estrechamente relacionada con adhesión y proliferación celular. Además, la interacción bioquímica entre las estructuras del Col y las células son importantes para promover la regeneración de tejido en la pared del vaso [120]. Así mismo, [62] halló viabilidades en fibroblastos L929 superiores al 93 % en andamios de PCL y PCL/Gelatina después de 24 h de interacción directa, por lo que las estructuras fibrosas de PCL y gelatina no inducen un efecto citotóxico al medio circundante. Del mismo modo, andamios de poliuretano con modificaciones superficiales para implantes vasculares presentaron un incremento en la viabilidad con el transcurso del tiempo en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), aunque las membranas modificadas con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y heparina favorecieron en mayor medida la viabilidad celular, ya que tener propiedades antitrombogénicas y capacidad de endotelización es crucial para los injertos vasculares de pequeño calibre [121].



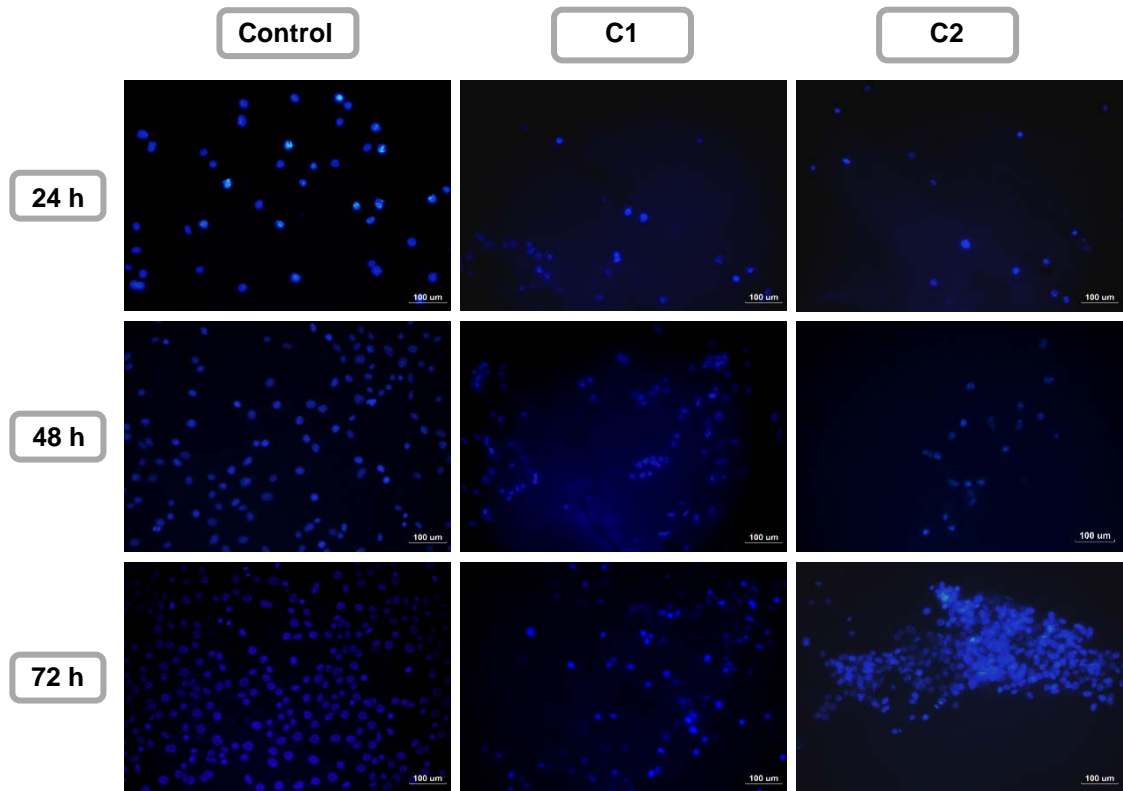
**Figura 27.** Viabilidad celular respecto al tiempo en interacción directa

Por su parte, en el análisis Anova multifactorial se encontró de acuerdo con el valor p que el material (0.76) no es un factor significativamente influyente en la viabilidad ya que el comportamiento es similar entre sí como se muestra en la Figura 48 del Anexo I, en la que C2 evidenció una mayor viabilidad que C1, aunque esta no superaba el 1% aproximadamente y ambos materiales eran considerados homogéneos estadísticamente (ver Tabla 26 y la Figura 49-A en el Anexo I) sin presentar diferencias significativas. Esto también fue respaldado por la gráfica de medias, en la cual si se realiza una proyección horizontal de las barras estas se cruzarían, por lo que la citocompatibilidad no difiere respecto al material. Seguidamente, el valor p del tiempo fue de 0.00 y mediante la prueba de hipótesis de normalidad y homocedasticidad se determinó la influencia de este factor en la viabilidad celular y como se puede observar en la Figura 27 y en la Tabla 27 en el Anexo I, los periodos de 24-48 h y 24-72 h presentan diferencias significativas, mientras que 48-72 h son un grupo homogéneo, esto también se puede validar en la Figura 49-B del Anexo I.

### **Circunferencialidad celular**

Mediante ensayos de tinción fluorescente con la molécula de detección de ADN, Hoechst, se realizó la tinción de los núcleos de las células en interacción con C1 y C2. En la Figura 28 se observan las imágenes de los núcleos celulares a 24, 48 y 72 h del control células (CC) y la interacción con C1 y C2, en la que se evidencia visualmente una diferencia en la densidad celular entre el control células y las membranas electrohiladas, esto se puede deber a que los andamios al ser considerados una estructura 3D facilitaron la penetración de las células en la pared y el material al ser opaco obstruye la señal, mientras que los controles proliferan en monocapa. Además, como se evidenció en las tinciones con hematoxilina-eosina (ver Figura 21) y en las micrografías (ver Figura 23), la membrana C2 a las 72 h de incubación promueve agregados celulares, lo cual es un efecto no deseado en la pared de los implantes vasculares para la angiogénesis, mientras que C1 promueve una adhesión homogénea en la superficie del material. Sin embargo, C1 y C2 promueve la

biointegración y la actividad biológica de las células, puesto que como se observa en la Figura 28, se presenta una relación directamente proporcional entre el tiempo de interacción y la densidad celular.



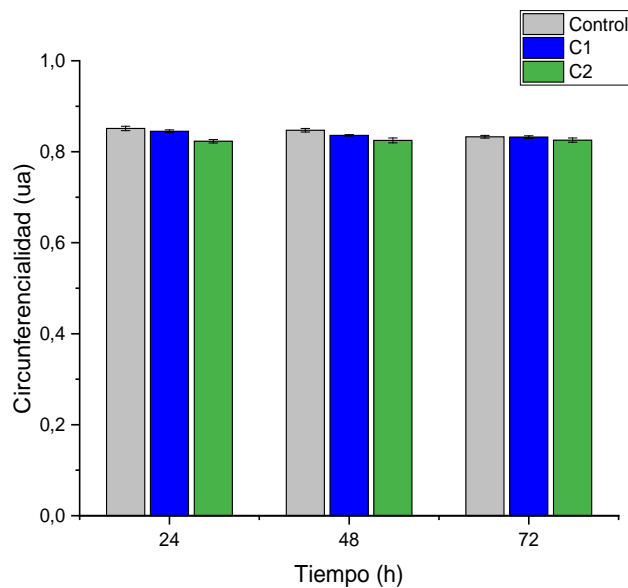
**Figura 28.** Tinción fluorescente de núcleos celulares mediada por Hoechst de las células control y fibroblastos en interacción con C1 y C2 a 24, 48 y 72 h.

Con el fin de determinar cambios estructurales en la morfología del núcleo, se realizó mediante el software ImageJ el procesamiento de las imágenes de la Figura 28 para obtener el índice de circunferencialidad de los núcleos, en el que 1 es una circunferencia perfecta y 0 correspondería a una línea. Como se reporta en la Figura 29, los índices de circunferencialidad para los controles fue de 0.851, 0.847 y 0.829 para 24, 48 y 72 h respectivamente, por lo que estos no presentaron alteraciones entre los periodos de incubación, para C1 a las 24, 48 y 72 h el índice fue de 0.845, 0.836 y 0.837 y para C2 de 0.823, 0.825 y 0.826 para 24, 48 y 72 h, respectivamente, como los cambios evidenciados no son tan notorios, se realizó un análisis Anova multifactorial, en el cual se determinó mediante el valor p que el tiempo (0.64) no es un factor influyente en la circunferencialidad del núcleo, ya que en la Tabla 29 del Anexo I, los tres periodos de incubación son considerados un grupo homogéneo, por lo que no se presentan diferencias significativas entre ellos y en la Figura 51-B en el Anexo I corrobora la similitud del comportamiento de la variable de respuesta respecto al tiempo. No obstante, el valor p para el material fue de 0.03 y su influencia fue verificada a través de la prueba de hipótesis de normalidad y homocedasticidad. Además, en la tabla de grupos homogéneos (ver Tabla 28 en el Anexo I) se determinó que el control células y C1 no presentan diferencias significativas, mientras



que C2 con respecto al control células y C1 evidenció cambios significativos en la circunferencialidad, por lo tanto, como se muestra en la Figura 51-A del Anexo I, C2 difiere del comportamiento de C1 en relación al control. De este modo, C1 es la membrana electrohilada que permite la menor alteración de la morfología del núcleo y así favorecer la actividad biológica de los fibroblastos 3T3.

La circunferencialidad nuclear ha sido reportada por [122], estudio que se enfocó en el desarrollo de andamios electrohilados de poliuretano termoplástico con memoria de forma, con el fin de inducir cambios en la microarquitectura en relación a la alineación de fibras, en la cual encontraron que los andamios con fibras aleatorias las células podrían preservar una mayor circunferencialidad aproximadamente en un rango de 0.56-0.71. Por otro lado, en fibras de poliéster determinaron que las células cuando se adhieren a estructuras fibrosas pueden presentar una disminución en la circunferencialidad nuclear debido a que la manera de adherirse involucra un cambio en la morfología del núcleo, sin embargo, este cambio depende del diámetro de fibra [123].

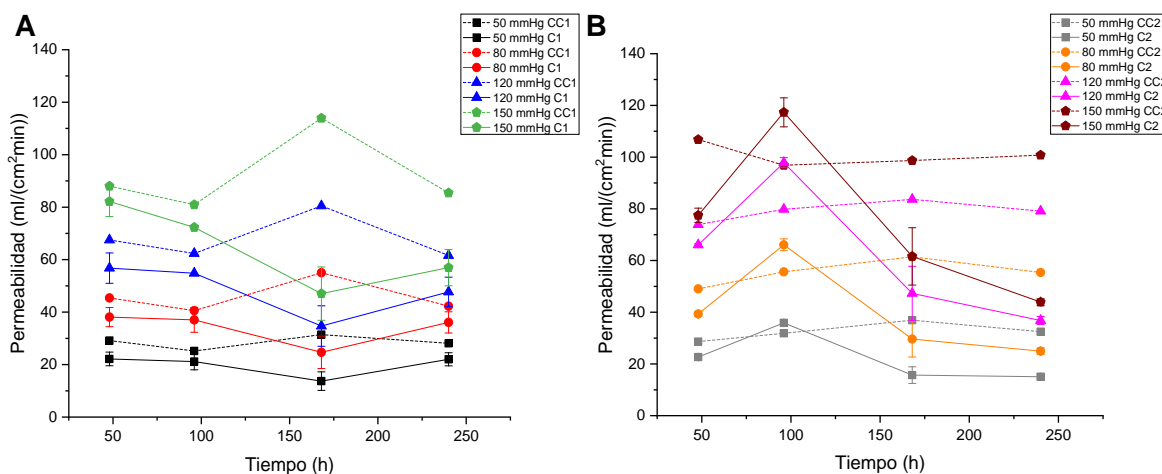


**Figura 29.** Índice de circunferencialidad del núcleo para los controles celulares, C1 y C2 a las 24, 48 y 72 h de interacción.

## FASE IV: EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD ESTÁTICA DE MEMBRANAS ELECTROHILADAS COMPUESTAS DE POLICAPROLACTONA/COLÁGENO CON Y SIN DEPOSICIÓN CELULAR.

### Permeabilidad estática

La permeabilidad estática al agua es un parámetro crítico utilizado en la evaluación de la función del implante vascular, ya que permite reconocer el comportamiento de este en presencia de presiones fisiológicas (80 – 120 mmHg) y patológicas (50 – 150 mmHg). De este modo, en la Figura 30 se reporta la permeabilidad de las membranas electrohiladas de PCL/Col-H con y sin deposición celular a 48, 96, 168 y 240 h de interacción. Para esto, los controles, es decir, las membranas sin células son denominadas CC1 para C1 y CC2 para C2, mientras que las que se encuentran celularizadas son nombradas como C1 y C2.



**Figura 30.** Gráficas de permeabilidad estática al agua a 50, 80, 120 y 150 mmHg durante 48, 96, 168 y 240 h de interacción celular, A) C1 y B) C2.

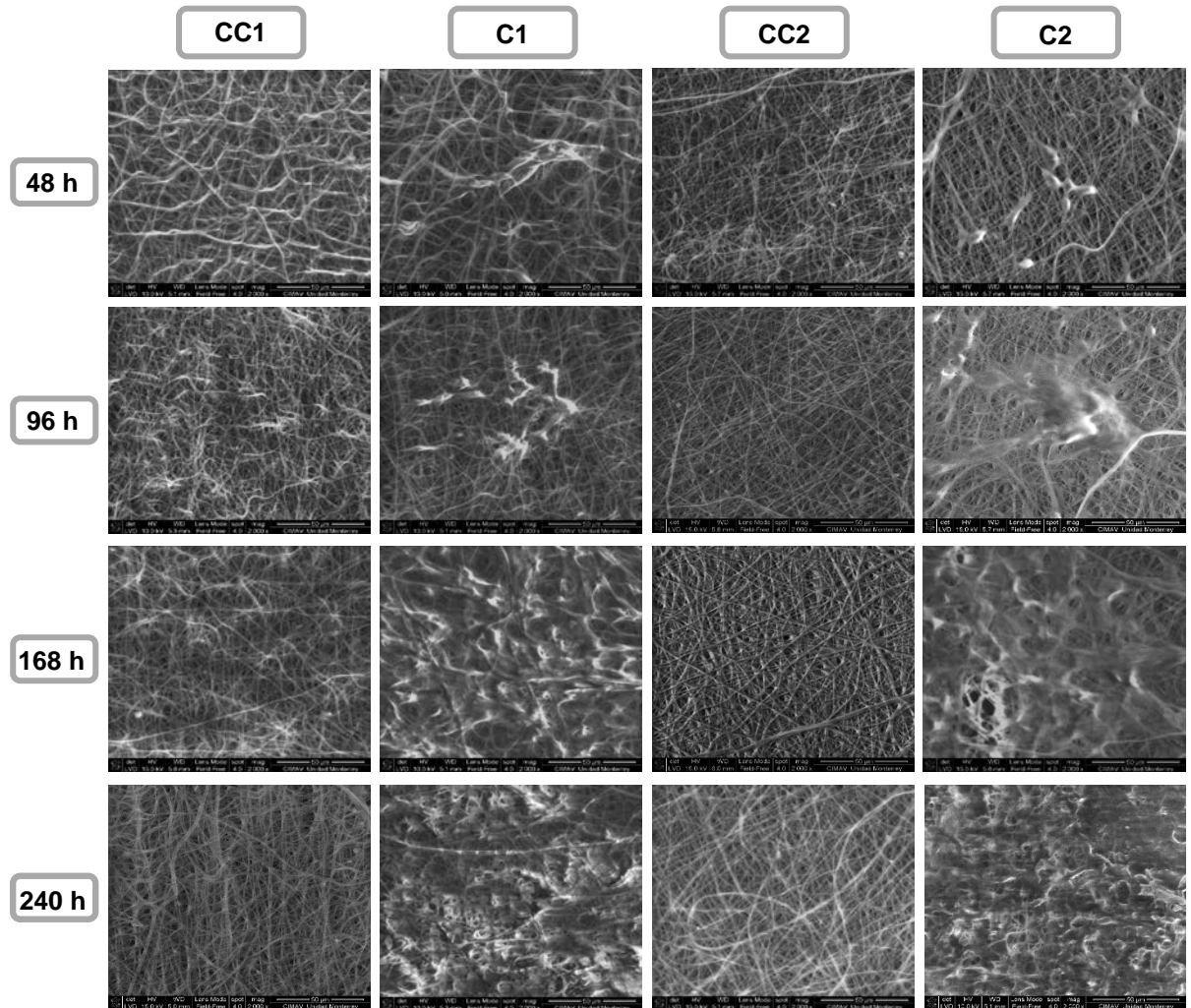
Como se puede observar en la Figura 30-A correspondiente a la membrana C1, el aumento de la presión conlleva a un incremento de la permeabilidad, puesto que es mayor la fuerza que se ejerce en el material para que el fluido permee la estructura. Así mismo, se observa que entre las 48 y 168 h de interacción con el modelo *in vitro* la permeabilidad disminuyó debido al aumento de la densidad celular como se observa en la Figura 31, por lo tanto, se confirma por esta técnica que, el andamio electrohilado con la microarquitectura de C1 permite la biointegración entre el material y las células debido a que estas pueden continuar con los procesos biológicos de división celular. Sin embargo, a las 240 h se evidenció un aumento en la permeabilidad en las cuatro presiones evaluadas, lo cual se puede deber a que esta técnica es un método indirecto y susceptible a cambios o alteraciones en el espesor de la membrana, este mismo fenómeno pudo haber ocurrido en las membranas control, CC1, a las 168 h.

Por otro lado, la permeabilidad de la membrana C2 se muestra en la Figura 30-B, en la que a medida que transcurre el tiempo, la permeabilidad decrece a causa de la adhesión y proliferación celular como se evidencia en las micrografías en la Figura 31, permitiendo así que las condiciones físicas del andamio C2 favorezcan la biointegración. No obstante, en el periodo de 96 h se presentó un incremento en la permeabilidad y como se mencionó anteriormente, dicha prueba es sensible a cambios mínimos en el espesor del material electrohilado, ya que como se ha discutido, el proceso de electrohilado puede afectarse por condiciones ambientales y generar modificaciones en las estructuras desarrolladas, en este caso, un andamio menos compacto.

Además, para determinar la influencia del material con y sin deposición celular, el tiempo y la presión en la permeabilidad se realizó un análisis Anova multifactorial, donde se encontró un valor  $p$  para los tres factores de 0.00, por lo que son factores influyentes significativamente en la permeabilidad y con la hipótesis de normalidad y homocedasticidad se corroboró esta información. Sin embargo, esta última hipótesis en relación con la presión indicó que la presión no es influyente, esto se pudo deber a que la variabilidad al momento de realizar la medición de la permeabilidad era alta, puesto que en algunas membranas daban valores cercanos o similares a los obtenidos en una presión diferente. No obstante, en la Tabla 32 del Anexo I, se muestra que ninguna de las presiones conforma un grupo homogéneo y por lo cual se presentan diferencias significativas entre cada una; de igual forma, el gráfico de medias (ver Figura 53-C en el Anexo I) confirma lo anterior donde se muestra una relación directamente proporcional entre la presión y la permeabilidad.

Por otro lado, el tiempo es uno de los factores influyentes y como lo muestra la tabla de grupos homogéneos (ver Tabla 31 del Anexo I) existen dos grupos, uno conformado por los periodos de 48, 96 y 168 h y otro por 48, 168 y 240 h, a lo que se le podría atribuir la variabilidad de la medición de permeabilidad como fue mencionada anteriormente, presentando diferencias significativas entre 96 y 240 h. Del mismo modo, la Figura 53-B en el Anexo I muestra dicho comportamiento y como a medida que transcurre el tiempo de incubación, la permeabilidad disminuye a excepción de 96 h debido a la alteración del espesor en CC1 y C2. En relación al influjo del material se encontró que las membranas celularizadas corresponden a un grupo homogéneo (C1 y C2) y los controles conforman otro (CC1 y CC2) sin evidenciar diferencias significativas entre cada grupo (ver Tabla 30 del Anexo I), pero entre las membranas con sus respectivos controles si hay una diferencia significativa, puesto que las células tapizan la superficie del andamio y se oponen al flujo a medida que el tiempo transcurre, este comportamiento coincide con la gráfica de medias (ver Figura 53-A en el Anexo I). Aunque se presenta similitud entre C1 y C2, es importante recordar que desde la caracterización fisicoquímica ambos materiales presentaron un comportamiento semejante estadísticamente, aunque en las imágenes de adhesión e inmunofluorescencia (Figura 21-Figura 28) la distribución de las células en los materiales era diferente, por lo que los valores de permeabilidad mayores en C2 se puede deber a esa misma razón, los aglomerados celulares. Adicionalmente, en la Figura 52 en el Anexo I se muestra la interacción entre la permeabilidad, el tiempo y el material ya que estos son los que influyen en la variable de respuesta. Así mismo, se puede observar la alteración de la permeabilidad a las 240 y 96 h para C1 y C2, respectivamente. De otro lado, C1 hasta las 168 h fue la que menores resultados evidenció en comparación con las demás membranas

y en todos los casos, los andamios celularizados evidenciaron menor permeabilidad en comparación con los controles.



**Figura 31.** Micrografías de los controles y las membranas celularizadas a 48, 96, 168 y 240 h para C1 y C2.

De igual modo se han reportado ensayos de permeabilidad al agua a 120 mmHg en membranas electrohiladas de poliuretano-policarbonato, en la cual mencionan que en un rango entre 10-40 ml/(cm<sup>2</sup> min) es beneficiosa para incrementar la permeabilidad vascular. Además, encontraron un valor de  $10.45 \pm 0.67$  ml/(cm<sup>2</sup> min) para la membranas con el cual afirman que se podría satisfacer las necesidades de la función biológica vascular [124]. No obstante, [125] afirma que en estructuras electrohiladas hidrofóbicas, una permeabilidad inferior a 600 ml/(cm<sup>2</sup> min) podría generar una menor tasa de curación, ya que limita el transporte de nutrientes y moléculas de señalización en la pared del implante vascular. Mientras que, para andamios con características hidrofílicas, como lo sería la PCL/Col-H, genera una alta retención de agua, lo que asegura un transporte molecular continuo a través de difusión, por lo tanto, en estos casos los valores de permeabilidad podrían ser inferiores

al informado [125]. Por otro lado, en andamios de PCL y colágeno con diferentes modificaciones como obtención de alta porosidad, adición de una capa de colágeno o tratamientos con plasma de oxígeno, obtuvieron valores de permeabilidad para PCL con un grosor de 120 y 240  $\mu\text{m}$  de 2380 y 1030  $\text{ml}/(\text{cm}^2 \text{ min})$  y con las diferentes modificaciones el resultado fue inferior a 600  $\text{ml}/(\text{cm}^2 \text{ min})$  y confirmaron la dependencia de la permeabilidad al espesor, donde al duplicarlo el resultado disminuyó el doble. Además, valores inferiores a este 600  $\text{ml}/(\text{cm}^2 \text{ min})$  no requieren del tratamiento de pre-coagulación antes de la implantación debido a la retención de agua [126].

## CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES

Se desarrollaron andamios electrohilados compuestos de PLC/Col-H con estructuras fibrilares sin defectos que emulan la microarquitectura de la matriz extracelular nativa, incluyendo micro y nanofibras, de las cuales se seleccionaron dos tipos de membranas electrohiladas, C1-0 y C2-0 con fibras heterogéneas y homogéneas, respectivamente. Mediante SEM no se evidenció una relación entre la velocidad de colección (rpm) y la distancia entre la aguja y el colector en el diámetro de fibra, esto fue corroborado con el análisis Anova, en el que los dos factores mencionados no influyeron en la variable de respuesta en las condiciones de trabajo implementadas. Posteriormente, los andamios seleccionados fueron tratados con etanol (C1 y C2) y con la deconvolución de los espectros de FTIR-ATR se determinó que después del tratamiento con etanol, C1 presentó un aumento del 33.64 % mientras que C2 del 9.47 %, estos cambios se debieron a que C1 exhibía una mayor área superficial a causa de las nanofibras en su estructura. Posiblemente, este resultado podría explicar un menor porcentaje de pérdida de masa para C1-0 en interacción con NaCl y etanol, a su vez, los porcentajes de pérdida de masa para C1-0 y C2-0 en relación con etanol permiten la implementación de este como método de esterilización y postratamiento. Además, las pruebas de humectabilidad con agua y plasma sanguíneo en los andamios de PCL y sin tratar (C1-0 y C2-0) mostraron diferencias significativas, ya que la PCL es hidrofóbica y al incluir Col-H a la membrana adquirió características hidrofílicas, en la que la gota se absorbía inmediatamente, mientras que en C1 y C2 la humectabilidad fue controlada, lo que podría favorecer el transporte de nutrientes y reducir el riesgo de trombogenicidad.

Adicionalmente, las propiedades físicas son determinantes en el comportamiento celular en cuanto a la adhesión, proliferación y migración celular. De tal manera, que la rugosidad es una de las características que promueven y determinan la adhesión celular, en este caso se midió a través de AFM antes y después del tratamiento, en la que C1 evidenció una menor rugosidad en comparación con C2. Con relación al módulo de Young se encontró que al incorporar Col-H las propiedades elásticas del andamio incrementaron, además, el tratamiento con etanol mejoró significativamente el módulo en comparación a la PCL y las membranas sin tratar. Respecto a las caracterizaciones fisicoquímicas, los andamios tratados no presentan diferencias estadísticamente significativas, por lo que ambos materiales cuentan con comportamientos similares en un intervalo de confianza del 95 %.

En cuanto al comportamiento hemolítico, los andamios electrohilados exhibieron porcentajes de hemólisis inferiores al 1 % y de acuerdo con la norma ISO 10993-4 los materiales para interacciones directas con sangre deben garantizar un porcentaje de hemólisis inferior al 5 %. Por lo tanto, C1 y C2 son materiales no hemolíticos. Además, se determinó que las longitudes de onda implementadas (540-545 nm) no fueron factores influyentes en el porcentaje de hemólisis, por lo que se podría implementar alguna de las dos y no afectar los resultados.

Por otro lado, en las características biocompatibles los andamios C1 y C2 mediante la tinción con hematoxilina-eosina y SEM, se evidenció adhesión y un incremento de la densidad celular a medida que el periodo de incubación aumentó. Sin embargo, en el material electrohilado C2 después de las 48 h de interacción, se presentaron aglomerados celulares, lo que con el tiempo podría impedir la regeneración de tejido o desencadenar una angiopatía y C1 exhibió una distribución homogénea de los fibroblastos 3T3 en el andamio, lo que permitió una adecuada celularización y con el tiempo, poder favorecer la angiogénesis. Además, a través de FTIR se determinó el cambio del porcentaje de estructuras secundarias que aportan a la fase cristalina de la proteína, las cuales son más susceptibles a modificaciones, encontrando que a las 48 h hubo un aumento en ambas membranas y a las 72 h una disminución de la presencia de estas estructuras, lo cual podría asociarse a que a las 48 h se presentó adhesión de proteínas secretadas por las células, mientras que en el otro periodo de incubación la señal pudo haberse afectado por la presencia de células a causa del incremento de la densidad celular, característica que se evidenció en los resultados a campo claro.

Así mismo, C1 y C2 no evidenciaron efectos citotóxicos y según la norma ISO-10993-5/12, la viabilidad metabólica de los tratamientos por encima del 70 % del control celular se considera no tóxica, por lo que los excipientes y la interacción directa con los andamios no generaron alteraciones en la viabilidad celular; con los excipientes se reportaron viabilidades superiores al 89 %, mientras que por el método directo la viabilidad incrementó con el tiempo, aunque entre las 24 y 48 h el cambio fue más notorio y entre 48 y 72 h el aumento fue menos del 2 %. De tal modo, que los andamios electrohilados compuestos de PCL/Col-H permitieron la actividad biológica y la proliferación celular. Estadísticamente no se presentaron diferencias significativas entre C1 y C2 en la cuantificación de la proliferación ni en los ensayos de viabilidad celular a través de MTT. Sin embargo, en las tinciones fluorescentes C1 y C2 presentaron índices de circunferencialidad del núcleo significativamente diferentes, aunque estos fueron superiores a 0.82 y con las imágenes se corroboró la formación de aglomerados o fusión celular en el andamio C2.

En la evaluación de la funcionalidad de los andamios con y sin deposición celular se realizó la prueba de permeabilidad estática al agua, en la que se encontró que con el incremento del periodo de incubación la densidad celular aumentó y por ende la permeabilidad disminuyó por la oposición de las células al paso del fluido, sin embargo se concluye que el espesor es un factor determinante en dicha prueba, por lo que en ambas membranas en diferentes periodos de incubación se evidenció una alteración o incremento de la permeabilidad atribuida a cambios en el espesor. Así mismo, los aumentos de presión exhiben diferencias significativas en la permeabilidad del andamio en una relación directamente proporcional. Además, el andamio que menores resultados evidenció fue C1 con respecto a C2, ya que como se ha mencionado, C2 generó aglomerados celulares, por lo que podrían existir espacios vacíos por donde el fluido puede permear la estructura tridimensional. Del mismo modo, los controles de CC1 tuvieron menores permeabilidades respecto a CC2, aunque este último presentó un diámetro de fibra mayor y una menor porosidad.

Finalmente, con los resultados obtenidos se determinó que el andamio electrohilado compuesto de PCL/Col-H con una microarquitectura multiescala (C1) podría exhibir un desempeño adecuado como implante vascular de pequeño diámetro (<6 mm), ya que la humectabilidad en la pared del vaso permitiría la absorción de nutrientes debido a los poros interconectados, un mayor porcentaje de estructuras que aporta a la fase cristalina y propiedades mecánicas en cuanto al módulo de Young similar a un vaso nativo. Además, C1 es un material no hemolítico y exhibió características biocompatibles con relación a la adhesión, proliferación, distribución homogénea de los fibroblastos 3T3 y altos porcentajes de viabilidad celular. Así mismo, no generó cambios significativos en la morfología del núcleo, preservando un índice de circunferencialidad similar al control. De igual modo, en cuanto a la funcionalidad del andamio, C1 presentó menores resultados de permeabilidad en el tiempo lo que favorecería la biointegración con el medio circundante y promover la angiogénesis.



## TRABAJOS FUTUROS

El desarrollo de andamios electrohilados con potencial uso como implantes vasculares deben emular la microarquitectura de un vaso nativo, por lo que se debe tener en cuenta que su estructura está compuesta por tres capas principalmente, túnica íntima, media y adventicia, en la que cada una presenta una microarquitectura diferente de acuerdo con la función que desempeña. De este modo, como trabajo futuro se espera continuar con una segunda fase del proyecto, en la que se desarrollen implantes vasculares bioinspirados mediante electrohilatura, con la que se puedan incorporar diferentes técnicas de electrohilado. Posteriormente, se valorarían los implantes tricapas tubulares de pequeño diámetro (<6 mm), variando la microarquitectura con el fin de obtener diferentes porosidades y distribución de las fibras en la estructura para promover la endotelización del andamio electrohilado y el transporte de nutrientes a través del vaso.

Así mismo, se ampliarán las caracterizaciones del vaso, determinando las propiedades dinámicas y los perfiles de flujo, ya que se debe garantizar que la pared del vaso no genere turbulencia en el flujo sanguíneo, dado que podría generar trombos y desencadenar una embolia. Con el objetivo de obtener resultados comparativos, en las caracterizaciones de las propiedades mecánicas y dinámicas se podrían implementar como controles un vaso nativo bovino y un implante vascular comercial.

Para la evaluación de las características biocompatibles se podría implementar un modelo *in vitro* de células endoteliales extraídas de cordón umbilical (HUVEC) con el fin de evaluar la adhesión, proliferación, viabilidad celular y cambios estructurales en la morfología de los núcleos celulares.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Asistencia a *15th International Topical Meeting on Nanostructured Materials and Nanotechnology* (Nanotech 2019). 21 – 25 octubre 2019. Puerto Vallarta, Jalisco, México.

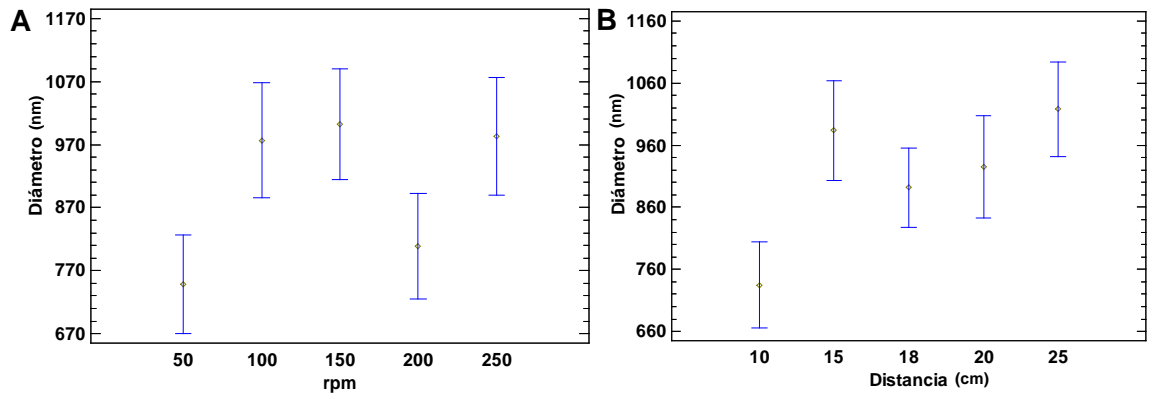
Presentación oral en *15th International Topical Meeting on Nanostructured Materials and Nanotechnology* (Nanotech 2019). “*Development electrospun membranes of polycaprolactone/hydrolyzed collagen emulating the microarchitecture of the extracellular matrix*”, Juan Camilo Atehortua, Yuliet Montoya, John Bustamante. 23 octubre 2019. Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Pasantía de investigación en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV). 30 de septiembre – 15 noviembre 2019. Monterrey, Nuevo León, México.

En escritura artículo científico sometido a revista internacional. “*Hemolytic, biocompatible and functional effect of electrospun membranes of polycaprolactone-collagen cellularized with fibroblasts as possible use for vascular implants*”, Juan Camilo Atehortua, Yuliet Montoya, Alejandra García, John Bustamante.

## ANEXO I

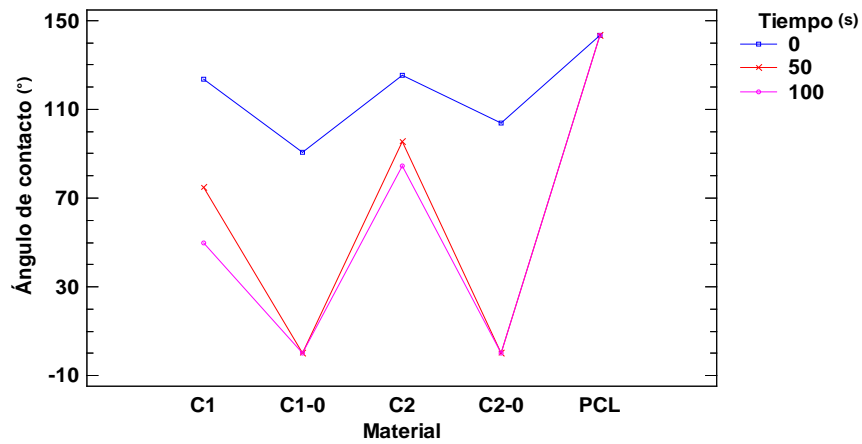
### SEM – diámetro de fibra



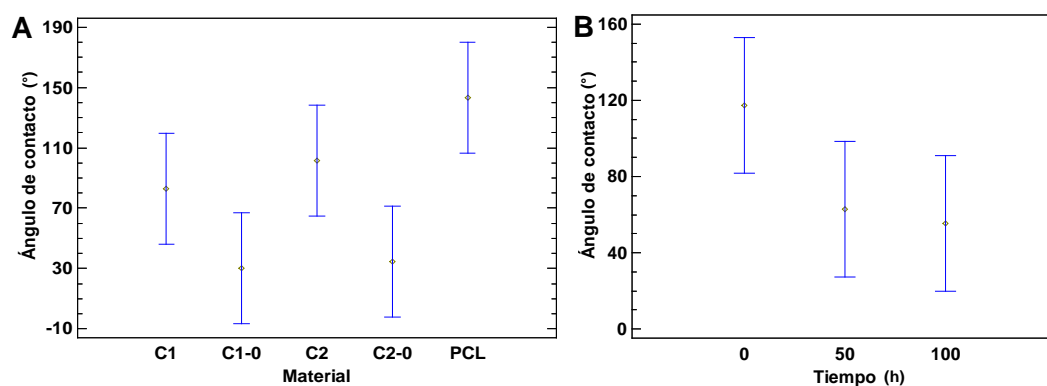
**Figura 32.** Gráfico de medias de diámetro de fibra respecto a, A) variación de las rpm, B) variación de la distancia entre la aguja y el colector.

### Ángulo de contacto

Ángulo de contacto en agua destilada.



**Figura 33.** Gráfico de interacción del ángulo de contacto con H<sub>2</sub>O respecto al material y al tiempo.



**Figura 34.** Gráfico de medias del ángulo de contacto con H<sub>2</sub>O respecto al, A) material, B) tiempo

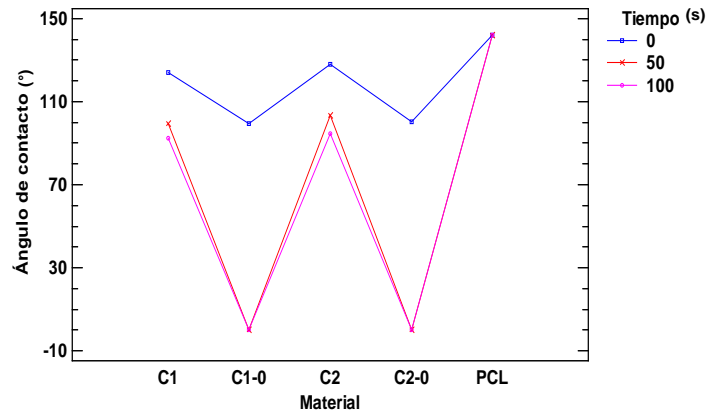
**Tabla 12.** Prueba de múltiples rangos para ángulo de contacto con H<sub>2</sub>O respecto al material.

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C1-0	3	30.2667	23.3712	X
C2-0	3	34.6	23.3712	X
C1	3	82.8667	23.3712	XX
C2	3	101.7	23.3712	XX
PCL	3	143.4	23.3712	X

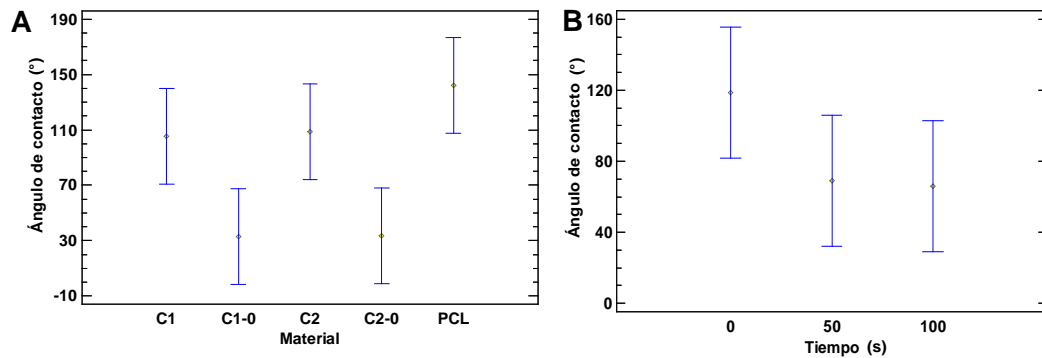
**Tabla 13.** Prueba de múltiples rangos para ángulo de contacto con H<sub>2</sub>O respecto al tiempo.

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
100	5	55.56	23.0998	X
50	5	62.74	23.0998	X
0	5	117.4	23.0998	X

Ángulo de contacto en plasma sanguíneo.



**Figura 35.** Gráfico de interacción del ángulo de contacto con plasma sanguíneo respecto al material y al tiempo.



**Figura 36.** Gráfico de medias del ángulo de contacto con plasma sanguíneo respecto al, A) material, B) tiempo.

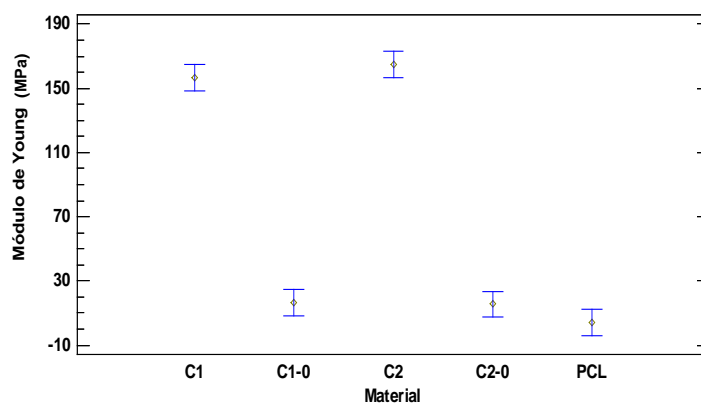
**Tabla 14.** Prueba de múltiples rangos para ángulo de contacto con plasma sanguíneo respecto al material.

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C1-0	3	33.1	21.9271	X
C2-0	3	33.4333	21.9271	X
C1	3	105.3	21.9271	X
C2	3	108.8	21.9271	X
PCL	3	142.0	21.9271	X

**Tabla 15.** Prueba de múltiples rangos para ángulo de contacto con plasma sanguíneo respecto al tiempo.

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
100	5	65.88	23.9299	X
50	5	68.96	23.9299	X
0	5	118.74	23.9299	X

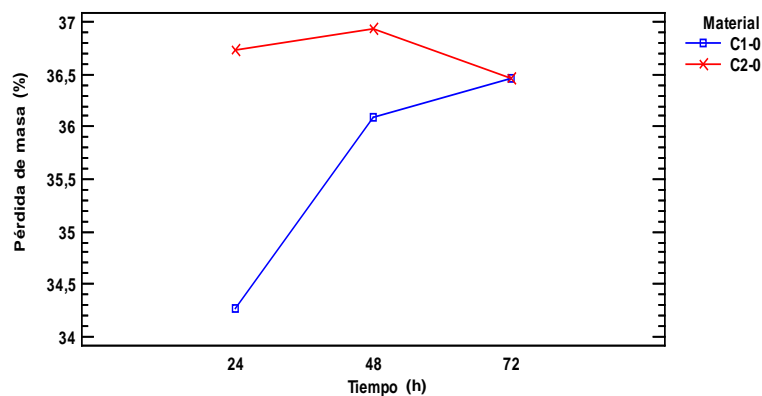
### Prueba de tracción



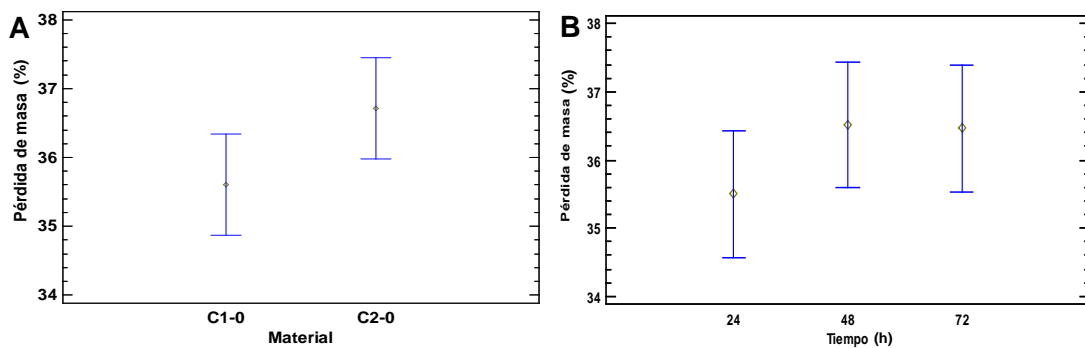
**Figura 37.** Gráfico de interacción del módulo de Young respecto al material.

### Pérdida de masa

Pérdida de masa en NaCl.



**Figura 38.** Gráfico de interacción de pérdida de masa con NaCl respecto al material y al tiempo.



**Figura 39.** Gráfico de medias de pérdida de masa con NaCl respecto al, A) material, B) tiempo.

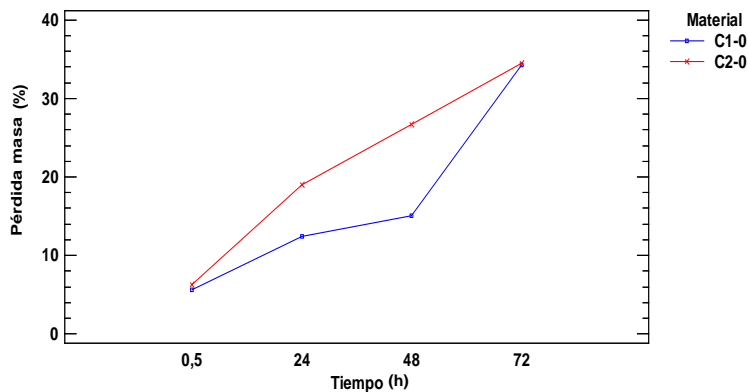
**Tabla 16.** Prueba de múltiples rangos para pérdida de masa con NaCl respecto al material.

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C1-0	9	35.6076	0.490738	X
C2-0	9	36.7143	0.490738	X

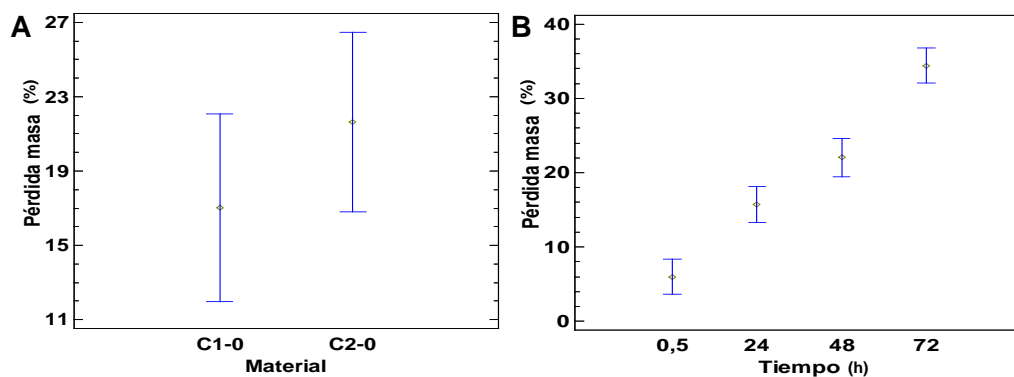
**Tabla 17.** Prueba de múltiples rangos para pérdida de masa con NaCl respecto al tiempo.

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
24	6	35.5016	0.60148	X
72	6	36.4662	0.60148	X
48	6	36.5152	0.60148	X

Pérdida de masa en etanol.



**Figura 40.** Gráfico de interacción de pérdida de masa con etanol respecto al material y al tiempo.



**Figura 41.** Gráfico de medias de pérdida de masa con etanol respecto al, A) material, B) tiempo.

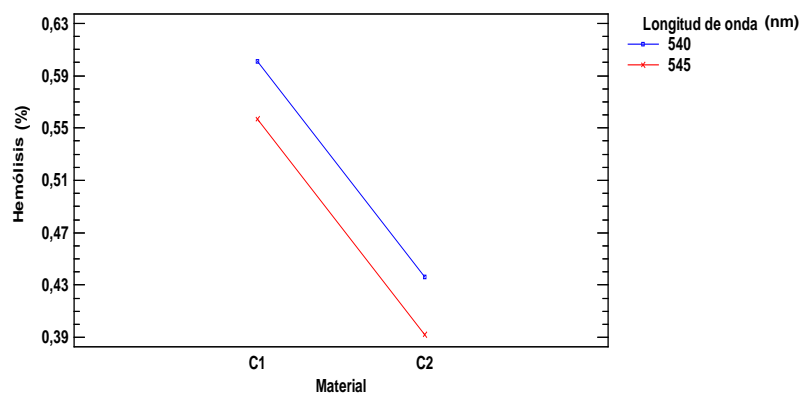
**Tabla 18.** Prueba de múltiples rangos para pérdida de masa con etanol respecto al material.

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C1-0	11	17.02	3.42726	X
C2-0	12	21.6311	3.28135	X

**Tabla 19.** Prueba de múltiples rangos para pérdida de masa con etanol respecto al tiempo.

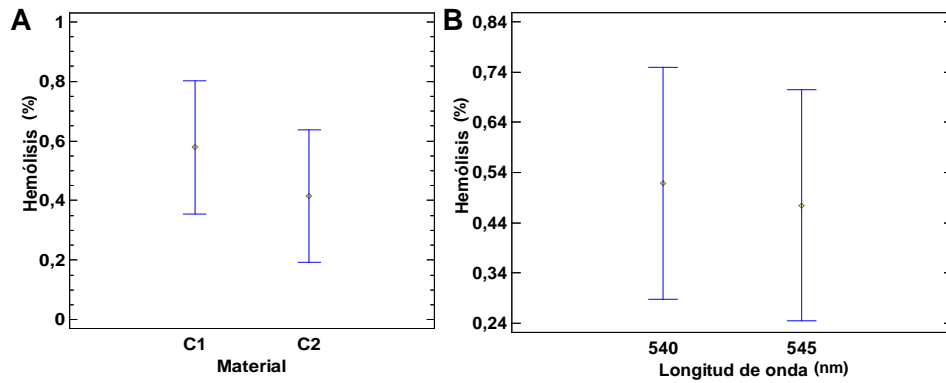
Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0,5	6	5.98277	1.59856	X
24	6	15.7181	1.59856	X
48	5	22.0553	1.75113	X
72	6	34.3853	1.59856	X

## Hemólisis



**Figura 42.** Gráfico de interacción de hemólisis respecto al material y a la longitud de onda.





**Figura 43.** Gráfico de medias de hemólisis respecto al, A) material, B) longitud de onda.

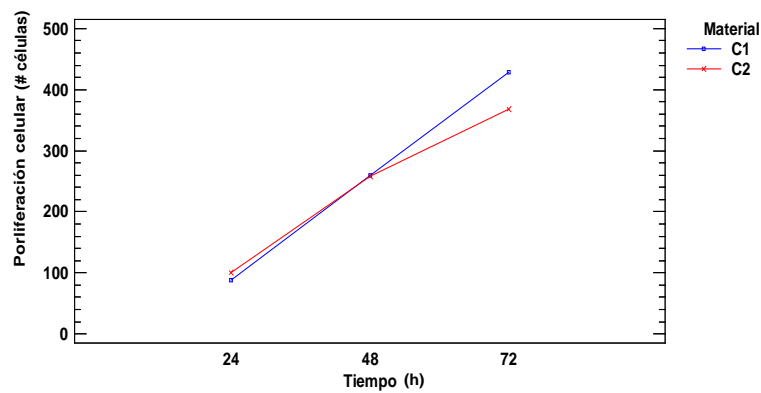
**Tabla 20.** Prueba de múltiples rangos para hemólisis respecto al material.

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C2	6	0.414341	0.141469	X
C1	6	0.578807	0.141469	X

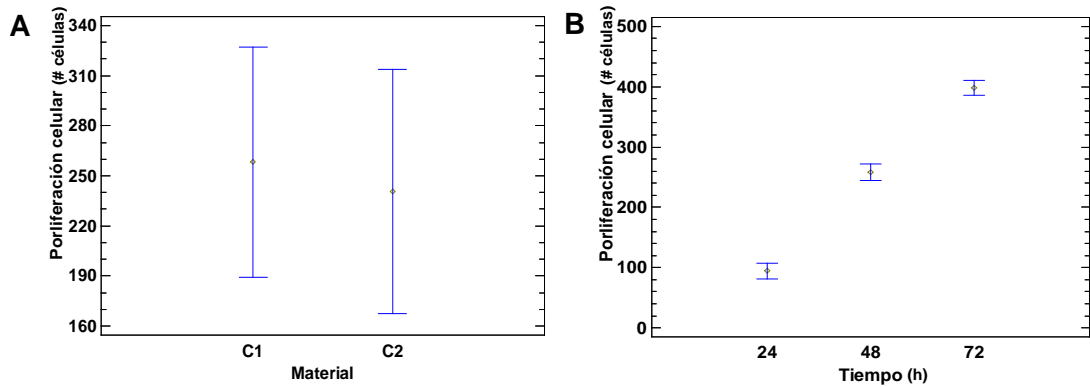
**Tabla 21.** Prueba de múltiples rangos para hemólisis respecto a la longitud de onda.

Longitud de onda	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
545	6	0.474538	0.145838	X
540	6	0.51861	0.145838	X

### Proliferación celular



**Figura 44.** Gráfico de interacción de proliferación celular respecto al material y al tiempo.



**Figura 45.** Gráfico de medias de proliferación celular respecto al, A) material, B) tiempo.

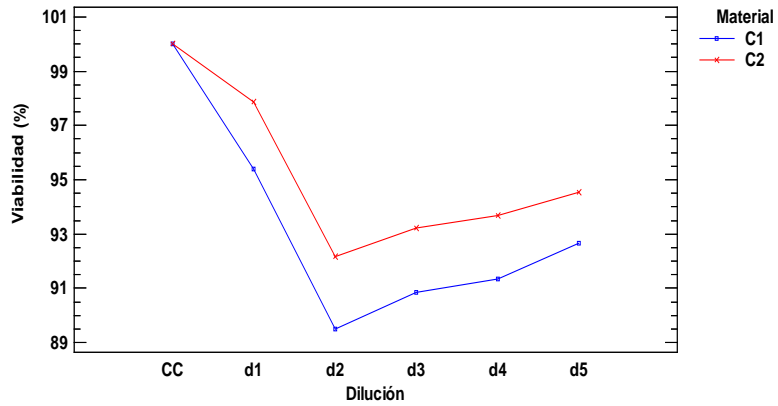
**Tabla 22.** Prueba de múltiples rangos para proliferación celular respecto al material.

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C2	8	240.429	48.5129	X
C1	9	258.34	45.7384	X

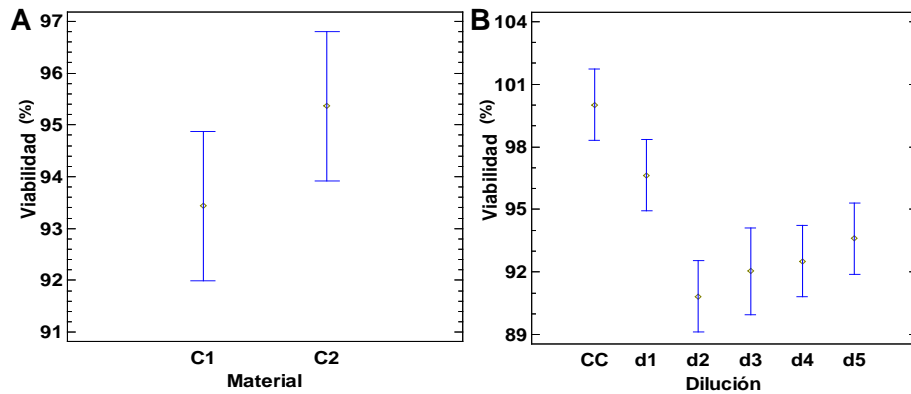
**Tabla 23.** Prueba de múltiples rangos para proliferación celular respecto al tiempo.

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
24	6	94.3333	8.4812	X
48	5	258.522	9.29069	X
72	6	398.313	8.4812	X

## MTT diluciones



**Figura 46.** Gráfico de interacción de viabilidad celular respecto al material (excipiente) y a las diluciones.



**Figura 47.** Gráfico de medias de viabilidad celular respecto al, A) material (excipiente), B) diluciones.

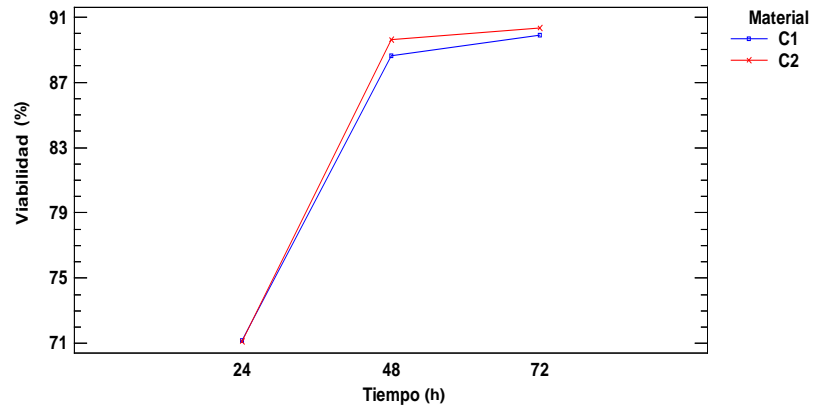
**Tabla 24.** Prueba de múltiples rangos para viabilidad celular respecto al material (excipiente).

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C1	17	93.4386	1.00043	X
C2	17	95.3637	1.00043	X

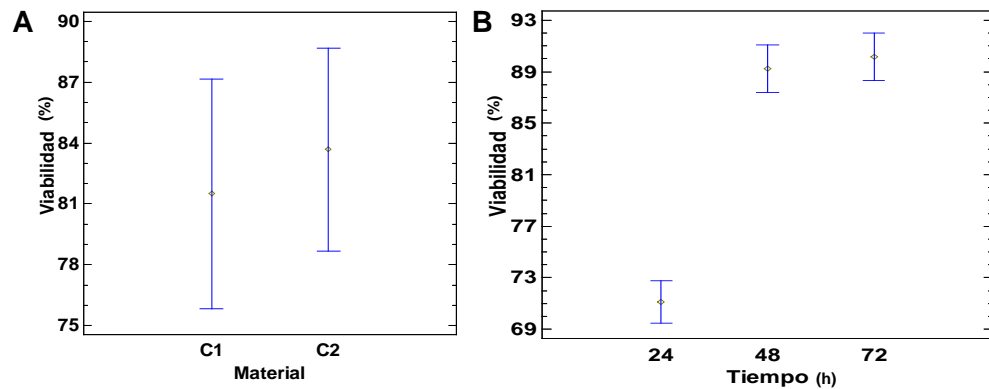
**Tabla 25.** Prueba de múltiples rangos para viabilidad celular respecto a la dilución.

Dilución	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
d2	6	90.827	1.17994	X
d3	4	92.0369	1.44512	X
d4	6	92.5214	1.17994	X
d5	6	93.5993	1.17994	XX
d1	6	96.6342	1.17994	XX
CC	6	100.0	1.17994	X

**MTT membranas**



**Figura 48.** Gráfico de interacción de viabilidad celular respecto al material y al tiempo.



**Figura 49.** Gráfico de medias de viabilidad celular respecto al, A) material, B) tiempo.

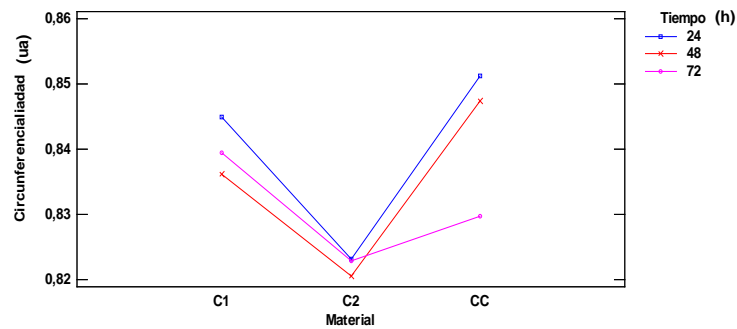
**Tabla 26.** Prueba de múltiples rangos para viabilidad celular respecto al material.

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C1	7	81.4957	3.73528	X
C2	9	83.6878	3.29421	X

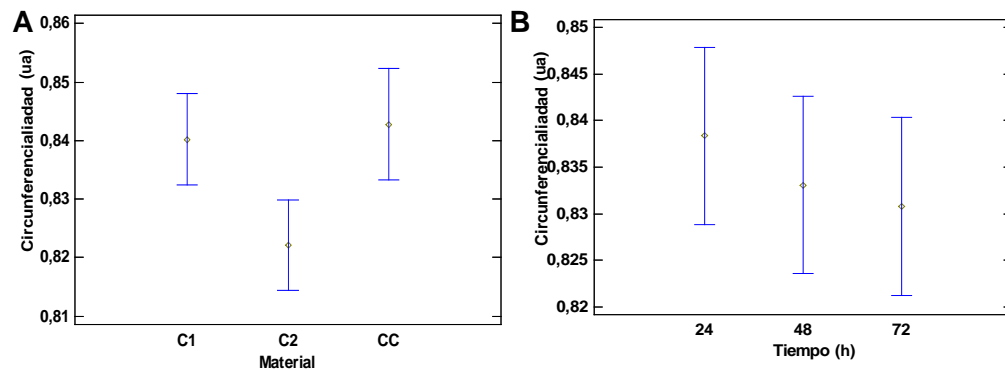
**Tabla 27.** Prueba de múltiples rangos para viabilidad celular respecto al tiempo.

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
24	6	71.1317	1.09159	X
48	5	89.22	1.19578	X
72	5	90.154	1.19578	X

### Circunferencialidad nuclear



**Figura 50.** Gráfico de circunferencialidad nuclear respecto al material y al tiempo.



**Figura 51.** Gráfico de medias de circunferencialidad nuclear respecto al, A) material, B) tiempo.

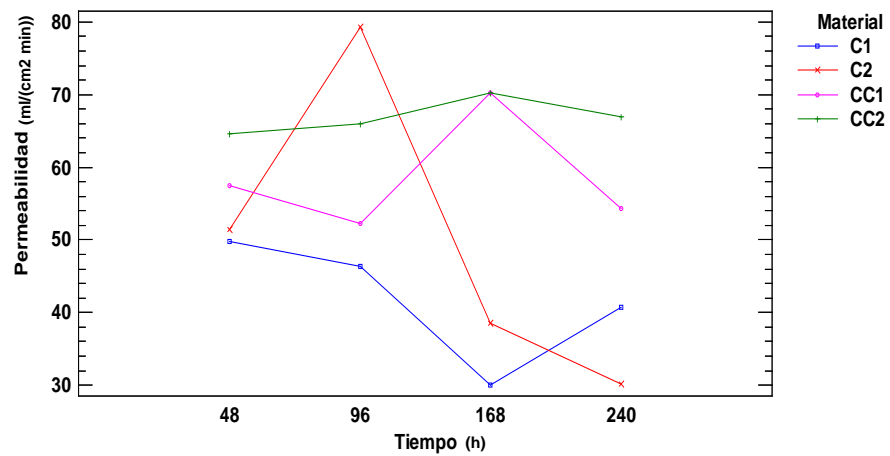
**Tabla 28.** Prueba de múltiples rangos para circunferencialidad nuclear respecto al material.

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C2	9	0.822148	0.0052853	X
C1	9	0.840204	0.0052853	X
CC	6	0.842778	0.00647315	X

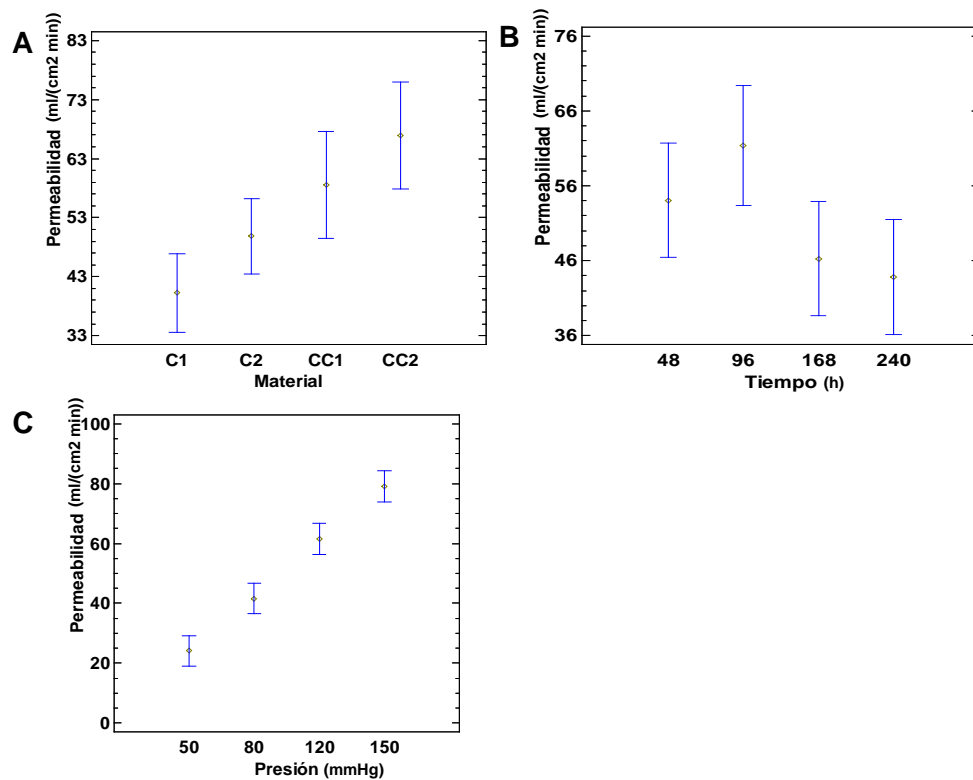
**Tabla 29.** Prueba de múltiples rangos para circunferencialidad nuclear respecto al tiempo.

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
72	8	0.830771	0.00650545	X
48	8	0.833092	0.00650545	X
24	8	0.838367	0.00650545	X

### Permeabilidad



**Figura 52.** Gráfico de permeabilidad estática respecto al material y al tiempo.



**Figura 53.** Gráfico de medias de permeabilidad estática respecto al, A) material, B) tiempo, C) presión.

**Tabla 30.** Prueba de múltiples rangos para permeabilidad estática respecto al material.

Material	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C1	30	40.255	4.71408	X
C2	32	49.85	4.56439	XX
CC1	16	58.5631	6.45502	XX
CC2	16	66.9344	6.45502	X

**Tabla 31.** Prueba de múltiples rangos para permeabilidad estática respecto al tiempo.

<b>Tiempo</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
240	24	43.8404	5.44782	X
168	24	46.2575	5.44782	XX
48	24	54.0613	5.44782	XX
96	22	61.4086	5.69006	X

**Tabla 32.** Prueba de múltiples rangos para permeabilidad estática respecto a la presión.

<b>Presión</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
50	24	24.1708	3.62853	X
80	24	41.5196	3.62853	X
120	23	61.6348	3.70657	X
150	23	78.9843	3.70657	X



## REFERENCIAS

- [1] A. Elmoselhi, "Cardiovascular Circuitry and Hemodynamics," in *Cardiology: An Integrated Approach*, McGraw-Hill., New York, 2017.
- [2] R. Shohet, "THE CARDIOVASCULAR SYSTEM," in *The Big Picture: Medical Biochemistry*, McGraw-Hill., New York, 2012.
- [3] OMS, "Enfermedades cardiovasculares," 2015. [Online]. Available: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). [Accessed: 10-May-2018].
- [4] I. Cicha, R. Singh, C. D. Garlich, and C. Alexiou, "Nano-biomaterials for cardiovascular applications: Clinical perspective," *J. Control. Release*, vol. 229, pp. 23–36, 2016.
- [5] S. Heydrick, E. Roberts, J. Kim, S. Emani, and J. Y. Wong, "Pediatric cardiovascular grafts: Historical perspective and future directions," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 40, pp. 119–124, 2016.
- [6] P. Andrades, S. Sepúlveda, and D. P. Wisnia, "Injertos," in *APUNTES DE CIRUGÍA PLÁSTICA*, 2014, pp. 43–60.
- [7] M. J. Smith *et al.*, "Suture-reinforced electrospun polydioxanone-elastin small-diameter tubes for use in vascular tissue engineering: A feasibility study," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 1, pp. 58–66, 2008.
- [8] B. Marelli, A. Alessandrino, S. Farè, G. Freddi, D. Mantovani, and M. C. Tanzi, "Compliant electrospun silk fibroin tubes for small vessel bypass grafting," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 10, pp. 4019–4026, 2010.
- [9] R. H. Schmedlen, W. M. Elbjeirami, A. S. Gobin, and J. L. West, "Tissue engineered small-diameter vascular grafts," *Clin. Plast. Surg.*, vol. 30, no. 4, pp. 507–517, 2003.
- [10] M. Scherner *et al.*, "In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: Proof of concept?," *J. Surg. Res.*, vol. 189, no. 2, pp. 340–347, 2014.
- [11] H. C. Wu, T. W. Wang, P. L. Kang, Y. H. Tsuang, J. S. Sun, and F. H. Lin, "Coculture of endothelial and smooth muscle cells on a collagen membrane in the development of a small-diameter vascular graft," *Biomaterials*, vol. 28, no. 7, pp. 1385–1392, 2007.
- [12] M. B. Browning *et al.*, "Multilayer vascular grafts based on collagen-mimetic proteins," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 3, pp. 1010–1021, 2012.
- [13] D. S. Vara, H. J. Salacinski, R. Y. Kannan, L. Bordenave, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, "Cardiovascular tissue engineering: State of the art," *Pathol. Biol.*, vol. 53, no. 10, pp. 599–612, 2005.
- [14] P. Qi, M. F. Maitz, and N. Huang, "Surface modification of cardiovascular materials and implants," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 233, pp. 80–90, 2013.

- [15] A. Y. Lee, Y. U. Lee, N. Mahler, C. Best, S. Tara, and C. K. Breuer, "Regenerative Implants for Cardiovascular Tissue Engineering," *Transl. Regen. Med. to Clin.*, vol. 163, no. 4, pp. 39–64, 2015.
- [16] J. Lannutti, D. Reneker, T. Ma, D. Tomasko, and D. Farson, "Electrospinning for tissue engineering scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, no. 3, pp. 504–509, 2007.
- [17] V. Khadivi, J. Anderson, and G. a. Zarb, "Cardiovascular disease and treatment outcomes with osseointegration surgery," *J Prosthet Dent*, vol. 81, no. 5, pp. 533–536, 1999.
- [18] H. Liu, X. Li, G. Zhou, H. Fan, and Y. Fan, "Electrospun sulfated silk fibroin nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 32, no. 15, pp. 3784–3793, 2011.
- [19] K. Ren, Y. Wang, T. Sun, W. Yue, and H. Zhang, "Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 324–332, 2017.
- [20] G. Yang, X. Li, Y. He, J. Ma, G. Ni, and S. Zhou, "From nano to micro to macro: Electrospun hierarchically structured polymeric fibers for biomedical applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 81, pp. 80–113, 2018.
- [21] X. Wang, B. Ding, and B. Li, "Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 16, no. 6, pp. 229–241, 2013.
- [22] V. M. Martín Giménez, M. B. Ruiz-Roso, A. B. Camargo, D. Kassuha, and W. Manucha, "Nanotecnología, un nuevo paradigma en el tratamiento de la aterosclerosis," *Clin. e Investig. en Arterioscler.*, vol. 29, no. 5, pp. 224–230, 2016.
- [23] J. Kucinska-Lipka, I. Gubanska, H. Janik, and M. Sienkiewicz, "Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system," *Materials Science and Engineering C*, vol. 46. Elsevier B.V., pp. 166–176, 2015.
- [24] X. Wang and B. S. Hsiao, "Electrospun nanofiber membranes," *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 12, pp. 62–81, 2016.
- [25] Universitat Politècnica de València, "Microscopia electrónica de barrido." [Online]. Available: <http://www.upv.es/entidades/SME/info/753120normalc.html>. [Accessed: 14-May-2018].
- [26] V. Sorrivás, A. Morales, and M. Yañez, *Principios y práctica de la Microscopía Electrónica*. Buenos Aires, 2014.
- [27] Scai, "Microscopía Electrónica de Barrido," 2016. [Online]. Available: <http://www.scai.uma.es/areas/micr/sem/sem.html>.
- [28] Asturnatura, "Métodos de estudio de la célula." [Online]. Available: <https://www.asturnatura.com/articulos/estructura-funcion-celular/metodos-estudio-celula.php>. [Accessed: 14-May-2018].
- [29] N. K. Awad, H. Niu, U. Ali, Y. Morsi, and T. Lin, "Electrospun Fibrous Scaffolds for Small-Diameter Blood Vessels : A Review," *Membranes (Basel)*, pp. 1–26, 2018.

- [30] Z. Tan *et al.*, “Electrospun vein grafts with high cell infiltration for vascular tissue engineering,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 81, no. July, pp. 407–415, 2017.
- [31] J. E. Hall, “La circulación,” in *Tratado de fisiología médica*, 12th ed., vol. 2, Barcelona, 2011, p. 1112.
- [32] C. B. Pinnock, E. M. Meier, N. N. Joshi, B. Wu, and M. T. Lam, “Customizable engineered blood vessels using 3D printed inserts,” *Methods*, vol. 99, pp. 20–27, 2016.
- [33] A. Yazdanpanah, M. Tahmasbi, G. Amoabediny, J. Nourmohammadi, F. Moztafzadeh, and M. Mozafari, “Fabrication and characterization of electrospun poly-L-lactide/gelatin graded tubular scaffolds: Toward a new design for performance enhancement in vascular tissue engineering,” *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 25, no. 5, pp. 405–413, 2015.
- [34] R. A. Valencia, Y. Montoya, S. Sánchez, I. C. Ortiz, L. M. Hoyos, and J. Bustamante, “Estudio in vitro de permeabilidad, porosidad y crecimiento celular en membranas electrohiladas para prótesis vasculares,” *Rev. Colomb. Cardiol.*, vol. 24, pp. 182–190, 2016.
- [35] Y. Shanjani *et al.*, “Endothelial pattern formation in hybrid constructs of additive manufactured porous rigid scaffolds and cell-laden hydrogels for orthopedic applications,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 65, pp. 356–372, 2017.
- [36] J. Zhao, Y. Farhatnia, D. M. Kalaskar, Y. Zhang, P. E. M. Bulter, and A. M. Seifalian, “The influence of porosity on the hemocompatibility of polyhedral oligomeric silsesquioxane poly (caprolactone-urea) urethane,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 68, pp. 176–186, 2015.
- [37] R. A. Valencia, M. García, and J. Bustamante, “Computational Study of Cell Mobility and Transport Phenomena Through Textile Vascular Grafts Using a Multi-Scale Approach,” p. 88, 2015.
- [38] “NIH3T3 Cell Line.” [Online]. Available: <http://www.nih3t3.com/>.
- [39] Altogen Biosystems, “NIH3T3 Transfection Kit (Swiss Mouse Fibroblasts).” [Online]. Available: <https://altogen.com/product/nih3t3-transfection-reagent-swiss-mouse-fibroblasts/>.
- [40] Sigma-Aldrich, “NIH 3T3 Cell Line.” [Online]. Available: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_93061524?lang=en&region=CO](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_93061524?lang=en&region=CO).
- [41] J. Schuster, C. Schvezov, and M. Rosenberger, “Evaluación De La Hemocompatibilidad Del Óxido De Titanio Y Del Carbón Pirolítico,” *Rev. la Asoc. Física Argentina - An. AFA*, vol. 22, no. 2, pp. 77–82, 2013.
- [42] Pública Ministerio de Salud., “Guía general para la evaluación y registro de equipos médicos implantables,” Ciudad de la Habana, 2007.
- [43] K. Stang *et al.*, “Hemocompatibility testing according to ISO 10993-4: Discrimination between pyrogen- and device-induced hemostatic activation,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol.

42, pp. 422–428, 2014.

- [44] ASTM, “Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials,” *Practice*, vol. i, pp. 1–5, 2013.
- [45] Clínica Universidad de Navarra, “Inmunofluorescencia.” [Online]. Available: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/inmunofluorescencia>.
- [46] R. Calderón and R. P. Stock, “Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología,” 2007.
- [47] Y. Franco, “La Microscopía De Fluorescencia Y Su Aplicación En El Diagnóstico De Bacterias Fitopatógenas,” *Fitosanidad*, vol. 9, no. 3, pp. 65–68, 2005.
- [48] Thermo Fisher Scientific, “Cell Viability, Proliferation and Function.” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation.html>.
- [49] M. Muñoz, “Lipofección del DNA con nanovectores coloidales de interés en terapia génica,” UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, 2013.
- [50] T. Thymidine, “Measuring Cell Viability / Cytotoxicity,” 2012.
- [51] American Type Culture Collection, “MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide,” 2011.
- [52] Clínica Universidad de Navarra, “¿Qué es permeabilidad capilar?” [Online]. Available: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/permeabilidad-capilar>.
- [53] S. Sanchez, “ANÁLISIS DE LA PERMEABILIDAD Y POROSIDAD EN MEMBRANAS ELECTROHILADAS,” Universidad Pontificia Bolivariana, 2016.
- [54] G. Yang, H. Lin, B. B. Rothrauff, S. Yu, and R. S. Tuan, “Multilayered polycaprolactone/gelatin fiber-hydrogel composite for tendon tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 35, pp. 68–76, 2016.
- [55] Y. C. Jiang, L. Jiang, A. Huang, X. F. Wang, Q. Li, and L. S. Turng, “Electrospun polycaprolactone/gelatin composites with enhanced cell–matrix interactions as blood vessel endothelial layer scaffolds,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 71, pp. 901–908, 2017.
- [56] R. Yao, J. He, G. Meng, B. Jiang, and F. Wu, “Electrospun PCL/Gelatin composite fibrous scaffolds: Mechanical properties and cellular responses,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 27, no. 9, pp. 824–838, 2016.
- [57] O. Hartman *et al.*, “Biofunctionalization of electrospun PCL-based scaffolds with perlecan domain IV peptide to create a 3-D pharmacokinetic cancer model,” vol. 31, no. 21, pp. 5700–5718, 2011.
- [58] K. Sisson, C. Zhang, M. C. Farach-carson, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, “Evaluation of Cross-Linking Methods for Electrospun Gelatin on Cell Growth and Viability,” vol. 10, no. 7, 2009.
- [59] E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, and B. H. Bay, “Evaluation of electrospun PCL / gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution,” vol. 3, pp. 321–330, 2007.

- [60] P. Xiang, M. Li, C. Zhang, D. Chen, and Z. Zhou, "Cytocompatibility of electrospun nanofiber tubular scaffolds for small diameter tissue engineering blood vessels," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 49, no. 3, pp. 281–288, 2011.
- [61] L. Ghasemi, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, N.-E. Mohammad, and S. Ramakrishna, "Electrospun poly(3-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," vol. 29, pp. 4532–4539, 2008.
- [62] S. Gautam, A. K. Dinda, and N. C. Mishra, "Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 3, pp. 1228–1235, 2013.
- [63] M. Li, M. J. Mondrinos, M. R. Gandhi, F. K. Ko, A. S. Weiss, and P. I. Lelkes, "Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 26, no. 30, pp. 5999–6008, 2005.
- [64] D. I. Zeugolis *et al.*, "Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin?," *Biomaterials*, vol. 29, no. 15, pp. 2293–2305, 2008.
- [65] K. M. Kennedy, A. Bhaw-luximon, and D. Jhurry, "Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance," *Acta Biomater.*, vol. 50, pp. 41–55, 2017.
- [66] P. Kuppan, S. Sethuraman, and U. M. Krishnan, "PCL and PCL-gelatin nanofibers as esophageal tissue scaffolds: Optimization, characterization and cell-matrix interactions," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 9, pp. 1540–1555, 2013.
- [67] A. Khalf and S. V Madihally, "Modeling the permeability of multiaxial electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) -gelatin hybrid fibers for controlled doxycycline release," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 161–170, 2017.
- [68] A. Sadat, M. Hamid, and F. Hajjesmaeilbaigi, "Effect of electrospinning parameters on morphological properties of PVDF nanofibrous scaffolds," *Prog. Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 113–123, 2017.
- [69] J. C. Bridge *et al.*, "Adapting the Electrospinning Process to Provide Three Unique Environments for a Tri-layered In Vitro Model of the Airway Wall," no. July, pp. 1–11, 2015.
- [70] A. Haider, S. Haider, and I. Kang, "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology," *Arab. J. Chem.*, vol. 11, no. 8, pp. 1165–1188, 2015.
- [71] J. V Patil, A. S. Kamble, C. K. Hong, J. H. Kim, and P. S. Patil, "Electrospinning: A versatile technique for making of 1D growth of nanostructured nanofibers and its applications: An experimental approach," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 423, pp. 641–674, 2017.
- [72] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," vol. 28, pp. 325–347, 2010.
- [73] M. Danaei *et al.*, "Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 2, pp. 1–17,

2018.

- [74] C. Fracalossi, R. Corte, K. Dua, I. Satiko, T. De Jesus, and A. Pinto, "Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering," *Eur. Polym. J.*, vol. 82, pp. 181–195, 2016.
- [75] R. Liu, J. Ming, H. Zhang, and B. Zuo, "EDC / NHS Crosslinked Electrospun Regenerated Tussah Silk Fibroin Nanofiber EDC / NHS Crosslinked Electrospun Regenerated Tussah Silk Fibroin Nanofiber Mats," no. May, 2012.
- [76] S. Panzavolta, M. Giofrè, M. L. Focarete, C. Gualandi, L. Foroni, and A. Bigi, "Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 4, pp. 1702–1709, 2011.
- [77] J. J. Lee, H. S. Yu, S. J. Hong, I. Jeong, J. H. Jang, and H. W. Kim, "Nanofibrous membrane of collagen-polycaprolactone for cell growth and tissue regeneration," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 9, pp. 1927–1935, 2009.
- [78] J. Dulnik, D. Kolbuk, P. Denis, and P. Sajkiewicz, "The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres," *Eur. Polym. J.*, vol. 104, no. January, pp. 147–156, 2018.
- [79] Y. Zhang, H. Ouyang, T. L. Chwee, S. Ramakrishna, and Z. M. Huang, "Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 72, no. 1, pp. 156–165, 2005.
- [80] P. Coimbra *et al.*, "Coaxial electrospun PCL / Gelatin-MA fibers as scaffolds for vascular tissue engineering," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 159, pp. 7–15, 2017.
- [81] Y. Hu, B. E. I. Feng, W. Zhang, C. Yan, and Q. Yao, "Electrospun gelatin / PCL and collagen / PCL scaffolds for modulating responses of bone marrow endothelial progenitor cells," no. 1, pp. 3717–3726, 2019.
- [82] J. Xue, M. He, Y. Liang, and A. Crawford, "Fabrication and evaluation of electrospun PCL-gelatin micro-/nanofibers membrane for anti-infective GTR implant," *RSC Adv.*, vol. 7, no. 31, pp. 18993–19001, 2017.
- [83] M. Azizi, M. Azimzadeh, M. Afzali, M. Alafzadeh, and S. Hossein, "Characterization and Optimization of Using Calendula Officinalis Extract in The Fabrication of Polycaprolactone / Gelatin Electrospun Nanofibers for Wound Dressing Applications," vol. 6, no. 2, pp. 34–46, 2018.
- [84] R. Safaeijavan, M. Soleimani, A. Divsalar, and A. Eidi, "Biological behavior study of gelatin coated PCL nanofibrous electrospun scaffolds using fibroblasts," *J. Paramed. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 67–73, 2014.
- [85] E. M. Abdelrazek, A. M. Hezma, A. El-khodary, and A. M. Elzayat, "Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend," *Egypt. J. Basic Appl. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 10–15, 2016.
- [86] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, and P. Dumas, "FTIR study of

- polycaprolactone chain organization at interfaces,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 273, no. 2, pp. 381–387, 2004.
- [87] S. Mulyani, F. S. M. C. S. Setyabudi, Y. Pranoto, and U. Santoso, “Physicochemical properties of gelatin extracted from buffalo hide pretreated with different acids,” *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, vol. 37, no. 5, pp. 708–715, 2017.
- [88] J. H. Muyonga, C. G. B. Cole, and K. G. Duodu, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*),” *Food Chem.*, vol. 86, no. 3, pp. 325–332, 2004.
- [89] M. Drobot, I. Grierosu, I. Radu, and D. S. Vasilescu, “The effect of silver nanoparticles on the collagen secondary structure,” *Key Eng. Mater.*, vol. 638, pp. 8–13, 2014.
- [90] R. Usha and T. Ramasami, “Role of solvents in stability of collagen,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 93, no. 2, pp. 541–545, 2008.
- [91] A. Gopinath, S. M. M. Reddy, B. Madhan, G. Shanmugam, and J. R. Rao, “Effect of aqueous ethanol on the triple helical structure of collagen,” *Eur. Biophys. J.*, vol. 43, no. 12, pp. 643–652, 2014.
- [92] X. Hu, D. Kaplan, and P. Cebe, “Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy,” *Macromolecules*, vol. 39, no. 18, pp. 6161–6170, 2006.
- [93] Q. Lu *et al.*, “Water-insoluble silk films with silk I structure,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 4, pp. 1380–1387, 2010.
- [94] M. Adeli-sardou, M. Mehdi, M. Torkzadeh-mahani, and M. Dodel, “Controlled release of lawsone from polycaprolactone / gelatin electrospun nano fibers for skin tissue regeneration,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 124, pp. 478–491, 2019.
- [95] A. K. Jaiswal, H. Chhabra, V. P. Soni, and J. R. Bellare, “Enhanced mechanical strength and biocompatibility of electrospun polycaprolactone-gelatin scaffold with surface deposited nano-hydroxyapatite,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 4, pp. 2376–2385, 2013.
- [96] J. Joy *et al.*, “Gelatin-polytrimethylene carbonate blend based electrospun tubular construct as a potential vascular biomaterial,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 106, no. September 2018, p. 110178, 2020.
- [97] J. Pelipenko, P. Kocbek, B. Govedarica, R. Rošic, S. Baumgartner, and J. Kristl, “The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 84, no. 2, pp. 401–411, 2013.
- [98] J. Ahlawat, V. Kumar, and P. Gopinath, “Carica papaya loaded poly (vinyl alcohol)-gelatin nanofibrous scaffold for potential application in wound dressing,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 103, no. May, p. 109834, 2019.
- [99] “Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications - Google Libros.” [Online]. Available:

[https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=xPyPDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA207&ots=IXRteJGyWL&sig=z59qAqkAV29hl\\_fDhqAyDJYxd1I&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=xPyPDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA207&ots=IXRteJGyWL&sig=z59qAqkAV29hl_fDhqAyDJYxd1I&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false). [Accessed: 05-Dec-2019].

- [100] D. Kołbuk, P. Sajkiewicz, K. Maniura-Weber, and G. Fortunato, "Structure and morphology of electrospun polycaprolactone/gelatine nanofibres," *Eur. Polym. J.*, vol. 49, no. 8, pp. 2052–2061, 2013.
- [101] D. Rong *et al.*, "Fabrication of Gelatin/PCL Electrospun Fiber Mat with Bone Powder and the Study of Its Biocompatibility," *J. Funct. Biomater.*, vol. 7, no. 1, p. 6, 2016.
- [102] A. A. Aldana and G. A. Abraham, "Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications," *Int. J. Pharm.*, vol. 523, no. 2, pp. 441–453, 2017.
- [103] B. Zhu, W. Li, N. Chi, R. V Lewis, J. Osamor, and R. Wang, "Optimization of Glutaraldehyde Vapor Treatment for Electrospun Collagen/Silk Tissue Engineering Scaffolds," pp. 2–13, 2017.
- [104] M. J. McClure, S. A. Sell, D. G. Simpson, B. H. Walpoth, and G. L. Bowlin, "A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: A preliminary study," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2422–2433, 2010.
- [105] P. Xiang *et al.*, "The in vitro and in vivo biocompatibility evaluation of electrospun recombinant spider silk protein / PCL / gelatin for small caliber vascular tissue engineering scaffolds," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 163, pp. 19–28, 2018.
- [106] Z. Tan *et al.*, "Electrospun vein grafts with high cell in filtration for vascular tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 81, no. August, pp. 407–415, 2017.
- [107] W. Yuan *et al.*, "Hemocompatible surface of electrospun nano fibrous scaffolds by ATRP modification," vol. 33, pp. 3644–3651, 2013.
- [108] P. C. Caracciolo, M. I. Rial-hermida, F. Montini-ballarin, G. A. Abraham, A. Concheiro, and C. Alvarez-lorenzo, "Surface-modified bioresorbable electrospun scaffolds for improving hemocompatibility of vascular grafts," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 75, pp. 1115–1127, 2017.
- [109] J. Horakova *et al.*, "Comprehensive assessment of electrospun scaffolds hemocompatibility," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 82, pp. 330–335, 2018.
- [110] A. R. Padalhin, N. Thuy, B. Linh, Y. K. Min, and B. Lee, "Evaluation of the cytocompatibility hemocompatibility in vivo bone tissue regenerating capability of different PCL blends," no. December, pp. 37–41, 2014.
- [111] H. Zhang, "Development and blood compatibility assessment of electrospun polyvinyl alcohol blended with metallocene polyethylene and plectranthus amboinicus ( PVA / mPE / PA ) for bone tissue engineering," pp. 2777–2788, 2018.
- [112] V. Milleret, T. Hefti, H. Hall, V. Vogel, and D. Eberli, "Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 12, pp. 4349–4356, 2012.



- [113] C. Ming, P. Prabir K, W. Steven B, and B. Sankha, "Role of Fiber Diameter in Adhesion and Proliferation of NIH 3T3 Fibroblast on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds," *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 3, 2007.
- [114] D. Li *et al.*, "Biointerfaces A comparison of nanoscale and multiscale PCL / gelatin scaffolds prepared by disc-electrospinning," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 146, pp. 632–641, 2016.
- [115] C. Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Aligned biodegradable nanofibrous structure : a potential scaffold for blood vessel engineering," vol. 25, pp. 877–886, 2004.
- [116] M. A. Nazeer, E. Yilgor, and I. Yilgor, "Electrospun polycaprolactone / silk fibroin nano fi brous bioactive scaffolds for tissue engineering applications," vol. 168, no. January, pp. 86–94, 2019.
- [117] Z. G. Chen, P. W. Wang, B. Wei, X. M. Mo, and F. Z. Cui, "Electrospun collagen – chitosan nanofiber : A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 2, pp. 372–382, 2010.
- [118] Q. Zhang, S. Lv, J. Lu, S. Jiang, and L. Lin, "Characterization of polycaprolactone / collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 76, pp. 94–101, 2015.
- [119] J. Joy, R. Aid-launais, J. Pereira, G. Pavon-djavid, and A. R. Ray, "Gelatin-polytrimethylene carbonate blend based electrospun tubular construct as a potential vascular biomaterial," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 106, no. September 2019, p. 110178, 2020.
- [120] M. M. Lim, T. Sun, and N. Sultana, "In Vitro Biological Evaluation of Electrospun Polycaprolactone / Gelatine Nanofibrous Scaffold for Tissue Engineering," vol. 2015, 2015.
- [121] P. Davoudi, S. Assadpour, M. Ali, and J. Ai, "Biomimetic modification of polyurethane-based nano fi brous vascular grafts : A promising approach towards stable endothelial lining," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 80, pp. 213–221, 2017.
- [122] J. Wang, A. Quach, M. E. Brasch, C. E. Turner, and J. H. Henderson, "On-command on / off switching of progenitor cell and cancer cell polarized motility and aligned morphology via a cytocompatible shape memory polymer scaffold," *Biomaterials*, vol. 140, pp. 150–161, 2017.
- [123] K. Sheets *et al.*, "Cell-Fiber Interactions on Aligned and Suspended Nanofiber Scaffolds," vol. 3, no. 4, pp. 355–368, 2013.
- [124] Q. Li, L. Mu, F. Zhang, Z. Mo, C. Jin, and W. Qi, "Manufacture and property research of heparin grafted electrospinning PCU artificial vascular scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 854–861, 2017.
- [125] N. Nagiah, R. Johnson, R. Anderson, W. H. Elliott, and W. Tan, "Highly compliant vascular grafts with gelatin- sheathed coaxially-structured nanofibers," 2015.
- [126] K. Madhavan, W. H. Elliott, W. Bonani, E. Monnet, and W. Tan, "Mechanical and

biocompatible characterizations of a readily available multilayer vascular graft,” pp. 506–519, 2012.