

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRAS
POLIMÉRICAS POR ELECTROHILADO PARA SU
APLICACIÓN EN CULTIVO CELULAR

The seal of the University of Sonora is a circular emblem. It features a central shield with a sunburst at the top, a book, and a figure holding a staff. The shield is flanked by two figures. Above the shield is a banner with the motto "TODO LO ILUMINAN". The shield is set against a background of a grid. The entire seal is surrounded by a circular border containing the text "UNIVERSIDAD DE SONORA" and the year "1942" at the bottom.

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES

Presenta

I.Q. Raquel Díaz Ocaña

Hermosillo, Sonora

Marzo 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de Raquel Díaz Ocaña, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencia de Materiales, en el programa del posgrado en Ciencia de Materiales.

Dra. María Mónica Castillo Ortega
Presidente

Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix
Secretaria

Dr. José Carmelo Encinas Encinas
Sinodal

Dra. Mérida Sotelo Lerma
Sinodal

Dr. Tomás Jesús Madera Santana
Sinodal Externo

A Dios, Nuestro Señor, a quien le debo todo lo que soy y lo tengo.

A mis dos Jorgitos por ser lo más importante de mi vida.

A mi mamá por su amor incondicional y por ser un gran ejemplo para mí.

A la Doctora Mónica Castillo por su gran apoyo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora, Dra. María Mónica Castillo Ortega, por su gran perseverancia, por sus enseñanzas, ayuda y gestos de cariño.
- Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, por permitirme concluir mis estudios de maestría.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado dentro del Programa de Becas Nacionales así como dentro del Proyecto CB-2008/105003.
- A mis sinodales y profesores, con cariño especial a, Dra. Mérida Sotelo, Dr. Carmelo Encinas, Dra. Dora Rodríguez, y Dr. Tomás Madera por su valiosa cooperación en la elaboración de esta tesis.
- Al Dr. Rodolfo Cruz Silva y Dr. Jorge Uruchurtu Chavarín, por su apoyo en la estancia en el Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CIICAP) de la Universidad de Morelos.
- A la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera, M.C. Alida Ospina y de una manera muy especial a la M.C. Mabel Rodríguez Gonzáles por compartir conmigo sus conocimientos y por su apoyo para realizar el Cultivo Celular en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

- A la Dra. Catalina Cruz Vázquez y Dra. Judith Tánori por sus buenos consejos y amistad.
- Al Dr. Francisco Rodríguez Félix, Dra. Karen Lilian Ochoa Lara, Dra. Teresa del Castillo, Dra. Rosa Elena Navarro, Martha Cecilia Vázquez Moreno y María Dolores Gonzáles por sus diferentes pero muy importantes muestras de apoyo durante mis estudios de maestría.
- Al Ing. José Luis García Ruiz e Ing. Marisol Delgado Torres por su cooperación para lograr la estancia en Cuernavaca y trámite de beca Santander.
- A mis amigos y compañeros por el entusiasmo y alegría.
- A mis familiares a quien quiero mucho, mi mamá Arcelia Ocaña, mi padrastro Tomohiko Okuya, mis hermanos Yasuo y Midori Okuya, mi abuelita Virginia Maseda, mi tío Samuel Ocaña Maseda, mis suegros Jorge Espinoza y María Maciel por impulsarme siempre en mis estudios.
- A mi abuelo Samuel Ocaña García de una manera muy particular por su apoyo constante y valiosos consejos.
- A mi amado esposo Jorge Espinoza Maciel por estar conmigo en todo momento.

ÍNDICE

Lista de figuras, I

Lista de tablas, IV

1. Objetivos, V
2. Resumen, VI
3. Introducción, 1
4. Antecedentes, 6
 - 4.1 Técnica de Electrohilado, 6
 - 4.11 Generalidades, 6
 - 4.12 Descripción del Proceso, 8
 - 4.121 Campo eléctrico formado en el proceso de electrohilado, 12
 - 4.13 Parámetros de la Técnica de Electrohilado, 14
 - 4.131 Parámetros de la Solución, 15
 - 4.1311 Viscosidad, 15
 - 4.1312 Concentración, 17
 - 4.1313 Tensión Superficial, 18
 - 4.1314 Peso Molecular, 18
 - 4.1315 Conductividad, 19
 - 4.132 Parámetros del Proceso, 21
 - 4.1321 Velocidad de Flujo, 21

- 4.1322 Voltaje Aplicado, 21
- 4.1323 Distancia de la aguja al colector, 22
- 4.133 Tipos de Colectores, 23
- 4.134 Parámetros Ambientales, 25
- 4.14 Disolventes utilizados en Electrohilado, 26
- 4.15 Fuerzas Intermoleculares, 29
- 4.2 Caracterización de las Fibras preparadas por Electrohilado, 32
- 4.21 Caracterización Geométrica, 32
- 4.211 Microscopía Electrónica de Barrido, 35
- 4.22 Caracterización Química, 38
- 4.222 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier, 39
- 4.23 Caracterización Mecánica, 40
- 4.3 Aplicaciones, 43
- 4.31 Aplicaciones Biomédicas, 44
- 4.311 Andamios para la Ingeniería de Tejidos, 45
- 4.312 Apósitos, para la cicatrización de heridas, 47
- 4.313 Liberación de Fármacos, 48
- 4.32 Filtración, 49
- 4.33 Biosensores y Generación Energética, 51
- 4.34 Cosméticos, 53

- 4.35 Inmovilización de Enzimas, 53
- 4.36 Membranas de Afinidad, 54
- 4.4 Polímeros Utilizados en Electrohilado, 55
 - 4.41 Colágeno, 56
 - 4.42 Poliácido láctico, 60
 - 4.43 Polivinil pirrolidona, 60
 - 4.44 Acetato de celulosa, 61
- 4.5 Cultivo Celular, 62
 - 4.51 Historia, 65
 - 4.52 Técnica de Cultivo Celular, 66
 - 4.521 Manipulación de Células, 68
 - 4.53 Líneas Celulares Establecidas, 71
 - 4.54 Cultivo de Células no-Mamíferas, 73
 - 4.55 Especificaciones del Cultivo, 74
 - 4.56 Microscopía de Fluorescencia como caracterización de células vivas, 78
- 5. Metodología Experimental, 81
 - 5.1 Materiales, 81
 - 5.2 Preparación de Membranas Fibrosas Poliméricas, 82
 - 5.3 Cultivo Celular en Membranas Electrohiladas, 85
 - 5.31 Cultivo de 273T, 87

5.32	Cultivo de J774,	91
6.	Resultados y Discusión,	93
6.1	Condiciones Óptimas para Preparar Membranas por Electrohilado,	93
6.2	Microscopía Electrónica de Barrido a membranas fibrosas,	94
6.3	Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier,	96
6.4	Microscopía Electrónica de Barrido de membranas con cultivo celular,	98
6.5	Microscopía de Fluorescencia,	103
7.	Discusión,	107
8.	Conclusiones,	109
9.	Recomendaciones,	111
10.	Referencias,	112

LISTA DE FIGURAS

1. Aparato electrostático de Electrohilado patentado por Formahls, 7
2. Diagrama esquemático del equipo de electrohilado, 11
3. Diagrama del cono de Taylor, 12
4. Efectos de cambio en líneas de fuerza del campo eléctrico, 13
5. Puentes de hidrógeno entre dos moléculas de agua, 30
6. Moléculas de glicina, prolina e hidroxiprolina, 31
7. Esquema del microcopio electrónico de barrido, 37
8. Vibraciones fundamentales de las moléculas, 40
9. Aplicación de fibras por electrohilado, 44
10. Estructura química del PLLA, 60
11. Polimerización del PVP, 60
12. Obtención de acetato de celulosa, 61
13. Hemocitómetro, 78
14. Microscopio de fluorescencia, 80
15. Colorantes fluorescentes, 80
16. Microfotografía de membrana de colágeno, 95
17. Microfotografía de membrana de AC/PVP/AC, 95
18. Microfotografía TEM de membrana de AC/PVP/AC, 95

19. Microfotografía de membrana de PLLA-Col, 95
20. Espectro FTIR de colágeno, 96
21. Espectro FTIR de AC/PVP/AC, 97
22. Espectro FTIR de PLLA-Col, 97
23. Espectro FTIR de PLLA puro, 97
24. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con células 293T 170x, 98
25. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con células 293T 275x, 98
26. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con células 293T 500x, 99
27. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con células 293T 1200x, 99
28. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con residuos de cultivo, 99
29. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con residuos celulares, 99
30. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con células J774 72x, 100
31. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con células J774 300x, 100
32. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con células J774 500x, 100
33. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con células J774 1500x, 100
34. Microfotografía de membrana PLLA-Col con células J774 1000x, 101
35. Microfotografía de membrana PLLA-Col con células J774 2000x, 101
36. Microfotografía de membrana PLLA-Col con células J774 5000x, 102
37. Microfotografía de membrana PLLA-Col con células J774 5000x, 102
38. Microfotografía de membrana PLLA-Col con células J774 10000x, 102

39. Microfotografía de membrana PLLA-Col con células J774 1000x, 102
40. Fluorescencia de AC/PVP/AC a campo volteado 10x, 104
41. Fluorescencia de AC/PVP/AC a campo volteado 20x, 104
42. Fluorescencia de AC/PVP/AC con DAPI 10x, 104
43. Fluorescencia de AC/PVP/AC con DAPI 20x, 104
44. Fluorescencia de AC/PVP/AC a campo volteado 20x, 105
45. Fluorescencia de AC/PVP/AC con DAPI 20x, 105
46. Fluorescencia de AC/PVP/AC con DAPI 40x, 105
47. Fluorescencia de PLLA-Col a campo volteado, 106
48. Fluorescencia de PLLA-Col a campo volteado, 106
49. Fluorescencia de PLLA-Col con DAPI, 106
50. Fluorescencia de PLLA-Col con DAPI, 106

LISTA DE TABLAS

1. Parámetros de electrohilado y su efecto en la morfología de las fibras, 15
2. Solventes usados en electrohilado, 28
3. Propiedades de los solventes comunes en electrohilado, 29
4. Fuerza mecánica de algunas fibras poliméricas, 42
5. Dosis UV requerida para la esterilización de microorganismos, 76
6. Descripción de experimentación para encontrar las condiciones para formar fibras de colágeno, 86

1. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo consiste en preparar membranas poliméricas de colágeno y de polivinil pirrolidona con acetato de celulosa utilizando la técnica de electrohilado, su caracterización; así como su evaluación como andamio en cultivo celular. Comparar los resultados obtenidos en el cultivo celular con membranas de poliácido láctico con colágeno.

Encaminados a lograr lo anterior, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Obtener membranas fibrosas por la técnica de electrohilado para cultivo celular.
- Llevar a cabo la caracterización de las nanofibras.
- Evaluar el desempeño de las membranas como andamios para ingeniería de tejidos mediante la realización de cultivo celular sobre éstas, comparando la respuesta de diversas líneas celulares de las membranas de polivinil pirrolidona recubiertas de acetato de celulosa con respecto a las membranas de PLLA con colágeno.
- Analizar las células cultivadas para determinar las características biológicas de las membranas; adhesión, proliferación, biocompatibilidad, bioactividad, o en su caso toxicidad, liberación de residuos, etc.

2. RESUMEN

La investigación de nuevos materiales poliméricos con aplicación biomédica es actualmente de gran interés para la ciencia, ya que es necesario dar una mejor solución a diversos problemas de salud del ser humano.

La técnica de electrohilado ofrece una manera efectiva de elaborar membranas poliméricas fibrosas útiles en la regeneración celular. Debido a la morfología que las nanofibras poseen al emplear esta técnica, la matriz extracelular se simula permitiendo aplicar las membranas como andamios en la ingeniería de tejidos.

En este trabajo se prepararon por electrohilado membranas fibrosas de colágeno, acetato de celulosa con polivinil pirrolidona AC/PVP/AC y poliácido láctico con colágeno PLLA-Col para su aplicación en el cultivo de dos líneas celulares. Durante el tiempo de cultivo se observó la proliferación, adhesión y penetración celular en las membranas para evaluar las propiedades biológicas y toxicidad de las mismas.

Las membranas fueron caracterizadas por Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR, por sus siglas en inglés) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) antes del cultivo. Mientras que el crecimiento de las células fue observado por Microscopía Óptica, SEM y Microscopía de Fluorescencia.

De acuerdo a la literatura, las membranas de espesor reducido son favorables para el crecimiento celular ya que permiten la interacción entre células así como el paso

efectivo de nutrientes y bióxido de carbono. En este trabajo se logró preparar membranas muy delgadas. Específicamente en el caso del colágeno, su espesor excesivamente pequeño impidió realizar un cultivo celular favorable. Por otro lado, las membranas AC/PVP/AC y PLLA-Col dieron buenos resultados de crecimiento de células. Las características biológicas de ambas membranas fueron comparadas.

Las membranas PLLA-Col, por la presencia del colágeno, que además de ser proteína es un biopolímero, influyó para que se presentara mayor crecimiento de células en comparación con las membranas AC/PVP/AC. Sin embargo, existe la necesidad de mantener las membranas con colágeno a bajas temperaturas y con un manejo especialmente cuidadoso para evitar su degradación o desnaturalización, lo que representa una desventaja importante. Por otro lado, las membranas AC/PVP/AC favorecieron un buen crecimiento celular, su manipulación y almacenamiento no requiere un manejo especial.

Por los resultados obtenidos, se proponen a las membranas AC/PVP/AC como andamios para cultivo de células HEK293T y J774.

3. INTRODUCCIÓN

Actualmente es necesario mejorar las aplicaciones de ingeniería para sustituir o mejorar determinadas funciones biológicas. Por esto, es importante la investigación en biomateriales diseñados para la medicina regenerativa. [1]

De acuerdo a la técnica de cultivo celular, las células son sembradas en una estructura artificial capaz de sostener tejido tridimensional. Estas estructuras se conocen como andamios celulares y pasan a formar parte del microambiente de las células. Los andamios permiten la adhesión y migración celular, la difusión de nutrientes e influyen en el comportamiento del desarrollo celular. Es importante que los andamios posean alta porosidad y un adecuado tamaño de poros que permita la difusión de células y nutrientes a través de la estructura del material. Generalmente es necesario que el andamio sea biodegradable para evitar una intervención quirúrgica para ser removido. El tiempo de degradación del andamio debe permitir que el tejido sea regenerado antes que el material pierda su estructura. [2]

Se han creado diversos materiales para regenerar algún tejido específico. Los materiales poliméricos han sido los que han proporcionado los resultados más prometedores. Se han creado andamios para la regeneración de tejidos con polímeros tanto sintéticos como naturales, siendo estos últimos los que han aportado mayor compatibilidad con el medio biológico al que son expuestos. [3]

En este trabajo se utilizó el colágeno ya que, además de ser un polímero natural, es la proteína más abundante en el cuerpo humano. Es uno de los componentes más importantes de la matriz extracelular ya que proporciona propiedades de integridad estructural al tejido. La presencia del colágeno en una herida es determinante para su recuperación. Las fibras de colágeno poseen propiedades estructurales únicas e importantes; disipan energía, previenen fallas mecánicas prematuras y proveen señales biológicas a células adyacentes que regulan ciertas respuestas funcionales. Aunado a esto, el colágeno es reabsorbible, tiene alta afinidad al agua, baja antigenicidad, excelente compatibilidad celular y capacidad de promover la regeneración de tejido. Estos factores combinados hacen del colágeno uno de los biopolímeros ideales para su aplicación en la ingeniería de tejidos. Sin embargo, si el colágeno no se mantiene a bajas temperaturas puede convertirse en gelatina o degradarse, lo cual significa que necesita condiciones especiales para su almacenamiento y manipulación. [4]

De esta manera, también se decidió emplear membranas de polivinil pirrolidona cubiertas de acetato de celulosa AC/PVP/AC para demostrar que la estructura de nanofibras similares a la matriz extracelular, ofrece una morfología apta para la regeneración de tejido. Además, las membranas AC/PVP/AC pueden mantenerse bajo condiciones normales del medio ambiente sin que su naturaleza y propiedades se vean afectadas. Los resultados con estas membranas fueron posteriormente comparados con membrana preparada con proteínas (biopolímeros). Dicha membrana se compone

de poliácido láctico con colágeno PLLA-Col (30:1) donde las células respondieron de una manera favorable.

También es importante mencionar que la estructura del biomaterial debe ser compatible con el tejido y, específicamente, con la matriz extracelular. Las membranas fibrosas obtenidas por electrohilado imitan casi de manera idéntica la estructura y propiedades físicas de la matriz extracelular. [3]

El electrohilado es una técnica que hace uso de fuerzas electrostáticas para producir fibras delgadas a partir de una solución polimérica. Un generador de voltaje con un amplio rango de kV es necesario para consumir esta técnica. Dicho generador debe ir conectado a un capilar metálico que a su vez está integrado a la solución polimérica contenida en una jeringa. Se provoca una inestabilidad en aumento sobre la superficie de la solución, y cuando se alcanza y supera la tensión superficial, se expulsa una fibra del capilar, que viaja una distancia determinada para depositarse en un colector metálico conectado a tierra que funge como electrodo negativo. El solvente de la solución polimérica se evapora durante el trayecto del capilar al colector y de esta manera se forma una membrana fibrosa sobre el colector. [5,6]

Las fibras componentes de la membrana, poseen pequeños diámetros que van desde la escala nanométrica hasta algunos micrómetros. Esto es una característica favorable para la medicina regenerativa debido a que las células proliferan mejor sobre un sustrato delgado que les permita interconectarse entre sí, además de adherirse [7, 8].

Lowery y colaboradores [9] cultivaron células de piel humana (HDF) en nanofibras de policaprolactona (PCL) y polioxido etileno (PEO) preparadas por electrohilado, donde destacaron la importancia de la porosidad en las membranas.

El objetivo de este trabajo es preparar por electrohilado membranas fibrosas con vista a su aplicación como sustrato en cultivos de diversas líneas celulares. Así como la comparación de la respuesta celular hecha entre membranas electrohiladas de acetato de celulosa y polivinil pirrolidona con membranas de poliácido láctico con colágeno. Esto, para la evaluación de las membranas electrohiladas como andamios funcionales en la medicina regenerativa. Yang y colaboradores [10] cultivaron células madre neuronales NSC en fibras alineadas de poliácido láctico (PLLA) por electrohilado empleando un colector giratorio y una aguja aislada, también emplearon electrohilado magnético.

Encaminados para lograr lo anterior, primero fue necesario plantear una manera de combinar los diversos parámetros en la técnica de electrohilado con la finalidad de obtener las condiciones óptimas que al ser aplicadas, siempre proporcionen membranas fibrosas bien formadas. Las condiciones reportadas en la literatura solo proporcionan amplios rangos de valores para cada parámetro de la técnica empleada. Para la preparación de fibras con colágeno, generalmente se reporta aplicar un voltaje de 10-20 kV, un flujo de 0-30 ml/h y una distancia de la aguja al colector de 10-30 cm. Fue

necesario encontrar el valor exacto de cada parámetro que al combinarlo con los otros dieran como resultado fibras bien formadas, por lo que no fue una tarea sencilla.

El colágeno es difícil de disolver, aunque es soluble en solventes ácidos, principalmente ácido acético. Sin embargo, debido a la aplicación que se desea darle a las membranas en este trabajo, el uso de algún ácido como solvente no se recomienda. Por el contrario, para el uso del colágeno en el cultivo celular y medicina regenerativa se recomiendan los solventes fluorados, principalmente dos de ellos que son: el 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) y el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). En este caso se ha decidido emplear el TFE [11]. Mattheews y colaboradores [12] prepararon fibras de colágeno por electrohilado y lograron hacer crecer células SMC empleando un solvente fluorado para destacar su importancia.

Continuando con el trabajo, se realizó el cultivo celular en las membranas de colágeno, acetato de celulosa y polivinil pirrolidona, poliácido láctico con colágeno y se analizaron los resultados con imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía óptica y de fluorescencia. Las imágenes SEM permiten comprobar la presencia de células, mientras que la fluorescencia nos dice si están vivas o muertas. Posteriormente, se evaluó su biocompatibilidad y se estudiaron las características con las que las células crecen sobre estos sustratos con la finalidad de compararlos.

4. ANTECEDENTES

4.1 Técnica de Electrohilado

4.11 Generalidades

La técnica de electrohilado proviene de los primeros experimentos en electrospray de Rayleigh en 1897 y del estudio detallado de Zeleny en 1914. Sin embargo fue Formhals quien la patentó en 1934. Formahls inventó el aparato electrostático de electrohilado, donde a una solución polimérica se le aplicó un campo eléctrico proveniente del electrodo de polaridad negativa para formar fibras delgadas que eran atraídas a un electrodo móvil de polaridad positiva. Un dispositivo con una cinta segmentada recolectaba las fibras astilladas, que luego eran removidas con un cilindro, como lo muestra la Figura 1. Formahls electrohiló acetato de celulosa disuelto en etilenglicol, a un voltaje de 57kV. Posteriormente, se le dio el nombre a la técnica como electrohilado en 1994, término que se deriva de “hilado electrostático”. Esto fue en base al trabajo de Taylor en 1969 sobre chorros dirigidos a un colector mediante la influencia de un campo eléctrico. Como es posible notar, a pesar que el término electrohilado es reciente, sus orígenes son antiguos. [13, 14]

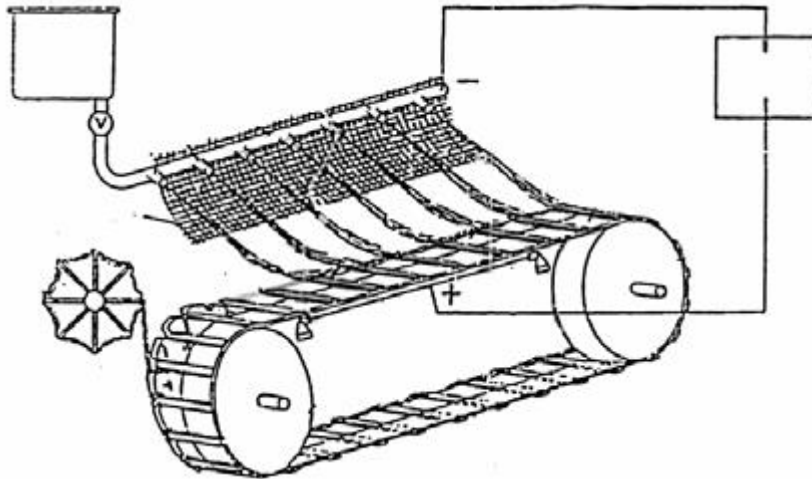


Figura 1. Aparato electrostático de electrohilado patentado por Formhals.

El electrohilado es una técnica ampliamente utilizada en la formación electrostática de fibras poliméricas, donde se hace uso de fuerzas eléctricas para producir fibras con diámetros en un rango desde 2 nanómetros hasta varios micrómetros a partir de soluciones polimérica. Este proceso ofrece facilidad para producir nanofibras con estructuras porosas controlables. Las fibras preparadas por electrohilado, con poros más pequeños y mayor área superficial que las fibras regulares, se han aplicado exitosamente en diversos campos, tales como, nanocatálisis, andamios para ingeniería de tejidos, ropa protectora, filtración, biomédico, farmacéutico, óptica, electrónicos, cuidados de la salud, biotecnología, defensa y seguridad e ingeniería ambiental.

Estas nanofibras también ofrecen muchas ventajas como una proporción superficie-volumen muy alta, porosidad controlable, posibilidad de controlar la composición química de las fibras, así como su acomodo. Todo esto para lograr los resultados deseados para su aplicación.

Recientemente, se ha incrementado el interés de utilizar esta tecnología para producir fibras a nanoescala como andamios útiles en la ingeniería de tejidos a partir de polímeros naturales y sintéticos, tales como poliácido láctico, poliuretanos, seda, colágeno, ácido hialurónico, celulosa, entre otros.

A pesar de las múltiples ventajas ofrecidas por el electrohilado, el bajo rendimiento de producción ha sido un problema que limita su aplicación. Específicamente en el área biomédica, una de las mayores limitantes encontradas al usar membranas fabricadas por electrohilado como andamios para regeneración celular es que la distribución celular no es uniforme y la falta de migración celular al incrementarse el espesor de la membrana bajo condiciones normales pasivas de sembrado. También se ha reportado que con la disminución del diámetro de las fibras aumentan los contactos fibra a fibra por unidad de longitud; esto conlleva una reducción del tamaño promedio de poros en el enrejado y, por tanto, una difícil migración celular en el interior del andamio. Por lo anterior, membranas delgadas son recomendables para el cultivo celular.

4.12 Descripción del Proceso

Esta técnica de hilado utiliza fuerzas electrostáticas para producir fibras finas a partir de una solución polimérica, por tanto dichas fibras tienen diámetros mucho más delgados y una mayor área superficial que las fibras obtenidas por métodos de hilatura

convencionales. Ejemplos de métodos convencionales de hilado son: hilado húmedo, seco, fundido y en gel. El hilado húmedo es el método más antiguo donde el polímero disuelto se sumerge en un baño químico donde la fibra se precipita, se solidifica y finalmente emerge a la superficie. El método seco consiste en diluir el polímero para después evaporar el solvente haciendo pasar una corriente de aire o gas. Para polímeros que pueden ser mezclados se emplea el método de fundición donde las fibras se solidifican al dejar enfriar la mezcla polimérica después de haber pasado por un extrusor. En el método en gel se forman fibras resistentes donde el polímero se disuelve parcialmente formando un gel. Las cadenas poliméricas permanecen unidas y se orientan en la fibra hacia una determinada dirección. Las fibras son secadas y enfriadas en un baño líquido.

Por otra parte, un voltaje de corriente directa en un rango de varias decenas de kV es necesario para generar el proceso del electrohilado. Otras técnicas como los precipitadores electrostáticos y dispersores de pesticidas trabajan bajo el mismo principio que el electrohilado, basado principalmente en que fuerzas eléctricas repulsivas mutuas superan las fuerzas más débiles de tensión superficial en el líquido polimérico cargado [1]. Actualmente existen dos arreglos estándar para electrohilado, el vertical y el horizontal, como se puede observar en la Figura 2. Con la expansión de esta tecnología, diversos grupos de investigación han desarrollado sistemas más sofisticados capaces de fabricar nanofibras con estructuras más complejas, tal cual lo hace la Dra.

Mónica Castillo para formar un nanotubo de acetato de celulosa en su interior recubierto por polivinil pirrolidona (PVP) [15, 16, 17].

El electrohilado se lleva a cabo a temperatura ambiente bajo las condiciones de la atmósfera. Básicamente, un sistema de electrohilado consiste en 3 componentes principales: una fuente de alto voltaje, un dispositivo tubular delgado o tubo capilar (Ej. La punta de una aguja) y un colector conectado a tierra, usualmente una pantalla metálica, placa o tambor rotante. Se utiliza la fuente de alto voltaje para cargar con una determinada polaridad a la solución polimérica, la cual es posteriormente acelerada hacia el colector de polaridad opuesta [2, 3].

La mayoría de los polímeros son disueltos en algún solvente volátil antes del electrohilado, y al estar totalmente disuelto forma la solución polimérica. Este fluido polimérico es luego introducido en el tubo capilar para el electrohilado. Sin embargo, algunos polímeros pueden emitir olores desagradables e incluso dañinos, por esta razón, es importante que el proceso sea realizado dentro de una cámara con sistema de ventilación.

En el proceso de electrohilado, la solución polimérica que depende de su tensión superficial al final del tubo capilar es sometida a un campo eléctrico, y una carga eléctrica es inducida en la superficie del líquido debido a este campo eléctrico. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas repulsivas superan las fuerzas de tensión superficial. Finalmente, un hilo de la solución

cargada es expulsado de la punta del cono de Taylor (Figura 3) como un rápido batido inestable que ocurre entre el tubo capilar y el colector, donde se permite la evaporación del solvente dejando únicamente una fibra de polímero [18, 19, 20]. El hilo solo es estable en la punta del capilar e inmediatamente después comienza su inestabilidad. Por lo tanto, el proceso de electrohilado es una técnica simplificada para la formación de fibras.

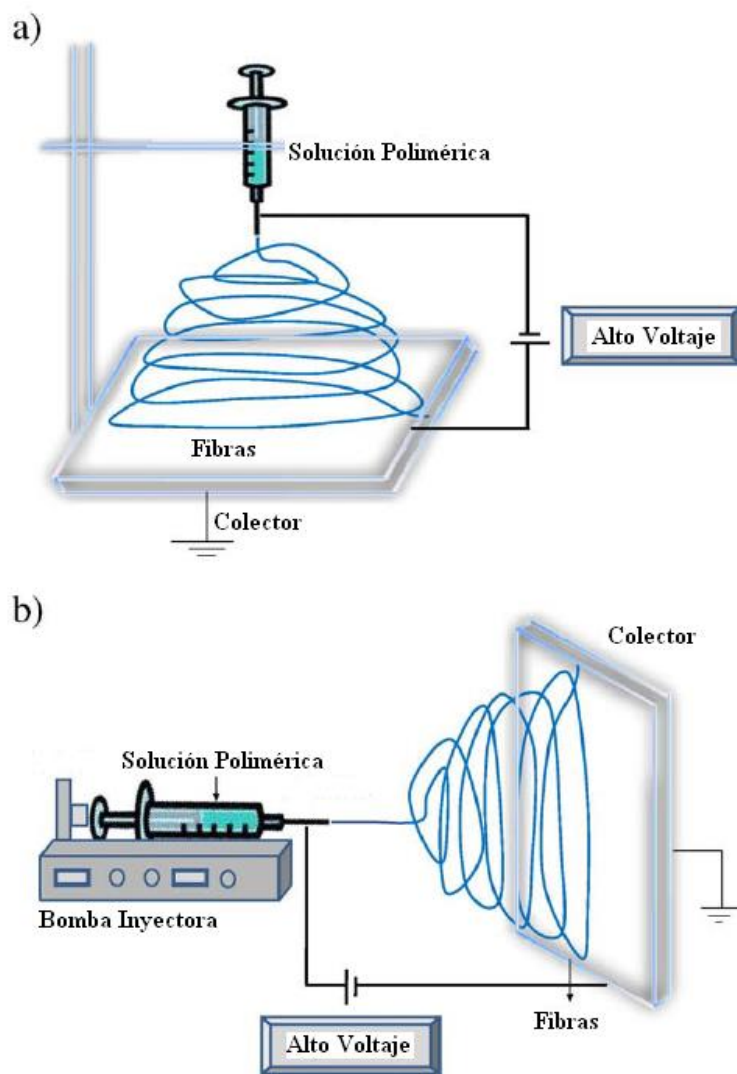


Figura 2. Diagrama esquemático del equipo de electrohilado a) Arreglo típico vertical y

b) Arreglo típico horizontal para electrohilado. Adaptado de la fuente: [21]

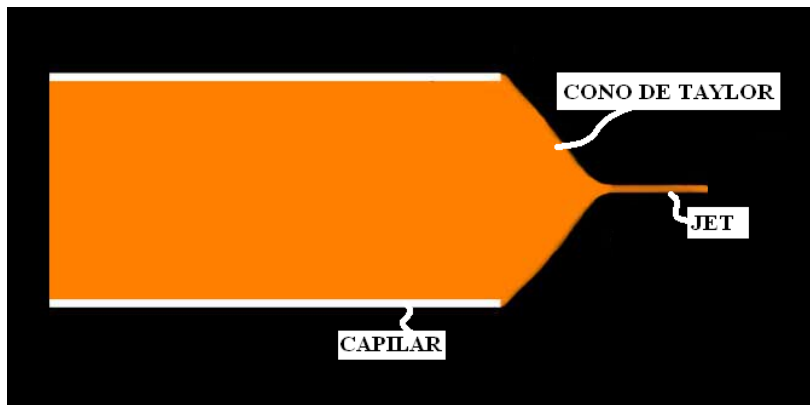


Figura 3. Diagrama del cono de Taylor que se forma en la solución polimérica al aplicarle voltaje.

4.121 Campo eléctrico formado en el proceso de electrohilado

Cuando el voltaje se aplica inicialmente a la solución, la gota en la punta de la boquilla forma una superficie hemisférica. Cuando el campo eléctrico se aumenta, la superficie pasa de una forma hemisférica a una esférica, y al final a una forma cónica. Estos cambios son debido a la competencia del aumento de carga en la solución con su tensión superficial, y la forma cónica final. Cuando el voltaje aplicado induce carga para superar la tensión de superficie, un chorro es eyectado desde el cono de Taylor. El voltaje y el campo eléctrico aplicados al sistema afectan la morfología de la fibra y el diámetro, mientras que la orientación de las líneas de campo eléctrico tiene efecto en la orientación final de la fibra dentro de la estructura. Debido a que se aplica más fuerza y

más resistencia para transformar la solución en un jet, menos voltaje da como resultado fibras más delgadas.

Ravichandran y colaboradores [22] aseguran que la morfología y distribución de las fibras en el colector varía en función a las líneas del campo eléctrico que pueden ser alteradas por la posición, cantidad y forma de los electrodos así como por la intensidad de campo. La Figura 4 muestra como se presentan cambios en las líneas de fuerza.

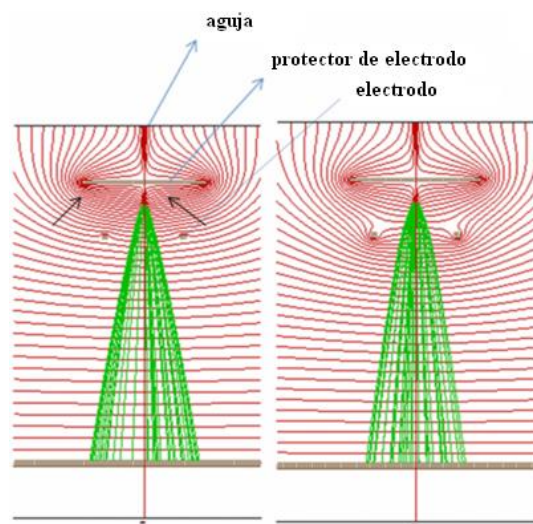


Figura 4. Efectos del cambio de intensidad de campo eléctrico en las líneas de fuerza. Adaptado de fuente [22]

4.13 Parámetros de la técnica de Electrohilado

El proceso de electrohilado depende únicamente de una serie de parámetros, que pueden ser clasificados de una manera general en:

1. Parámetros de la Solución
2. Parámetros del Proceso
3. Parámetros Ambientales.

Los parámetros que se consideran en la solución son la viscosidad, la conductividad, el peso molecular y la tensión superficial. Los parámetros a considerar en el proceso son el campo eléctrico aplicado, la distancia del capilar al colector y la velocidad de flujo. Cada uno de estos parámetros afecta significativamente la morfología de las fibras obtenidas por electrohilado, y mediante una manipulación apropiada de estos parámetros es posible formar nanofibras de una determinada morfología y diámetros [23].

En adición a estas variables, los parámetros del medio ambiente son principalmente la humedad y la temperatura de los alrededores, que también juega un papel importante en la morfología y diámetros de las nanofibras. En la Tabla 1 se muestra de forma resumida los efectos reportados de cada parámetro en la morfología de las fibras.

Tabla 1. Parámetros del Electrohilado y su Efecto en la Morfología de las Fibras. [21]

Parámetros	Efecto en la Morfología de la Fibra	Referencias
<i>Parámetros de la Solución</i>		
Viscosidad	Baja-genera grumos, Alta-aumenta el diámetro de la fibra y desaparecen grumos.	13
Concentración del Polímero	Aumento del diámetro al aumentar concentración.	24
Peso Molecular del Polímero	Aumento de peso molecular reduce formación de grumos y gotas.	25
Conductividad	Disminuye el diámetro al aumentar la conductividad.	26
Tensión Superficial	Alta tensión superficial genera inestabilidad en el chorro. No hay relación con la morfología de la fibra.	27
<i>Parámetros del Proceso</i>		
Voltaje Aplicado	Disminuye el diámetro al aumentar el voltaje.	28
Distancia de la aguja al colector	A distancias muy cortas o muy largas se generan grumos.	7
Velocidad de Flujo	Disminuye el diámetro al disminuir la velocidad de flujo. Se generan grumos a altas velocidades de flujo.	2
<i>Parámetros Ambientales</i>		
Humedad	Alta humedad forma poros circulares en las fibras.	29
Temperatura	Altas temperaturas disminuyen el diámetro de las fibras.	29

4.131 Parámetros de la Solución

4.1311 Viscosidad

La viscosidad de la solución tiene un papel determinante en el tamaño de la fibra y morfología durante el proceso de hilado. Se ha encontrado que a muy bajos

valores de viscosidad no se presenta una formación continua de fibra, mientras que a valores muy altos de viscosidad hay una gran dificultad en la expulsión de fibra de la solución polimérica, por lo que un valor óptimo de viscosidad es requerido para formar nanofibras por electrohilado. Investigadores como Buchko y colaboradores [7], Doshi y Reneker [5], han reportado valores máximos de viscosidad en un rango de 1 a 215 poises para diferentes soluciones poliméricas.

La viscosidad de la solución ha sido estrechamente relacionada a la concentración de la solución. La relación entre la viscosidad o la concentración de fibras obtenidas por electrohilado, ha sido estudiada en diversos sistemas como poliácido láctico-co-glicólico (PLGA), polivinil alcohol (PVA), polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS), gelatina, entre otros [13, 24-27, 30-32].

En soluciones poliméricas de muy alta viscosidad se presenta usualmente mayores tiempos de relajación, lo que puede prevenir la fractura del hilo expulsado durante el proceso. Un aumento en la viscosidad o concentración de la solución origina un mayor y más uniforme diámetro en la fibra. El valor de la viscosidad es determinante para formar fibras continuas. En soluciones de baja viscosidad, la tensión superficial es el factor dominante, y solo es posible la formación de grumos o fibras grumosas; mientras que a valores por encima de una concentración crítica se obtiene una estructura fibrosa continua cuya morfología es afectada por el valor de la concentración.

4.1312 Concentración

Para que pueda ocurrir la formación de una fibra por electrohilado, se requiere una determinada concentración mínima de la solución. Investigadores diversos aseguran que a bajas concentraciones, se ha observado que se obtiene un conjunto de grumos y, al ir aumentando el valor de la concentración, la forma de estos grumos cambia de esférico a alargado hasta llegar a formarse una fibra completamente uniforme con diámetros cada vez mayores [6, 33, 34]. Sin embargo, a muy altas concentraciones las fibras no son continuas debido a la incapacidad que se presenta para mantener el flujo de la solución en la punta del capilar impidiendo la formación de hilos o fibras largas.

Por ejemplo Yang y colaboradores [10] disolvieron poli-L-ácido láctico en la combinación de solventes diclorometano (DCM)/n,n-dimetil-formamida (DMF) (70:30) a las concentraciones de 1%, 2% y 5% p/p. Para la concentración de 1% p/p se obtuvieron fibras con grumos, mientras que para las concentraciones 2% y 3% p/p se obtuvieron fibras uniformes, con diámetros de 150-500 nm para la concentración de 2% de PLLA y de 800–3000 nm para la concentración de 5% de PLLA, demostrando que a bajas concentraciones se generan grumos y conforme la concentración aumenta también aumenta el diámetro de la fibra. Sin embargo, en el electrohilado existen otros parámetros que también son determinantes en la morfología de las fibras, como la tensión superficial de la solución y la viscosidad, entre otros.

4.1313 Tensión Superficial

Esta propiedad es una función de la composición del solvente utilizado. Entre menor sea la tensión superficial de la solución polimérica las fibras obtenidas presentarán ausencia de grumos. Los solventes contribuyen a diferentes valores de tensión superficial. Una tensión superficial muy elevada inhibe el proceso de electrohilado ya que se presenta mucha inestabilidad del hilo expulsado y la formación de gotas. La formación de gotas, grumos o fibras depende directamente de la tensión superficial. Valores bajos de tensión superficial de la solución ayudan a que el electrohilado pueda darse a valores menores de campo eléctrico. Sin embargo, no es posible concluir que valores pequeños de tensión superficial son favorecedores para formar fibras. Básicamente la tensión superficial determina los límites superior e inferior del rango dentro del que es posible la formación uniforme de fibras, si todas las demás variables se mantienen constantes.

4.1314 Peso Molecular

El peso molecular del polímero tiene un efecto significativo en las propiedades reológicas y eléctricas tales como viscosidad, tensión superficial, conductividad y fuerza dieléctrica. Generalmente se utilizan polímeros de altos pesos moleculares ya que proveen la viscosidad necesaria para la formación de fibras. Se ha observado que

soluciones de polímeros con muy bajo peso molecular tienden a formar grumos, mientras que soluciones con polímeros de muy alto peso molecular forman largas fibras de mayor diámetro en promedio.

El peso molecular de un polímero refleja el grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas en una solución y por tanto, la viscosidad de la solución. El entrecruzamiento de las cadenas juega un papel importante en el proceso de electrohilado. Por lo tanto, aún cuando la concentración del polímero es baja, polímeros como el HM-PLLA (poli-L-ácido láctico de alto peso molecular) pueden mantener suficiente entrecruzamiento entre las cadenas para asegurar un buen nivel de viscosidad y producir fibras uniformes restringiendo los efectos de la tensión superficial, que influye para que no se formen grumos.

Sin embargo, los altos pesos moleculares no son siempre esenciales para el electrohilado en caso de que existan suficientes interacciones intermoleculares que puedan sustituir la conectividad intercadena [34, 35].

4.1315 Conductividad

Una amplia variedad de polímeros son conductores por lo que los iones cargados en la solución polimérica tienen una gran influencia en la formación del hilo expulsado. La conductividad de la solución está principalmente determinada por el tipo de polímero empleado, el solvente utilizado, y la disponibilidad de sales que se pueden

ionizar. Se ha encontrado que al aumentarse la conductividad eléctrica de la solución, se presenta una disminución significativa en el diámetro de la nanofibras mientras que a bajas conductividades de la solución, resulta una elongación deficiente del hilo expulsado, formando fibras no uniformes que incluso pueden llegar a tener grumos.

Diversos grupos de investigación han comprobado que el radio del hilo expulsado de la solución polimérica varía inversamente a la raíz de la conductividad eléctrica de la solución [28-29, 36-38].

Los polímeros naturales son generalmente polielectrolitos, es decir que su unidad de repetición es un grupo electrolito que es el que tiene iones libres y hace al polímero conductor eléctrico, un ejemplo de esto es la gelatina. Los iones aumentan la capacidad de carga del chorro o hilo expulsado, con lo que se somete a una mayor tensión con el campo eléctrico aplicado. Por lo que la capacidad de la gelatina para la formación de fibras es mucho menor comparada con la de los polímeros sintéticos.

Con el uso de sales, la uniformidad de las fibras aumenta y disminuye la generación de grumos. Zong y colaboradores [38] demostraron el efecto de los iones en la morfología y los diámetros de las fibras por electrohilado adicionando sal iónica como KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , y NaCl que produjeron fibras sin grumos de menor diámetro en un rango de 200 a 1000 nm.

4.132 Parámetros del Proceso

4.1321 Velocidad de Flujo

La velocidad de flujo desde la jeringa es un parámetro importante de proceso ya que determina la velocidad del chorro expulsado y la velocidad de salida de materia de la jeringa. Una velocidad de flujo baja es deseable para dar tiempo suficiente al solvente para su evaporación. También se ha observado que a altas velocidades de flujo las fibras obtenidas contienen grumos debido a la incapacidad de un secado apropiado del solvente antes de alcanzar el colector.

4.1322 Voltaje Aplicado

Solamente hasta alcanzar el voltaje de umbral ocurre la formación de fibras ya que se induce la carga necesaria en la solución con el campo eléctrico para iniciar el proceso de electrohilado. Se ha probado experimentalmente que la forma de la gota inicial cambia con las condiciones o parámetros (viscosidad, velocidad de flujo y voltaje).

Existe un desacuerdo en la literatura respecto al efecto del voltaje aplicado en el diámetro de las fibras. Reneker y Chun demostraron que no hay muchos cambios en el diámetro de las fibras de óxido de polietileno al variar el campo eléctrico [39]. Zhang, Demir y colaboradores sugieren que cuando altos voltajes son aplicados hay más expulsión de polímero, lo que facilita la formación de fibras con mayores diámetros [27,

40]. Otros autores han reportado que un aumento en el voltaje aplicado, y por lo tanto aumento en la fuerza del campo eléctrico, aumentan las fuerzas electrostáticas repulsivas en el chorro expulsado, lo que favorece el adelgazamiento del diámetro de la fibra. En la mayoría de los casos, los voltajes altos causan un mayor alargamiento de la fibra debido a las fuerzas Coulómbicas en el chorro, así como también a un campo eléctrico más fuerte. Todo esto resulta en una reducción del diámetro de la fibra y en una rápida evaporación del solvente [7, 31-33, 40-42]. Sin embargo, a muy altos voltajes hay mayor probabilidad de formación de grumos o aglomerados poliméricos. Larrondo y Manley obtuvieron resultados similares [43], mostraron que el diámetro de las fibras se reduce prácticamente a la mitad cuando se dobla el campo eléctrico aplicado.

Concluyendo, se puede afirmar que el voltaje aplicado sí influye sobre el diámetro de la fibra creada por electrohilado, sin embargo su nivel de significancia varía dependiendo de la concentración del polímero en la solución y de la distancia entre la aguja y el colector.

4.1323 Distancia de la aguja al colector

La distancia entre la aguja y el colector ha sido estudiada como otro de los medios de control del diámetro y morfología de fibras en el proceso de electrohilado. Una distancia apropiada es requerida para darles a las fibras tiempo suficiente para

secarse antes de llegar al colector, de otra forma a distancias muy cortas o muy largas se obtienen grumos e incluso gotas de solvente que no se alcanzó a evaporar.

Sin embargo, el efecto de la distancia de la aguja al colector no es tan significativo como otros parámetros, esto se ha observado en diferentes investigaciones con PVA, gelatina, quitosano, entre otros [27, 32, 44-45]. Utilizando seda como polímero funcionalizado con fibronectina, se ha reportado que se obtienen fibras más planas a distancias cortas mientras que aumentando la distancia, se obtuvieron fibras redondeadas [7]. Para la polisulfona distancias pequeñas entre la aguja y el colector formaron fibras muy cortas [46].

Un aspecto físico muy importante en la formación de nanofibras por electrohilado es el secado del solvente utilizado para disolver el polímero en un principio; por esto es necesario encontrar la distancia óptima entre la aguja y el colector para cada solución polimérica para favorecer la evaporación de dicho solvente.

4.133 Tipos de Colectores

En el electrohilado, el colector tiene la función de sustrato conductor donde las fibras son depositadas. Generalmente se utilizan láminas de aluminio como colectores, pero debido a la dificultad de despegar las fibras colectadas o a la necesidad de obtener fibras alineadas para su aplicación, se han utilizado otro tipo de colectores

como papel conductor, tela conductora, mallas de alambre, barras cuadradas o alineadas, barras o ruedas rotatorias, entre otros [32, 47-48].

Wang y colaboradores utilizaron dos tipos de colectores para formar fibras de ácido hialurónico por electrohilado, los colectores fueron una lámina de aluminio y una malla de alambre, y encontraron que las partes menos conductoras de la malla de alambre generan efectos negativos en las fibras debido a que se generaron grumos debido a la menor disponibilidad de área superficial. Sin embargo, en otro estudio compararon la malla de alambre con lámina de aluminio y sin lámina de aluminio y encontraron que la malla de alambre sola es mejor colector porque permite la separación de las fibras de una manera fácil. Por lo que se puede concluir que dependiendo de las necesidades de cada aplicación se debe escoger el tipo de colector en base a las ventajas y desventajas que cada uno ofrece.

Para obtener fibras alineadas es necesario emplear un colector giratorio. El grado de alineación de las fibras está en función del tipo del colector y de la velocidad de rotación. Las nanofibras generadas se depositan en el colector como una masa al azar debido a la inestabilidad de flexión del chorro altamente cargado. Muchos grupos de investigación han demostrado que el uso de un tambor giratorio o rueda rotatoria ayuda a obtener fibras alineadas más o menos paralelas entre sí [5, 33]. También se utilizan diferentes tipos de electrodos para obtener fibras alineadas. Típicamente consisten en

dos sustratos conductores separados por un espacio vacío donde las fibras alineadas son colectadas [47, 49-50].

4.134 Parámetros Ambientales

Además de los parámetros del proceso y de la solución, existen también los parámetros ambientales que incluyen la humedad, la temperatura, etc. Se han realizado estudios para investigar el efecto de la temperatura en fibras de poliamida-6 variando de 25 a 60 °C y se encontró que con el aumento de la temperatura se producen fibras de menores diámetros. Mit-Uppatham y colaboradores atribuyeron esta reducción en el diámetro a la disminución de la viscosidad de las soluciones poliméricas a altas temperaturas ya que existe una relación inversa entre viscosidad y temperatura [51].

Se ha estudiado la variación de la humedad durante el electrohilado de poliestireno y se ha demostrado que al aumentar la humedad ambiental se presenta una aparición de pequeños poros circulares en la superficie de las fibras, aumentando aún más la humedad se obtienen poros que se unen [52]. También se ha encontrado que en ambientes casi secos o de muy poca humedad, un solvente volátil se evapora más rápidamente. A veces la velocidad de evaporación es demasiado rápida, comparada con la eliminación del disolvente en la punta de la aguja que se crea una deficiencia en el proceso de electrohilado al taparse la aguja después de pocos minutos de haber empezado el proceso [53]. Aunque otros investigadores, también han sugerido que

ambientes muy húmedos pueden ayudar a la descarga de las fibras [50, 54]. Por lo anteriormente explicado, los parámetros ambientales también afectan el proceso de electrohilado.

4.14 Disolventes utilizados en Electrohilado

El solvente utilizado para preparar las soluciones poliméricas ejerce una influencia significativa en la capacidad del proceso de formar fibras satisfactorias. El primer paso preliminar en el proceso, es la disolución del polímero en un solvente adecuado. Es recomendable que los solventes empleados tengan propiedades como buena volatilidad, presión de vapor, punto de ebullición y deben mantener la integridad de la solución polimérica. Por lo tanto, para lograr un proceso de electrohilado exitoso la selección acertada del solvente es indispensable. Las interacciones intermoleculares entre un polímero y el solvente (sistema binario) solo pueden ser atractivas o repulsivas, lo que depende únicamente del tipo de solvente.

En electrohilado, la evaporación rápida del solvente y la separación de fases ocurre debido al adelgazamiento del chorro expulsado. La presión de vapor del solvente posee un papel crítico en la determinación de la tasa de evaporación y el tiempo de secado. La volatilidad del solvente también es importante para la formación de las nanoestructuras, ya que posee gran influencia en el proceso de separación de fases.

Diversos grupos de investigación han investigado los efectos del solvente, entre estos, cloroformo, etanol, agua, dimetilformamida (DMF), mezcla de ácido trifluoroacético, diclorometano y agua, y han estudiado los efectos de las propiedades de estos solventes y de la concentración del polímero en la morfología, estructura y propiedades mecánicas y térmicas durante el electrohilado [55]. Es bien conocido que la morfología y tamaño de las nanofibras dependen fuertemente de las propiedades de la solución como viscosidad y tensión superficial. El solvente puede contribuir a diversos valores de tensión superficial. En la Tabla 2 se muestran diversos solventes que han sido utilizados en electrohilado y el tamaño de diámetro que se han obtenido para su aplicación específica. La viscosidad de la solución está determinada por la concentración del polímero, pero el valor de la tensión superficial depende tanto del polímero como del solvente [8].

Las propiedades de los solventes poseen un profundo efecto en el diámetro de la fibra. En la Tabla 3 se muestran diversas propiedades de algunos solventes importantes en esta técnica. Fundamentalmente el solvente tiene dos funciones cruciales en electrohilado, la primera es disolver las moléculas del polímero para formar el chorro electrificado que se expulsa de la aguja, y la segunda es llevar a dichas moléculas disueltas hasta el colector.

Tabla 2. Solventes utilizados en Electrohilado [21]

<i>Solvente</i>	<i>Polímero</i>	<i>Diámetro Fibras (nm)</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Referencias</i>
Agua	Seda/PEO	590±60	Ingeniería de Tejidos en huesos	107
Ácido fórmico / acético	Gelatina	109-761	Biomaterial, andamio	115
HFP ^a	Colágeno I	100-600	Ciencia de Materiales e Ingeniería	65
HFP ^a	Colágeno II	496	Ingeniería de cartílagos	66
Ácido fórmico	Gelatina /PVA	133-147	Liberación de Fármacos	116
Ácido acético	Quitosano	130	Aplicaciones biomédicas	45
Agua	PVA	250-300	Liberación de fármacos	117
Ácido Fórmico, TFA ^b , HCl	Quitosano/ PVA	330	Ingeniería de Tejidos	109
Acetona, DMF ^c , trifluoroetileno (3:1:1)	Acetato de Celulosa	200-1000	Filtración	118
DMF ^c / Agua	HA/Gelatina	190-500	Ingeniería de Tejidos	106
HFP ^a	Fibrinogeno	80±30	Cicatrización de Heridas	83
m-Cresol/ Ácido fórmico	Poliamida-6	98.3±8.2	Aplicaciones biomédicas	29
Agua	Poliuretano	100-500	Ingeniería de Tejidos	74
DMF ^c / cloruro de metileno	Policaprolactona	200	Cicatrización de heridas	75
HFP ^a /TFA ^b	Colágeno/ Quitosano	300-500	Andamio biomaterial	76
HFP ^a	Quitina	163	Cicatrización de heridas	77
TFE ^d	PCL/ Gelatina	470±120	Cicatrización de heridas	23
HFP ^a	Polianilina/ Gelatina	61±13	Ingeniería de Tejidos	78

^a HFP hexafluoro isopropanol

^b TFA trifluoro ácido acético

^c DMF dimetil formamida

^d TFE trifluoroetileno

Tabla 3. Propiedades de los Solventes comunes empleados en Electrohilado

Solventes	Tensión Superficial (mN/m)	Constante Dieléctrica	Punto de Ebullición (°C)	Densidad (g/ml)
Cloroformo	26.5	4.8	61.6	1.498
Dimetilformamida	37.1	38.3	153	0.994
Hexafluoro isopropanol	16.1	16.7	58.2	1.596
Tetrahidrofurano	26.4	7.5	66	0.886
Trifluoro etanol	21.1	27	78	1.393
Acetona	25.2	21	56.1	1.786
Agua	72.8	80	100	1.000
Metanol	22.3	33	64.5	0.791
Ácido acético	26.9	6.2	118.1	1.049
Ácido fórmico	37	58	100	1.210
Dicloro metano	27.2	9.1	40	1.326
Etanol	21.9	24	78.3	0.789
Trifluoro ácido acético	13.5	8.4	72.4	1.525

4.15 Fuerzas Intermoleculares

Existen dos clases de fuerzas intermoleculares: interacciones dipolo-dipolo y fuerzas de Van der Waals. Las interacciones dipolo-dipolo es la atracción que ejerce el extremo positivo de una molécula polar por el negativo de otra semejante. En el cloruro de hidrógeno, por ejemplo, el hidrógeno relativamente positivo de una molécula es atraído por el cloro relativamente negativo de otra.

$$\overset{\delta+}{\text{H}}-\overset{\delta-}{\text{Cl}} \cdots \overset{\delta+}{\text{H}}-\overset{\delta-}{\text{Cl}}$$

Como resultado de esta interacción dipolo-dipolo, las moléculas polares por lo general se unen entre si mas firmemente que las no polares de peso molecular comparable; esta diferencia entre la intensidad de las fuerzas intermoleculares se refleja en las propiedades físicas de los compuestos implicados. [56]

Los puentes de hidrógeno son un tipo de atracción dipolo-dipolo particularmente fuerte, en el cual un átomo de hidrógeno sirve como puente entre dos átomos electronegativos, sujetando a uno con enlace covalente, y al otro, con fuerzas puramente electrostáticas. Cuando un hidrógeno se encuentra unido a un átomo muy electronegativo, la nube electrónica se distorsiona considerablemente hacia éste, exponiendo el núcleo del hidrógeno. La fuerte carga positiva del escasamente protegido núcleo del hidrógeno es atraída por la carga negativa del átomo electronegativo de una segunda molécula. Esta atracción tiene una fuerza de unas 5kcal/mol, por lo que es mucho mas débil que el enlace covalente (50-100 kcal/mol) que lo mantiene unido al primer átomo electronegativo. Es, sin embargo, bastante más fuerte que otras atracciones dipolo-dipolo. Para que un enlace por puente de hidrógeno sea importante, ambos átomos electronegativos deben ser del grupo F, O, N ya que solo estos tres son suficientemente negativos para que exista la atracción necesaria. [56] Dos moléculas de agua pueden formar puentes de hidrógeno como se muestra en la Figura 5 a continuación.

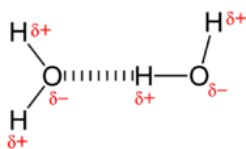


Figura 5. Puentes de Hidrógeno entre dos moléculas de agua

Las fuerzas de Van der Waals corresponden a las interacciones entre moléculas con enlaces covalentes apolares debido a fenómenos de polarización temporales. Estas fuerzas se explican de la siguiente forma: como las moléculas no tiene carga eléctrica neta en ciertos momentos se puede producir una distribución en la que hay mayor densidad de electrones en una región que en otra, por lo que aparece un dipolo momentáneo. Cuando dos de estas moléculas polarizadas y orientadas convenientemente se acercan lo suficiente entre ambas, puede ocurrir que las fuerzas eléctricas atractivas sean lo bastante intensas como para crear uniones intermoleculares. Estas fuerzas de corto alcance son muy débiles y se incrementan con el tamaño de las moléculas. [56]

Particularmente en el caso del uso del 2, 2, 2-trifluoroetanol como solvente de polímeros tal como el colágeno, cabe mencionar que la presencia de un átomo tan electronegativo como es el flúor permite formar puentes de hidrógeno con la secuencia de aminoácidos que forman al colágeno como son la glicina, prolina, hidroxiprolina, etcétera, ya que poseen hidrógenos unidos covalentemente al oxígeno.

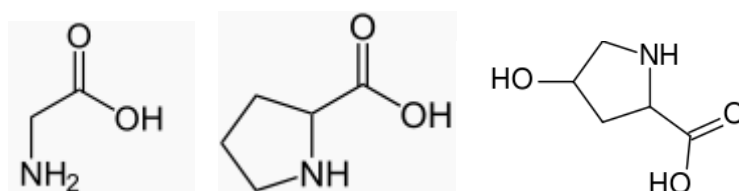


Figura 6. Moléculas de glicina prolina e hidroxiprolina

4.2 Caracterización de Fibras preparadas por Electrohilado

La caracterización de fibras producidas por el proceso de electrohilado es una de las más difíciles tareas, ya que no son aplicables las técnicas convencionales de caracterización de materiales para estudiar una sola fibra. Para entender los resultados obtenidos mediante el proceso, los estudios deben ser realizados con precisión, desde la selección del polímero hasta las pruebas mecánicas. Generalmente, los polímeros utilizados son caracterizados en tres categorías diferentes, física y estructural, mecánica y química. Actualmente, las nanofibras han atraído gran interés de los investigadores debido a sus características estructurales en la escala micro y nanométrica, elevada área superficial, pequeños tamaños de poro, y la posibilidad de producirlas en estructuras de tres dimensiones que permitan el desarrollo de materiales avanzados con aplicaciones sofisticadas.

4.2.1 Caracterización Geométrica

La caracterización física esta asociada con la estructura y morfología de la muestra, y la estructura interna de la nanofibras básicamente determina las propiedades físicas y mecánicas. Las propiedades geométricas de las nanofibras incluyen el diámetro de la fibra, distribución de diámetros, orientación y morfología de las fibras, como la forma de la sección transversal y la rugosidad de la superficie. Para la caracterización de las propiedades geométricas se utilizan técnicas tales como Microscopía Electrónica de

Barrido (MEB), Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM, por sus siglas en inglés), Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).

La Microscopía Electrónica de Barrido ha sido utilizada por muchos investigadores para observar la morfología de las fibras producidas, debido a que el SEM tiene la capacidad de detectar el tamaño de diámetros y la morfología; sin embargo su resolución disminuye en magnificaciones extremas. Como requisito para que las muestras puedan ser analizadas por SEM, es importante que puedan conducir electricidad, por tanto, para la mayor parte de las fibras poliméricas producidas es necesario recubrirlas con una capa delgada de oro o platino, lo que podría alterar las lecturas del diámetro a magnificaciones muy altas. A pesar de esto, SEM es un método rápido y efectivo que permite observar las fibras producidas con un tamaño de muestra muy pequeño.

Otra alternativa para obtener los diámetros de fibras extremadamente delgadas, menores de 300 nm, es la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) es otra de las técnicas utilizada para determinar los diámetros pero el proceso de obtener medidas acertadas es muy difícil debido a la convolución de la punta del equipo. Sin embargo, AFM es el mejor instrumento para observar cualquier tipo de morfología superficial permitiendo hacer descripciones exactas de la superficie de la fibra.

Doshi y Reneker [5] utilizaron un método de difracción de luz láser para observar la disminución del diámetro en el chorro polimérico expulsado hasta volverse más pequeño que la frecuencia de la luz visible.

Para obtener información respecto a la cristalinidad de la muestra es necesario utilizar otra forma de caracterización como Microscopía de Luz Polarizada, que es el método más sencillo y la determinación se hace en base a la cantidad de birrefringencia producida [57, 58]. La Microscopía de Luz Polarizada es una prueba barata y rápida que puede ser llevada a cabo en las fibras colectadas.

Otros grupos de investigación han utilizado varias de las otras alternativas para determinar la cristalinidad de las nanofibras producidas con diferentes niveles de éxito. Estos métodos necesitan un valor de cristalinidad conocido como referencia para ser comparado con la cristalinidad del material estudiado. Dichos métodos alternativos son Difracción de Rayos X, de ángulo amplio (WAXS, por sus siglas en inglés) y de ángulo pequeño (SAXS, por sus siglas en inglés), así como Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB). Algunas técnicas como Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (XPS, por sus siglas en inglés), Espectroscopía de Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR) son también utilizadas para determinar la química superficial de las fibras electrohiladas.

La porosidad es otro parámetro geométrico que, junto con el tamaño de poro de la membrana de nanofibras, es importante para la aplicación ya sea en filtración,

andamio para ingeniería de tejidos, ropa protectora, etc. La medición de tamaño de poro puede llevarse a cabo mediante un porosímetro de mercurio de flujo capilar. Diversos grupos de investigación han reportado en andamios fibrosos hechos por electrohilado resultados favorables tales como una porosidad del 91.63%, un volumen total de poros de 9.69 mL/g, un área total de 23.54 m²/g y un diámetro de poros en un rango de 2 a 465 μm. En andamios fabricados por electrohilado con poros de tamaño pequeño se presenta el inconveniente de no ser adecuados para la infiltración o migración celular. Por este motivo, Lee y colaboradores han combinado la técnica de electrohilado con métodos de lixiviación con sal y formación de espuma con gas resultando en un andamio fibroso con dualidad de poros: los formados entre nanofibras y los micro-poros creados por las partículas de sal que se distribuyen en el andamio [58].

4.211 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Una vez obtenidas las membranas fibrosas de colágeno se prosiguió a caracterizarlas, analizando el tamaño promedio de los diámetros de las fibras y las características morfológicas de las membranas fibrosas mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL 5410LV donde se utilizó un haz de electrones de 15kV de intensidad a alto vacío.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial al proporcionar información morfológica del

material analizado. El microscopio electrónico de barrido obtiene imágenes de la muestra mediante un patrón de escaneo con un haz de electrones de alta energía. Los electrones interactúan con los átomos que conforman la muestra produciendo señales que contienen información sobre la topografía de la superficie, la composición y algunas otras propiedades de la muestra tales como la conductividad eléctrica.

Los tipos señales producidos por este microscopio incluyen electrones secundarios, los electrones retrodispersos (BSE), rayos X característicos, luz (catodoluminiscencia), electrones actuales y de transmisión. Los detectores de electrones secundarios son comunes en la mayoría de los equipos; sin embargo es difícil que un solo equipo posea detectores para todas las señales posibles. Dichas señales resultan de la interacción del haz de electrones con los átomos en la superficie de la muestra o muy cerca de ella. Un microscopio electrónico de barrido es capaz de proporcionar imágenes de muy alta resolución (inferior a 1 nm) en su modo estándar de detección; imagenología de electrón secundario (SEI) [59-61]. Las partes principales de un microscopio electrónico de barrido se muestran a continuación en la Figura 5.

Los electrones retrodispersos son aquellos electrones del haz que se reflejan de la muestra por dispersión elástica. Este tipo de electrones provee información sobre la distribución de diferentes elementos en la muestra; por esta razón es importante cubrir la muestra con una capa fina de oro-paladio (Au-Pd) o carbono, de entre 5 y 10 nm de

espesor, ya que de otra manera sería muy difícil poder observar con claridad los detalles de la muestra analizada.

Los rayos X característicos son emitidos cuando el haz de electrones expulsa un electrón de la muestra ocasionando que un electrón de mayor nivel energético ocupe dicho lugar liberando energía de esta manera en forma de los rayos X. Estos rayos son empleados para identificar la composición así como medir la abundancia de ciertos elementos en la muestra [61].

Debido a que el haz de electrones es muy estrecho, las micrográficas SEM poseen una gran profundidad de campo mostrando una apariencia tridimensional, útil para la comprensión de la estructura superficial de la muestra. Es posible aplicar un amplio rango de magnificaciones desde 10 veces rebasando hasta 500 000 veces [62].

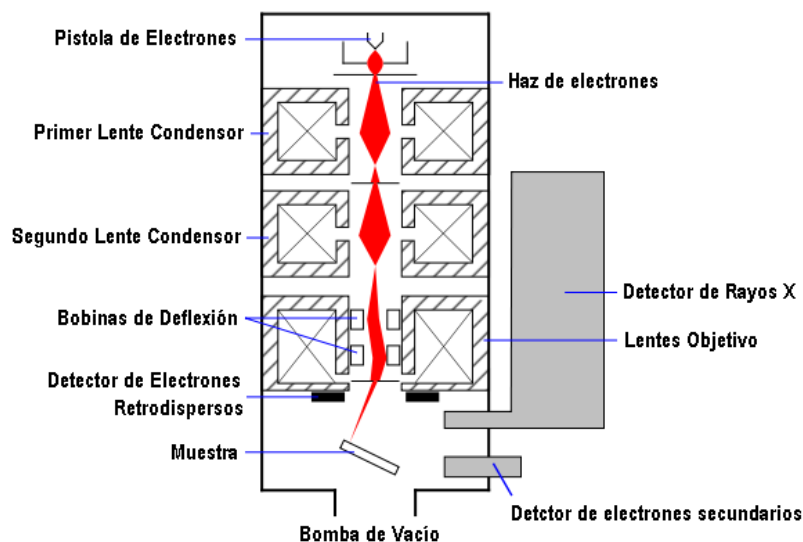


Figura 5. Esquema de las partes de un microscopio electrónico de barrido. Adaptado de

Fuente [63]

4.22 Caracterización Química

La caracterización de la estructura molecular de una nanofibra puede ser realizada mediante las técnicas de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) y mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Si dos polímeros son mezclados en la fabricación de nanofibras, es posible detectar tanto la estructura de estos dos materiales como las interacciones intermoleculares.

La estructura supermolecular está relacionada con la configuración de las macromoléculas en una nanofibras, y se caracteriza por birrefringencia óptica, difracción de Rayos X de ángulo amplio (WAXD), dispersión de Rayos X de ángulo pequeño (SAXS) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Las propiedades superficiales de las fibras pueden ser evaluadas por su carácter hidrófilo, el cual puede ser evaluado mediante la medición del ángulo de contacto de la membrana con el agua, o también por Espectroscopía de Fotoelectrón de Rayos X (XPS). Algunos investigadores han utilizado incluso la Espectroscopía de Raman e Infrarrojo con Transformada de Fourier para los cambios que pueden presentarse a nivel molecular.

4.221 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Aplicando la técnica de pellet de KBr en un equipo Perkin- Elmer FTIR espectrofotómetro de espectro GX, se obtuvieron los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier.

La espectroscopía de infrarrojo abarca la región de infrarrojo del espectro electromagnético. Se emplea principalmente para identificar grupos funcionales. Los equipos con transformada de Fourier obtienen espectros infrarrojo de la absorción, emisión, superconductividad o dispersión Raman de una muestra.

La región infrarroja del espectro electromagnético abarca la parte cercana (longitud de onda $\lambda=14000-4000\text{ cm}^{-1}$), media ($\lambda=4000-400\text{ cm}^{-1}$) y lejana ($\lambda=400-10\text{ cm}^{-1}$). El principio de esta técnica se basa en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración. Una molécula absorbe la energía de un haz de luz IR cuando dicha energía incidente es igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Por tanto, la molécula vibra de una cierta forma gracias a la energía que se le suministra mediante luz IR.

En la Figura 6 se muestran algunos ejemplos de las vibraciones que sufren las moléculas al ser excitadas por energía IR. Cuando la energía que excita a las moléculas posee una longitud de onda perteneciente al infrarrojo cercano, las moléculas pueden presentar vibraciones armónicas o sobretonos. Si dicha energía se encuentra dentro del infrarrojo medio las vibraciones fundamentales que se presentan en las moléculas son

principalmente rotacionales-vibracionales; Mientras que en el infrarrojo lejano se presentan vibraciones rotacionales. [61, 64]

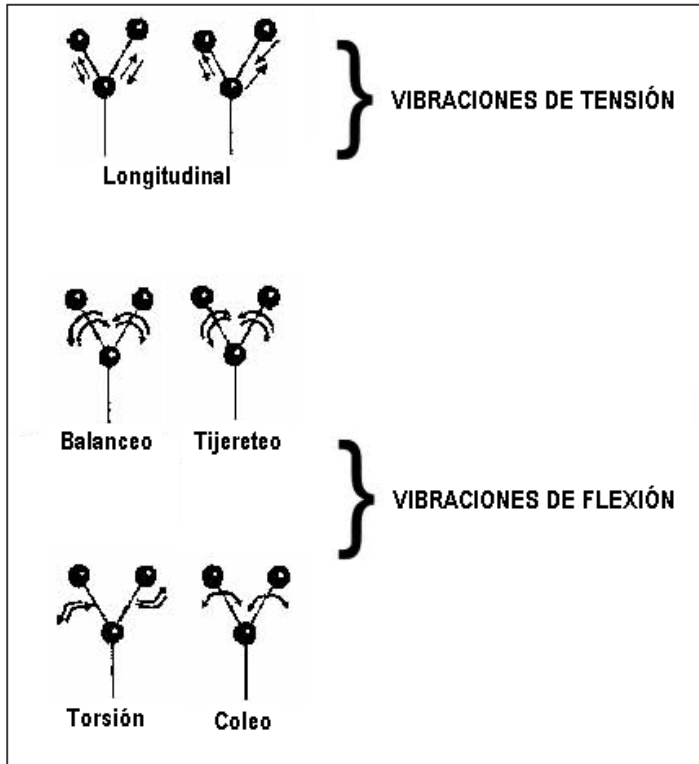


Figura 6. Ejemplos de vibraciones fundamentales de las moléculas [56]

4. 23 Caracterización Mecánica

La medición precisa de las propiedades mecánicas de las fibras de la membrana es crucial, especialmente para aplicaciones en biomedicina, como en andamios. Ya que es necesario que estos sean capaces de soportar las fuerzas ejercidas por el tejido creciente o por las actividades fisiológicas y biomecánicas relacionadas, como el pulso de la circulación sanguínea. La caracterización mecánica se lleva a cabo aplicando pruebas de tensión a muestras ultrafinas de membranas no tejidas. Durante la

caracterización mecánica, se debe tener especial cuidado al montar la muestra para no provocar daños que se reflejen en resultados erróneos.

Diferentes posibilidades se han empleado para caracterizar mecánicamente las membranas fabricadas por electrohilado, tales como nanoindentación, pruebas de doblado, medidas de frecuencia de resonancias y micropruebas de tensión. Se ha encontrado que cuando las fibras entretejidas son colectadas en una placa metálica estática, no se encuentran diferencias en sus propiedades independientemente de la dirección que se estudie (isotrópicas). Sin embargo, en fibras no tejidas colectadas en un dispositivo rotor las propiedades mecánicas varían dependiendo de la dirección estudiada (anisotrópicas), ya que la alineación de las fibras depende de la velocidad linear de giro del colector, así como de las características de su superficie y otros parámetros de la técnica de electrohilado.

Propiedades como el módulo de elasticidad de Young, la resistencia a la tracción y la tensión a la ruptura son determinadas al realizar pruebas de tensión en las fibras. La resistencia a la tracción de varios polímeros se presenta en la Tabla 4. Las pruebas de tensión para determinar la fuerza mecánica de las nanofibras por electrohilado simplemente obedecen estándares en macroescala e involucra el menor número de supuestos necesarios para obtener las propiedades del material. Este método es útil para fibras con diámetros de aprox. 1 μm y permite realizar la prueba de tensión hasta la falla mecánica.

Las propiedades elásticas del material son determinadas por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), que consiste en un ensamble de cantílever o palanca y una punta que es utilizada para la exploración de la superficie de la muestra. Al medir la deflexión del cantílever debido a la repulsión que se presenta al entrar la punta en contacto con cortezas atómicas, es posible obtener una resolución atómica con un contacto muy ligero. Las imágenes obtenidas por AFM permiten la detección de variaciones en la composición y dureza de las membranas estudiadas. Ha sido posible calcular los módulos de flexión y cortante mediante AFM y realizando ensayos de flexión micromecánica en fibras poliméricas formadas por la técnica de electrohilado [65]. El método de la nanoindentación basado en AFM es utilizado para calcular el módulo de elasticidad en estructuras de una dimensión tales como fibras por electrohilado. A pesar de que éste método ha arrojado resultados exitosos para caracterizaciones mecánicas, también posee ciertas limitantes como la incertidumbre derivada de la forma de la punta del nanoindentador y la configuración relativa entre la punta y la fibra, así como la fuerza de adhesión entre la muestra y el indentador.

Tabla 4. Fuerza Mecánica de algunas fibras poliméricas electrohiladas

Polímeros	Resistencia a la Rotura	Referencias
Colágeno II	3.3±0.3 MPa	66
Poli ε-caprolactona	40±10 MPa	67
Gelatina	4.79 MPa	68
Gelatina entrecruzada	12.62±1.28 MPa	4
Fibroína de Seda	7.25 MPa	69
Poliuretano/ Policloruro de vinilo (75:25)	6.3 MPa	70
Polióxido de etileno	10±0.2 MPa	62

4.3 Aplicaciones de las Fibras preparadas por Electrohilado

Recientemente las aplicaciones que se les han dado a las fibras y matrices preparadas por electrohilado han sido muy diversas debido a que proporcionan diferentes ventajas como una muy alta porosidad, cociente superficie y volumen alto, mejoradas propiedades físico-mecánicas, con respecto a fibras formadas por otros métodos, ya que es posible manipular diversos parámetros del proceso para obtener la morfología y fuerza mecánica deseadas. En adición a lo anterior, las fibras por electrohilado se necesitan en pequeñas cantidades y el proceso es muy versátil, ya que se puede utilizar una gran variedad de polímeros así como colectarlos en cualquier forma deseada.

Las fibras electrohiladas son ampliamente aplicadas en biomedicina como andamios para ingeniería de tejidos, en curación de heridas, liberación de fármacos, filtración, membranas de afinidad, inmovilización de enzimas, implantes vasculares de injerto de diámetros menores, cuidados para la salud, biotecnología, ingeniería ambiental, defensa y seguridad, generación y almacenamiento de energía, y otras investigaciones en curso [71-73]. En la Figura 8 se resumen las aplicaciones más comunes del electrohilado.

Las nanofibras poliméricas electrohiladas han sido propuestas en aplicaciones de prótesis vasculares y de mama desde 1980. Desde entonces, se han emitido diversas patentes sobre métodos de fabricación y técnicas de electrohilado para estas prótesis en

los Estados Unidos de América [79-80]. Es posible notar que aproximadamente dos tercios de las aplicaciones del electrohilado en las patentes es en el área biomédica.

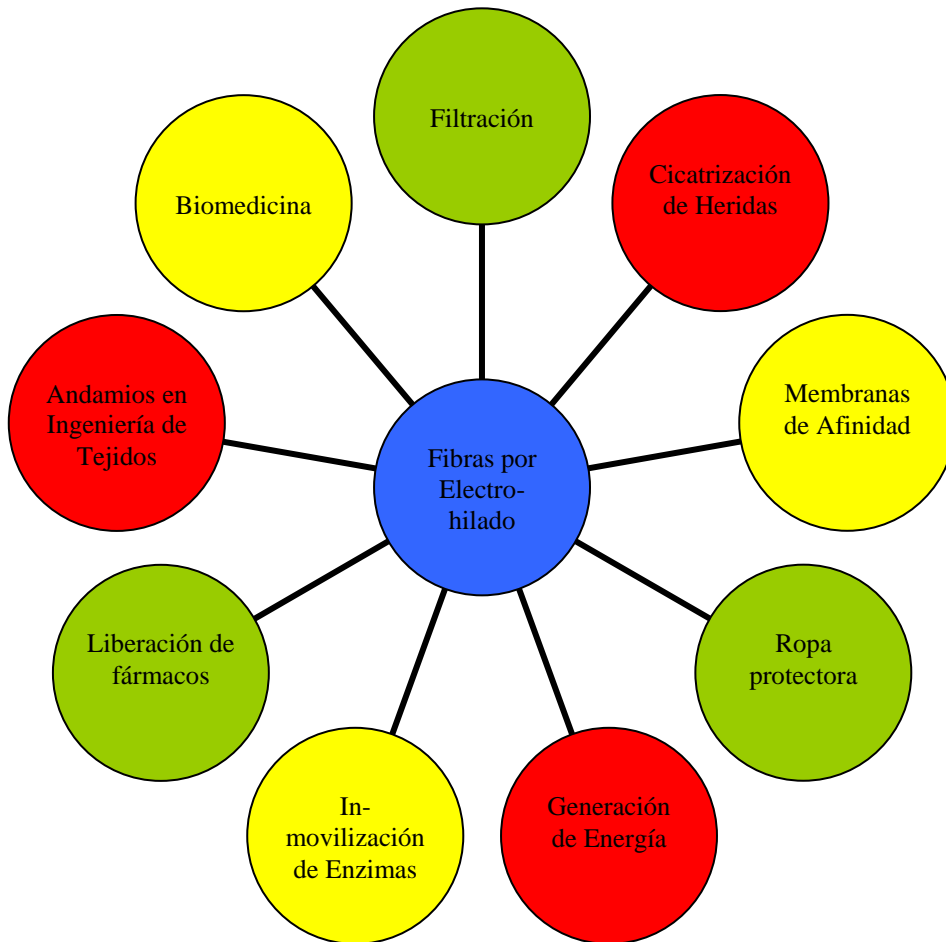


Figura 8. Aplicaciones de las fibras electrohiladas en diferentes sectores.

4.31 Aplicaciones Biomédicas

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario que combina los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que permitan la restauración, mantenimiento o mejora de determinadas

funciones del tejido. La investigación en biomateriales es un área nueva que posee un papel fundamental en la ingeniería de tejidos fungiendo como matrices para crecimiento celular, proliferación y formación de nuevo tejido en tres dimensiones.

Comparado con otros métodos de formación de fibras, el electrohilado ofrece ser una técnica simple y económica para producir andamios fibrosos en la escala submicrométrica con posibilidad de una estructura porosa interconectada.

4.311 Andamios para la Ingeniería de Tejidos

Un andamio biodegradable es generalmente indispensable para un tejido vivo, ya que son utilizados como plantillas temporales para la siembra, invasión, proliferación, diferenciación y regeneración de tejido biológicamente funcional o de la matriz extracelular. Se ha presentado un notable aumento en el uso de la técnica de electrohilado para crear estos andamios, debido a que existe una diversidad de reportes donde se comprueba que estos andamios promueven de una manera positiva las interacciones entre las células y la matriz, así como de las células entre sí. De igual manera, los diámetros de las fibras electrohiladas son de tamaño similar a las fibrillas naturales presentes en la matriz extracelular, de esta forma se imita el ambiente natural del tejido y se demuestra la efectividad que se aporta como sustrato para crecimiento celular.

El electrohilado se ha convertido en el método más utilizado para la preparación de estos andamios fibrosos, empleando con alta frecuencia los polímeros naturales ya que aumentan la biocompatibilidad y mejoran aspectos biofuncionales. Algunos ejemplos de polímeros naturales son el colágeno, alginato de algas, proteína de seda, ácido hialurónico, quitosano, fibrinógeno, almidón, entre otros. Es posible utilizar polímeros naturales por sí mismos para crear los andamios pero también mezclarlos con polímeros sintéticos mejorando la citocompatibilidad del andamio formado. Las fibras electrohiladas de diversos polímeros han sido consideradas como andamios para la ingeniería de tejidos utilizándolas en cartílago, piel, huesos, vasos arteriales sanguíneos, corazón, nervios, entre otros [10, 41, 48, 81]. Además de los polímeros naturales, un copolímero considerado especialmente bueno para electrohilado es el Poliácido láctico-co-glicólico (PLGA) ya que posee una porosidad mayor al 90% permitiendo que exista una mayor fijación celular por su gran área superficial, pero también por la presencia de diversos puntos focales de adhesión en diferentes fibras debido a sus diámetros en escala nanométrica.

Recientemente se ha presentado un gran aumento en la incorporación de células madre o células medulares en estrategias de regeneración de cartílago y hueso debido a su capacidad de poderse diferenciar en múltiples linajes celulares. Es por esto que es común sembrar dichas células en los andamios fibrosos creados por electrohilado

ya que promueven la adhesión, proliferación y diferenciación de linajes adipogénico, condrogénico o osteogénico basados en el medio de cultivo seleccionado.

Sin embargo, las matrices fibrosas para ingeniería de tejidos presentan la desventaja de poseer muy pequeños tamaños de poros que impiden la infiltración celular dentro de la matriz. Esto provoca la obtención de tejidos bidimensionales que no cumplen con la simulación del microambiente fisiológico de tejido tridimensional, limitando en desarrollo de órganos artificiales.

4.312 Apósitos, para la Cicatrización de Heridas

El recubrimiento ideal para cicatrizar una herida debe tener ciertas características como capacidad hemostática, que son los mecanismos que detienen los procesos hemorrágicos, eficacia como barrera bacteriana, capacidad de absorber excesos de líquidos exudados como fluidos de la herida o pus, transmisión apropiada entre agua y vapor, habilidad para intercambios gaseosos, capacidad de ajustarse al contorno de la herida, adhesión funcional, es decir, adherencia a tejidos sanos pero no al tejido herido, indoloro para el paciente, capacidad de removerse con facilidad y finalmente que sea de bajo costo.

En la actualidad, el uso de nanofibras poliméricas como recubrimientos médicos para las heridas, aún se está investigando; sin embargo los materiales electrohilados cumplen con la mayoría de las características necesarias para ser

utilizados como apósitos debido a su estructura y citocompatibilidad [42, 82-84]. Rho y colaboradores [81] investigaron las propiedades del colágeno tipo I como apósito para la cicatrización de heridas en ratones. Se obtuvieron buenos resultados al utilizar recubrimientos nanofibrosos de colágeno, especialmente en las primeras etapas del proceso de curación.

4.313 Liberación de Fármacos

La liberación controlada de fármacos a una determinada velocidad en un periodo de tiempo definido es posible utilizando matrices poliméricas biocompatibles para la liberación de agentes terapéuticos, siendo los polímeros biodegradables los más usados ya que pueden ser fácilmente diseñados para la difusión programada de forma controlada. Las membranas nanofibrosas han sido aplicadas en sistemas de liberación de fármacos debido a sus características altamente funcionales y porque el sistema de liberación se basa en el principio de que la velocidad de disolución de una partícula aumenta cuando se incrementa el área superficial del fármaco y del portador correspondiente.

Es importante destacar que la gran área superficial asociada con las fibras electrohiladas permite la evaporación rápida y eficiente del solvente, lo que proporciona al fármaco incorporado un tiempo limitado para recristalizarse, favoreciendo la formación de dispersiones amorfas o soluciones sólidas. Dependiendo del portador

polimérico empleado, la dosis farmacéutica puede ser diseñada para liberarse inmediatamente, rápida o lentamente, o en disolución modificada. Muchos investigadores han encapsulado fármacos exitosamente en fibras electrohiladas mezclando el fármaco en la solución polimérica previa al proceso de electrohilado [42, 85-86]. Ejemplos de los fármacos que se utilizaron son: ibuprofeno, cefazolina, rifampicina, paclitaxel, itraconazol y los medicamentos hidrofílicos como mefoxin y clorhidrato de tetraciclina, e incluso algunas proteínas.

Además del proceso normal de electrohilado, otra manera de desarrollar nanofibras poliméricas cargadas de algún fármaco es mediante el uso del electrohilado coaxial donde, a través de este proceso, se ha logrado encapsular varios tipos de fármacos médicamente puros [14].

4.32 Filtración

Las membranas poliméricas han sido utilizadas en aplicaciones de filtración por más de una década. En filtración, los canales y elementos estructurales de un filtro deben coincidir con la escala de partículas o gotas que serán capturadas en el filtro. Por lo tanto, es posible tomar ventaja de las propiedades únicas de las membranas electrohiladas que consisten en fibras de diámetros muy pequeños. Por lo anterior, se ha notado que el electrohilado proporciona solución a la dificultad de remover partículas en rangos submicrométricos. Generalmente debido al elevado cociente entre área

superficial y volumen, y la elevada cohesión superficial resultante, es posible atrapar fácilmente partículas pequeñísimas menores a 0.5 μm en las estructuras de los filtros nanofibrosos electrohilados. Membranas electrohiladas no tejidas han sido aplicadas con éxito en el desarrollo de filtros de aire de alto rendimiento. Las membranas nanofibrosas muestran una eliminación muy eficaz de partículas con diámetros entre 1 y 5 μm ; no solo debido al mecanismo físico de atrapamiento, sino también por la captura electrocinética del filtro [73, 87].

Las membranas pueden ser cargadas electrostáticamente para modificar su habilidad de atracción electrostática sobre las partículas, con la finalidad de incrementar posteriormente la eficiencia de filtración al integrar la carga y el hilado de las fibras en un solo paso [88]. La eficiencia de la filtración, que está estrechamente relacionada con la finura de las fibras, es una de las inquietudes más importantes en el rendimiento del filtro. Generalmente, la eficiencia del filtro aumenta linealmente con la disminución del grosor de la membrana filtro y con el aumento de la presión aplicada. Sibbiah y colaboradores afirman que es posible mantener la eficiencia mejorada en filtración bajo la misma caída de presión cuando las fibras poseen diámetros menores a 0.5 μm [89]. En la actualidad existen numerosos ejemplos de trabajos de investigación donde se ha logrado filtrar pequeñas bacterias: *Escherichia coli*, de 0.5 μm de diámetro y 2 μm de largo, y *Estafilococo aureus* con diámetro de 0.5-1 μm ; e incluso en purificación de biomoléculas como el ADN y proteínas [90-91].

4.33 Biosensores y Generación Energética

Ya que la tasa de las reacciones electroquímicas es proporcional al área superficial del electrodo, las membranas poliméricas conductoras tienen potencial en disipación electrostática, anticorrosivos, blindaje electromagnético, dispositivos fotovoltaicos, fabricación de pequeñísimas partes electrónicas tales como sensores, uniones y actuadores, etc. También, debido a su alta porosidad y área superficial total, es posible aplicar las membranas conductoras nanofibras como electrodos porosos para el desarrollo de baterías de alto rendimiento y pilas poliméricas electrolíticas.

Las baterías poliméricas se han desarrollado para su uso en teléfonos celulares reemplazando las voluminosas baterías convencionales de litio. Los componentes de las baterías poliméricas son un ánodo de carbono, un cátodo de óxido de cobalto y litio, y un electrolito polimérico en gel. Este tipo de baterías ofrece notables beneficios como disminución en las fugas de electrolito, flexibilidad y alta densidad energética [92].

Los biosensores, que típicamente consisten en una membrana biofuncional y un transductor, han sido utilizados ampliamente en aplicaciones ambientales, clínicas y alimentarias. Existe una diversidad de parámetros que afectan el funcionamiento de un sensor como la sensibilidad, selectividad, tiempo de respuesta, reproductibilidad, tiempo de vida; que dependen directamente de la membrana utilizada.

Debido a que hay una gran necesidad de detectar gases y sustancias biológicas a bajas concentraciones, la sensibilidad particularmente posee un papel muy importante.

Los sensores biomédicos modernos de fabricación y técnicas de procesado de señal avanzadas se han convertido en dispositivos cada vez más precisos y económicos. El reto actual radica en la miniaturización de instrumentos voluminosos y en el desarrollo de sensores portátiles. Las membranas electrohiladas se han aplicado satisfactoriamente como sensores debido a sus características de amplia área superficial, que es la propiedad más deseada para mejorar la sensibilidad de los sensores de conductividad, ya que entre mayor sea el área superficial se absorberá mayor cantidad de analito gaseoso y cambiará la conductividad del sensor mas significativamente [93].

En la literatura se presentan sensores poliméricos de membranas de fibroína de seda para analizar sustancias como la glucosa, peróxido de hidrógeno y ácido úrico [94-95]. También se presentan sensores a partir de polianilina, polipirrol, nylon-6, polivinil alcohol, entre otros [96-97]. Actualmente se realizan investigaciones para producir nanofibras aplicables en sensores electroquímicos; mientras que los sensores ópticos son relativamente nuevos y no existe mucho trabajo respecto a este tipo de uso específico, tal vez debido a que el gran avance en tecnología biomédica ha demandado el desarrollo de nuevos sensores mejorados para su uso en este campo.

4.34 Cosméticos

Las membranas preparadas por electrohilado se han utilizado con y sin aditivos como mascarillas cosméticas para la piel que buscan dar ayuda a pieles dañadas o en tratamientos de limpieza con propiedades médicas y terapéuticas.

La elevada área superficial de este tipo de mascarillas fibrosas acelera la tasa de transferencia de ciertos aditivos a la piel. También tiene como ventajas que puede ser utilizada sin dolor alguno y directamente sobre la topografía característica tridimensional de la piel a tratar. Es posible agregar factores revitalizantes para la piel dentro de la membrana de una manera fácil ya que poseen un gran potencial cosmético debido a su área superficial y pequeños poros [73, 84].

4.35 Inmovilización de Enzimas

La inmovilización de enzimas sobre materiales inertes insolubles es un área importante para mejorar el funcionamiento enzimático en aplicaciones específicas de bioprocesos, ya que las enzimas inmovilizadas ofrecen ventajas como su reutilización, mayor estabilidad y control en las reacciones [98-99]. El comportamiento de las enzimas inmovilizadas depende en gran parte de la estructura y características del material portador como del método de preparación, biocompatibilidad, hidrofobicidad, etc. Sin embargo, incluso en materiales modificados, usualmente la carga de enzima es

baja. Para obtener mayores cargas enzimáticas se han empleado materiales tales como membranas, matrices de gel y partículas porosas [98, 100].

La estructura de poros finos en las membranas preparadas por electrohilado puede vencer eficazmente la resistencia a la difusión de sustratos o productos, y puede aumentar en gran manera la capacidad de canalización en enzimas inmovilizadas debido a la amplia área superficial específica. Las membranas fibrosas ofrecen ventajas como el poder ser procesadas con diversas estructuras; no tejidas, alineadas, etcétera, es mucho más fácil colectarlas y son mas duraderas que otras nanopartículas o nanotubos de carbono [101].

Jia y colaboradores [98] prepararon nanofibras de poliestireno por electrohilado para la inmovilización de la enzima α -chymotrypsin y encontraron que la enzima inmovilizada presentaba 65% más de actividad hidrolítica que la misma enzima libre. Sin embargo, la baja estabilidad y eficiencia catalítica de las enzimas, aunado a que existen pocas herramientas de evaluación, ha limitado el desarrollo de este tipo de aplicación en operaciones a gran escala.

4.36 Membranas de Afinidad

Las membranas de afinidad son una amplia clase de membranas que captura o liga selectivamente moléculas específicas mediante la inmovilización de un ligando en la superficie de la membrana, presentando mejores resultados que con otras técnicas de

cromatografía o filtración [102-103]. En la mayoría de los casos es importante unir los ligandos de manera covalente para evitar su pérdida en algún lavado. Las membranas de afinidad son capaces, por ejemplo, de remover moléculas orgánicas de aguas residuales o de purificar proteínas.

En la purificación de proteínas, las membranas de afinidad deben estar hechas con materiales hidrofílicos como la celulosa que presenta una adsorción menos específica de proteínas que aquellos polímeros hidrofóbicos. Bamford y colaboradores [104] prepararon una membrana nanofibrosa de superficie modificada de poliuretano por electrohilado para utilizarse con la proteína A para la purificación de moléculas IgG.

4.4 Polímeros Utilizados en Electrohilado

Existe una amplia gama de polímeros que son capaces de formar fibras en escala igual o inferior a la micrométrica. En la técnica de electrohilado es posible utilizar polímeros sintéticos, naturales o incluso mezclarlos con proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc.

En este trabajo nos enfocaremos en los polímeros naturales ya que normalmente presentan mejor biocompatibilidad y baja inmunogenicidad, en comparación con los polímeros sintéticos para ser aplicados en áreas biomédicas. Otra razón importante para utilizar polímeros naturales es su capacidad intrínseca para vincular células, ya que poseen secuencias específicas de proteínas. Además, los

andamios hechos de proteínas prometen mejor desempeño clínico. En las investigaciones recientes se ha reportado el uso de polímeros naturales en la preparación por electrohilado de membranas con proteínas, principalmente con colágeno, quitosano, caseína, gelatina, elastina, quitina, acetato de celulosa, y fibroína de seda [4, 9, 105-108].

Sin embargo, los polímeros naturales presentan la desventaja de su desnaturalización bajo determinadas condiciones. También es importante mencionar que los polímeros sintéticos ofrecen muchas ventajas que los polímeros naturales no poseen, tales como buenas propiedades mecánicas y un tiempo de degradación deseable. Los polímeros sintéticos reportados más utilizados como andamios para aplicaciones biomédicas son los poliésteres hidrofóbicos biodegradables, como el ácido poliglicólico (PGA), poliácido láctico (PLLA), polivinil pirrolidona (PVP), la poli ϵ -caprolactona (PCL), también el poliuretano (PU), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y el copolímero ácido poli-L-láctico-co- ϵ -caprolactona [(PLLA-CL)]; empleados en ingeniería de tejidos para huesos, injertos cardiacos, apósitos, sustitutos de vasos sanguíneos, entre otros [41, 48, 67, 109].

4.41 Colágeno

El colágeno es un biopolímero prominente usado extensivamente debido a sus excelentes propiedades biológicas y fisicoquímicas para aplicaciones de ingeniería de

tejidos. El colágeno es la proteína mas abundante en el cuerpo humano, es un elemento clave de la matriz extracelular (ECM) e imparte integridad estructural y fuerza de tensión y soporte a los tejidos. La alteración que sufre un tejido después de una lesión, requiere colágeno para la restauración de su estructura y función. Sin embargo, una deposición excesiva de colágeno en una herida resulta en una pérdida de estructura y función, y en fibrosis. Por el contrario, cuando cantidades insuficientes de colágeno son depositadas en una herida, el tejido es débil y tiende rápidamente a la ruptura [110].

La gran familia del colágeno incluye 20 tipos de colágeno genéticamente diferentes, que pueden ser homotrimétricos u heterotrimétricos en la naturaleza. Un homotrímero es una proteína que se compone de tres unidades polipeptídicas idénticas; mientras que un heterotrímero posee unidades diferentes entre sí. Todos los tipos de colágeno poseen una estructura molecular de triple hélice. Los colágenos que tienen mayor participación en estructuras fibrilares incluyen los tipos I, II, III, V y XI; siendo los tipos I, II y III los más abundantes [12]. Las cadenas α subyacentes que forman estos polímeros se arreglan en un motivo de repetición que forma una estructura en espiral, que posee intervalos de 67 nm impartiendo el patrón de bandas característico del colágeno.

Los colágenos que generalmente han sido atractivos para los investigadores en la preparación de andamios son los tipos I, III y IV. El colágeno tipo I consiste en dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, formando fibrillas de 50 nm de diámetro. El tipo I está

presente en huesos, piel, dentina, córnea, vasos sanguíneos, fibrocartílagos y tendones. El colágeno tipo III, presente tanto en la piel como en ligamentos, vasos sanguíneos y órganos internos; se compone en tres cadenas $\alpha I(III)$ resultando fibrillas con diámetros entre 30 y 130 nm. El colágeno tipo III también contribuye a la flexibilidad de los vasos sanguíneos y se expresa durante el periodo inicial de la cicatrización de una herida. El colágeno tipo IV, que es uno de los principales elementos estructurales de la lámina basal y las membranas basales, es un colágeno no fibrilar. Este tipo de colágeno se asocia con colágenos fibrilares para formar microfibrillas y estructuras en red [11].

El colágeno se ha empleado en una variedad de aplicaciones en ingeniería de tejidos ya que predomina en la matriz extracelular, inmunogenicidad nula y diversos métodos existentes para aislarlo a partir de una variedad de fuentes. Sin embargo, los procedimientos típicos utilizados para aislar el colágeno y procesarlo en un material ingenieril pueden modificar muchas de sus propiedades estructurales y biológicas [12]. Las fibras de colágeno también poseen algunas propiedades estructurales únicas muy importantes en la ingeniería de tejidos, tales como: transmiten fuerzas, disipan energía, previenen fallas mecánicas prematuras y proporcionan señales biológicas a las células adyacentes para la regulación de respuestas funcionales. Adicional a lo anterior, el colágeno es reabsorbible, tiene alta afinidad por el agua, baja antigenicidad, muy buena compatibilidad con las células y la capacidad de promover la regeneración celular [111].

Estos factores combinados hacen del colágeno un biopolímero ideal para su aplicación en ingeniería de tejidos.

El colágeno ha sido muy utilizado en aplicaciones *in Vivo* e *in Vitro* para la ingeniería de tejidos. Encontrar un solvente apropiado para disolver este biopolímero a concentraciones deseadas para poder llevar a cabo el proceso de electrohilado, así como la volatilidad del solvente para asegurar un secado rápido durante la formación de membranas son elementos clave para formar exitosamente un andamio de colágeno. How y colaboradores [112] fue el primer grupo de investigadores en utilizar colágeno tipo I extraído de piel de becerro y disuelto en hexafluoro propanol para su caracterización en Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Posteriormente diversos estudios se han realizado en la formación de membranas de colágeno con vistas a simular la red natural de colágeno presente en los tejidos [13, 15, 66, 81, 105].

Actualmente el método más común para el electrohilado del colágeno incluye el uso de solventes fluoroalcoholes altamente volátiles tales como el 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol y el 2,2,2-trifluoroetanol [81, 108]. Sin embargo, recientemente Yang y colaboradores [65] han encontrado que cerca del 45% del colágeno se pierde durante el proceso de electrohilado debido a su conversión a gelatina, por lo que todavía existen ciertas limitantes para su aplicación médica a gran escala.

4.42 Poli-L-ácido láctico

El poliácido láctico es un polímero biocompatible y biodegradable, muy utilizado en aplicaciones de bioingeniería. Por su naturaleza quiral o de espejo existe en diferentes formas. Tiene una cristalinidad de 38%, su temperatura de fusión es 175C y de transición vítrea de 63C. Puede obtenerse a partir de etanol y cianuro de sodio:

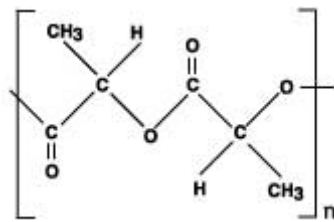
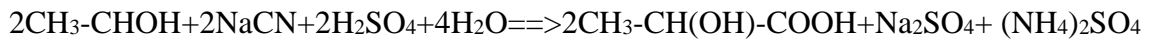


Figura 10. Estructura química del poli-L-ácido láctico [56]

4.43 Polivinil Pirrolidona (PVP)

Es un polímero ramificado que cuando se encuentra seco es un polvo escamoso, sin embargo, al estar en solución tiene excelentes propiedades para formar membranas. Es un polímero soluble en agua y otros polímeros polares. El monómero es carcinógeno y tóxico, por el contrario el polímero puro no lo es [56].

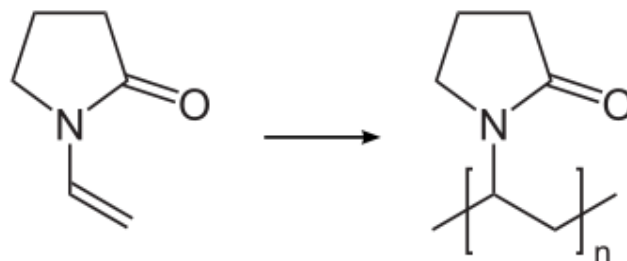


Figura 11. Polimerización del PVP

4.44 Acetato de Celulosa (AC)

El acetato de celulosa tuvo gran impacto durante la 1era guerra mundial al emplearse en láminas y tubería. Es dócil al proceso de extrusión y posee buena resistencia al impacto, es soluble en solventes orgánicos, es incoloro e inodoro, posee alta capacidad absorción de agua y es de baja inflamabilidad [56].

En la Figura 12 se muestra la síntesis por la reacción de la celulosa natural con ácido anhídrido acético y catalizadores como ácido sulfúrico ó ácido perclórico, seguido por una hidrólisis.

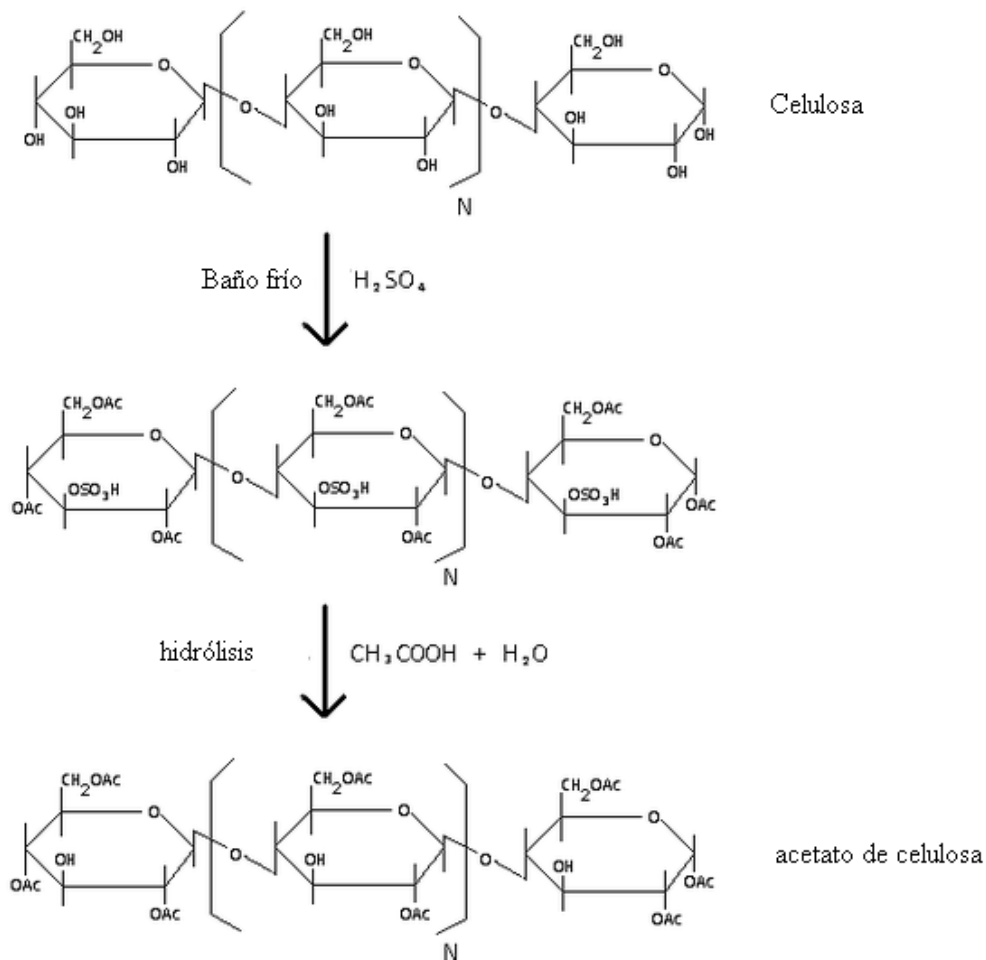


Figura 12. Obtención de acetato de celulosa

4.5 Cultivo Celular

El cultivo celular es el procedimiento que se lleva a cabo para hacer crecer células in Vitro bajo condiciones controladas. Existen cultivos de plantas, microbios, bacterias, virus y derivados de células eucariotas, especialmente células animales. Las células, tejidos y órganos que son aislados y mantenidos en un laboratorio son los objetos vivos que pretenden ser cultivados. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas de origen; sin embargo, en la práctica el término de “cultivo celular” hace referencia principalmente al cultivo de células animales y humanas, es decir, eucariotas. El desarrollo histórico y los métodos de cultivo de células están estrechamente relacionados con el cultivo de tejidos y con el cultivo de órganos.

La técnica de cultivo celular es aquella que permite hacer crecer y mantener vivas células provenientes de organismos multicelulares fuera del organismo, en contenedores especialmente diseñados para este fin, y que se encuentran en condiciones que imitan las condiciones exactas del bioambiente natural en el que se desarrollarían dentro del organismo. Las condiciones que se manejan son humedad, nutrición, temperatura e incluso un medio libre de contaminación como el del mismo organismo.

Cultivar células permite el estudio de células bajo condiciones controladas donde es posible examinar los efectos de las condiciones específicas del ambiente y de mutación en la fisiología celular. Así mismo, es posible estudiar la bioquímica, el

metabolismo, el ciclo celular, los efectos de diversos componentes químicos o fármacos sobre algún tipo de células, entre otros.

En los cultivos celulares las células no están organizadas en verdaderos tejidos. El cultivo iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo recibe el nombre de cultivo primario. Cada vez que se cultive una línea celular se repetirán los numerosos linajes de células presentes originalmente en el cultivo primario. Sin embargo, a excepción de los derivados de tumores, la mayoría de los cultivos primarios tienen vida útil limitada. Después de un cierto número de duplicaciones de la población, llamado el límite de Hayflick, las células sufren el proceso de senescencia y dejan de dividirse, aunque por lo general pueden mantener la concurrencia o viabilidad celular adecuada.

Un cultivo primario debe ser considerado como tal hasta que se subcultive con éxito la primera vez que es cuando puede empezar a considerarse una línea celular. Las líneas celulares son células específicas que se originaron a partir de un cultivo primario, y que pueden crecer indefinidamente al brindarles un medio y condiciones adecuadas. Una línea celular inmortal es aquella que ha adquirido la capacidad de proliferar indefinidamente incluso bajo mutaciones raras o modificaciones deliberadas, tal como la expresión artificial de gen telomerasa. Actualmente, existen numerosas líneas celulares bien establecidas representativas de tipos particulares de células.

El cultivo celular se conoce como un estudio *ex vivo* del medio celular. Esta es una limitante ya que la célula no se encuentra en su entorno fisiológico normal y original. El cultivo celular es simplemente un intento de proporcionar un entorno simulado. También un problema en el cultivo celular es el uso de las células que se han sido transformadas. Por ejemplo, las células Hep G2 son una línea que se deriva de células humanas hepáticas de cáncer, y por lo tanto son una línea celular de hepatocarcinoma. La desventaja es que estas células a menudo difieren notablemente de las células normales de las que se han alterado, o presentan una importante pérdida de su función celular específica debido a las mutaciones en las que estuvieron involucradas. La alternativa al uso de las células transformadas es el cultivo de células primarias, que están sin transformar, y son las células normales aisladas recientemente de un animal mediante un cultivo de sus tejidos.

Algunos retos actuales para la ciencia en el campo de cultivo celular podrían ser que las células cultivadas no se encuentran bajo la circulación original de sangre, a menudo cambia la organización y estructura natural del tejido, faltan algunos factores sanguíneos como las hormonas, las células no están siempre en contacto con otras células ya que la confluencia en un cultivo nunca alcanza una perfecta totalidad. A diferencia de las células primarias que necesitan el contacto célula a célula para crecer y dividirse, las células transformadas lo hacen perfectamente sin necesidad de estar siempre en contacto con otra célula. Otras complicaciones a las que se enfrenta un

cultivo *ex Vivo* es a la contaminación por bacterias, hongos, micoplasma e inclusive virus. Aunado a esto, es necesario subcultivar las células con frecuencia para prevenir el hacinamiento de las células. Debido a lo anterior, es necesario cambiar a menudo el medio para prevenir la acumulación de contaminantes, toxinas y proporcionar los nutrientes que son rápidamente metabolizados por las células en cultivo.

4.51 Historia

Alrededor de 1955 el cultivo celular se convirtió en una técnica conocida en laboratorios de investigación. Sin embargo, desde 1870 Sydney Ringer desarrolló solución salina que contenían cloruro de sodio, potasio, calcio y magnesio, adecuada para mantener latiendo un corazón fuera del animal. Posteriormente, el embriólogo Wilhelm Roux extrajo una porción de la médula de un pollo y la mantuvo en una solución salina tibia por varios días; iniciando así el cultivo de tejidos. Las técnicas de cultivo celular avanzaron significativamente para apoyar las investigaciones en virología, ya que el crecimiento de virus en cultivos celulares permitió la preparación de virus purificados para el desarrollo posterior de vacunas. Un ejemplo de esto fue la vacuna para poliomielitis, fruto de las investigaciones del crecimiento de virus en cultivos de células renales de mono.

4.52 Técnica del Cultivo Celular

Las células pueden ser aisladas para su cultivo de diferentes maneras. El método de explante se refiere al tejido vivo separado de su propio órgano y transferido a un medio artificial para su crecimiento. En éste método se colocan pedazos de tejido en un medio de crecimiento, donde las células que crecen satisfactoriamente están disponibles para ser cultivadas. Por otra parte, las células mononucleares pueden ser separadas de tejido suave mediante una digestión enzimática con enzimas como la tripsina, pronasa o colagenasa, que rompen la matriz extracelular. Finalmente, es posible cultivar leucocitos o glóbulos blancos a partir de la purificación de la sangre, ya que es el único componente de la sangre capaz de crecer cultivado.

Una vez aisladas las células, son necesarias condiciones específicas para mantenerlas vivas. Tratándose de células animales las incubadoras generalmente se programan bajo condiciones estándar; 37C y 5% de CO₂. Sin embargo, cada tipo de células demanda que se establezcan condiciones características del medio ambiente y el tipo de medio de cultivo a emplear. Los medios proveen los nutrientes necesarios para el crecimiento celular. Las diferencias entre los medios de cultivo radican esencialmente en la variación de concentraciones de glucosa, nutrientes, factores de crecimiento y pH. Comúnmente los factores de crecimiento que complementan los medios de cultivo son extraídos de sangre animal; uno de los mas utilizados es el suero de becerro. Estos ingredientes derivados de la sangre representan un potencial para la contaminación del

cultivo con virus o priones, por lo que se recomienda minimizar o eliminar el uso de estos ingredientes en la medida de lo posible especialmente tratándose de estudios con aplicaciones biomédicas. El número de células por volumen de medio de cultivo también posee un papel crítico para algunos tipos de células.

Otro tipo de posible contaminación es el cruce entre diferentes líneas celulares. Por esto es importante autenticar las líneas celulares para garantizar su identidad. Existen diferentes métodos para la autenticación como el análisis de isoenzimas, el antígeno de linfocitos humanos (HLA), el análisis cromosómico y el análisis por repeticiones cortas en tándem (STR), que es un método biológico molecular donde se compara el ADN estudiado con uno de referencia. Así mismo es recomendable adquirir las líneas celulares de proveedores reconocidos como la “American Type Culture Collection” (ATCC), la “Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares” (DSMZ), la “Colección Europea de Cultivo Celular” (ECACC), “Colección Italiana Interlab de líneas celulares” (ICLC) y el “Instituto Nacional de depósito del envejecimiento celular de los Estados Unidos de América” (NIA).

Antes de iniciar un cultivo celular, es importante tener conocimiento de que algunas células viven naturalmente sin pegarse a una superficie, tales como las células que existen en el torrente sanguíneo. Al cultivo de estas células se le conoce como cultivo en suspensión. Sin embargo, la mayoría de las células que se derivan de tejidos sólidos requieren de una superficie. El cultivo de las células que crecen adjuntas se

conoce como cultivo adherente. La superficie a la que es factible que se adhieran y crezcan las células puede ser de plástico, al cual se le pueden añadir componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, para aumentar las propiedades de adhesión y proporcionar señales necesarias para el crecimiento.

Cuando se desea tener un cultivo de células exitoso es necesario tomar en cuenta que generalmente estas crecen llenando el área o volumen disponible debido a que las células siempre continúan dividiéndose cuando están cultivadas. A raíz de esto existen varios problemas que pueden generarse: agotamiento de nutrientes en el medio de crecimiento, la acumulación de apoptosis o células necróticas o muertas, también es posible que se presente la inhibición por contacto o senescencia que es cuando el contacto de la célula a célula pueda estimular la detención del ciclo celular haciendo que las células dejen de dividirse.

4. 521 Manipulación Celular

Entre las manipulaciones comunes que son llevadas a cabo en un cultivo celular están los cambios de medio, los pases o subcultivos de las células, y transfecciones, donde se les introduce a las células material genético externo mediante plásmidos o algún vector para la transferencia. Toda manipulación de las células se realiza utilizando una técnica estéril que tiene como objetivo evitar la contaminación con bacterias, levaduras u otras líneas celulares. Las manipulaciones se realizan en una

campana de seguridad para biotecnología o de flujo laminar para excluir a los microorganismos contaminantes. También es posible añadir antibióticos y antifúngicos a los medios de cultivo. De la misma manera, es común añadir un indicador de pH para medir el agotamiento de nutrientes ya que como las células sufren procesos metabólicos, se produce ácido disminuyendo el valor de pH.

Cuando se necesita cambiar el medio de cultivo de células que crecen adheridas es posible hacerlo por aspiración directa y después sustituirlo. Subcultivar o pasar células se refiere a la transferencia de un pequeño número de células de un cultivo previo a otro contenedor con un medio de cultivo nuevo. Las líneas celulares no pueden ser mantenidas en un mismo cultivo indefinidamente debido al aumento gradual de metabolitos tóxicos, gasto de nutrientes y aumento en el número de células debido a su crecimiento. Por lo que el objetivo de subcultivar células es prolongar su tiempo de vida o expandir el número de células ya que se genera un nuevo cultivo con nutrientes frescos y sin metabolitos tóxicos que permiten un crecimiento celular continuo sin riesgos de muerte. Cabe mencionar que un subcultivo típico se realiza a partir de un cultivo de determinado volumen a un cultivo fresco de igual volumen, lo que permite el mantenimiento a largo plazo de la línea celular. Cuando se subcultiva a volúmenes mayores de medio de cultivo se pretende incrementar el número de células como se hace en los procesos industriales y en algunos experimentos científicos. Siempre es importante registrar el número de pases o subcultivos.

El protocolo a seguir para llevar a cabo el subcultivo de células depende de las características mismas de las células utilizadas. Para aquellas células que no crecen adheridas, es decir, que crecen en solución, su subcultivo se realiza tomando un pequeño volumen del cultivo original y diluyéndolo en un nuevo medio de cultivo. La densidad de saturación es el número máximo de células que se puede mantener bajo condiciones específicas de cultivo en un recipiente. La densidad para células que crecen suspendidas se expresa comúnmente en células por mililitro.

A diferencia, las células que crecen adheridas a una superficie necesitan ser despegadas de la superficie antes de realizar el subcultivo. La densidad celular se mide como el número de células por centímetro cuadrado de superficie, o en términos de confluencia que es el porcentaje de superficie cubierta por las células que han crecido. Uno de los métodos comunes para despegar las células es el tratamiento con tripsina, que es una enzima peptidasa que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. Las proteínas que son rotas son las responsables de la adhesión celular a la superficie. Otra manera de despegar células son utilizando iones quelantes de sodio con ácido etilen diamino tetra acético (EDTA) donde algunos mecanismos de adherencia de las proteínas se deshacen. Finalmente, es posible despegar células por métodos mecánicos como un lavado repetido o el uso de un rascador de células. Una vez despegadas, las células son resuspendidas en un medio de cultivo fresco donde se les permite reposar de nuevo en la superficie de crecimiento. Al

porcentaje de células sembradas que se adhieren a la superficie del recipiente de cultivo en un tiempo determinado se le conoce como Eficiencia de Siembra de Adhesión.

4.53 Líneas Celulares Establecidas

Una amplísima variedad de líneas celulares se han reconocido a lo largo del tiempo. Las líneas celulares se pueden clasificar según la especie de la que provienen, según el tipo de tejido tumoral del que se extrajeron o según el tejido del cual fueron originadas. Se han desarrollado líneas celulares a partir de seres humanos y diversos animales, tales como: gusanos, larvas, babuinos, murciélagos, osos, bovinos, gatos, pollos, corderos, chimpancés, gorilas, perros, delfines, moscas, patos, peces, ranas, cerdos, zorros, iguanas, insectos diversos, ratones, mosquitos, ovejas, aves, conejos, ratas, tigres, pavos, tortugas, lobos, etc. Los tejidos humanos, animales y embrionarios a partir de los cuales se han creado líneas celulares incluyen el abdomen, la corteza suprarrenal, médula, aorta, endotelio, células linfáticas, sangre, vejiga, huesos, vulva, médula ósea, cerebro, mama, cartílagos, epidermis, cuello uterino, tejido conectivo, arterias, endotelio, pulmones, vagina, córnea, prepucio, corazón, riñón, intestinos, laringe, ganglios linfáticos, músculos, pelvis, ovarios, tabique nasal, esófago, páncreas, glándula pituitaria, placenta, próstata, ano, médula espinal, estómago, testículos, tiroides, lengua, cordón umbilical, entre otros.

Existen muchísimos ejemplos de líneas celulares, por mencionar algunos están: HEK 293T (de riñón de embrión humano), CCD19 Lu (de pulmón humano caucásico), HeLa S3 (de cáncer de cuello uterino de humano afroamericano), J774 (de sacroma de tejido conectivo de ratón), WES (de piel de chimpancé), OVNIS (de tiroides de oveja).

Las líneas celulares originadas a partir de seres humanos han sido siempre un tema controvertido en materia de bioética. Como las líneas celulares son capaces de vivir sin necesidad del organismo del que fueron extraídas, y después ser aplicadas en tratamientos médicos lucrativos existe conflicto sobre si la persona de la que se derivó la línea celular tiene derechos de propiedad sobre las ganancias. Además cuando alguna línea celular proviene de un feto humano abortado, la moral bioética impide el estudio científico con este tipo de células.

Las aplicaciones que se les da al cultivo en masa de líneas celulares son muy variadas. Entre las más relevantes se encuentra la manufactura de vacunas virales y otros productos de biotecnología. Ejemplos de vacunas realizadas a partir de cultivos celulares son la de poliomielitis, paperas, varicela, rubéola y sarampión, Los productos biológicos producidos por la tecnología de ADN recombinante o artificial incluyen hormonas sintéticas, proteínas de estructura compleja, anticuerpos, enzimas e incluso agentes anticancerígenos. Así mismo, el cultivo celular es fundamental para el cultivo

de tejidos y para la ingeniería de tejidos, ya que establece los principios básicos del crecimiento y mantenimiento de células *ex Vivo*.

Las células HEK 293T, provenientes del riñón de un feto humano abortado, crecen en monocapa y son de morfología parecida a las células epiteliales. Fueron descubiertas en Holanda por Alex Van der Eb aproximadamente en 1973 mediante la transformación de células normales del riñón del feto en presencia del adenovirus 5 ADN. La línea celular J77 proveniente del ratón de especie BALB/c, comúnmente útil en estudios de laboratorio, presenta un crecimiento continuo de monocapa. Estas células provienen de un tumor sarcoma histiocítico. La etiología del sarcoma histiocítico es desconocida. Se piensa que deriva de los histiocitos tisulares, los cuales forman parte del sistema mononuclear fagocítico. Los histiocitos y los macrófagos son fagocitos mononucleares (células procesadoras de antígenos) que proceden de los monocitos circulantes, que migran hacia los órganos linfoides.

4.54 Cultivo de Células no Mamíferas

Existe también el cultivo de células de plantas, que crecen generalmente en suspensión si están en medios de cultivo líquidos y crecen como callos en medios sólidos de cultivo. Para que este tipo de células crezcan satisfactoriamente debe existir un balance apropiado de las hormonas auxina y citoquinina.

Para el cultivo de levaduras y bacterias, se hacen crecer muy pequeñas cantidades de células sobre un soporte sólido que contiene los nutrientes incorporados, usualmente se trata de un gel como el agar de origen marino. Sin embargo, en los cultivos a gran escala, las células se hacen crecer suspendidas en un caldo de nutrientes. El caldo es una solución nutritiva para cultivo de células vegetales donde la estructura química de cada uno de sus componentes es conocida. Es importante hacer uso de compuestos químicos de alta calidad con datos analíticos para minimizar al máximo la posible presencia de contaminantes.

Con la finalidad de cultivar virus, un cultivo de células mamíferas, de plantas, fungi o bacterias es requerido como cultivo anfitrión para que los virus crezcan y se repliquen. Todos los tipos de virus ya sean salvajes, recombinantes o productos virales pueden ser generados en otros tipos de células diferentes a las del cultivo anfitrión bajo las condiciones apropiadas. Dependiendo de la especie del virus, el proceso infeccioso y la replicación viral puede resultar en lisis o ruptura de la membrana de las células anfitrionas y en la formación de placas virales.

4.55 Especificaciones del Cultivo

Debido a que se trató de células mamíferas, las condiciones de la incubadora fueron una temperatura de 37 C y una atmósfera con 5% de CO₂. Se empleó una incubadora marca CellStar modelo QWJ300TABA. El medio de cultivo utilizado fue

DMEM D-5030 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Base) para las células HEK 293T, y el medio de cultivo para las células J774 fue RPMI. Además de todos los componentes que cada medio posee, se les agregó 4.5g/L de D-glucosa, 292 mg/L de L-glutamina, 110 mg/L de piruvato de sodio, 2.4 g/L de HEPES, 15mg/L de rojo de fenol, 10 ml de solución de aminoácidos no esenciales (100X Sigma) y 0.037g/ml de Bicarbonato de sodio (10X Sigma). Todo esto con la finalidad de proveer a las células de un medio más enriquecido para que la probabilidad de tener altas cantidades de células sanas sea mayor.

Finalmente, la esterilidad de todo lo que se utilizó para el cultivo celular es un factor determinante. Todo material empleado fue esterilizado con vapor a muy altas temperaturas en un Autoclave marca Tomy modelo ES-315. También se utilizó material esterilizado desechable. Las membranas fueron esterilizadas al exponerse a radiación ultravioleta con una longitud de onda de 254 nm en periodos de 15 min a 4 h, tiempo determinado utilizando un Crosslinker marca UVP modelo CL-1000, de esta manera las membranas quedaron libres de toda bacteria, virus, hongos, bacteriófagos y pequeños organismos. A continuación, en la Tabla

5 se presenta la dosis UV necesaria para la eliminación satisfactoria de microorganismos que contaminan a las membranas proporcionada por el proveedor del equipo. El tiempo necesario de exposición de las membranas bajo radiación UV para su esterilización fue encontrado aplicando las siguientes fórmulas:

$$DosisEsterilización = (IntensidadUV)(TiempoExposición) \quad (\text{Ec. 1})$$

$$TiempoEsterilización(seg) = \frac{DosisEsterilización \left(\frac{\mu Wseg}{cm^2} \right)}{Intensidad \left(\frac{\mu W}{cm^2} \right)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Tabla 5. Dosis UV requerida para la esterilización de microorganismos. (Adaptada de la información del proveedor del equipo UVP Crosslinker)

LEVADURAS	ENERGÍA ($\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$)
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	13200
<i>Saccharomyces esp.</i>	17600
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13200
<i>Brewer levadura</i>	6600
<i>Baker levadura</i>	8800
<i>Levadura común</i>	13200
ESPORAS DE MOHO	ENERGÍA ($\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$)
<i>Penicillium roqueforti</i>	26400
<i>Penicillium expansum</i>	22000
<i>Penicillium digitatum</i>	88000
<i>Aspergillus glaucus</i>	88000
<i>Aspergillus flavus</i>	99000
<i>Aspergillus niger</i>	330000
<i>Rhizopus nigricans</i>	220000
<i>Mucor racemosus A</i>	35200
<i>Mucor racemosus B</i>	35200
<i>Oospora lactis</i>	11000
VIRUS	ENERGÍA ($\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$)
<i>Bacteriophage (E. coli)</i>	6600
<i>Tobacco mosaic</i>	44000
<i>Influenza</i>	6600
PROTOZOARIOS	ENERGÍA ($\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$)
<i>Paramecium</i>	200000
<i>Nematode huevos</i>	92000
<i>Chlorella vulgaris (alga)</i>	22000

BACTERIAS	ENERGÍA ($\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$)
<i>Bacillus anthracis</i>	8700
<i>S. enteritidis</i>	7600
<i>B. megatherium sp. (veg.)</i>	2500
<i>B. megatherium sp. (esporas)</i>	5200
<i>B. paratyphosus</i>	6100
<i>B. subtilis</i>	11000
<i>B. subtilis esporas</i>	22000
<i>Clostridium tetani</i>	22000
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	6500
<i>Eberthella typosa</i>	4100
<i>Escherichia coli</i>	6600
<i>Micrococcus cadidus</i>	12300
<i>Micrococcus sphaeroides</i>	15400
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1000
<i>Neisseria catarrhalis</i>	8500
<i>Phytomonas tumefaciens</i>	8500
<i>Proteus vulgaris</i>	6600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10500
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6600
<i>S. typhimurium</i>	15200
<i>Salmonella</i>	10000
<i>Sarcina lutea</i>	26400
<i>Serratia marcescens</i>	6160
<i>Dysentery bacilli</i>	4200
<i>Shigella paradysenteriae</i>	3200
<i>Spirillum rubrum</i>	6160
<i>Staphylococcus Albus</i>	5720
<i>Staphylococcus aureus</i>	6600
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	5500
<i>Streptococcus lactis</i>	8800
<i>Streptococcus viridans</i>	3800

Una vez que la confluencia de las células sea mayor al 70%, la evaluación de tener células vivas o muertas se realiza utilizando el Hemocitómetro, como se muestra en la Figura 13, con el cual se pueden contar las células vivas que se observan transparentes y las células muertas que se observan azul oscuro. Esto sucede gracias a la solución Azul de Tripano, colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas, que al

ser agregado en pequeñas cantidades a una muestra de solución celular, colorea únicamente las células que no tienen vida. Cuando se observa que la cantidad de células muertas es baja en comparación al número de células vivas, se concluye que el cultivo celular ha sido exitoso.

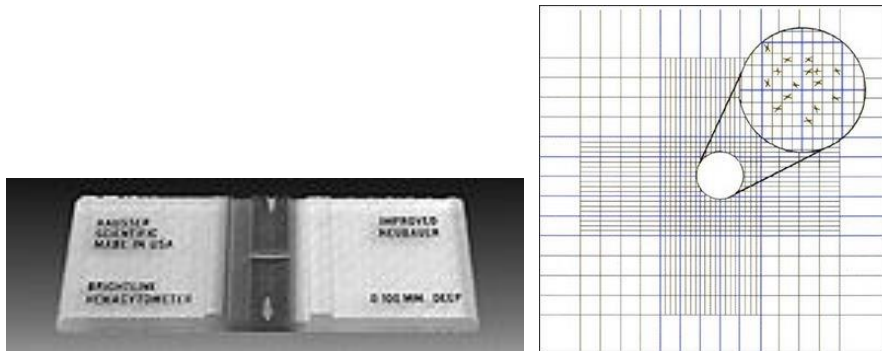


Figura 13. Imagen y Representación del Dispositivo Hemocitómetro. Adaptado de la fuente [113]

4.56 Microscopía de Fluorescencia como caracterización de células vivas

Para el análisis de las células cultivadas sobre las membranas fibrosas se empleó el microscopio de EPI Fluorescencia donde se utilizó la técnica APOTON donde es posible ver imágenes en un solo eje. Cabe mencionar que para poder observar y analizar las imágenes del microscopio se empleó el software AxioVision.

El microscopio de fluorescencia es un microscopio óptico que emplea los fenómenos de la fluorescencia y la fosforescencia en algunas ocasiones combinados con la absorción. El funcionamiento de este microscopio se representa en la Figura 14 donde la fuente de luz o lámpara envía luz de espectro completo, pasando por el cubo

fluorescente o filtro, se ilumina selectivamente al espécimen con longitudes de onda que excitan a un determinado fluoróforo (se muestra verde que excita a la rodamina). La fluorescencia roja envía fotones en todas las direcciones, y una fracción es colectada por el objetivo y enviada a través del cubo o filtro hacía el lente o cámara. Dicho cubo o filtro se compone por un espejo dicroico y un filtro de barrera, para prevenir que otras longitudes de onda excitadas sean detectadas.

El principio de estos microscopios se basa en la iluminación de la muestra con un haz de luz cuya longitud de onda ocasione que la muestra fluoresca. La luz emitida por la fluorescencia posee una longitud de onda mucho mayor que la de la iluminación normal; dicha luz es detectada en el equipo. Se emplean dos filtros distintos en esta técnica. El primer filtro, de excitación, asegura que la iluminación sea monocromática y con una longitud de onda adecuada. El otro filtro, de emisión o detección, impide que cualquier haz de luz de excitación alcance el detector [114].

Para poder observar células vivas mediante esta técnica de caracterización se hace uso de colorantes fluorescentes que tiñen el ADN de las células que se encuentra en el núcleo. En la Figura 15 se muestra algunos de los compuestos mas empleados en la tinción celular: el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y el agente intercalante yoduro de propidio [86].

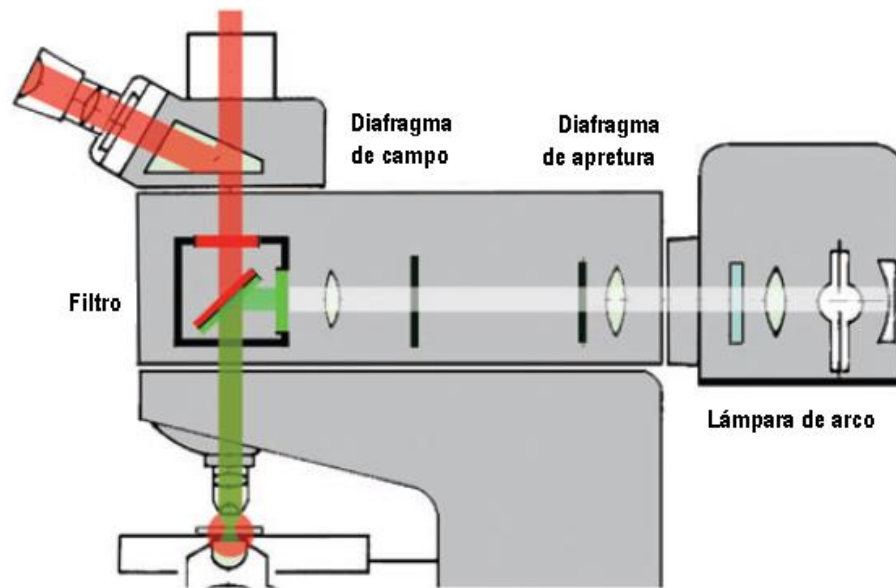


Figura 14. Representación de un Microscopio de Fluorescencia. Adaptado de fuente

[63]

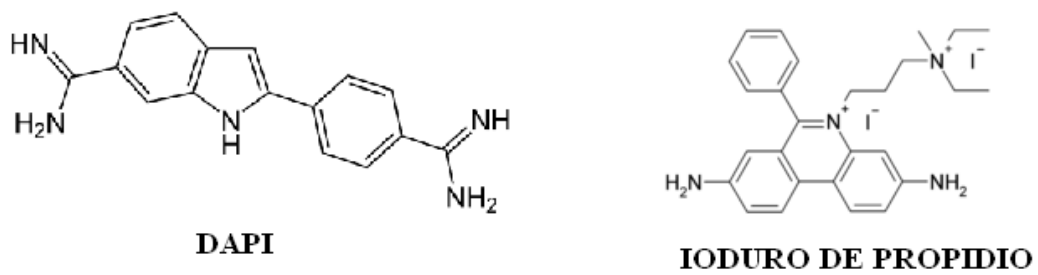


Figura 15. Colorantes fluorescentes

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Materiales

Los materiales utilizados en este trabajo de investigación son los siguientes:

- Colágeno Tipo I de piel de conejo, marca Sigma-Aldrich
- 2,2,2-trifluoro etanol, marca Sigma
- Línea celular 293T, colección ATCC
- Línea Ceular J774, colección ATCC
- Solución salina de fosfatos, PBS
- Azul de Tripano
- Medio de Cultivo DMEM D-5030 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Base)
- Medio de Cultivo RPMI
- D-glucosa
- L-glutamina
- Piruvato de sodio
- Hepes
- Rojo de fenol
- Aminoácidos no esenciales (100X Sigma)
- Bicarbonato de sodio (10X Sigma).

- Acetato de celulosa, $M_n= 50000$, marca Aldrich.
- Poli(vinil pirrolidona), $M_w= 360000$, marca Aldrich.
- Poli (L-ácido láctico) (Resomer L210, Boeringer Ingelheim Germany)
- Ácido acético glacial, marca Sigma.
- Hexafluoroisopropanol, marca Sigma
- Acetona, marca Aldrich.
- Etanol, marca Meyer

5.2 Preparación de Membranas Fibrosas Poliméricas

Con el motivo de encontrar los valores óptimos, el colágeno soluble en ácido fue disuelto en varias concentraciones en trifluoro etanol en agitación constante en un lapso de 2 a 6 horas. La solución polimérica fue transferida a una jeringa de 1 ml para la formación de fibras por electrohilado. La jeringa se colocó en una bomba kdScientific, donde se varió la velocidad de flujo en un intervalo de 0-30 mL/h. Se utilizó una fuente de poder de alto voltaje marca Spellman modelo CZE 1000R para aplicar un voltaje a la solución polimérica en un intervalo de 10-30 kV. El colector fue colocado variando la distancia entre 10-30 cm, siendo éste una lámina estática de aluminio con dimensiones de 10X10 cm. En resumen, se examinó durante el proceso de electrohilado como la variación de concentración de colágeno en la solución polimérica, el voltaje aplicado, la

distancia entre la aguja y el colector, y las velocidades de flujo afectaron el proceso de electrohilado.

Primero se fue variando el voltaje aplicado a una velocidad de flujo constante de 30 mL/h y una distancia de 15 cm. El voltaje de 30kV fue disminuyendo hasta 10kV observando que lo único que se obtenía eran gotas como en forma de spray que de alguna manera eran más grandes o viajaban más lentamente conforme el voltaje disminuía, hasta el grado de observar gotas escurriendo de la punta de la aguja. Se decidió modificar la velocidad de flujo para ser probada nuevamente con distintos valores de voltaje. El flujo elegido fue de 20 mL/h donde no se lograron ver fibras formadas en el colector, por el contrario lo único que se observaba era que el colector se mojaba en diferentes ubicaciones dependiendo del cambio de voltaje. Cuando el voltaje estaba cerca de los 15kV el colector se mojaba de la solución polimérica en la parte central, mientras que a otros valores se presentaban manchas húmedas en diversos lados del colector. Esto indicó que no se dieron las condiciones apropiadas para darle oportunidad al solvente de evaporarse. Se disminuyó la velocidad de flujo a 10 ml/h para ser probada con muchos valores de voltaje. Se notó que en el rango de voltaje entre 5 y 15kV la jeringa presentó menor cantidad de goteo y la placa colectora no se mojaba tanto. Por esto se decidió que el nuevo rango de voltaje sería únicamente entre 5 y 15kV.

Se disminuyó la velocidad de flujo a 5ml/h donde el voltaje solo varió entre 5 y 15kV. Se noto que la placa colectora no se mojaba tanto donde era posible observar gotitas húmedas y no una gran mancha mojada por lo que se pensó que un flujo menor era buena señal. Se disminuyó el flujo a 4, 3, 2 y 1ml/h donde en este último valor se pudo observar la presencia de fibras en el colector aunque aún había evidencia de solvente. Se notó que el colector presentó menos manchas mojadas a 10kV. Se decidió continuar disminuyendo el voltaje a 0.8, 0.5, 0.3ml/h y se observó que a 0.5 y 0.3 se formaban mas o menos la misma cantidad de fibras a 10kV por lo que se decidió fijar el voltaje en 0.4mL/h.

Bajo estas condiciones se lograron obtener fibras secas pero muchas de ellas no eran capaces de alcanzar el colector y se depositaban en los alrededores del arreglo instrumental. Todo este tiempo la distancia de la aguja al colector fue constante de 15 cm por lo que se decidió modificarla a 30 cm donde casi ninguna fibra alcanzó el colector. La distancia se redujo a 5 cm donde el colector se mojó otra vez debido a la presencia de solvente. Al usar una distancia de 10 cm se observó que las fibras iban dirigidas al colector sin la presencia de solvente, por lo que se concluyó que esa era la distancia óptima. Este procedimiento se resume en la Tabla 6.

Por otra parte se emplearon membranas AC/PVP/AC preparadas en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales mediante un arreglo coaxial de agujas de 1.5 y 0.8 mm. Tanto para el AC como para el PVP la concentración de la

solución fue del 8 % (P/P). El PVP fue disuelto en una solución etanol:agua al 85 % V/V, mientras que el AC fue disuelto en una solución acetona:agua al 80% (V/V). El voltaje aplicado, la distancia entre la aguja y el colector, así como la velocidad de flujo tuvieron los mismos valores para ambos polímeros; 15 kV, 15 cm y 0.3 mL/h respectivamente.

Las membranas de poliácido láctico con colágeno PLLA-Col fueron preparadas en la Universidad Nacional Autónoma de México con 30:1 de proporción. El colágeno fue añadido a la misma solución polimérica de PLLA y se agitó durante 24 h. Se utilizó 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol HFP para disolver los polímeros.

5.3 Cultivo Celular en Membranas Electrohiladas

Con la finalidad de evaluar la factibilidad del uso de las membranas fabricadas por electrohilado como biomaterial para la ingeniería de tejidos, se efectuó el cultivo celular utilizando dichas membranas como sustrato. De esta manera, se cultivaron células sobre membranas de Colágeno, AC/PVP/AC y PLLA-Col. El objetivo principal fue, más que un simple sustrato, las membranas se comporten como andamios que permitan la adhesión y proliferación celular de una manera eficiente. Para ello, la biocompatibilidad del material es una propiedad indispensable, ya que esto define la viabilidad celular que se obtenga, es decir, que el número de células vivas sea mucho mayor en comparación a las células muertas que son imposibles de evitar.

Tabla 6. Descripción de la experimentación para encontrar las condiciones que formaran fibras de colágeno

PARÁMETROS			RESULTADOS
Voltaje (kV)	Flujo (ml/h)	Distancia (cm)	
30	30	15	Gotas pequeñas por la presencia de solvente en el colector
20	30	15	Gotas en el colector
10	30	15	Gotas mas grandes en colector viajando a menor velocidad
30	20	15	Colector mojado en diversas áreas
20	20	15	Colector mojado inclinado hacia la izquierda
15	20	15	Colector mojado en la parte central principalmente
10	20	15	Colector mojado en diversas áreas
30	10	15	Colector mojado en diversas áreas
15	10	15	Se presentó goteo
5	10	15	Se presentó goteo
15	5	15	Disminución de goteo
10	5	15	Disminución de goteo y algunos pedazos de fibras
5	5	15	Disminución de goteo
10	4	15	Disminución de mojado y pedazos de fibras
10	3	15	Disminución de mojado y pedazos de fibras
10	2	15	Mayor cantidad de pedazos de fibras
10	1	15	Mayor cantidad de pedazos de fibras
10	0.5	15	Mayor cantidad de fibras formadas
10	0.3	15	Mayor cantidad de fibras formadas
10	0.4	15	Mayor cantidad de fibras formadas
10	0.4	30	Fibras fuera del colector
10	0.4	5	Fibras sin alcanzar colector
10	0.4	10	Fibras formadas en el colector

Se cultivaron dos tipos de líneas celulares disponibles en las membranas de Colágeno y en las membranas de AC/PVP/AC: HEK 293T (Riñón de Embrión Humano) y Macrófagos de Ratón J774. Mientras que en las membranas PLLA-Col únicamente se cultivó la línea celular J774. Este tipo de células crecen adheridas a una superficie; esto es a diferencia de otras líneas celulares que únicamente pueden proliferar en solución. Así mismo, dichas líneas celulares son dóciles en el sentido que requieren el cuidado normal para lograr una concurrencia celular de más del 70%. Se decidió utilizar estas células ya que su cultivo requiere los cuidados estándar y son de fácil proliferación. Sin embargo, se ha decidido dejar de investigar con la línea celular 293T ya que existen problemas de bioética por tratarse de células provenientes de un feto humano abortado. Además, se han reportado mejores resultados con otros tipos de células que se asemejan a cierto grupo de tejido celular humano, como las que provienen del cerdo o del ratón. Y por esto se empleó otra línea celular; macrófagos murinos J774.

5.31 Cultivo de 273T

A continuación se presentan los pasos seguidos para realizar el cultivo de células HEK en las membranas nanofibrosas. Conociendo que el área de cada pozo de cultivo es de 1.76 cm^2 se recortaron las membranas AC/PVP/AC y de colágeno en

círculos de poco más de 1.5 cm. de diámetro, y se colocaron en los pozos para después ser esterilizados bajo luz UV. Del cultivo existente en el laboratorio de células HEK 293T, se le realizó un lavado con PBS (Buffer Salino de Fosfatos) que es una solución fisiológica de pH 7.4 y cuya composición es 8 g/L de NaCl, 0.2 g/L de KCl, 1.44 g/L de Na₂HPO₄, 0.24 g/L de KH₂PO₄. Este lavado tuvo como finalidad despegar a las células adheridas al plástico de la caja de cultivo, un frasco T de 25 cm.

De esta solución de PBS con células se extrajo una pequeña muestra para hacer el conteo celular utilizando el Hemocitómetro. Se realizó una dilución 1 en 10 con Azul de Tripano. Se contaron 34 células vivas y 5 células muertas en los 4 cuadrantes del hemocitómetro. A partir de este dato se calculó la viabilidad celular y la concentración que se tiene de células. Para obtener la concentración que se logró de células se calculó primero el promedio de células vivas en el Hemocitómetro y se convierte de microlitros (μL) a mililitros (ml) multiplicando por 10⁴. Cuando se observan grumos celulares o varias células pegadas, se cuentan como una sola célula para prevenir la sobreestimación de concentraciones.

$$Viabilidad = \frac{CélulasVivas}{CélulasTotales} = \frac{34}{39} = 0.8718 \quad (Ec. 3)$$

$$Concentración = \left(\frac{TotalCélVivas}{4cuadrantes} \right) \times (Dilución) \times (1 \times 10^4) = \left(\frac{34}{4} \right) \times (10 \times 10^4) = 0.85 \times 10^6 \frac{células}{ml} \quad (Ec. 4)$$

Una vez conocida la concentración que se tiene, se decidió cultivar 2 concentraciones diferentes tanto en los pozos con membrana como en los pozos vacíos de cultivo. Esto con la finalidad de comparar el crecimiento celular a diferentes concentraciones en las membranas. Se decidió sembrar 10^5 células/ml y 2×10^5 células/ml. Cada una de las concentraciones se sembró en 3 pozos con membrana y en 1 pozo vacío. Por lo que se sembró 2 ml en cada pozo.

Se deseaba tener 8 ml de solución de cultivo con cada una de las concentraciones elegidas. Por lo que se calculó la cantidad de medio de cultivo y la cantidad de solución celular que es necesario mezclar. Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \quad (\text{Ec. 5})$$

- Para una concentración de 10^5 cél/ml

$$X (0.85 \times 10^6 \text{ cél/ml}) = (10^5 \text{ cél/8 ml}) (8 \text{ ml})$$

$$X (0.85 \times 10^6 \text{ cél/ml}) = (0.0125 \times 10^6 \text{ cél/ml}) (8 \text{ ml})$$

$$X = 0.117 \text{ ml} = 117 \text{ } \mu\text{L de cultivo}$$

Por lo que para tener 8ml se debió agregar 7.88 ml de medio

- Para una concentración de 2×10^5 cél/ml

$$X (0.85 \times 10^6 \text{ cél/ml}) = (2 \times 10^5 \text{ cél/8 ml}) (8 \text{ ml})$$

$$X (0.85 \times 10^6 \text{ cél/ml}) = (0.025 \times 10^6 \text{ cél/ml}) (8 \text{ ml})$$

$$X = 0.235 \text{ ml} = 235 \text{ } \mu\text{L de cultivo}$$

Por lo que para tener 8ml se debió agregar 7.76 ml de medio

Se sembraron las dos concentraciones en diferentes pozos con membrana y en pozo sin membrana como control. Se introdujeron las membranas con células sembradas en la incubadora y se estuvieron monitoreando. Como las membranas impiden el paso de la luz del microscopio óptico fue imposible saber con certeza como iban evolucionando. Sin embargo, en el pozo sin membrana las células crecieron satisfactoriamente. Se extrajeron membranas cultivadas a diferentes tiempos; 1, 3 y 5 días, empezando con las de mayor concentración. Se expusieron a un flujo laminar por 30 min para su secado. Una vez secas, se agregaron 400 μ L de una solución de paraformaldehído en PBS al 2%, esto tiene la finalidad de fijar las células en el sustrato tal cual se encuentran en ese momento y así poder estudiarlas en microscopía de fluorescencia y SEM. Dicha solución estuvo 15 min en cada membrana. Posteriormente se realizó un lavado con PBS para evitar que el para formaldehído deteriore la membrana.

Para poder analizar con el microscopio de fluorescencia, se impregnaron las membranas en el líquido reactivo Slow Fade Gold antifade con DAPI de Invitrogen, ya que el DAPI colorea el ADN, que solo se encuentra en el núcleo de las células vivas. También se analizaron mediante SEM, justo después de lavar con PBS el para formaldehído y ser recubiertas con una película de oro.

5.32 Cultivo de J774

A continuación se presentan los pasos seguidos para realizar el cultivo de macrófagos J774 en las membranas fibrosas preparadas por electrohilado. Se recortaron las membranas de colágeno, AC/PVP/AC, PLLA-Col en círculos de aproximadamente 1.5 cm. de diámetro, y se colocaron en los pozos para después ser esterilizados por luz UV. Del cultivo existente en el laboratorio de macrófagos de ratón J774, se le realizó un lavado con PBS (Buffer Salino de Fosfatos) y, en este caso también con ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) y tripsina, que es una enzima peptidasa que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formando de esta manera péptidos de menor tamaño y aminoácidos. Este lavado es debido a que las células J774 se pegan con mayor fuerza a la superficie. Se agregaron 6 μL de EDTA/Tripsina y se introdujo durante 1 minuto a la incubadora. Posteriormente se hace un lavado abundante con medio de cultivo, ya que contiene suero fetal bovino que inhibe la acción del EDTA/Tripsina. De esta nueva solución con medio fresco de cultivo se extrajo una pequeña muestra para hacer el conteo celular utilizando el Hemocitómetro. Se realizó una dilución 1 en 10 (5 μL de solución en 45 μL de Azul de Tripaño). Se contaron 69 células vivas y 6 células muertas en los 4 cuadrantes del hemocitómetro. A partir de este dato podemos calcular la viabilidad celular y la concentración que se tiene de células. De acuerdo a la ecuación 3 se encontró una viabilidad de 0.92, y siguiendo la ecuación 4 la concentración fue de 1.725×10^6 células/ml.

Una vez conocida la concentración que se tiene, se decidió sembrar 10^5 células/ml. Por lo que se debe agregar 116 μL de cultivo de acuerdo a la ecuación 5. De esta manera para tener 8ml totales se debió agregar 1.88 ml de medio.

Una vez conocidas las cantidades de células y medio necesarios para obtener la concentración deseada, se sembraron las células en pozos con membrana y en pozo sin membrana. Se introdujeron las membranas con células sembradas en la incubadora y se estuvieron monitoreando. Se extrajeron membranas cultivadas a diferentes tiempos; 2 y 4 días, y finalmente se expusieron a un flujo laminar por 30 minutos para el secarlas. Una vez secas, se agregaron 400 μL de solución de paraformaldehído al 2% en PBS, esto tiene la finalidad de fijar las células y así poder estudiarlas en microscopía de fluorescencia y SEM. Dicha solución estuvo 15 minutos en cada membrana antes de un nuevo lavado con PBS para evitar que el para formaldehído deteriore la membrana.

Para poder analizar con el microscopio de fluorescencia, se impregnaron las membranas en el líquido reactivo Slow Fade Gold antifade con DAPI de Invitrogen. También se analizaron las imágenes mediante SEM, justo después de lavar el paraformaldehído con PBS y ser recubiertas con una película de oro.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Condiciones óptimas para preparar membranas por electrohilado

Para las membranas de colágeno, la mejor concentración de la solución polimérica encontrada fue de 5 % peso en volumen (P/V), de la cual el volumen total inyectado fue de 1 ml. El colágeno se disolvió en el solvente 2,2,2-trifluoro etanol. La velocidad de flujo fue de 0.4 mL/h y se utilizó valor de voltaje aplicado de 10 kV a una distancia entre la aguja y placa colectora de 10 cm.

En las membranas de AC/PVP/AC se encontró que la mejor concentración de la solución fue del 8 % (P/P). El PVP fue disuelto en una solución etanol:agua al 85 % V/V, mientras que el AC fue disuelto en una solución acetona:agua al 80% (V/V). El voltaje aplicado de 15 kV, la distancia entre la aguja y el colector de 10 cm, así como la velocidad de flujo de 0.3 ml/h fueron iguales tanto para el PVP como para el AC.

Las membranas de PLLA-Col (30:1) se formaron a partir de una solución polimérica empleando HFP como solvente, donde 0.6 g de PLLA fueron agregados a 10 ml de HFP. El electrohilado se llevó a cabo a 0.2 ml/h, 15 kV y 12 cm de distancia entre la aguja y el colector.

6.2 Microscopia electrónica de Barrido a Membranas fibrosas

En la Figura 16 se presenta la microfotografía de una membrana fibrosa de colágeno, se puede observar que está compuesta de fibras en forma de listón cuyos diámetros varían entre 100 y 700 nm, dichos valores fueron determinados mediante análisis de imagen, utilizando el Software Image Tool. La magnificación empleada fue de 4300x.

También es posible observar que las membranas AC/PVP/AC presentan morfología cilíndrica con diámetro de 0.5 a 2 micrometros como muestra la Figura 17. La magnificación empleada fue de 1000x.

Por otra parte, en la Figura 18 se muestra una imagen de Microscopía Electrónica de transmisión de la membrana AC/PVP/AC.

Con una morfología uniforme en forma de cilindros, se presenta la imagen de la membrana PLLA-Col con una magnificación de 5000x en la Figura 19. Mediante el análisis de imagen con software se determinó un diámetro de los cilindros que oscila entre 200 y 400 nm.

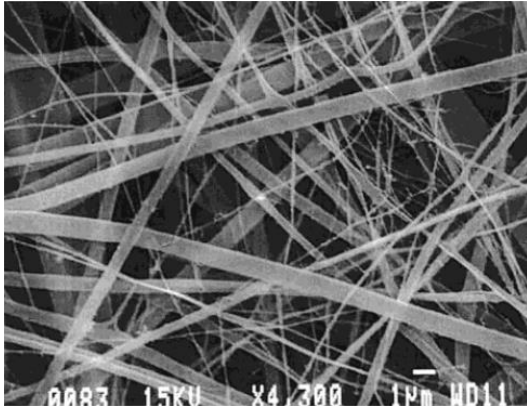


Figura 16. Microfotografía de una membrana fibrosa de colágeno, 4300x.

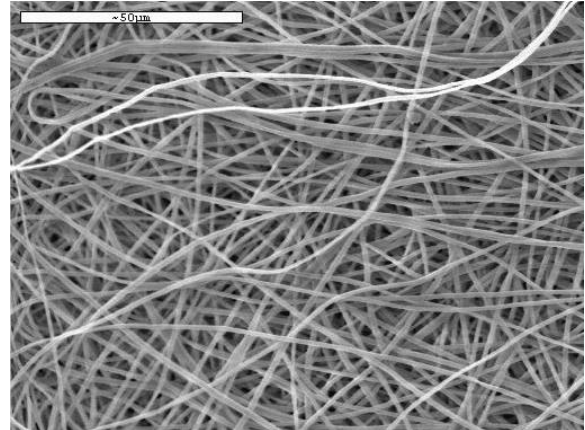


Figura 17. Membrana de AC/PVP/AC, magnificación 1000x.



Figura 18. Microfotografía TEM de membranas AC/PVP/AC. Fuente [17]

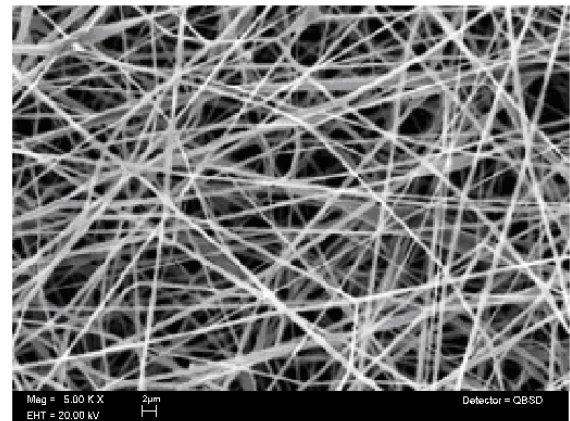


Figura 19. Microfotografía de nanofibras PLLA-Col 5000x.

6.3 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

La espectroscopia FTIR de las membranas se realizó con la finalidad de corroborar la existencia de sus aminoácidos característicos en las membranas. Se siguió la técnica de pastillas de KBr. En la Figura 20 se muestra el espectro IR de colágeno, donde se presenta el pico característico de la cisteína S-H a 1171.74 cm^{-1} . Mientras tanto en la Figura 21 se presentan los picos característicos de la membrana AC/PVP/AC en su espectro IR. De igual forma la Figura 22 muestra el espectro del PLLA-Col, donde se restaron señales de ambos componentes puros para resaltar los picos formados por la unión del biopolímero PLLA con la proteína colágeno. Por lo anterior se presenta en la figura 23 el espectro del PLLA puro.

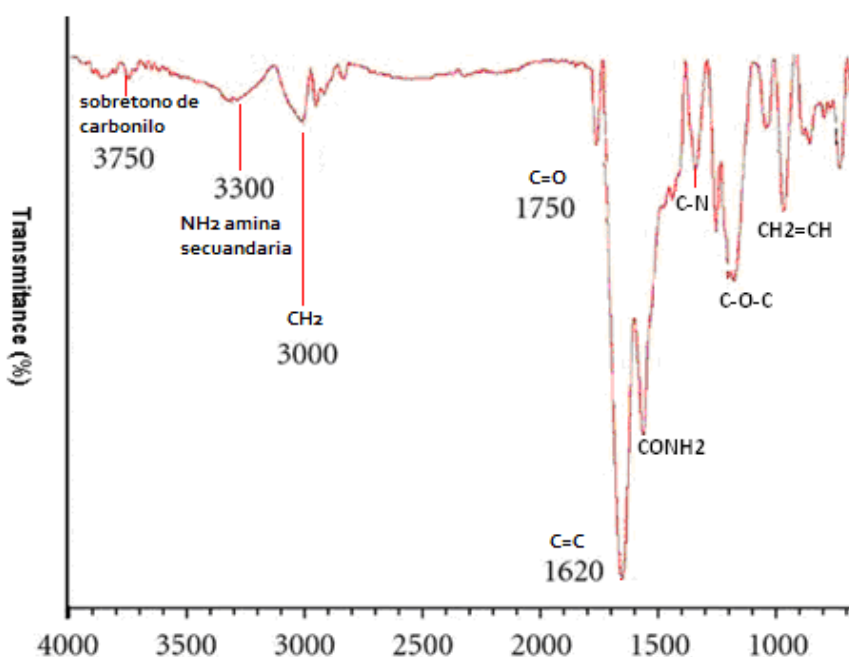


Figura 20. Espectro de FTIR de membranas de colágeno

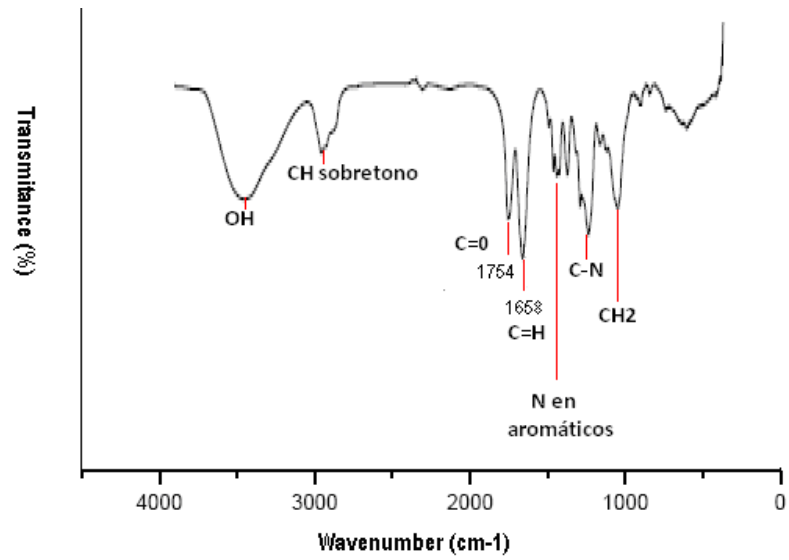


Figura 21. Espectro de FTIR de membranas AC/PVP/AC

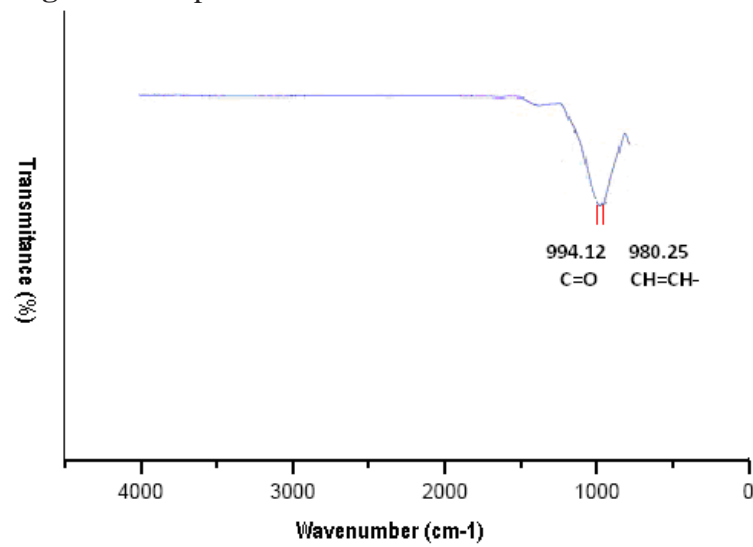


Figura 22. Espectro de FTIR de membrana PLLA-Col (30:1)

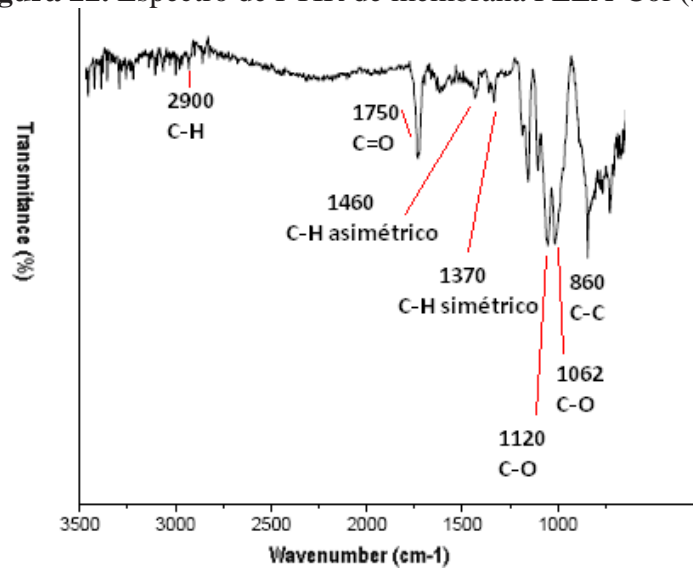


Figura 23. Espectro de FTIR de membrana de PLLA puro.

6.4 Microscopía Electrónica de Barrido en las membranas con cultivo celular.

Una vez realizado el cultivo celular en las membranas fibrosas, PLLA-Col y AC/PVP/AC, y fijadas las células en ellas, se presentan las microfotografías obtenidas donde se comprueba la presencia de las células adheridas al material. En las Figuras 24-27 es posible observar las membranas con el cultivo celular 293T en AC/PVP/AC. También se presenta en las Figuras 28 y 29 los residuos celulares o del medio de cultivo sobre las membranas AC/PVP/AC. Mientras que en las Figuras 30-33 se observan las mismas membranas con las células J774 cultivadas.

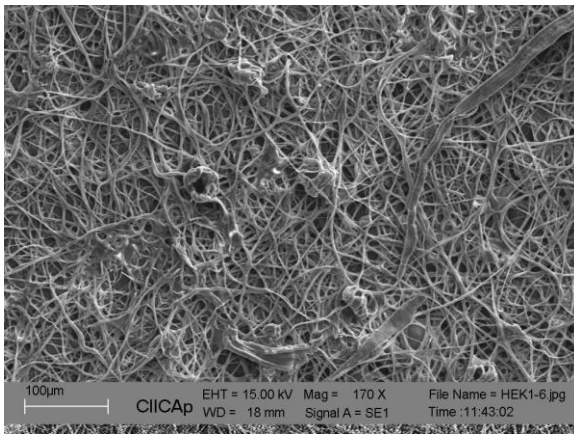


Figura 24. Membranas AC/PVP/AC con células 293T en una vista panorámica, 170x.

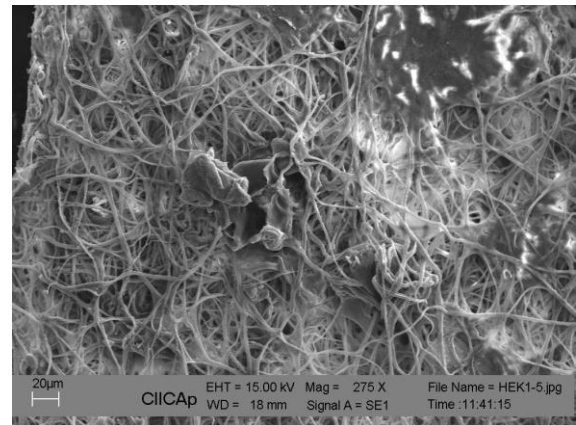


Figura 25. Microfotografía de Membranas AC/PVP/AC con algunas células 293T dentro de la misma, 275x.

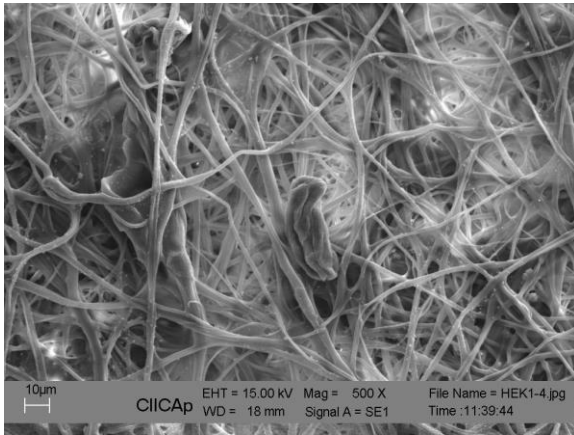


Figura 26. Microfotografía de Membranas AC/PVP/AC con células 293T donde se observa una célula adherida a la superficie, 500x.



Figura 27. Microfotografía de Membranas AC/PVP/AC con células 293T donde se observa un cúmulo celular, 1200x.

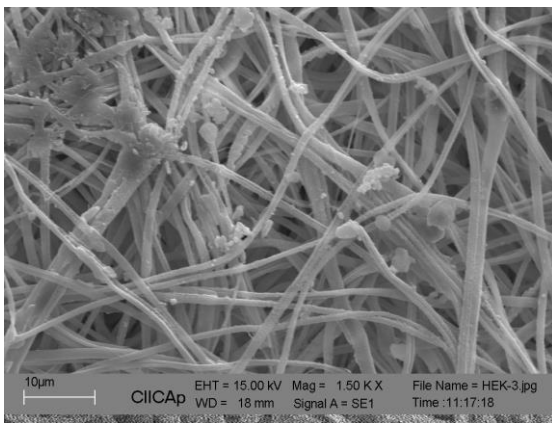


Figura 28. Membranas AC/PVP/AC después del cultivo de células HEK 293T, mostrando residuos celulares

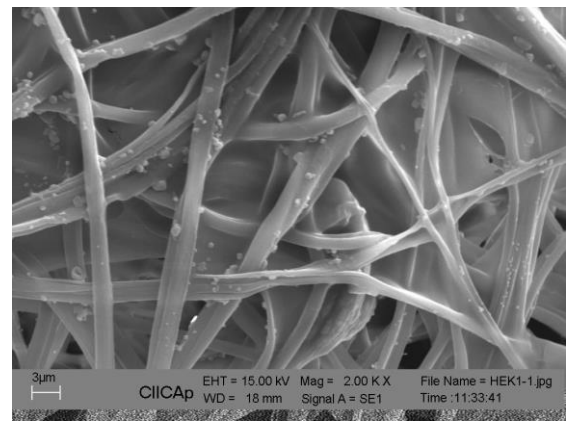


Figura 29. Membranas AC/PVP/AC después de haberse realizado el cultivo de células HEK 293T, mostrando otra vista de los residuos

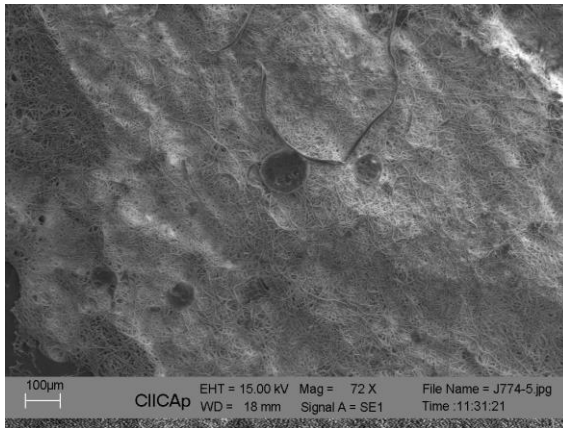


Figura 30. Se presenta una vista panorámica de la membrana AC/PVP/AC después del cultivo celular J774, 72x

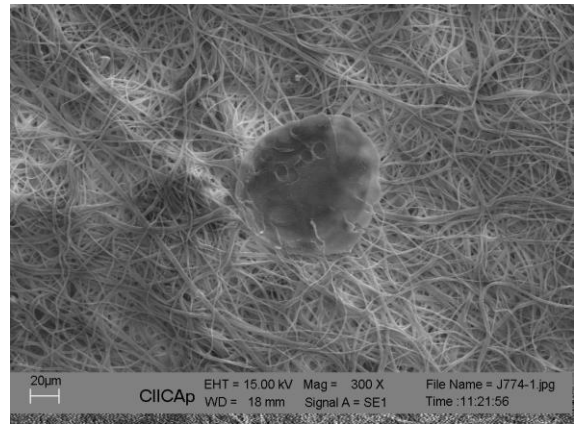


Figura 31. Se muestra en la membrana AC/PVP/AC un conjunto de macrófagos J774 agrupados, 300x.

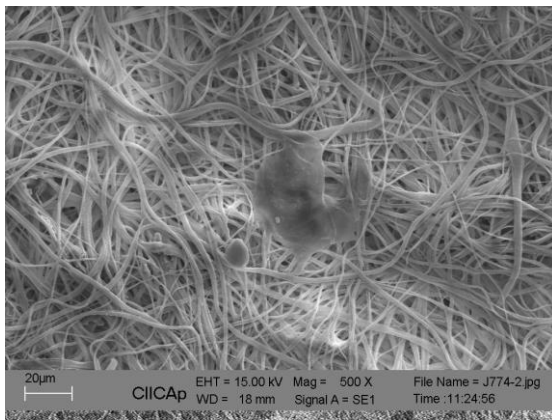


Figura 32. Se observa una célula J774 adherida a la membrana AC/PVP/AC, 500x.

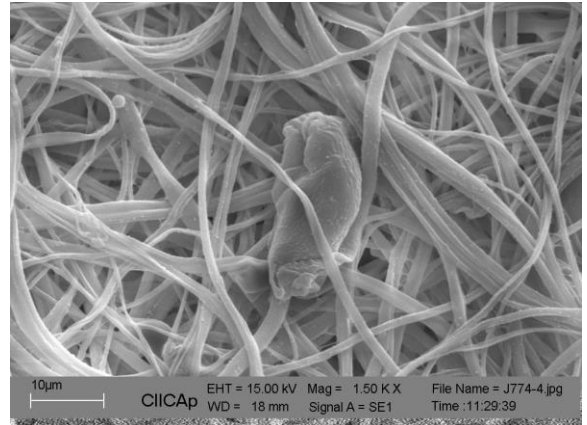


Figura 33. Microfotografía de membrana AC/PVP/AC con una célula J774, 1500x.

A continuación se presentan los resultados del cultivo de J774 sobre las membranas de PLLA-Col donde la confluencia celular es visiblemente mayor que en membranas AC/PVP/AC. Los resultados fueron estudiados 2 y 3 días después de haber sembrado la línea celular sobre las nanofibras PLLA-Col debido a que el crecimiento de las células fue mucho más rápido que en el caso anterior. En las imágenes es posible observar una penetración celular óptima en la matriz de nanofibras, por lo que la adhesión celular a la membrana es muy favorable para la proliferación celular.

Se presentan los resultados de 48 h de incubación celular en las Figuras 34-37; mientras que los resultados del sembrado celular después de 72 h se muestran en las Figuras 38 y 39.

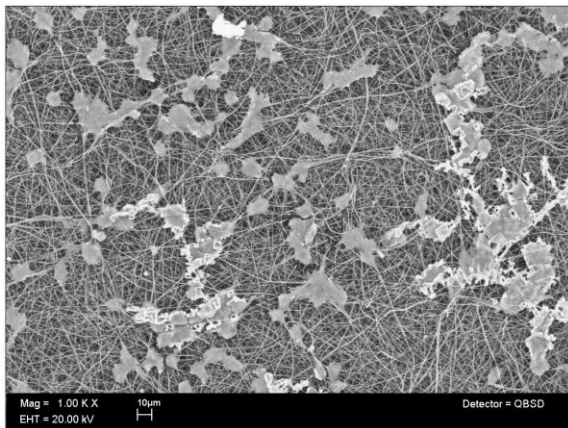


Figura 34. Microfotografías de membranas PLLA-Col con células J774 cultivadas en ellas después de 48 h en una vista general de la membrana después del cultivo celular, 1000x.

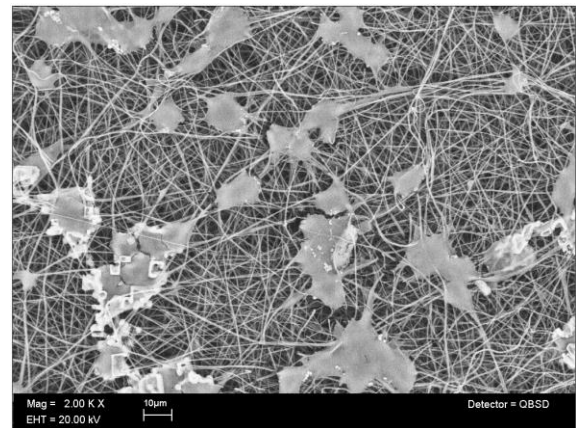


Figura 35. Varias células J774 agrupadas en la membrana PLLA-Col mostrando conexión entre ellas, 2000x.

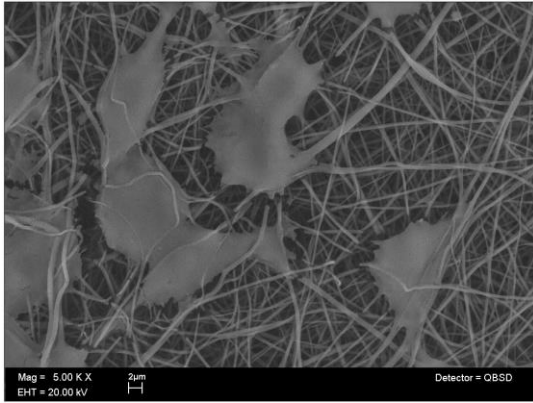


Figura 36. Penetración de varias células J774 en las nanofibras PLLA-Col, 5000x.

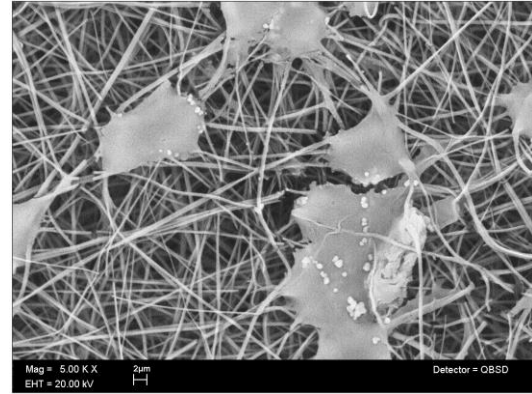


Figura 37. Se muestran células J774 adheridas a la membrana PLLA-Col después de 48 h de haber sido sembradas, 5000x

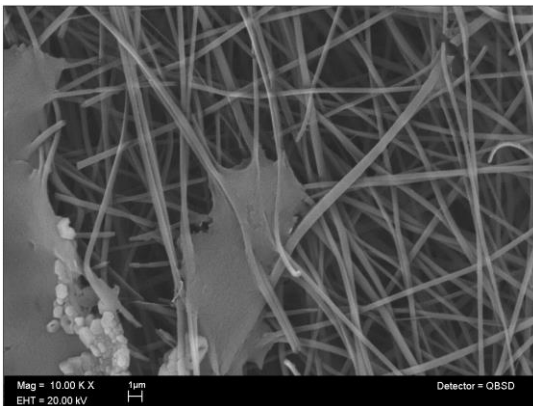


Figura 38. Se observa la penetración de una célula J774 en las nanofibras de PLLA-Col, 10000x.

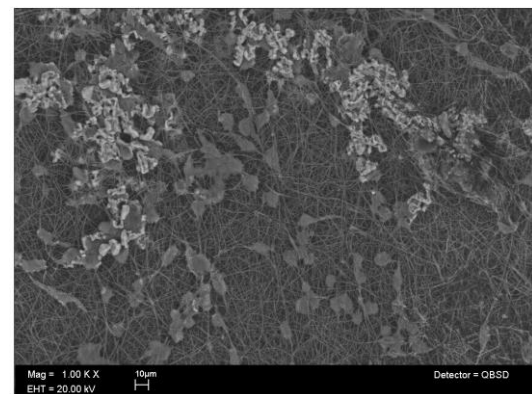


Figura 39. Microfotografía de membranas PLLA-Col con células J774 cultivadas en ellas después de 72 h en una vista general con importantes agrupaciones celulares, 1000x.

6.5 Microscopía de Fluorescencia

La realización de este estudio tuvo como finalidad no solo comprobar la existencia de células en las membrana AC/PVP/AC y PLLA-Col, de la misma manera que con la microscopía electrónica de barrido, sino asegurar que dichas células estuvieran vivas. Con esta técnica es posible observar el núcleo de células vivas, ya que el colorante solo tiñe esta área donde se encuentra el ADN. En las Figuras 40-43 se presentan las imágenes de fluorescencia de las membranas con células HEK 293T cultivadas en AC/PVP/AC. Mientras que en las Figuras 44-46 se exhiben las imágenes de fluorescencia de las membranas fibrosas con cultivo celular J774 en AC/PVP/AC. El microscopio empleado posee la capacidad de tomar imágenes a campo claro y en fluorescencia. Ambos tipos de imágenes se muestran en las figuras a continuación.

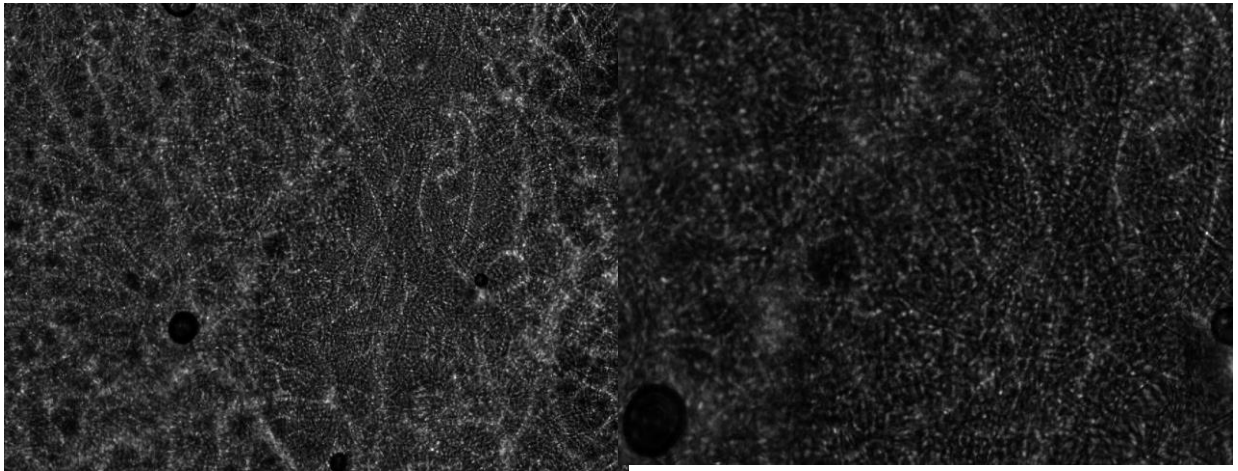


Figura 40. Imágenes de fluorescencia de membranas AC/PVP/AC con cultivo de células HEK 293T en una Vista panorámica de la membrana a campo volteado, 10x.

Figura 41. Amplificación de la membrana AC/PVP/AC a campo volteado con células HEK293T, 20x

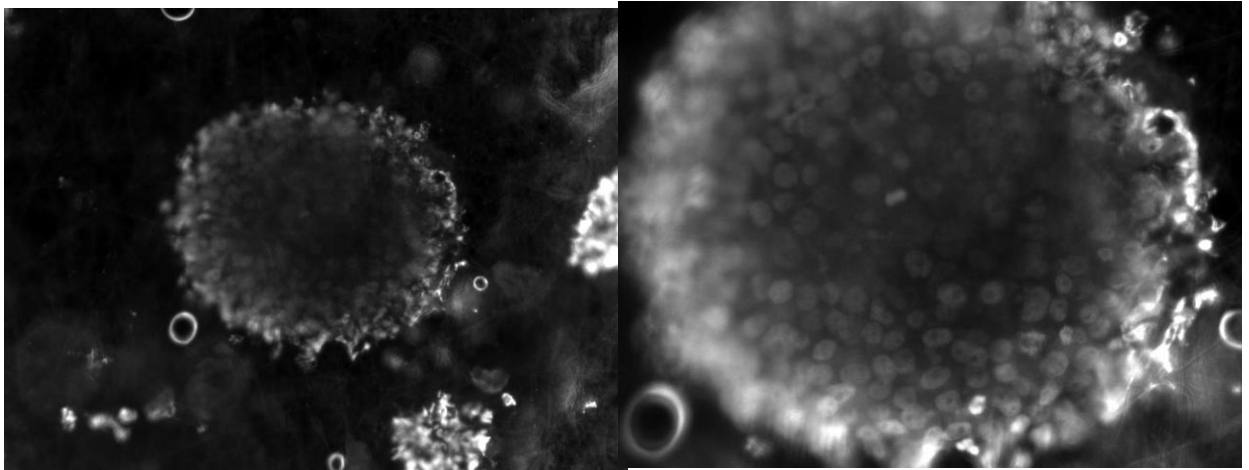


Figura 42. Se observan varias células HEK293T en AC/PVP/AC teñidas con DAPI, 10X.

Figura 43. Célula HEK293T con ADN coloreado con DAPI sobre membrana AC/PVP/AC, 20x.

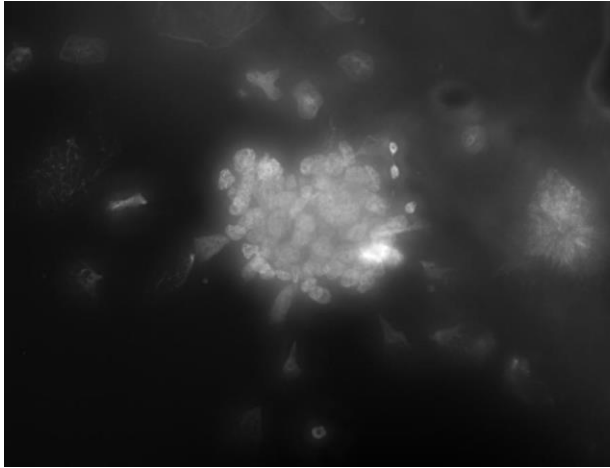


Figura 44. Imagen de las membranas AC/PVP/AC con un cúmulo de macrófagos J774 cultivados en ellas a campo volteado, 20x.

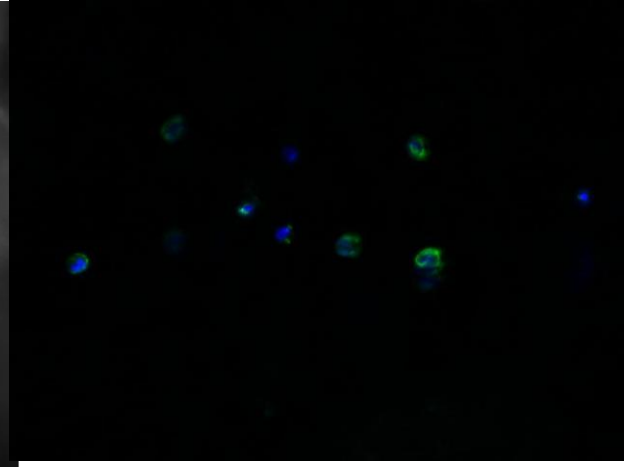


Figura 45. Conjunto de células J774 coloreadas con DAPI sobre AC/PVP/AC, 20x.

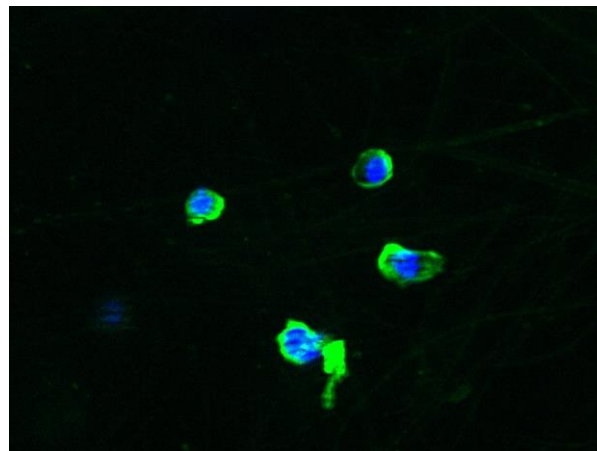


Figura 46. Varios macrófagos J774 en AC/PVP/AC coloreados con DAPI donde es posible notar claramente el ADN del núcleo, 40x.

Los resultados del cultivo celular en las membranas PLLA-Col se muestran en las Figuras 47-50, donde es posible observar una mayor cantidad de células vivas por

unidad de área. Las imágenes destacan que el contacto celular favoreció a la proliferación de los macrófagos adheridos a las nanofibras.

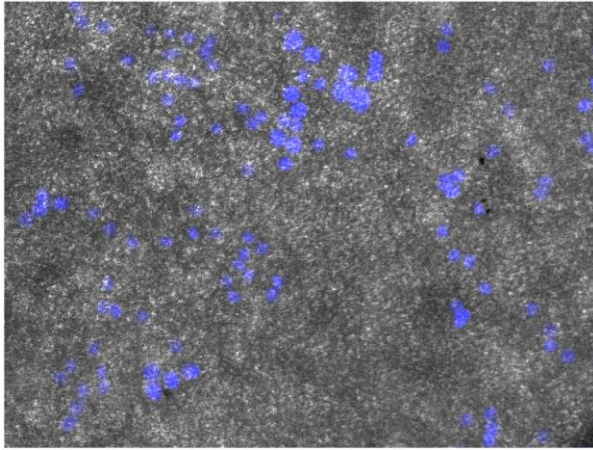


Figura 47. Imágenes 10x de las membranas PLLA-Col con células vivas J774 a 48h de haber sido cultivadas.

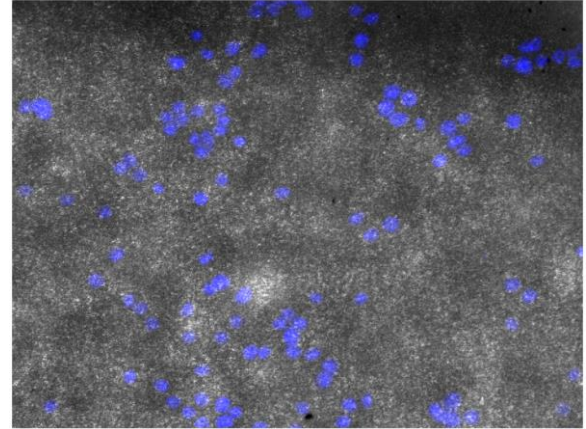


Figura 48. Conjunto de células J774 coloreadas con DAPI sobre membranas de PLLA-Col, 48h, 10x.

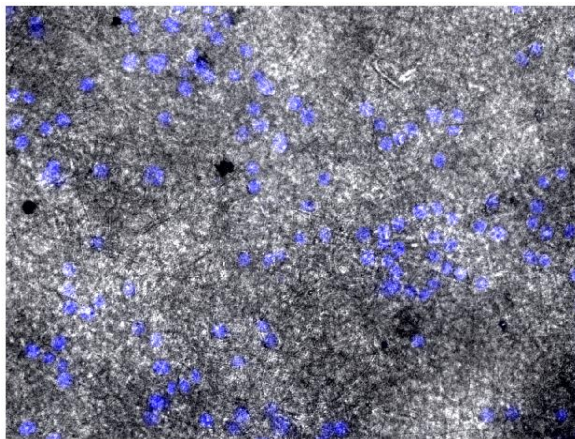


Figura 49. Células J774 concurrentes a campo volteado, después de 72h de haber sido sembradas en PLLA-Col, 10x.

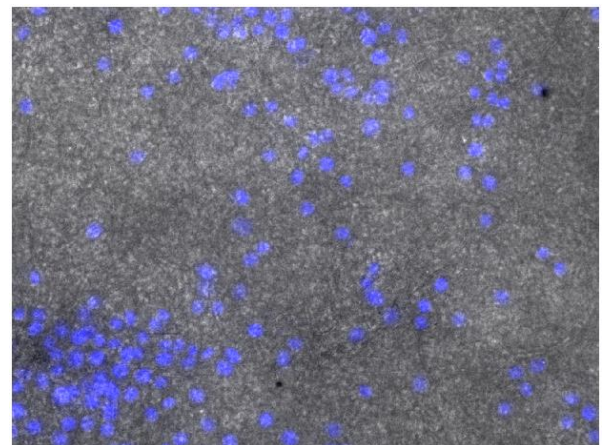


Figura 50. Agrupaciones celulares en PLLA-Col de la línea J774 teñidas para fluorescencia, 72h, 10x.

7. DISCUSIÓN

En la preparación de las fibras se obtuvieron diferentes membranas al modificar los parámetros de la técnica de electrohilado. Fue necesario escoger las fibras capaces de alcanzar al colector con apariencia seca. De la misma manera se prefirió que no hubiera gotas ya que serían capaces de fusionarse con otras fibras debido a la presencia de solvente. También se observó que las fibras fueran depositadas principalmente en el centro del colector buscando cierta uniformidad de espesor.

Una vez elegidas las mejores condiciones para preparar fibras, se fabricaron las membranas PLLA-Col y AC/PVP/AC que presentaron características adecuadas para cultivo celular, y se compararon los resultados entre ellas. Al sembrar células sobre ambas membranas se comprobó que ambas membranas no presentan citotoxicidad. La presencia del colágeno en las membranas PLLA-Col favoreció significativamente la proliferación de células como era de esperarse. La desventaja con este andamio es que la desnaturalización o degradación del colágeno se presenta fácilmente, ocasionando alteraciones en cada cultivo realizado. A pesar de haber mantenido las membranas en refrigeración, el colágeno exige una manipulación más delicada.

En términos de cultivo celular, Chen y colaboradores recomiendan [7] que el sustrato donde las células sean cultivadas sea lo más delgado posible, ya que así el intercambio de oxígeno y bióxido de carbono es mucho más viable que en sustratos muy gruesos. También es más factible que las células proliferen más rápido en

membranas delgadas. Sin embargo, aunque su morfología fibrosa fue adecuada, se comprobó experimentalmente que las membranas delgadas de colágeno obtenidas no resultaron adecuadas para hacer cultivo celular. Tal vez porque debido a su bajo espesor, las fibras no estaban enmarañadas entre sí y al sumergirlas en el medio de cultivo las fibras de membrana solo se separaron cuando parecían deshacerse. Esto requiere un futuro trabajo de investigación.

La naturaleza química de las membranas de AC/PVP/AC no sufrió cambio alguno ya que este material no requiere de condiciones especiales. Por esto, se afirma que los resultados obtenidos en diversos cultivos siempre serán constantes. En estas membranas hubo buen crecimiento y adhesión celular. Por lo anterior mencionado, se eligen las membranas AC/PVP/AC como andamios para la regeneración de células J774.

8.CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones para la obtención de las membranas empleadas para cultivo de células HEK293T y J774.

Las membranas fibrosas de colágeno por la técnica de electrohilado. La velocidad de flujo fue de 0.4 mL/h, el voltaje aplicado de 10 kV y una distancia entre la aguja y placa colectora de 10 cm. Las mejor concentración para la preparación de estas membranas fue de 5 % (P/V), de la cual se inyectó 1 ml.

En las membranas de AC/PVP/AC la concentración fue 8 % (P/P). Tanto para el PVP como para el AC, el voltaje aplicado de 15 kV, la distancia entre la aguja y el colector de 10 cm, así como la velocidad de flujo de 0.3 ml/h. El PVP fue disuelto en una solución etanol:agua al 85 % (V/V), mientras que el AC fue disuelto en una solución acetona:agua al 80% (V/V).

Las membranas de PLLA-Col (30:1) se formaron a partir de una misma solución polimérica empleando HFP 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol como solvente, el cual se sometió a agitación magnética durante un periodo de 24 horas. La concentración fue de 6% (P/V). El electrohilado se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas de 0.2 ml/h, 15 kV y 12 cm de distancia entre la aguja y el colector.

La membrana de colágeno presentó nanofibras en forma de listones con un amplio rango de diámetros; mientras que las membranas AC/PVP/AC, al igual que las de PLLA-Col, mostraron una morfología cilíndrica y uniforme. Los diámetros de las

fibras anteriores fueron obtenidos dentro de la escala micro y nanométrica de esta manera la membrana presentó gran área superficial respecto al volumen, ventaja necesaria para un adecuado cultivo celular.

Las membranas de colágeno no tuvieron un espesor adecuado para lograr el cultivo celular.

Las membranas AC/PVP/AC no contienen biopolímeros o proteínas, sin embargo, permiten la proliferación de células y un medio biocompatible donde se mantienen adheridas las células vivas. Estas membranas ofrecen la gran ventaja de mantenerse bajo condiciones normales de temperatura.

Todas las membranas poliméricas mostraron una morfología adecuada para ser utilizadas como andamios celulares. Las tres membranas estudiadas presentan la porosidad adecuada para el cultivo de células ya que esta es importante porque permiten la intercomunicación entre las mismas favoreciendo su proliferación.

Aunque la tasa de crecimiento celular fue mayor en las membranas PLLA-Col, se proponen a las membranas AC/PVP/AC como sustrato para cultivo celular porque presentaron buena compatibilidad, son fáciles de almacenar y fue fácil la obtención del espesor adecuado.

9. RECOMENDACIONES

En relación con el presente trabajo de tesis, las líneas de investigación de interés serían:

- Encontrar un colector cuyo material y forma favorezcan el cultivo celular sin necesidad de despegar la membrana del mismo, y que al mismo tiempo permita un proceso de electrohilado exitoso.
- Aumentar el volumen inyectado de solución polimérica de colágeno en el proceso de electrohilado para obtener un espesor mayor en las membranas y facilitar su manipulación y hacer cultivo celular.
- Evaluar el comportamiento de estas membranas con otras líneas celulares para comparar su efecto respecto a otros sustratos.
- Evaluar el papel de estas membranas in Vivo en algún animal o con cultivos celulares primarios.
- Mezclar el colágeno con otros polímeros para mejorar sus propiedades mecánicas y evaluar su biocompatibilidad.

10. REFERENCIAS

1. Chew SY, Wen Y, Dzenis Y, Leong KW. The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. *Curr Pharm Des* 2006a;12:4751-70.
2. Sill TJ, Recum HAV. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29:1989-2006.
3. Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1392-412.
4. Zhong S, Teo WE, Zhu X, Beuerman RW, Ramakrishna S, Yung LYL. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *J Biomed Mater Res A* 2006;79A:456-63.
5. Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostat* 1995;35:151-6.
6. Liu HQ, Hsieh YL. Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate. *J Polym Sci B Polym Phys* 2002;40:2119-29
7. Buchko CJ, Chen LC, Shen Y, Martin DC. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer* 1999;40: 7397-407
8. Reneker DH, Chun L. Nanometre diameters of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996;7:216-23.
9. Joseph L, Lowery, Ne'ha Datta, Gregory C. Rutledge. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(3-caprolactone) fibrous mats. *Biomaterials* 31 (2010) 491-504
10. F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering *Biomaterials* (2005); 26: 2603-2610
11. L. Kolacna, J. Bakesova, F. Varga, E. Kostakova, L. Planka, A. Necas, D. Lukas, E.Amler, V. Pelouch, Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix, *Physiol. Res.* 56 (Suppl 1) (2007) S51-60
12. J.A. Matthews, G.E. Wnek, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Electrospinning of collagen nanofibers, *Biomacromolecules* 3 (2002) 232-238
13. Huang L, Nagapudi K, Apkarian RP, Chaikof EL. Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001a;12:979-93.
14. Huang ZM, He CL, Yang A, Zhang YZ, Han XJ, Yin J, et al. Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *J Biomed Mater Res A* 2006;77:169-79
15. Kidoaki S, Kwon IK, Matsuda T. Mesoscopic spatial designs of nano and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials* 2005;26:37-46.
16. Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, Wagner WR. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials* 2006;27:735-44.
17. Castillo-Ortega MM, Romero-García J, Rodríguez F, Nájera-Luna A, Herrera-Franco PJ. Fibrous Membranes of Cellulose Acetate and Poly(vinyl pyrrolidone) by Electrospinning Method: Preparation and Characterization. *Wiley InterScience* 2009; DOI 10.1002/app.31722
18. Taylor GI. Electrically Driven Jets. *Proc R Soc Lond, A Math Phys Sci*, (1934-1990), 1969; 313, 453-75.
19. Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH. Bending instability in electrospinning of nanofibers. *J Appl Phys* 2001;89:3018-26.

20. Adomaviciute E, Milasius Rimvydas. The influence of applied voltage on poly (vinyl alcohol) (PVA) nanofibre diameter. *Fibers Text East Eur* 2007;15:64–5.
21. Nandana Bhardwaj, Subhas C. Kundu. *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Elsevier 2010; *Biotechnology Advances* 28: 325–347
22. Rajeswari Ravichandran, Clarisse CH, Susan Liao, Damian Pliszka, Michael Raghunath, S Ramakrishna and Casey K Chan. Biomimetic surface modification of titanium surfaces for early cell capture by advanced electrospinning. 2012 *Biomed. Mater.* 10.1088/1748-6041/7/1/015001
23. Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, et al. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Mater* 2007;3:321–30.
24. SonWK, Youk JH, Lee TS, ParkWH. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly (ethylene oxide) fibers. *Polymer* 2004c;45:2959–66.
25. Gupta P, Elkins C, Long TE, Wilkes GL. Electrospinning of linear homopolymers of poly (methylmethacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer* 2005;46:4799–810.
26. Koski A, Yim K, Shivkumar S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Mater Lett* 2004;58:493–7
27. Zhang C, Yuan X, Wu L, Han Y, Sheng J. Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *Eur Polym J* 2005b;41:423–32.
28. Kim B, Park H, Lee SH, Sigmund WM. Poly (acrylic acid) nanofibers by electrospinning. *Mater Lett* 2005b;59:829–32.
29. Mit-uppatham C, Nithitanakul M, Supaphol P. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. *Macromol Chem Phys* 2004;205:2327–38
30. Kim KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol* 2005a;120: 327–39.
31. Lee JS, Choi KH, Ghim HD, Kim SS, Chun DH, Kim HY, et al. Role of molecular weight of a tactic poly (vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *J Appl Polym Sci* 2004;93:1638–46
32. Ki CS, Baek DH, Gang KD, Lee KH, Um IC, Park YH. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer* 2005;46:5094–102
33. Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Tan NCB. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 2001;42:261–72
34. McKee MG, Layman JM, Cashion MP, Long TE. Phospholipid non-woven electrospin membranes. *Science* 2006;311:353–5
35. Burger C, Hsiao BS, Chu B. Nanofibrous marterials and their applications. *Annu Rev Mater Res* 2006;36:333–68.
36. Baumgarten PK. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J Colloid Interface Sci* 1971;36:71–9.
37. Fong H, Chun I, Reneker DH. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 1999;40:4585–92.
38. Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B. Structure and process relationship of electrospun bioadsorbable nanofiber membrane. *Polymer* 2002a;439:4403–12
39. Reneker DH, Chun L. Nanometre diameters of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996;7:216–23.

40. Demir MM, Yilgor I, Yilgor E, Erman B. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer* 2002;43:3303–9.
41. Mo XM, Xu CY, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun P (LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004;25:1883–90
42. Katti DS, Robinson KW, Ko FK, Laurencin CT. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. *J Biomed Mater Res* 2004;70B:286–96
43. Larrondo L, Manley RSJ. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. III. Electrostatic deformation of a pendant drop of polymer melts. *J Polym Sci, Polym Phys Ed* 1981c;19:933–40.
44. Zhao ZZ, Li JQ, Yuan XY, Li X, Zhang YY, Sheng J. Preparation and properties of electrospun poly (vinylidene fluoride) membranes. *J Appl Polym Sci* 2005;97: 466–74
45. Geng X, Kwon OH, Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 2005;26:5427–32
46. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospun poly (ϵ -caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* 2006;7:2796–805.
47. Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel. *Adv Mater* 2004;16: 1151–70.
48. Xu CY, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 2004;25:877–86.
49. Jalili R, Morshed M, Abdolkarim S, Ravandi H. Fundamental parameters affecting electrospinning of PAN nanofibers as uniaxially aligned fibers. *J Appl Polym Sci* 2006;101:4350–7.
50. Li D, Ouyang G, McCann JT, Xia Y. Collecting electrospun nanofibers with patterned electrodes. *Nano Lett* 2005b;5:913–6.
51. Mit-uppatham C, Nithitanakul M, Supaphol P. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. *Macromol Chem Phys* 2004;205:2327–38.
52. Casper CL, Stephens JS, Tassi NG, Chase DB, Rabolt JF. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* 2004;37:573–8.
53. Baumgarten PK. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J Colloid Interface Sci* 1971;36:71–9
54. Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel. *Adv Mater* 2004;16: 1151–70.
55. Son WK, Youk JH, Lee TS, Park WH. Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers. *J Polym Sci, B Polym Phys* 2004b;42:5-11.
56. Morrison y Boyd. *Química Orgánica*, 5ta edición. Editorial Pearson. 1998
57. Srinivasan G, Reneker DH. Structure and morphology of small diameter electrospun Aramid fibers. *Polymer Int* 1995;36:195–201.
58. Lee YH, Lee JH, An IG, Kim C, Lee DS, Lee YK, et al. Electrospun dual-porosity structure and biodegradation morphology of montmorillonite reinforced PLLA nanocomposite scaffolds. *Biomaterials* 2005a;26:3165–72.
59. Hearle, J. W. S., Sparrow, E. *The Use of the Scanning Electron Microscope*. Pergamon press, Canada, 1972.

60. López, R. R., Tsutsumi, V., Frixione, E. *Temas Selectos de Biología Celular, Microscopio Electrónico*. SEP/COSNET/CINVESTAD, México, 1986.
61. Skoog, D. A., Leary, J. J. *Analisis Instrumental*. Cuarta edición, Mac Graw Hill, México, 1999.
62. Townsend-Nicholson A, Jayasinghe SN. *Biomacromolecules*. 7 (2006) 9-3364.
63. http://nanoudla.blogspot.mx/2007_11_01_archive.html
64. Skoog, D. A., Leary, J. J. *Principles of Instrumental Analysis*. 6 (2007) 169-351
65. Yang L, Fitie CFC, Werf KOV, Bennink ML, Dijkstra PJ, Feijen J. Mechanical properties of single electrospun collagen type I fibers. *Biomaterials* 2008;29:955–62
66. Boland ED, Matthews JA, Pawlowski KJ, SimpsonDG, Wnek GE, Bowlin GL. Electrospinning collagen and elastin : preliminary vascular tissue engineering. *Front Biosci* 2004c;9: 1422–32
67. Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002;60:613–21
68. Ayutsede J, Gandhi M, Sukigara S, Micklus M, Chen HE, Ko F. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning. Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat. *Polymer* 2005;46:1625–34
69. Lee KH, Kim HY, Ryu YJ, Kim KW, Choi SW. Mechanical behavior of electrospun fiber mats of poly(vinyl chloride)/polyurethane polyblends. *J Polym Sci, B Polym Phys* 2003c;41:1256–62.
70. Ojha SS, Stevens DR, Stano K, Hoffman T, Clarke LI, Gorga RE. Characterization of electrical and mechanical properties for coaxial nanofibers with poly (ethylene oxide) (PEO) core and multiwalled carbon nanotube/PEO sheath. *Macromolecules* 2008;41:2509–13.
71. How TV. *Synthetic Vascular Grafts and Methods of Manufacturing Such Grafts*. US Patent 4552707, 1985.
72. Reneker DH, Yarin AL, Fong H, Koombhongse S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J Appl Phys* 2000;87:4531–47.
73. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Yong T, Ma Z, Ramaseshan R. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Mater Today* 2006;9:40–50.
74. Lee KH, Kim HY, Khil MS, Ra YM, Lee DR. Characterization of nanostructured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer* 2003b;44:1287–94
75. Chen Z, Mo X, Qing F. Electrospinning of collagen–chitosan complex. *Mater Lett* 2007;61:3490–4
76. Noh HK, Lee SW, Kim JM, Oh JE, Kim KH, Chung CP, et al. Electrospinning of chitin nanofibers: degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomaterials* 2006;27:3934–44
77. Li M, Guo Y, Wei Y, MacDiarmid AG, Lelkes PI. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2006c;27: 2705–15
78. Huang ZM, Zhang YZ, Ramakrishna S, Lim CT. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer* 2004;45:5361–8.
79. US PATENT 4044404,
80. US PATENT 4552707
81. Rho KS, Jeong L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD, et al. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials* 2006;27:1452–61

82. Coffee RA. A dispensing device and method for forming material. PCT International Application No: PCT/GB97/01968; 1998
83. Wnek GE, Carr ME, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of nanofibers fibrinogen structures. *Nano Lett* 2003;3:213–6.
84. Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol* 2003;63:2223–53.
85. Kenawy ER, Bowlin GL, Mansfield K, Layman J, Simpson DG, Sanders EH, et al. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly (ethylene-co-vinylacetate, poly (lactic acid), and a blend. *J Control Release* 2002;81:57–64.
86. Zong X, Fang D, Kim K, Ran S, Hsiao BS, Chu B, et al. Nonwoven nanofiber membranes of poly(lactide) and poly (glycolide-co-lactide) via electrospinning and application for antiadhesions. *Polym. Preprints-Am Chem Soc Div Polym Chem* 2002b;43: 659–60.
87. Kattamuri N, Shin JH, Kang B, Lee CG, Lee JK, Sung C. Development and surface characterization of positively charged filters. *J Mater Sci* 2005;40:4531–9.
88. Tsaia PP, Schreuder-Gibson H, Gibson P. Different electrostatic methods for making electret filters. *J Electrostat* 2002;54:333–41
89. Subbiah T, Bhat GS, Tock RW, Parameswaran S, Ramkumar SS. Electrospinning of nanofibers. *J Appl Polym Sci* 2005;96:557–69.
90. Burger C, Hsiao BS, Chu B. Nanofibrous marterials and their applications. *Annu Rev Mater Res* 2006;36:333–68.
91. Jeong EH, Yang J, Youk JH. Preparation of polyurethane cationomer nanofiber mats for use in antimicrobial nanofilter applications. *Mater Lett* 2007;61:3991–4.
92. Figeys D, Pinto D. Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences—a look at some of the basic concepts and novel components used to construct prototype devices. *Anal Chem* 2000;72:330A–5A.
93. Liu Y, Liu H, Qian J, Deng J, Yu T. Feature of an amperometric ferrocyanide-mediated H₂O₂ sensor for organic-phase assay based on regenerated silk fibroin as immobilization matrix for peroxidase. *Electrochim Acta* 1996;41:77–82.
94. Zhang YQ. Natural silk fibroin as a support for enzyme immobilization. *Biotechnol Adv* 1998;16:961–71
95. Wang X, Drew C, Lee SH, Senecal KJ, Kumar J, Samuelson LA. Electrospun nanofibrous membranes for highly sensitive optical sensors. *Nano Lett* 2002;2:1273–5.
96. Wang X, Kim YG, Drew C, Ku BC, Kumar J, Samuelson LA. Electrostatic assembly of conjugated polymer thin layers on electrospun nanofibrous membranes for biosensors. *Nano Lett* 2004;4:331–4.
97. Kwon IK, Matsuda T. Co-electrospun nanofiber fabrics of poly (l-lactide-co- ϵ -caprolactone) with type I collagen or heparin. *Biomacromolecules* 2005;6:2096–105.
98. Jianrong C, Yuqing M, Nongyue H, Xiaohua W, Sijiao L. Nanotechnology and biosensors. *Biotechnol Adv* 2004;22:505–18
99. Bacheva AV, Baibak OV, Belyaeva AV, Oksenoit ES, Velichko TI, Lysogorskaya EN, et al. Activity and stability of native and modified subtilisins in various media. *Biochemistry* 2003;68:1261–6.
100. Xie JB, Hsieh YL. Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: casein and lipase enzyme. *J Mater Sci* 2003;38:2125–33
101. Bhardwaj A, Lee J, Glauner K, Ganapathi S, Bhattacharyya D, Butterfield DA. Biofunctional membranes: an EPR study of active site structure and stability of

- papain noncovalently immobilized on the surface of modified poly- (ether) sulfone membranes through the avidin–biotin linkage. *J Membr Sci* 1996;119:241–52
102. Tomas J, Kula MR. Membrane chromatography—an integrative concept in the downstream processing of proteins. *Biotechnol Prog* 1995;11:357–67.
 103. Klein E. Affinity membranes: a 10-year review. *J Membr Sci* 2000;179:1–27
 104. Bamford CH, Al-Lamee KG, Wear PTJ. Studies of a novel membrane for affinity separations. I. Functionalisation and protein coupling. *J Chromatogr* 1992;606: 19–31
 105. Li M, Mondrinos MJ, Gandhi MR, Ko FK, Weiss AS, Lelkes PI. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* 2005a;26:5999–6008
 106. Li J, He A, Zheng J, Han CC. Gelatin and gelatin-hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solutions. *Biomacromolecules* 2006a;7:2243–7.
 107. Li C, Vepari C, Jin HJ, Kim HJ, Kaplan DL. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006b;27:3115–24.
 108. Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005a;72:156–65.
 109. Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer* 2006;47:2911–7
 110. Huang L, Apkarian RP, Chaikof EL. High-resolution analysis of engineered type I collagen nanofibers by electron microscopy. *Scanning* 2001b;23:372–5.
 111. C.P. Barnes, S.A. Sell, E.D. Boland, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 59 (2007) 1413–1433
 112. How TV, Guidoin R, Young SK. Engineering design of vascular prostheses, proceedings of the institution of mechanical engineers. Part H. *J Eng Med* 1992;206:61–72.
 113. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>
 114. Lichtman, J. W; Conchello, J. A. *Fluorescence Microscopy*. Nature Publishing Group, 2005.
 115. Yang D, Li Y, Nie J. Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs. *Carbohydr Polym* 2007;69:538–43.
 116. Zeng J, Hou H, Wendorff JH, Greiner A. Photo-induced solid-state crosslinking of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers. *Macromol Rapid Commun* 2005;26:1557–62.
 117. Ma ZW, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun cellulose nanofiber as affinity membrane. *J Membr Sci* 2005b;265:115–23.
 118. Pedicini A, Farris RJ. Mechanical behavior of electrospun polyurethane. *Polymer* 2003;44:6857–62.