

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales



Fabricación y Caracterización de Cilindros Fibrosos por la Técnica de Electrohilado con Posible Aplicación en Ingeniería de Tejidos Vasculares

Que como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

Presenta

M.C. Abraham Alejandro Leyva Verduzco

Directora de tesis: Dra. María Mónica Castillo Ortega

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

INDICE

I LISTA DE FIGURAS.....	5
II LISTA DE TABLAS.....	7
III REsumen.....	8
IV Abstract.....	9
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo General.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 ANTECEDENTES.....	14
3.1 Ingeniería de Tejidos.....	14
3.1.1 Ingeniería de tejidos vasculares.....	15
3.1.2 Técnicas basadas en andamios.....	16
3.1.3 Técnicas con matrices descelularizadas.....	16
3.1.4 Procesos de autoensamblaje.....	18
3.1.5 Andamios con materiales naturales.....	19
3.1.6 Andamios con materiales sintéticos.....	19
3.2 PLA.....	20
3.2.1 PLA en Ingeniería de Tejidos.....	21
3.2.4 PLA modificado químicamente.....	22
3.2.5 PLA mezclado con otros materiales.....	23
3.3 Gelatina.....	24
3.3.1 Generalidades de la Gelatina.....	24
3.3.2 Gelatina en Ingeniería de Tejidos.....	25

3.4 Electrohilado.....	26
3.4.1 Parámetros de la Solución para Electrohilado	27
3.4.2 Electrohilado Aplicado a Ingeniería de Tejidos	28
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1 Materiales.....	31
4.2 Métodos	31
4.2.1 Preparación de Membranas Tubulares electrohiladas de PLA, Gelatina, Mezcla PLA/Gelatina, PLA/Gelatina en Arreglo Coaxial	31
4.2.2 Entrecruzamiento de Gelatina con Genipina en las Membranas Tubulares.....	33
4.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido	33
4.2.4 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	34
4.2.5 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	34
4.2.6 Análisis Termogravimétrico.....	34
4.2.7 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	35
4.2.8 Difracción de Rayos X	35
4.2.9 Análisis Mecánico	35
4.2.10 Cultivo y Viabilidad Celular.....	37
4.2.11 Análisis Celular por Microscopía Confocal	38
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1 Análisis morfológico por SEM.....	39
5.2 Análisis de la estructura núcleo-coraza por TEM	41
5.3 Análisis químico por FTIR.....	42
5.4 análisis de la estabilidad térmica por la técnica de tga.....	44
5.5 Análisis de las transiciones térmicas de los materiales por la técnica de DSC.....	46
5.6 Análisis de cristalinidad por DRX.....	47

5.7 Propiedades Mecánicas de las Membranas Tubulares Bajo Tensión Longitudinal, Radial y Ensayo de Resistencia a la sutura	50
5.8 Ensayo de Viabilidad Celular	51
5.9 Análisis Celular por Microscopía Confocal	52
6 CONCLUSIONES	55
7 ANEXOS.....	57
8 PERSPECTIVAS	71
9 BIBLIOGRAFÍA	72

I LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ingeniería de Tejidos con matrices descelularizadas ²⁸	17
Figura 2. Procesos de Ingeniería de Tejidos por autoensamblaje ²⁸	18
Figura 3 Ácido Láctico.....	20
Figura 4 Políácido láctico.....	21
Figura 5 Esquema del proceso de electrohilado	26
Figura 6 Fibras con arreglo coaxial fabricadas por electrohilado ⁴⁹	29
Figura 7 Membranas antes (a) y después (b) del tratamiento de entrecruzamiento con genipina .	33
Figura 8. Esquemas de los sistemas de deformación mecánica para los ensayos de tensión longitudinal, radial y retención de sutura.....	36
Figura 9. Sección (k) Micrografías SEM a 2000X de las muestras PLA (a), CPLA (b), Gelatina (c), CGelatina (d), Coaxial (e), CCoaxial (f), Mezcla (g) y CMezcla (h). Sección (l) Distribución de diámetro de fibra de las muestras PLA, Gelatina, Coaxial y Mezcla.	40
Figura 10. Micrografía TEM de una fibra con estructura núcleo-coraza proveniente del material Coaxial	41
Figura 11. Espectro ATR-FTIR de las membranas PLA, Gelatina, Coaxial y Mezcla (a). Representación molecular de la interacción entre PLA y Gelatina (b).....	43
Figura 12. (a) Espectro ATR-FTIR de las membranas Gelatina y CGelatina, (b) representación gráfica de la reacción entre Gelatina y Genipina (b) ⁵⁷⁻⁵⁹	44
Figura 13 Curvas de termogravimetría de las muestras PLA y CPLA (a), Gelatina y CGelatina (b), Coaxial y CCoaxial (c) Mezcla y CMezcla (d).....	45
Figura 14. Termogramas DSC de las muestras PLA y CPLA (a), Gelatina y CGelatina (b), Coaxial y CCoaxial (c), Mezcla y CMezcla (d).....	47
Figura 15. (a) Patrón DRX de los pellets de PLA, (b) polvo de gelatina, (c) muestras PLA y CPLA, (d) Gelatina y CGelatina, (e) Mezcla y CMezcla, (f) Coaxial y CCoaxial.....	49
Figura 16. Gráficos de barra de la viabilidad de HUVECs sembradas sobre los materiales (a) PLA y Gelatina, (b) Mezcla, CMezcla, Coaxial y CCoaxial. Se realizó un ANOVA y una prueba múltiple de rango de Duncan utilizando el software statGraphics. El asterisco (*) indica los grupos estadísticamente diferentes a un nivel de ($p < 0.05$).....	52

Figura 17. Micrografia confocal de HUVECs teñidas con calceína-AM y sembradas sobre las muestras (a) Coaxial, (b) CCoaxial, (c) Mezcla y (d) CMezcla..... 53

Figura 18. Espectros ATR-FTIR de las muestras Coaxial, CCoaxial, Mezcla y CMezcla después de haber estado 5 días en cultivo..... 53

II LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Conductas al Modificar los Parámetros de Electrohilado.....	27
Tabla 2. Parámetros de electrohilado seleccionados para producir los productos finales.	32
Tabla 3. Resumen de las propiedades mecánicas de los materiales.....	51

III RESUMEN

Se caracterizaron fisicoquímica y biológicamente membranas tubulares fibrosas de poli(ácido láctico) (PLA) y gelatina. Cuatro tipos de tubos fibrosos se elaboraron por la técnica de electrohilado. En cada tubo se utilizó una composición diferente (Fibras de PLA, fibras de gelatina, fibras de la mezcla de PLA y gelatina y, por último, fibras de PLA y gelatina con arreglo coaxial donde el PLA fue el núcleo y la gelatina la coraza). A los tubos que contenían gelatina se les realizó un tratamiento químico de entrecruzamiento con genipina. Todos los materiales obtenidos se caracterizaron por SEM, ATR-FTIR, TGA, DSC, XRD y diferentes ensayos mecánicos, también se realizaron ensayos de viabilidad celular y microscopía confocal de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs) en contacto directo con los materiales. Se observó que cuando la gelatina se encontraba estable en el material (ya sea por interacción química con el PLA o por entrecruzamiento químico), no se solubilizaba, facilitando que las HUVECs tuviesen una base firme donde adherirse y desarrollarse. Las membranas tubulares tipo núcleo-coraza presentaron solamente un 50% de viabilidad celular debido a la solubilidad de la gelatina que no se entrecruzó con el PLA

IV ABSTRACT

A physicochemical and biological characterization were made to different tubular membranes composed by poly(lactic acid) (PLA) and Gelatin. Four tubular membranes based on PLA and gelatin were prepared by the electrospinning technique. Each of the four tubes had different arrangement (PLA fibers, gelatin fibers, PLA-gelatin Blend fibers and PLA/gelatin Core/Shell fibers). The tubes containing gelatin were crosslinked with genipin. All the manufactured materials were characterized by SEM, ATR-FTIR, TGA, DSC, XRD and different mechanical tests. Also, a viability essay and a confocal microscopy of HUVECs in contact with the materials were carried out. The HUVECs attached and grown on the materials when the gelatin was stable (either for chemical interaction between with PLA or for chemical crosslinking) because the non-solubilization of the gelatin provided a firm base to the cells. Only a 50% of cellular viability was observed in the fibers with Core/Shell structure due to solubilization of non-crosslinked gelatin

1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de padecimientos que afectan tanto al corazón como a los vasos sanguíneos. Se consideran un enorme problema puesto que según datos de la organización mundial de la salud (OMS) el 39% de los fallecimientos a nivel mundial durante el año 2015 fueron consecuencia de una ECV. Enseguida se muestra una lista de las ECV (según la OMS) y una breve descripción del sitio donde se presentan:

- **Cardiopatía coronaria:** enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco.
- **Enfermedades cerebrovasculares:** enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- **Arteriopatías periféricas:** enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.
- **Cardiopatía reumática:** lesiones del músculo cardíaco y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por bacterias denominadas estreptococos del grupo A.
- **Cardiopatías congénitas:** malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento.
- **Trombosis venosa profunda y embolia pulmonar:** coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.

Dentro de las ECV que involucran algún padecimiento relacionado con los vasos sanguíneos se encuentran la cardiopatía coronaria, las enfermedades cerebrovasculares, las arteriopatías periféricas y la trombosis venosa profunda. Entre estas la cardiopatía coronaria se caracteriza por la formación de un cúmulo ceroso que termina tapando y endureciendo a las arterias que irrigan al corazón, impidiendo que este sea nutrido y consecuentemente ocasionando un infarto.

Con el propósito de atender la cardiopatía coronaria se han elaborado diferentes procesos invasivos, los cuales tienen la simple finalidad de reestablecer el flujo de sangre. Básicamente hay dos métodos, uno que se encarga de extender el diámetro de la arteria afectada expandiendo un *stent* en el lumen de esta; y otro llamado revascularización sanguínea, en el cual se utiliza un injerto

vascular como vehículo para llevar el flujo sanguíneo desde un sitio sano hacia el sitio afectado. Ambos procedimientos se utilizan bajo consideración del médico y tomando en cuenta las condiciones del paciente. La revascularización sanguínea tiene como inconveniente el uso de injertos vasculares ya sea del mismo paciente o de un donador. Si el injerto es del mismo paciente es necesario realizar una cirugía para la extracción de este (comúnmente la vena safena, situada en la parte interior de la pierna en sentido del plano sagital) y si el injerto se extrae de un donador siempre existe la posibilidad de rechazo por parte sistema inmune del receptor¹⁻³. Con el propósito de evitar una segunda cirugía o el uso de un aloinjerto, actualmente ya se han elaborado sustitutos tubulares poliméricos compuestos de politetrafluoroetileno o de polietilentereftalato; sin embargo, han surgido ciertas problemáticas puesto que estos dispositivos presentan fallas mecánicas como goteo, extensión en diámetro, ruptura, entre otros^{3,4}. Una segunda aproximación es el uso de la ingeniería de tejidos, la cual se basa en injertar un dispositivo al cual previamente se le han cultivado componentes celulares con la intención de que se biomimeticen la función vascular y se favorezca la biocompatibilidad y propiedades mecánicas del dispositivo⁵.

Para fabricar un injerto en ingeniería de tejidos, los materiales que lo conformen deben ser biocompatibles y su estructura microscópica debe favorecer la adhesión y desarrollo celular al punto en el cual las células sembradas en este, secreten matriz extracelular y promuevan la formación de nuevo tejido^{5,6}. Uno de los materiales que se ha utilizado ampliamente en ingeniería de tejidos es el poliácido láctico (PLA). Este poliéster es biocompatible, biodegradable, se puede manipular fácilmente, no es de alto costo y presenta propiedades mecánicas favorables⁷; a pesar de ello, se ha observado que es conveniente mejorar sus características en cuanto a fungir como anfitrión celular. Por esta razón, se sugiere el uso de PLA en combinación con materiales que tienen una mayor bioafinidad, por ejemplo, polisacáridos, colágeno o gelatina⁸⁻¹³. Entre estos tres materiales, el colágeno destaca puesto que en su estructura conserva secuencias de aminoácidos denominadas motivos que resaltan por ser sitios de anclaje celular, no obstante, este material es costoso y su tiempo de extracción muy largo. Por otra parte, resulta atractivo el uso de gelatina, una proteína de bajo costo derivada de la hidrólisis parcial del colágeno. En su secuencia, ésta conserva motivos que le confieren las características de adhesión al colágeno¹⁴⁻¹⁷. Sin embargo, la solubilidad en agua de la gelatina a temperaturas corporales es alta, pero este problema se puede solucionar entrecruzándola químicamente. De tal manera que si se plantea elaborar un andamio utilizando gelatina es necesario incluir un entrecruzante que presente baja o nula citotoxicidad y que

preferentemente reaccione con la gelatina ya que este se puede liberar si el andamio se degrada. Una molécula que en comparación con otros entrecruzantes (dialdehídos, carbodiimidas, diisocianatos) satisface estas necesidades es la genipina^{18,19}. La genipina es un producto químico (extraído del fruto de la planta *Gardenia jasminoides Ellis*) que actúa como entrecruzante reaccionando preferentemente con grupos amina primarios. Tomando en cuenta la propuesta de manufacturar un andamio tubular para ingeniería de tejidos vasculares utilizando PLA y gelatina como materia prima, se propuso realizarlo por la técnica de electrohilado, puesto que ésta permite procesar diferentes arreglos al mezclar polímeros y uno de los productos que se pueden obtener mediante esta técnica son matrices micro o nano-fibrosas^{20,21}.

Con la finalidad de mimetizar la estructura física de la matriz extracelular de un vaso sanguíneo, se fabricaron membranas fibrosas tubulares de diámetro promedio 4 mm. La materia prima utilizada fueron los polímeros biocompatibles PLA y gelatina. Lo novedoso de este estudio fue que la técnica de electrohilado hizo posible obtener diferentes arreglos tubulares en cuanto a composición y estructura de la fibra para así comparar sus ventajas y limitaciones. Además, por un tratamiento químico de entrecruzamiento dirigido hacia la gelatina se logró evitar la solubilidad de los componentes y así mantener la estabilidad de las membranas tubulares. Se realizaron caracterizaciones químicas, físicas, mecánicas y celulares a las membranas tubulares como primer paso de evaluación hacia su función como injerto vascular biomimético.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar materiales tubulares electrohilados para su potencial desarrollo en ingeniería de tejidos vasculares biodegradables.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fabricar por la técnica de electrohilado membranas tubulares porosas basadas en PLA, gelatina y genipina con características adecuadas para su posible uso como andamios celulares e injertos vasculares.
- Caracterizar con apoyo técnicas de espectroscopía infrarroja, calorimetría diferencial de barrido, análisis termogravimétrico, microscopias electrónicas de barrido y de transmisión los materiales obtenidos.
- Evaluar las propiedades de biocompatibilidad y toxicidad de los andamios sembrados con células HUVEC.

3 ANTECEDENTES

3.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos (IT) es una ciencia producto de la evolución del área de biomateriales y se refiere a la utilización de materiales, células y moléculas biológicamente activas en conjunto; esto con la finalidad de crear un tejido. Por ejemplo, actualmente se pueden fabricar instrumentos injertables que permiten la regeneración de la piel de una manera adecuada, también se encuentran dispositivos que funcionalmente sustituyen fragmentos de la vejiga, del hueso o de las válvulas cardiacas²².

Existen tres áreas que la ingeniería de tejidos debe satisfacer para incrementar la probabilidad de que la fabricación de un dispositivo se concluya de manera exitosa. Estas son, el área de construcción del material, la tecnología celular utilizada y la introducción del dispositivo al sistema vivo.

En el área de construcción del material se toma principalmente en cuenta el diseño del dispositivo para IT, los materiales que lo compondrán y la técnica con la que estos van a ser procesados. Por ejemplo, se tendrían que tomar en cuenta diferentes parámetros de diseño para la fabricación de un dispositivo para IT óseo que para uno de IT vascular, puesto que la morfología y mecánica que soportan estos dos tejidos es sumamente distinta. Por consiguiente, los materiales a usar también tendrían que satisfacer diferentes necesidades y, por último, la manera en que los dispositivos se fabricarán requerirá de diferentes consideraciones.

La tecnología celular involucra el tipo de línea celular utilizada. Las líneas celulares pueden ser autógenas, alógenas o xenógenas, cada una con sus diferentes ventajas y desventajas. Por ejemplo, siempre es conveniente inocular células autógenas con el fin de asegurar biocompatibilidad. Sin embargo, esto resulta difícil puesto que, en muchos casos, es preferible la disponibilidad inmediata del injerto a que este esté compuesto por células autógenas; es ahí cuando se tienen que utilizar líneas celulares alógenas o injertos exógenos. La selección de una línea celular que permita tener acceso al injerto sin desgastar o arriesgar la vida del paciente, siempre será lo más conveniente.

El reto con respecto a la introducción del injerto en humanos empieza con la implantación de estos en modelos animales. Sin embargo, no hay modelo animal que cumpla con las características de un humano al cien por ciento, y, aún falta desarrollar metodologías que avalen los resultados tanto en animales como en intentos hacia humanos. Por tanto, hay mucho recorrido por avanzar para poder satisfacer las necesidades en cuanto a un dispositivo en ingeniería de tejidos²²⁻²⁴.

3.1.1 Ingeniería de tejidos vasculares

La ingeniería de tejidos vasculares tiene la intención de fabricar un injerto vascular que cumpla con todas las características necesarias para fungir como tal; por ejemplo, geometría adecuada, resistencia mecánica, biocompatibilidad, que evite la inflamación o la formación de coágulos, etc. No obstante, el ideal no se ha conseguido.

Actualmente existen varios dispositivos de teflón y dacrón (poliéster) que son implantables y relativamente duraderos. Sin embargo, estos no han sido efectivos en vasculaturas de diámetro pequeño (<6mm) puesto que al paso del tiempo tienden a fallar mecánicamente, deformarse y/o activar la respuesta inflamatoria. Se han realizado varias investigaciones en las que se han sintetizado, funcionalizado o recubierto (con materiales de mayor biocompatibilidad como colágeno) a diferentes materiales sintéticos (como los de uso comercial) con la finalidad de mejorar la capacidad de hospedaje celular.

En un estudio Kobayashi H y colaboradores²⁵ sembraron células endoteliales de aorta de rata sobre un tubo manufacturado de PTFE recubierto con colágeno. Observaron una buena confluencia celular y permeabilidad. Sin embargo, se realizaron ensayos *in vivo* y se observó activación plaquetaria y formación de trombos puesto que las células sembradas se desprendieron y la sangre del modelo animal tuvo contacto con el colágeno.

Lee Y. y colaboradores²⁶ modificaron químicamente la superficie de un tubo de poliuretano comercial (chronoflex) injertando dipiridamol y observaron que el injerto tenía buena respuesta celular *In vitro*. Sin embargo, los resultados obtenidos *In vivo* mostraron lo contrario, no se encontró una mejora en cuanto a la disminución de formación de coágulos en los grupos que tenían

dipyridamole con respecto a los de solo polímero. No obstante, las características mecánicas del material no satisficieron las necesidades biológicas una vez que el dispositivo fue injertado. Por otra parte, el uso de albúmina y el inhibidor de las vías del factor tisular en la funcionalización de andamios de PTFE ha brindado resultados favorables en cuanto a la agregación plaquetaria²⁷. No obstante, los estudios en esta área se mantienen con bastante actividad puesto que no se ha logrado fabricar un material que sea lo suficientemente compatible y que conserve las características mecánicas necesarias para fungir como injerto vascular. Por consiguiente, se ha buscado la obtención de dispositivos vasculares de diferentes maneras; por ejemplo, técnicas basadas en andamio que utilizan materiales naturales o sintéticos, o también, llevando a cabo técnicas con matrices descelularizadas y procesos de autoensamblaje^{28,29}. En los siguientes párrafos se describe en qué consiste cada una de las formas de fabricar un injerto vascular por ingeniería de tejidos y avances actuales.

3.1.2 Técnicas basadas en andamios

Los métodos basados en andamios tienen gran importancia puesto que las células en cultivo no forman estructuras tridimensionales, es entonces donde por medio de un andamio se proporciona el soporte para que las células formen una estructura tridimensional y puedan adoptar la morfología de un tejido.

3.1.3 Técnicas con matrices descelularizadas

Dentro de los andamios naturales se encuentran aquellos en los que se toma como base a componentes tisulares de origen animal (Figura 1), estos tienen que ser tratados químicamente con el fin de obtener materiales descelularizados que no generen respuesta inmune. Por ejemplo, se han realizado ensayos en modelos caninos utilizando injertos fabricados a partir de la submucosa intestinal. Los resultados han sido favorables, después de 90 días de implantación los andamios presentaron estructura histológica similar a la de las venas adyacentes²². En otro estudio se observó una conducta mecánica mejor en andamios descelularizados derivados de vasos sanguíneos porcinos que en aquellos que no habían sido descelularizados. También observaron buenas conductas de citocompatibilidad de células endoteliales de vena safena humana, sugiriendo que

estos materiales pudiesen ser un buen sustituto vascular. Sin embargo, diferentes estudios sugieren la optimización de los procesos de descelularización, puesto que este altera de diferentes maneras las características físicas y químicas de los materiales. Por otra parte, la variedad en cuanto a la fuente del andamio resulta en la necesidad de la protocolización de su fuente y un método aplicable para ingeniería de tejidos vasculares²⁸.

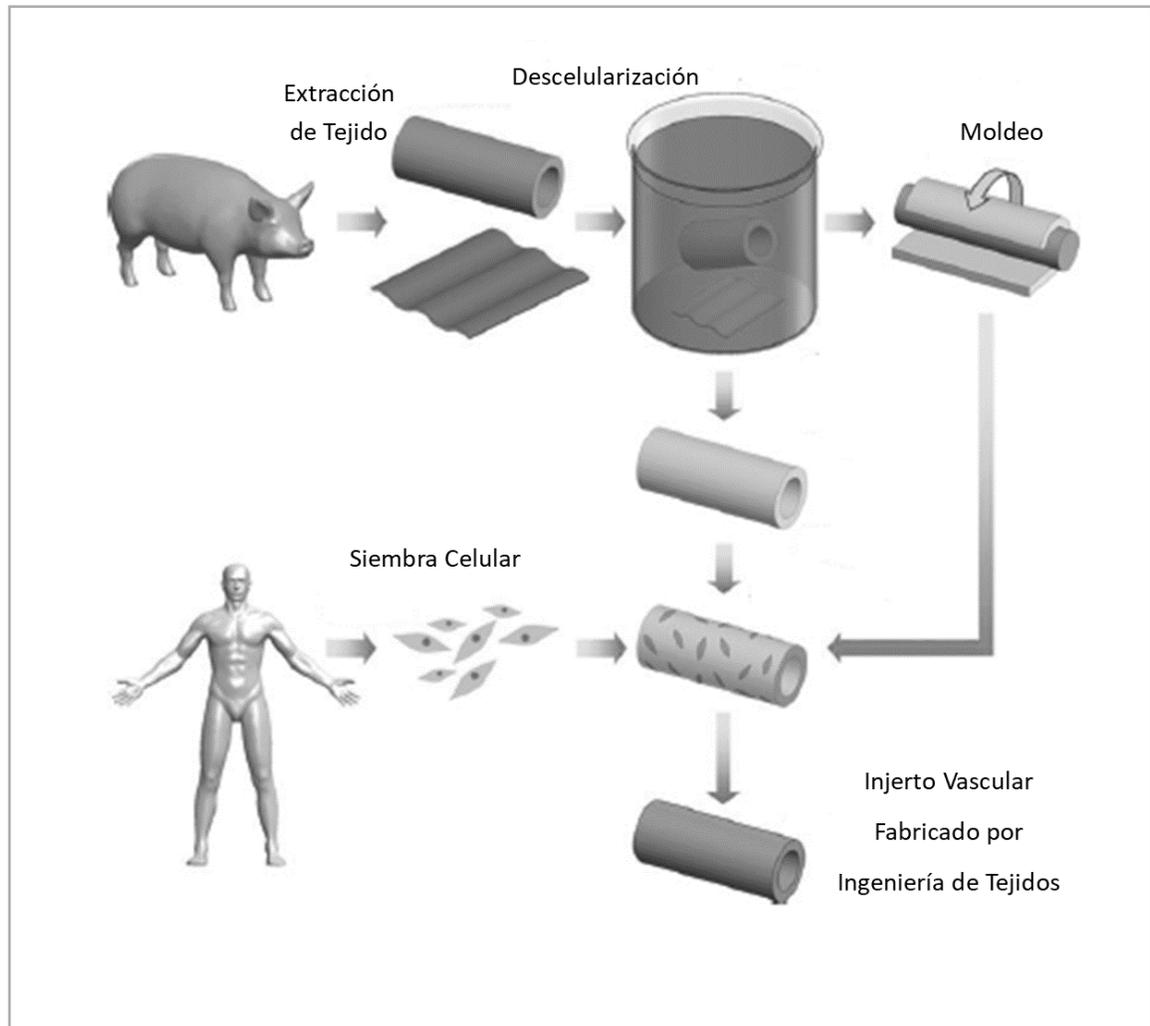


Figura 1 Ingeniería de Tejidos con matrices descelularizadas²⁸

3.1.4 Procesos de autoensamblaje

En cuanto a los procesos de autoensamblaje la ingeniería de tejidos se apoya de las técnicas de impresión celular y la agregación de microtejidos en donde células y matriz extracelular se manipulan físicamente para dar la forma del tejido deseado (Figura 2). Por ejemplo, el enfoque utilizado por Cytograft™ consiste en la fabricación de un andamio laminar en el que se cultivan fibroblastos con sustancias que promueven la formación de matriz extracelular para posteriormente enrollarlo alrededor de un soporte de acero inoxidable que se encuentra cubierto de pintura de teflón y dejarlo en condiciones de cultivo por 10 semanas con la finalidad de implantarlo. Aunque las láminas celulares Cytograft™ han tenido éxito en algunos ensayos clínicos, el tiempo de manufacturación puede estar por arriba de las 40 semanas y se observó que no funcionaron adecuadamente cuando se utilizaron como sustitutos de arteria coronaria^{30,31}. La figura 2 representa 3 diferentes técnicas de autoensamblaje que se manejan en IT, la primera corresponde al concepto utilizado por Cytograft™.

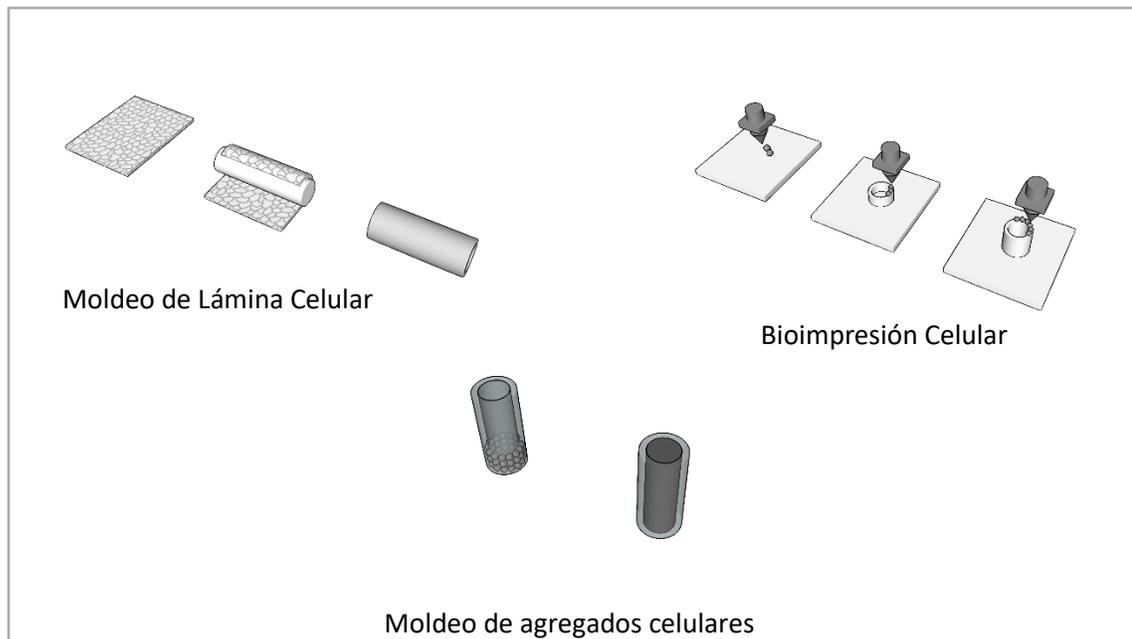


Figura 2. Procesos de Ingeniería de Tejidos por autoensamblaje²⁸

3.1.5 Andamios con materiales naturales

La finalidad de utilizar polímeros naturales como andamio es que los materiales fabricados tengan una alta biocompatibilidad en comparación con los materiales sintéticos. Comúnmente se han utilizado polímeros como colágeno, gelatina, fibrina, fibroína derivada de seda, quitosano, entre otros^{5,15,32-34}. Se ha observado que generalmente las matrices obtenidas con estos materiales presentan propiedades mecánicas insuficientes, es por este motivo que comúnmente se utilicen en conjunto con materiales sintéticos con la finalidad de reforzar los dispositivos para IT.

3.1.6 Andamios con materiales sintéticos

La fácil producción y bajo costo en la fabricación de andamios con materiales sintéticos biodegradables como poliésteres y poliuretanos, ha permitido una gran cantidad de ensayos clínicos. Por ejemplo, se obtuvieron buenos resultados colocando injertos vasculares de un copolímero de PLLA y Policaprolactona (PCL) reforzados con Poliácido glicólico. En 25 pacientes tratados se observó que al paso de 7 años no hubo ruptura, formación de aneurisma, calcificación ni infección en la zona tratada. Algunos pacientes fallecieron por causas exógenas al tratamiento y en ellos se realizó análisis histológico, con el cual se demostró la formación de tejido vascular y que el material se había degradado por completo²⁸. Cabe mencionar que las medidas de los injertos fueron de entre 12 y 24 mm de diámetro y que las zonas de inserción eran de flujo alto y baja presión. Se considera que un valor importante a considerar en la búsqueda de materiales para Ingeniería de tejidos vasculares es que mínimamente soporten las presiones de la vena safena (1599 ± 877 mmHg)³⁵. Por otra parte, Yu E. y colaboradores³² elaboraron tubos con poliuretano termoplástico y fibroína de seda utilizando la técnica de electrohilado y observaron que a relaciones definidas de ambos materiales las propiedades mecánicas del material se comparan con los de una arteria coronaria y también observaron buena viabilidad y compatibilidad ante células endoteliales. Los autores sugirieron la realización de ensayos con modelos animales con el fin de comprobar si los materiales pueden realmente fungir como injerto vascular.

Una alternativa para mejorar las propiedades mecánicas de un andamio es someterlo a cultivo celular dinámico en un biorreactor. Se ha observado que las características mecánicas son más elevadas cuando un andamio se somete a cultivo dinámico en comparación con el estático³⁶. Fuera de esto, la finalidad de obtener un injerto que esté listo para utilizar justo en el momento de una urgencia aún no se cumple, por consiguiente, algunos investigadores plantean el uso de materiales que aparte de cumplir con los requisitos físicos y mecánicos puedan ser implantados sin un pretratamiento celular para que cuando el dispositivo sea injertado las células del hospedero puedan invadirlo y formar tejido propio del hospedero. En los siguientes capítulos se describen brevemente las cualidades de los materiales que se utilizaron en este proyecto.

3.2 PLA

El ácido láctico ($C_3H_6O_3$, Figura 3) es una molécula producto de la fermentación láctica de algunos microorganismos procariontes y de la respiración celular anaerobia. El ácido láctico tiene un centro quiral, por lo que presenta dos estereoisómeros. Uno es el dextrógiro ácido (D-(+)-láctico) y el otro es el levógiro (ácido L-(-)-láctico). El isómero L es el que tiene importancia biológica puesto que la mayor parte de los microorganismos producen a este estereoisómero. A la mezcla racémica se le denomina D,L-ácido láctico.

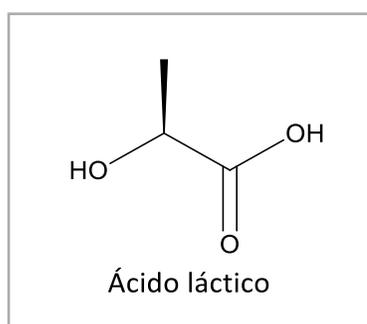


Figura 3 Ácido Láctico

El poli(ácido láctico) es un poliéster sintético fabricado a partir del ácido láctico (Figura 4). Ha sido utilizado ampliamente en asuntos biomédicos puesto que su composición química le permite ser un material biodegradable y biocompatible. Las propiedades quirales del ácido láctico

permiten obtener al polímero en variadas relaciones enantioméricas y de esta manera modificar sus propiedades físicas y químicas. Por otra parte, en comparación con otros compuestos químicos bioactivos, este tiene facilidad de procesamiento y presenta propiedades mecánicas convenientes para algunas aplicaciones biomédicas.

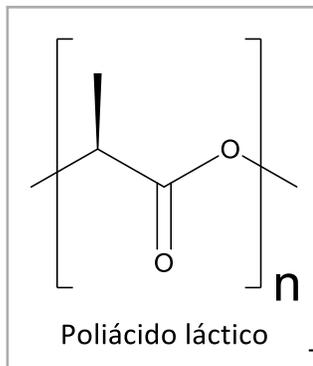


Figura 4 Poliácido láctico

Los materiales biodegradables y sus aplicaciones médicas han sido estudiados extensivamente durante las últimas 4 décadas. Las ventajas que estos ofrecen con respecto a los materiales no degradables radican en que, si se realiza un injerto utilizando como material de apoyo a un polímero degradable, este no se tendrá que extraer del cuerpo y por consiguiente puede considerarse un dispositivo con biocompatibilidad a largo plazo³⁷. Unos de los polímeros sintéticos biodegradables que comúnmente se utilizan en aplicaciones médicas son los poliésteres derivados de productos naturales, por ejemplo, el PLA, el poliácido glicólico (PGA) y la policaprolactona (PCL). Estos tres materiales han sido aprobados por agencias regulatorias de varios países para su uso en medicina utilizándose como implante⁷. Este interés ha propiciado la constante investigación de estos poliésteres, innovando su proceso de obtención, modificando sus propiedades químicas y su morfología.

3.2.1 PLA en Ingeniería de Tejidos

Como se mencionó anteriormente el PLA ha sido modificado de diferentes maneras con la finalidad de aprovechar sus cualidades y aplicarlas en ingeniería de tejidos. Los tratamientos que se

le han dado se podrían dividir en dos enfoques, PLA modificado químicamente y mezclas de PLA con otros compuestos biocompatibles. En los siguientes párrafos se describe como funcionan estos procesos y se menciona brevemente lo que actualmente se ha hecho.

3.2.4 PLA modificado químicamente

La intención de modificar químicamente el PLA es variar su velocidad de degradación, propiedades mecánicas e incrementar su biocompatibilidad. La adición de diferentes grupos funcionales conlleva a diferentes propiedades físicas. Por ejemplo, en un estudio A. Ospina y colaboradores³⁸ injertaron colágeno a la cadena de PLA utilizando anhídrido maléico como agente enlazante. Observaron que las propiedades mecánicas y la respuesta celular ante el material sintetizado eran mejores que aquel material fabricado con solo PLA. Por otra parte, cuando el ácido láctico es copolimerizado con ácido glicólico se obtiene el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) el cual presenta mejores propiedades en cuanto a cristalinidad (más bajas que los homopolímeros de los materiales individuales) permitiendo obtener un perfil de degradación que puede ser modificado con respecto a la cantidad adicionada de ácido glicólico. También, se fabricaron geles de quitosano injertado con PLA y se observó que el Injertar PLA a la cadena de quitosano se logró disminuir la cristalinidad de este. Además, se han realizado modificaciones químicas con plasma de diferentes orígenes (Oxígeno, Helio, Nitrógeno) con la finalidad de modificar químicamente la superficie de matrices elaboradas con PLA. Se observó que los tratamientos con plasma no afectaron la velocidad de biodegradación en suelo. Por otra parte, los tratamientos con plasma de amoníaco (NH₃) y oxígeno (O₂) incrementaron la hidrofiliidad de las matrices poliméricas y también se observó una mejora en la conducta celular de células musculares y nerviosas en contacto con el material tratado con plasma con respecto al que no se trató³⁹. La mejora de los materiales se encuentra en constante evolución y otra manera de optimizar sus propiedades (hacia alguna aplicación en específico) ha sido el generar materiales compuestos. En el siguiente subtema se describe de manera breve lo que es un material compuesto y algunos avances en cuanto a ingeniería de tejidos y PLA como componente en un material compuesto.

3.2.5 PLA mezclado con otros materiales

Se le denomina material compuesto o composito a aquel material elaborado a partir de la combinación de dos o más materiales distintos. La finalidad de elaborar un material compuesto es que éste presente las propiedades características de los materiales que lo conforman, por ejemplo, Bryan W Tillman y colaboradores⁴⁰ elaboraron andamios electrohilados combinando PCL y colágeno con la finalidad de favorecerse de las características mecánicas del PCL y de las de buen anfitrión celular del colágeno. Las membranas tubulares elaboradas con este material compuesto soportaron el flujo sanguíneo durante un mes sin que la permeabilidad y calidad de andamiaje del dispositivo fuera afectada, sugiriendo que este material compuesto podría utilizarse como sustituto vascular. Tuerdimaimaiti Abudula y colaboradores⁴¹, elaboraron andamios vasculares utilizando fibrillas de celulosa reforzadas con PLA y polibutileno succinato, observaron que cuando los materiales se encontraban combinados las conductas mecánicas del andamio eran comparables a las de un vaso sanguíneo nativo. En otro estudio se elaboraron andamios de celulosa bacteriana (CB) recubiertas con colágeno, sumergiendo varias capas de películas de CB en una solución ácida de colágeno. Se observó que el material espumoso obtenido incrementó su resistencia mecánica y que podía soportar en cultivo a fibroblastos de ratón. Los autores recomendaron el uso del dispositivo como apósito para heridas⁴². Otro enfoque para mejorar las propiedades mecánicas de los materiales es mezclarlos no solo con polímeros sino con materiales cerámicos o con sales metálicas, por ejemplo, se observó que al mezclar PLA con fosfato de calcio el módulo elástico incrementó hasta ser comparable con aquel de un hueso nativo. También el PLA ha sido combinado con óxidos metálicos como alúmina y Titania con la finalidad de obtener propiedades mecánicas que encajen con aplicaciones ortopédicas³⁹. Existen numerosas mezclas de materiales ya elaboradas y también por elaborar, lo que da paso a la investigación de materiales compuestos, en el caso de este proyecto, de compositos con actividad biológica.

3.3 GELATINA

3.3.1 Generalidades de la Gelatina

La gelatina es un biopolímero natural que se obtiene a través de la hidrólisis ácida o alcalina del colágeno de los huesos, tendones y piel de animales. Existen dos tipos de gelatina, la gelatina tipo A y la tipo B. La hidrólisis alcalina de piel y huesos animales a un periodo de tiempo y temperatura apropiados resultan en la obtención de gelatina tipo B. Por otra parte, la hidrólisis ácida utilizando HCl y H₂SO₄ resulta en la obtención de la gelatina tipo A. La gelatina es soluble en polioles como glicerol y propilenglicol y en varios compuestos orgánicos como trifluoroetanol, ácido acético y formamida. Debido a que la gelatina es soluble en agua caliente, existe la necesidad de mejorar su estabilidad para poder utilizarse como biomaterial implantable.

Las propiedades mecánicas de la gelatina pueden ser mejoradas utilizando métodos de entrecruzamiento químico. Los entrecruzantes comunes son EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, glutaraldehído, polifenoles y genipina. De entre estas sustancias destaca la genipina, puesto que se ha visto que presenta buenos rendimientos como entrecruzante y su toxicidad es baja en comparación con los otros materiales^{18,19}.

El uso de la gelatina ha ganado mucha importancia en los campos de la ingeniería biomédica, ingeniería de tejidos, en la industria de los cosméticos y la comida debido a las siguientes razones:

- Presenta buena relación de costo/eficiencia y rápida disponibilidad
- Es biodegradable y biocompatible
- Presenta antigenicidad mínima (por ser derivado de la degradación del colágeno)
- Presenta secuencias RGD que promueven la adhesión celular por medio de integrinas (RGD: Arginina-glicina-ácido aspártico).
- Sus grupos funcionales son químicamente modificables, puede ser mezclada con un gran número de polímeros naturales y sintéticos para su uso como andamio en el desarrollo de dispositivos para ingeniería de tejidos cardiovascular, de hueso, ocular y muscular⁴³.

3.3.2 Gelatina en Ingeniería de Tejidos

Se han elaborado muchas investigaciones en cuanto a la inclusión de la gelatina en ingeniería de tejidos. Por ejemplo, los resultados en los estudios de Wanyiao Xia y colaboradores⁴⁴, demostraron que fue posible regenerar cartílago elástico de animales inmunocompetentes utilizando un andamio poroso de gelatina y quitosano, sugiriendo que el material fabricado puede utilizarse en ingeniería de tejidos de cartílago. Mengyan Li y colaboradores⁴⁵ mezclaron gelatina con polianilina con la finalidad de crear un andamio inteligente que permitiera que las células sembradas (mioblastos cardíacos de rata) respondan a estímulos eléctricos. Los resultados en cuanto a biocompatibilidad y adhesión celular fueron convenientes. Sin embargo, la respuesta celular en cuanto a estímulos eléctricos sigue sin concluir. Sio Mei Lien y colaboradores⁴⁶ fabricaron andamios porosos de gelatina (50 a 500 μm) con la intención de observar si la diferencia en tamaño de poro generaba algún cambio en cuanto a la conducta celular de condrocitos. Observaron que las células presentaban un mayor crecimiento, proliferación y expresión de componentes de matriz extracelular cuando el tamaño de poro estaba por encima de 250 μm . Xiaohua Liu y colaboradores⁴⁷, fabricaron matrices porosas de nanofibras de gelatina con hidroxiapatita hipotetizando que estos andamios funcionarían de una manera adecuada en el cultivo de osteocitos. Observaron que el material presentaba mejores parámetros mecánicos y celulares cuando este contenía hidroxiapatita que cuando era solo de gelatina. Laleh Ghasemi M y colaboradores⁴⁸ manejaron la técnica de electrohilado para la elaboración de nanofibras con orden aleatorio y alineado utilizando Policaprolactona mezclada con gelatina. Con estos estudios comprobaron la hipótesis planteada en la que estos andamios podrían sostener células nerviosas. Observaron que a una relación de PCL:Gelatina de 70:30 p/p las células nerviosas presentaban mejor afinidad por el andamio que a una proporción de 50:50, otro dato interesante fue que las células tuvieron mejor interconectividad cuando se sembraron sobre los andamios con fibras alineadas que con fibras al azar. La gelatina se ha aplicado de diferentes maneras con la intención de incrementar la biocompatibilidad de los materiales con los que se ha combinado y se ha visto que ha presentado buenos resultados. Las cualidades mencionadas anteriormente y los buenos resultados que ha arrojado en investigación es lo que la vuelven un buen recurso para ingeniería de tejidos.

3.4 ELECTROHILADO

El electrohilado es un proceso muy interesante y de los más eficientes en cuanto a la producción de fibras de polímeros. El intervalo de diámetro de fibra que este proceso puede generar va desde varios micrómetros hasta nanómetros. El proceso de electrohilado utiliza un campo eléctrico que se aplica gradualmente entre la aguja metálica de una jeringa y un colector conductor (Figura 5) hasta lograr que la tensión superficial de una gota de la solución de polímero que se encuentra en la punta de una jeringa se venza, haciendo que ésta se transforme en un cono (cono de Taylor) que posteriormente forma un chorro que tiende a viajar hacia un colector debido a que este tiene carga opuesta a la que se le aplica a la solución polimérica. Mientras el chorro viaja hacia el colector, se va estirando y el solvente se va volatilizando, de tal manera que, cuando el material es recolectado, se encuentra en forma de fibras que pueden contener trazas de solvente.

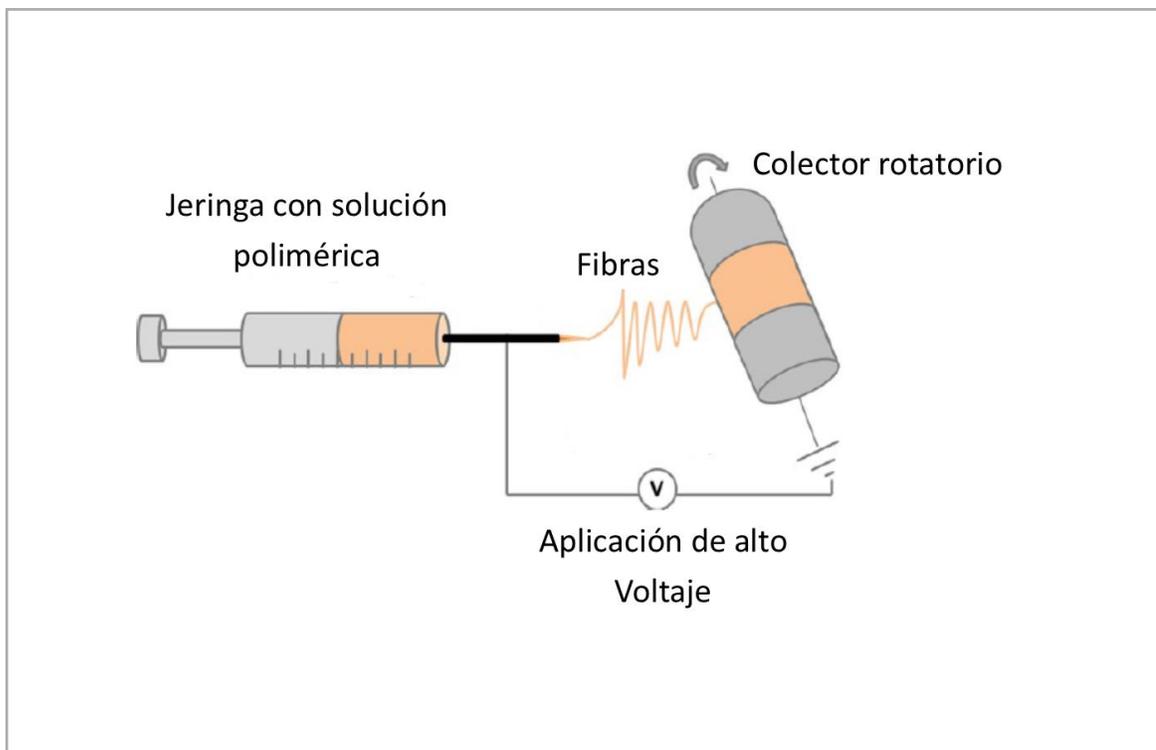


Figura 5 Esquema del proceso de electrohilado

En general, las fibras producidas por electrohilado tienen una textura suave y un núcleo sólido. Este tipo de fibras ha sido utilizado ampliamente y, además, el margen de uso de las fibras puede mejorarse debido a que la técnica de electrohilado es manipulable de tal manera que posee la capacidad de generar estructuras específicas, por ejemplo, fibras porosas, huecas, en arreglo coaxial, con materiales disueltos o mezclados en ella; lo que ofrece una ventaja en cuanto al número de aplicaciones. El proceso puede modificarse para obtener membranas porosas al azar u orientadas paralelamente. Es por eso que las fibras fabricadas por electrohilado ofrecen una alternativa ideal para aplicaciones en ropa de seguridad, catálisis, biosensores, ingeniería de tejidos, liberación de fármacos, membranas para filtros o plantillas para formar nanotubos funcionales. Los parámetros manipulables en el proceso de electrohilado se pueden generalizar en dos: aquellos que involucran a la solución y aquellos que son inherentes al mismo proceso. En la Tabla 1 se resume como es que cada una de estas variables afecta en el proceso de electrohilado.

3.4.1 Parámetros de la Solución para Electrohilado

Todos los parámetros tienen un intervalo de manejo en el cual por debajo o encima difícilmente es posible electrohilar. La tabla 1 describe como es que estos parámetros influyen en las características de las fibras producidas esta la técnica.

Tabla 1. Conductas al Modificar los Parámetros de Electrohilado

Parámetro	Incremento	Decremento
Concentración Solución	El diámetro de fibra aumenta. En exceso es imposible que el proceso se lleve a cabo puesto que la aguja se taponea con la solución polimérica	El diámetro de fibra disminuye y empieza a haber formación de lóbulos hasta llevar el proceso a electroaspersión
Viscosidad Solución	El diámetro de fibra aumenta (Se comporta de la misma manera que con la concentración de la solución)	El diámetro de fibra disminuye (Se comporta de la misma manera que con la concentración de la solución)
Voltaje Aplicado	El diámetro de fibra aumenta	El diámetro de fibra disminuye. Por debajo de umbral no se logra la formación del cono de Taylor

Velocidad de Flujo	Se ha observado que el diámetro y (si la fibra es porosa) el poro de fibra aumenta con un aumento en la velocidad de flujo en el caso de poliestireno	Una baja velocidad de alimentación es deseable porque de esta manera el solvente se alcanza a volatilizar completamente en el transcurso de la punta de la aguja al colector.
	Un flujo alto resulta en la formación de perlas debido a la incapacidad de que se seque la muestra antes de llegar al colector	Sin embargo, por debajo del umbral se observa aspersion o una mala formación de cono de Taylor
Distancia entre Colector y Aguja	Distancias muy largas se manifiestan con la presencia de perlas en las fibras. La distancia óptima del proceso es aquella en la que el material recolectado no tiene solvente	Distancias muy cortas se manifiestan con la presencia de perlas en las fibra y alta carga de solvente

3.4.2 Electrohilado Aplicado a Ingeniería de Tejidos

El uso de la técnica de electrohilado en ingeniería de tejidos deriva de su capacidad para crear soportes con propiedades físicas y químicas adecuadas para contener células y dejar que se desarrollen sobre ellos hasta el punto de generar un tejido nuevo. Puesto que la estructura física de las membranas obtenidas por electrohilado simulan físicamente a la matriz extracelular y los materiales que pueden ser procesados por esta técnica son muchos (incluidos polímeros sintéticos y biopolímeros), se han generado amplias y numerosas investigaciones en al área de andamiaje celular utilizando materiales fabricados por esta. Enseguida se muestra una imagen con micrografías de matrices obtenidas por electrohilado (Figura 6).

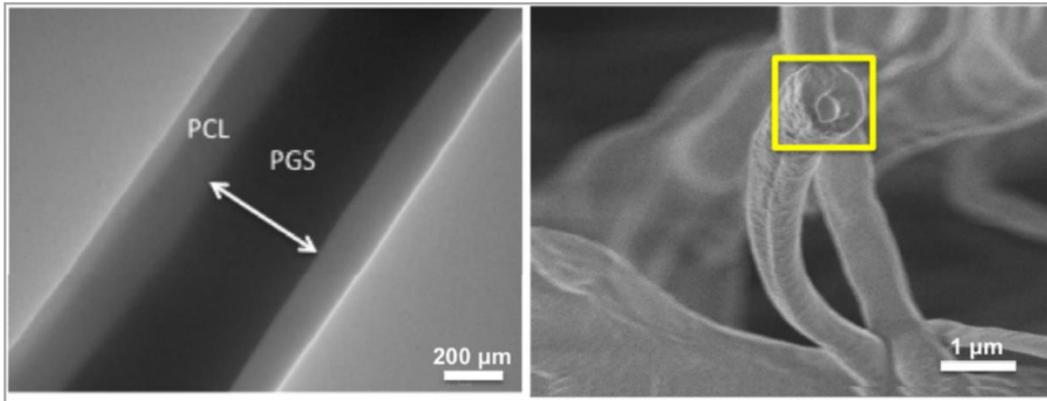


Figura 6 Fibras con arreglo coaxial fabricadas por electrohilado⁴⁹

Brito Pereira y colaboradores⁵⁰ elaboraron matrices poliméricas de fibroína de seda y nanopartículas magnéticas con la intención de generar andamios que fueran sensibles a estimular magnéticamente el crecimiento tisular. Se observó que cuando las nanopartículas magnéticas eran incorporadas al material este formaba estructuras fibrosas con diámetro de fibra más delgado en comparación con aquellas que eran solo de fibroína. Por otra parte, se demostró que el agregar las nanopartículas magnéticas hasta un 20 % no generó conductas citotóxicas. Abdalla Abdal-hay y colaboradores⁵¹, reforzaron un tubo membranoso de PCL agregando una segunda capa de PU y posteriormente lo entrecruzaron térmicamente con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas y así poder aplicarlos en ingeniería de tejidos vasculares. Se tuvo éxito en cuanto a los parámetros de presión a la ruptura, módulo elástico, esfuerzo cedencia y citocompatibilidad lo cual hace que el material sea potencialmente aplicable en ingeniería de tejidos vasculares. En otras investigaciones Marta S. Carvalho y colaboradores⁵² elaboraron andamios electrohilados con una combinación de matriz extracelular derivada de HUVECs y PCL, con la combinación de materiales obtuvieron una membrana con mayor resistencia mecánica que la de la matriz extracelular y con una conducta de hospedero celular mejor que la de solo PCL. El equipo de investigación sugirió realizar modificaciones en cuanto a la aspereza de los materiales obtenidos para mejorar las conductas de diferenciación celular. João C. Silva y colaboradores⁴⁹ elaboraron membranas de fibras alineadas

utilizando poliglicerol sebacate (PGS), PCL y kartogenina con la finalidad de obtener membranas para uso en cartílago. Se obtuvo un material con las dimensiones comparables a las fibras de un cartílago animal; aquellas fibras que tenían kartogenina promovieron la diferenciación de células madre estromales a condrocitos. Los resultados sugirieron que el material puede ser utilizado en las estrategias de generación de cartílago. En resumen, la técnica de electrohilado realmente permite fabricar matrices aplicables en ingeniería de tejidos, el uso de diferentes materiales para generar estructuras variadas da apertura a seguir investigando en la fabricación de andamios electrohilados.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

- Los productos utilizados fueron PLA 2002D (Nature Works).
- Gelatina tipo A derivada de piel de porcino (Sigma Aldrich).
- 2,2,2 – Trifluoroetanol. (Sigma Aldrich).
- Genipina. (Sigma Aldrich).
- Frascos de vidrio para almacenaje de 80 mL
- Medio de cultivo DMEM Suplementado con 10% de Suero fetal bovino (Caisson Labs)
- Resarzurina de Sodio, (Sigma Aldrich).
- Calceína AM (MERCK Co.).
- Azul de metileno (Sigma Aldrich).
- Células endoteliales HUVEC de la colección ATCC, CRL-1730

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparación de Membranas Tubulares electrohiladas de PLA, Gelatina, Mezcla PLA/Gelatina, PLA/Gelatina en Arreglo Coaxial

Cada membrana fabricada se nombró tomando en cuenta su composición y arreglo al electrohilarse, los nombres asignados fueron PLA para la membrana de solo PLA, Gelatina para la membrana de únicamente gelatina, Mezcla para la membrana con los dos materiales presentes en la misma solución de electrohilado y, por último, coaxial para aquella membrana cuya composición fue de fibras con arreglo núcleo/coraza, para esta se utilizaron las soluciones de PLA y gelatina mencionadas anteriormente, cada una puesta en una jeringa diferente, estas se unían concéntricamente en la sección de las agujas, esto con la finalidad de que se formara el arreglo coaxial estando como núcleo el PLA y como coraza la gelatina.

Para la preparación de la membrana PLA una cantidad correspondiente al 14% en P/V de PLA con respecto al volumen de 2,2,2-trifluoroetanol fue puesta en un frasco de almacenamiento de 50 mL, posteriormente, el solvente fue agregado mientras el material se encontraba en agitación magnética. La membrana tubular de gelatina fue fabricada utilizando una solución al 14 % P/V y La solución fue preparada colocando el polvo de gelatina en un frasco de almacenamiento para después agregar el solvente mientras el material se encontraba en agitación. La solución utilizada para la fabricación de la membrana mezcla se elaboró colocando en un frasco de almacenamiento una cantidad equivalente a una relación 100:30 de PLA y Gelatina, esta mezcla fue agitada a mano durante un minuto para posteriormente agregar el solvente correspondiente y llevarla a agitación magnética. Todas las soluciones se dejaron en agitación por 24 horas con la finalidad de que todo el sustrato que las compuso se disolviera por completo.

El sistema de electrohilado se compuso por una jeringa de 5 mL (marca HENKE SASS WOLF, modelo D-78532), una fuente de poder (marca SPELLMAN, modelo CZE 1000R), una bomba para jeringa (marca kdScientific, modelo 2568CO) y un mandril con un colector de aluminio con dimensiones de 5 mm y 120 mm de diámetro y largo, respectivamente. En todos los procesos se utilizó 2,2,2-trifluoroetanol como solvente. Para cada uno de los materiales se variaron los parámetros de electrohilado donde los cambios de voltaje fueron entre 10 y 18 kV variando 1 kV en cada ensayo, la distancia se varió entre 10 y 18 cm variando de 0.5 cm, los flujos que se manejaron fueron de 2, 4, 6 8 y 10 mL·min⁻¹, las concentraciones variaron entre 13, 14 y 15% P/V. En la Tabla 2 se muestran los parámetros obtenidos para electrohilar cada uno de los productos finales.

Tabla 2. Parámetros de electrohilado seleccionados para producir los productos finales

	Voltage (kV)	Distancia (cm)	flujo (mL·min ⁻¹)	Concentración
PLA	15	12.5	10	14 % p/v
Gelatina	15	16.5	10	14 % p/v
Mezcla	11	15.5	10	10:3 Relación masa PLA:Gelatina
Coaxial	17	16.5	10	14/14 % p/v PLA/Gelatina

4.2.2 Entrecruzamiento de Gelatina con Genipina en las Membranas Tubulares

El tratamiento de entrecruzamiento fue llevado a cabo colocando cada una de las membranas en un tubo de ensayo con tapón para después agregar una solución de genipina en etanol al 0.5% p/v hasta completar el 4% del peso de la cantidad de gelatina que cada muestra contenía. Los tubos se mantuvieron en agitación mecánica a 37°C durante 7 días, después de eso, las muestras fueron retiradas de los tubos y lavadas tres veces con 3 mL de etanol, a continuación, estos fueron secados a vacío durante 4 h. En la figura 7 se pueden observar dos fotografías que representan a las membranas tubulares antes (a) y después (b) de haber sido tratadas con genipina. Solo los tubos que contenían gelatina cambiaron de un color blanco a uno azul verdoso. El cambio de color observado es producto de la reacción de entrecruzamiento. Los tubos que recibieron el tratamiento fueron nombrados con una C al inicio de la palabra, indicando que el material ha sido entrecruzado (para cada de ellos los nombres fueron CGelatina, CMezcla y CCoaxial).

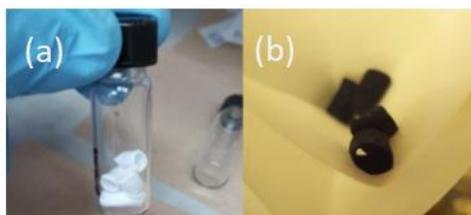


Figura 7 Membranas antes (a) y después (b) del tratamiento de entrecruzamiento con genipina

4.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido

La morfología microscópica de las membranas tubulares se estudió utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL, modelo 5410LV) con un voltaje de aceleración de 20kV. Cada muestra fue recubierta con oro antes de llevar a cabo el análisis.

4.2.4 Microscopía Electrónica de Transmisión

Las fibras de la muestra coaxial se estudiaron por Se realizó una microscopía electrónica de transmisión (JEOL 2010 F) a con la finalidad de observar si presentaban un arreglo núcleo-coraza, a un voltaje de aceleración de 200 kV. Las fibras fueron extraídas de la membrana utilizando unas pinzas, después, se colocaron cuidadosamente entre dos rejillas con la intención de que estas quedaran fijas durante la observación.

4.2.5 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis por FTIR se realizó con la finalidad de evidenciar alguna interacción entre los materiales que conforman las membranas. Las espectroscopías se llevaron a cabo con un equipo Perkin Elmer FT-IR modelo Frontier utilizando el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). El espectro fue obtenido en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} en el modo de transmitancia.

4.2.6 Análisis Termogravimétrico

El análisis termogravimétrico fue llevado a cabo con la intención de observar si la estabilidad térmica de los materiales era modificada una vez que la gelatina se entrecruzaba o una vez que aquellos interactuaban entre sí. Los experimentos se realizaron usando un equipo Perkin Elmer Pyris 1, utilizando muestras de 3 mg. El ensayo se realizó en un intervalo de 25 a 900°C, a una rampa de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$, utilizando un crisol de alúmina. Todos los análisis se llevaron a cabo en una atmósfera inerte bajo flujo de nitrógeno seco.

4.2.7 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se realizó un estudio por DSC a todos los materiales con la intención de observar cambios fisicoquímicos en las muestras debido al tratamiento de entrecruzamiento. Para llevar a cabo el análisis se utilizó un equipo Perkin Elmer DSC 8500. La masa utilizada para cada espécimen fue de entre de 5 a 8 mg. Todos los ensayos se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno utilizando un contenedor de aluminio. El intervalo de temperatura que se analizó fue de 25 a 250°C utilizando una rampa de calentamiento de 10 °C·min⁻¹

4.2.8 Difracción de Rayos X

El análisis de difracción de rayos X se llevó a cabo con la finalidad de observar si el proceso de electrohilado modificaba la cristalinidad de las muestras. Para ejecutar el análisis los materiales fueron cortados en cuadros de 1 cm por lado. El experimento se corrió con un equipo de difracción Rigaku modelo Dmax2100 utilizando radiación de Cu-Ni ($\lambda=1.54184 \text{ \AA}$) con un potencial de 30kV. Los difractogramas fueron escaneados en un intervalo de 4 a 80° a una velocidad de escaneo de 2°·min⁻¹.

4.2.9 Análisis Mecánico

Se realizaron diferentes ensayos mecánicos bajo tensión uniaxial con la intención de observar si los materiales fabricados cumplen con las características mecánicas para fungir como un injerto de vaso sanguíneo. Las pruebas que se realizaron fueron de deformación longitudinal y radial (utilizando las muestras en forma tubular) y resistencia a la sutura (en fragmentos de las muestras con dimensiones de 1 cm²). Los ensayos mecánicos se realizaron con una máquina Universal Instron ElectroPuls System, modelo E1000, utilizando una celda de carga de 100 N y una velocidad de deformación de 200 mm·min⁻¹.

Para determinar la deformación longitudinal se cortaron muestras de 50 mm de largo. Se utilizaron dos adaptadores de acero templado con una forma cilíndrica y dos sujetadores tipo cincho para sostener los extremos de las muestras.

Para llevar a cabo el ensayo de deformación radial, los tubos se cortaron a 10 mm de largo, dos varillas de acero de 2 mm de diámetro se pasaron por el lumen de las muestras. Se sujetaron los extremos de los tubos con unos adaptadores de aluminio para poder llevar a cabo la deformación.

Para calcular la retención a la sutura, los tubos fueron cortados en varias muestras cuadradas de 10 mm de lado y estas se pincharon y sujetaron con hilo de sutura a un nivel de 2 mm despegado de una de las orillas, el otro extremo de las muestras se sujetó con las pinzas de la máquina de ensayos mecánicos y la sutura en un garfio inmóvil. Posteriormente se llevó a cabo la deformación y se midió la fuerza a la cual la sutura rompía el material. La Figura 8 muestra fotografías de los sistemas para los ensayos de deformación longitudinal, radial y retención de sutura.

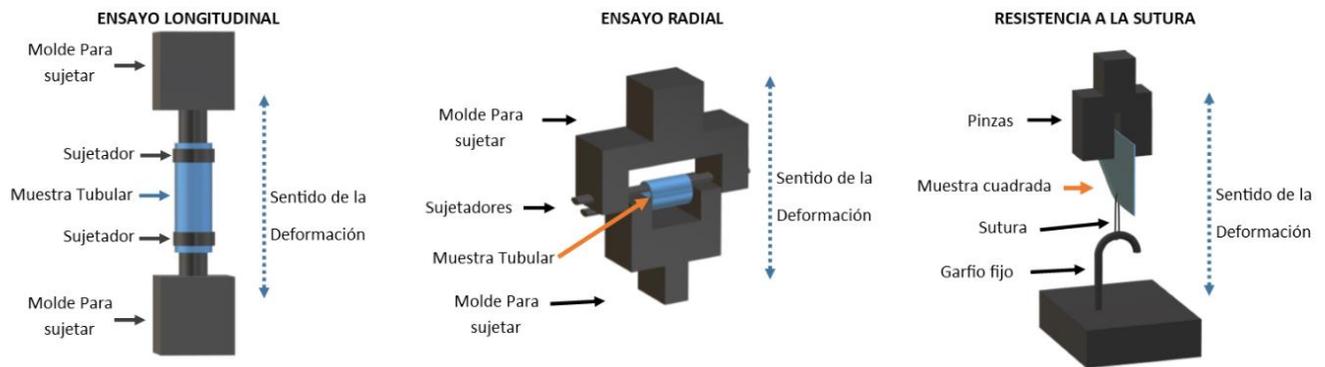


Figura 8. Esquemas de los sistemas de deformación mecánica para los ensayos de tensión longitudinal, radial y retención de sutura.

4.2.10 Cultivo y Viabilidad Celular

La técnica de cultivo celular es utilizada para mantener en constante multiplicación a células que no se encuentran dentro de su ambiente usual, para esto se utiliza medio de cultivo y placas de cultivo, el medio contiene suplementos como suero fetal bovino que proporciona factores de crecimiento para las células y antibióticos que permiten que no haya contaminación con agentes microbianos ambientales, mientras que la placa de cultivo es el contenedor transparente donde las células se pueden soportar y al mismo tiempo ser observadas al microscopio. Al traspase de células a otro contenedor (esto es necesario ya que las células se encuentran en constante reproducción y pueden sobrepoblar el contenedor y entrar en un proceso de muerte celular debido a la falta de espacio) se le denomina subcultivo.

Para realizar el ensayo de viabilidad celular se cultivaron células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) manteniéndolas en incubación a 37°C con una atmósfera con 5% de presión de CO₂ en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1% de solución de penicilina/estreptomicina, realizando cambio de medio cada dos días. Las células se trabajaron al 8^{vo} ciclo de cultivo.

Para cuantificar la viabilidad de las células HUVEC en contacto con los materiales, se realizó un ensayo colorimétrico utilizando resazurina como indicador. Las mediciones de absorbancia se realizaron con un lector multi-modal de microplacas marca BioTek modelo Synergy HTX.

En una placa de poliestireno transparente para cultivo celular (TCPS) de 96 pocillos se colocaron 10,000 células endoteliales sobre fragmentos circulares de 6 mm de diámetro de cada uno de los tubos fabricados. Posteriormente, se dejaron en incubación. Al paso de 24 h, se aspiró el medio de cultivo y se colocó medio de cultivo nuevo con resazurina a una concentración de 10 mg/mL, se regresó la placa a incubación y ahí permaneció durante 4 h. Después, la placa se sacó y leyó en un lector de placas a longitudes de onda de 570 y 600 nm. Se utilizó la ecuación 1 para el cálculo de viabilidad. Los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó el TCPS como control positivo y medio de cultivo como blanco.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \left(\frac{(\epsilon_{600} \times A_{570}) - (\epsilon_{570} \times A_{600})}{(\epsilon_{600} \times C_{570}) - (\epsilon_{570} \times C_{600})} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde ϵ_{600} y ϵ_{570} son el coeficiente de extinción molar de la resazurina a 600 y 570 nm respectivamente, A_{600} y A_{570} son las absorbancias de las muestras a 600 y 570 nm, y por último, C_{600} y C_{570} son las absorbancias de los controles a las mismas longitudes de onda.

4.2.11 Análisis Celular por Microscopía Confocal

Se utilizó un microscopio confocal Nikon A1R con la finalidad de observar la morfología que las HUVECs adoptaron una vez que estas se sembraron sobre los materiales. Para llevar a cabo el análisis, las muestras poliméricas se cortaron en rondanas de 6 mm de diámetro y se colocaron en placas de cultivo de 48 pocillos, posteriormente los especímenes se esterilizaron con 200 μL de etanol al 70%, una vez que las muestras estuvieron secándose durante 4 días a 45°C se procedió con la siembra celular. Cuidadosamente se colocó sobre cada una de las muestras una gota de 50 μL de medio DMEM que contenían 5,000 células, esto con la finalidad de asegurar que todas las células quedaran sobre el material. Después de la siembra los materiales se llevaron a incubación por 2 h y se agregó a cada pocillo 500 μl más de medio DMEM, para posteriormente teñirlas con calceína-AM y observarlas con el microscopio.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de realizar la preparación de las membranas, estas fueron caracterizadas por diferentes técnicas. en total se trabajaron con 6 materiales que se seleccionaron por presentar mejores características visuales y de manejo manual. A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de las diferentes técnicas aplicadas a los materiales.

5.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO POR SEM

La sección (k) de la Figura 9 muestra las micrografías a 2000X de cada una de las muestras antes (columna izquierda) y después (columna derecha) del proceso de entrecruzamiento químico con genipina. La membrana de PLA tiene una estructura con fibras con una superficie lisa. Por otra parte, la muestra CPLA presentó una tendencia a encogerse debido al contacto con los solventes polares utilizados en el proceso de entrecruzamiento. No hay evidencia de que el encogimiento haya sido porque el entrecruzante haya reaccionado con el PLA. La membrana de gelatina está compuesta por listones con una apariencia lisa. Después del tratamiento de entrecruzamiento, los listones tendieron a enrollarse y la superficie lisa tendió a ser un poco rugosa, producto de la compactación del material provocada por el entrecruzamiento químico. La membrana Coaxial está compuesta por fibras con una superficie suave y también se pueden observar fibras de menor diámetro. La muestra CCoaxial tiene una estructura diferente a la Coaxial puesto que cuando la gelatina se entrecruzó se despegó del núcleo de PLA probablemente debido a la rigidez provocada por la reacción de entrecruzamiento. La membrana de Mezcla (PLA/gelatina) presenta fibras de diferentes tamaños con superficie un poco rugosa. La falta de miscibilidad entre el PLA y la gelatina permite que se observen diferentes tonalidades de gris en cada fibra. Sin embargo, para la membrana CMezcla las tonalidades se homogenizaron y no se observaron estructuras deformadas como en la membrana CCoaxial. La sección (l) de la Figura 9 muestra la distribución de diámetro de las muestras PLA, Gelatina, Mezcla y Coaxial. Se puede observar que la distribución de diámetro es asimétrica y con poblaciones mayores a diámetros menores para aquellos materiales que contienen PLA. Por el contrario, la distribución del espesor de los listones que componen a la membrana de

gelatina tiende hacia la derecha. Se observa una distribución de diámetro con una desviación estándar muy alta para la membrana PLA, con la presencia de menores poblaciones de fibras de mayor tamaño con un valor de diámetro promedio de $0.957 \pm 0.619 \mu\text{m}$.

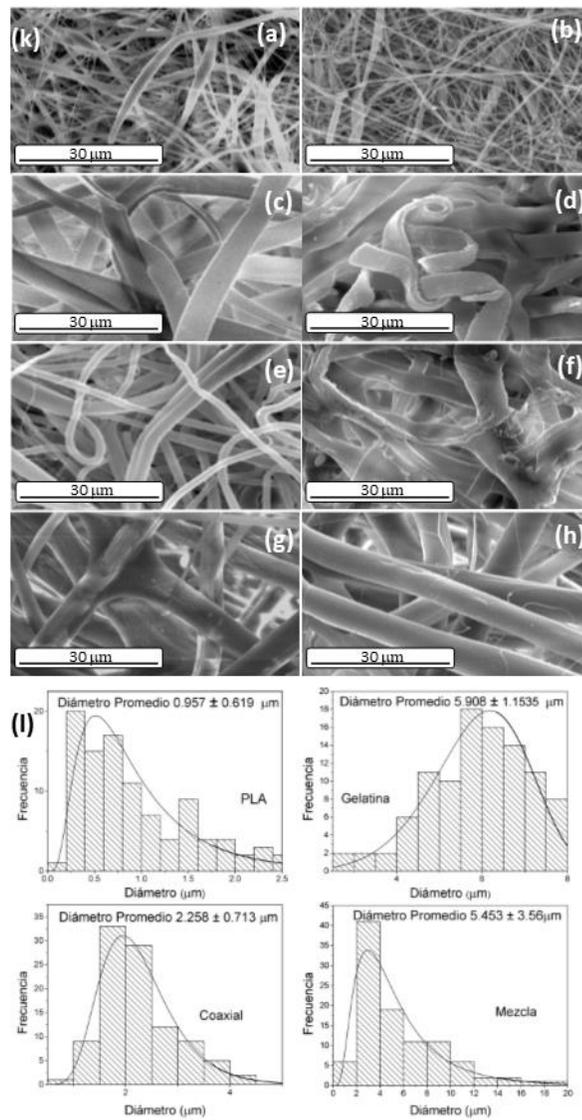


Figura 9. Sección (k) Micrografías SEM a 2000X de las muestras PLA (a), CPLA (b), Gelatina (c), CGelatina (d), Coaxial (e), CCoaxial (f), Mezcla (g) y CMezcla (h). Sección (l) Distribución de diámetro de fibra de las muestras PLA, Gelatina, Coaxial y Mezcla.

Los rangos de cada curva y el diámetro promedio de las fibras fueron de 0.148 a 2.874 μm con un diámetro promedio de $0.957 \pm 0.619 \mu\text{m}$ para las fibras de PLA, 2.923 a 7.901 μm con un ancho promedio de $5.908 \pm 1.154 \mu\text{m}$ para los listones de gelatina, 0.915 a 4.058 μm con un grosor promedio de $2.258 \pm 0.713 \mu\text{m}$ para las fibras Coaxial y, por último, un intervalo de 0.691 a 19.112 μm con un diámetro promedio de $5.453 \pm 3.560 \mu\text{m}$ para las fibras de la muestra mezcla.

5.2 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA NÚCLEO-CORAZA POR TEM

La figura 10 muestra una micrografía TEM de una fibra de la muestra Coaxial. Se puede observar la estructura núcleo-coraza como lo indican las flechas, una flecha señala el núcleo de PLA, otra señala la coraza de gelatina. El borde de la rejilla en la que se depositó la fibra para el análisis se indica con letras de color blanco.

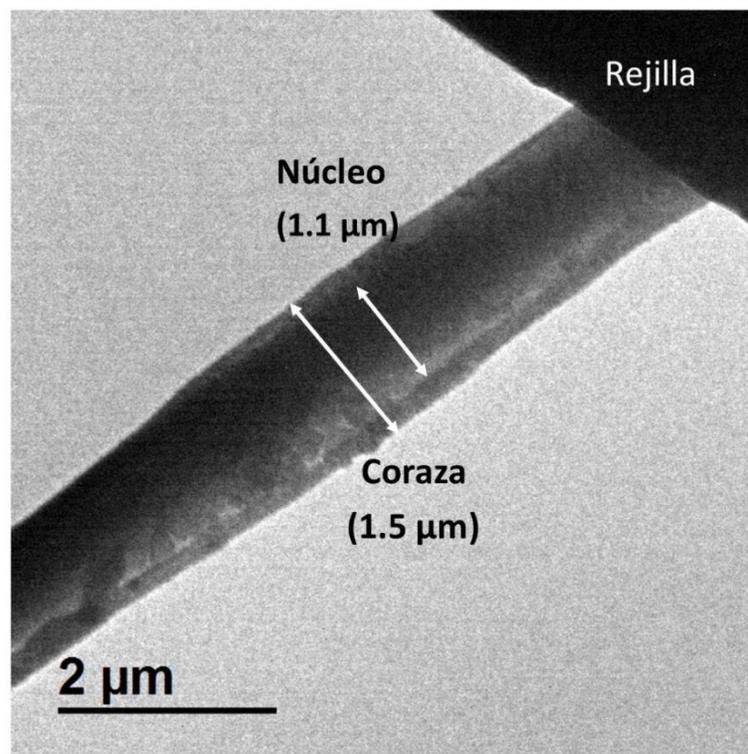


Figura 10. Micrografía TEM de una fibra con estructura núcleo-coraza proveniente del material Coaxial

5.3 ANÁLISIS QUÍMICO POR FTIR

En la sección (a) de la figura 11 se pueden observar los espectros FT-IR de las membranas PLA, Gelatina, Coaxial y Mezcla. Las vibraciones características del grupo éster del PLA correspondientes a los estiramientos vibracionales del enlace carbonilo (C=O) y carbono-oxígeno (C-O) se encuentran a 1756 cm^{-1} y 1183 cm^{-1} respectivamente^{53,54}. En el espectro correspondiente a la membrana gelatina se pueden observar tres señales principales que pertenecen al grupo amida (CONH), estas señales usualmente se nombran por amida I (1633 cm^{-1} , estiramiento del grupo C=O con contribuciones de vibraciones CN, CCN y NH), amida II (1533 cm^{-1} correspondiente al tijeo NH y a la vibración fuera de plano del enlace CO y CC) y amida III (1444 cm^{-1} correspondiente a vibraciones NH y CN)^{55,56}. Por otra parte, La banda amida I de los espectros Coaxial y Mezcla se encuentra desplazada de 1633 cm^{-1} a 1638 y 1650 cm^{-1} respectivamente. Esto indica una interacción entre el PLA y la gelatina para el caso de las dos membranas, también se puede observar que la señal del grupo carbonilo del PLA (C=O) se encuentra desplazada a menor energía para ambos casos (Coaxial y Mezcla) debido a la interacción por puente de hidrógeno entre los grupos N-H de las amidas de la gelatina y los C=O de la estructura del PLA. En la sección (b) de la Figura 11 se muestra una representación gráfica de la interacción entre los dos componentes de la membrana. Además, si se toma como referencia al grupo carbonilo (C=O) del PLA (1756 cm^{-1}) la intensidad de las señales que corresponden al grupo amida son mayores en el espectro Coaxial que en el espectro Mezcla debido a la cantidad de gelatina utilizada en sus composiciones, 50 y 30%, respectivamente.

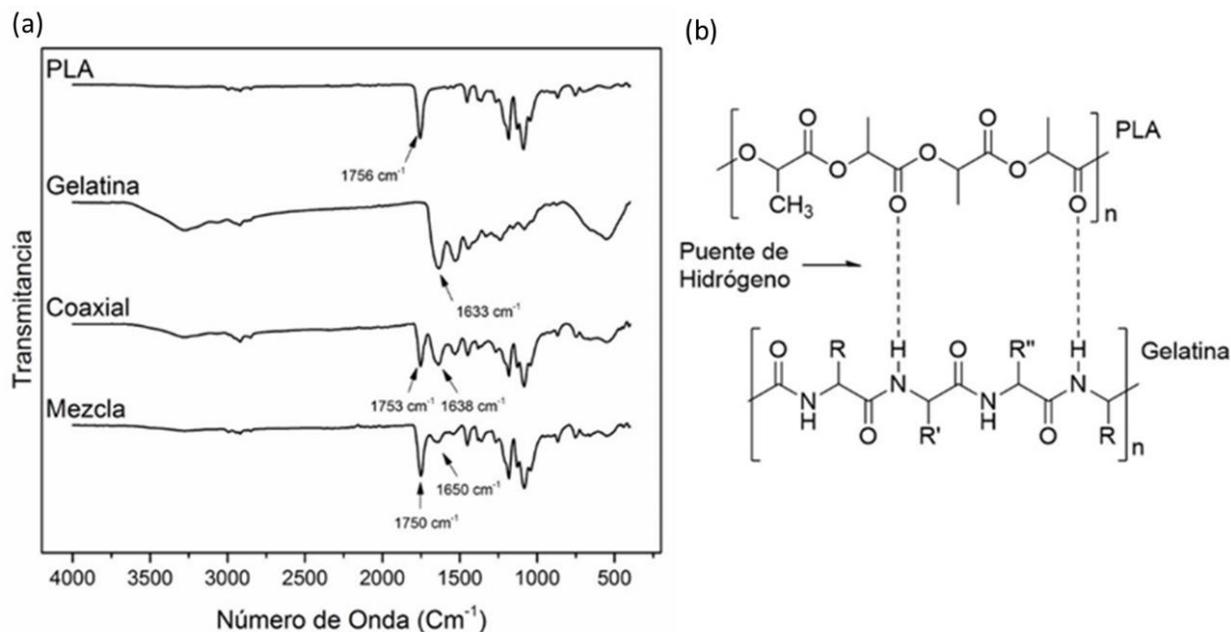


Figura 11. Espectro ATR-FTIR de las membranas PLA, Gelatina, Coaxial y Mezcla (a). Representación molecular de la interacción entre PLA y Gelatina (b).

La sección (a) de la figura 12 muestra los espectros ATR-FTIR de las membranas Gelatina y CGelatina. En el espectro de CGelatina se pueden observar dos bandas que no se observa en la muestra Gelatina; a 1732 cm^{-1} , correspondiente al grupo carbonilo (C=O) de la genipina, y otra a 1045 cm^{-1} correspondiente a una vibración CN de una amina terciaria producto de la reacción química entre la gelatina y la genipina. En la sección (b) de la figura 12 se puede observar una representación gráfica de esta reacción química. En resumen, mediante ATR-FTIR se pudo confirmar una interacción por puente de hidrógeno entre el PLA y la gelatina y también que la reacción de entrecruzamiento de la gelatina se llevó a cabo.

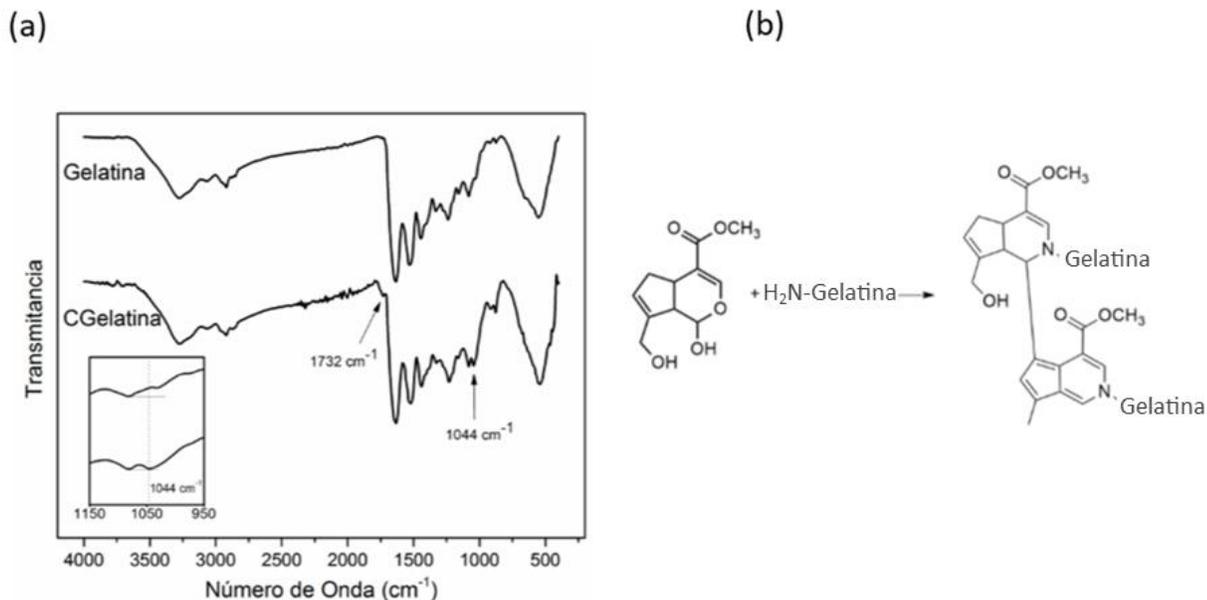


Figura 12. (a) Espectro ATR-FTIR de las membranas Gelatina y CGelatina, (b) representación gráfica de la reacción entre Gelatina y Genipina (b)⁵⁷⁻⁵⁹.

5.4 ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA POR LA TÉCNICA DE TGA

Aunque la aplicación de los materiales no requiere su uso en altas temperaturas, el análisis se realizó con la intención de observar si el entrecruzamiento hizo que los perfiles de estabilidad térmica de las muestras cambiaran y también si estos resisten a temperaturas de esterilización. La figura 13 muestra las curvas TGA de todas las muestras fibrosas, PLA y CPLA (a), Gelatina y CGelatina (b), Coaxial y CCoaxial (c) y, por último, Mezcla y CMezcla (d). El set completo de experimentos se realizó cuatro horas después de que las muestras fueron secadas a vacío durante 4 horas. Casi todos los materiales a excepción del PLA presentaron una caída alrededor de los 100 °C debido a la presencia de agua en ellos. Como es de esperar, las membranas compuestas por solo gelatina (b) son los materiales más higroscópicos, mostrando una caída correspondiente a la pérdida de un 10% de agua para ambos casos (antes y después del entrecruzamiento). Las muestras Coaxial y Mezcla retuvieron alrededor de 5% de agua antes y después del entrecruzamiento. Los perfiles termogravimétricos de las membranas PLA y CPLA se componen de una sola caída con un máximo

de velocidad a 364.6 ± 0.4 and 363.9 ± 1.3 °C. La degradación de Gelatina y CGelatina ocurre en tres pasos, el primero correspondiente a la pérdida de agua como se mencionó anteriormente; el segundo paso corresponde a hidrólisis y oxidación⁶⁰ y se encontraron a 330.9 ± 0.7 and 330.6 ± 0.4 °C para ambos casos, la última caída se encontró a 755.2 ± 10 y 778.2 ± 20 °C, respectivamente. La curva TGA para las membranas Coaxial y CCoaxial están compuestas por tres pasos con el correspondiente a degradación del PLA a 339.7 ± 5.7 , 347.8 ± 2.2 . Un perfil similar se encontró para las muestras Mezcla y CMezcla con la caída de masa correspondiente al PLA a 345.8 ± 2.3 y 345.1 ± 1.8 °C respectivamente. No se encontraron cambios estadísticamente significativos en los pasos de degradación debido al tratamiento de entrecruzamiento. Esto fue analizado con un ANOVA de una sola vía y por ensayo múltiple de rango de Duncan ($p < 0.05$).

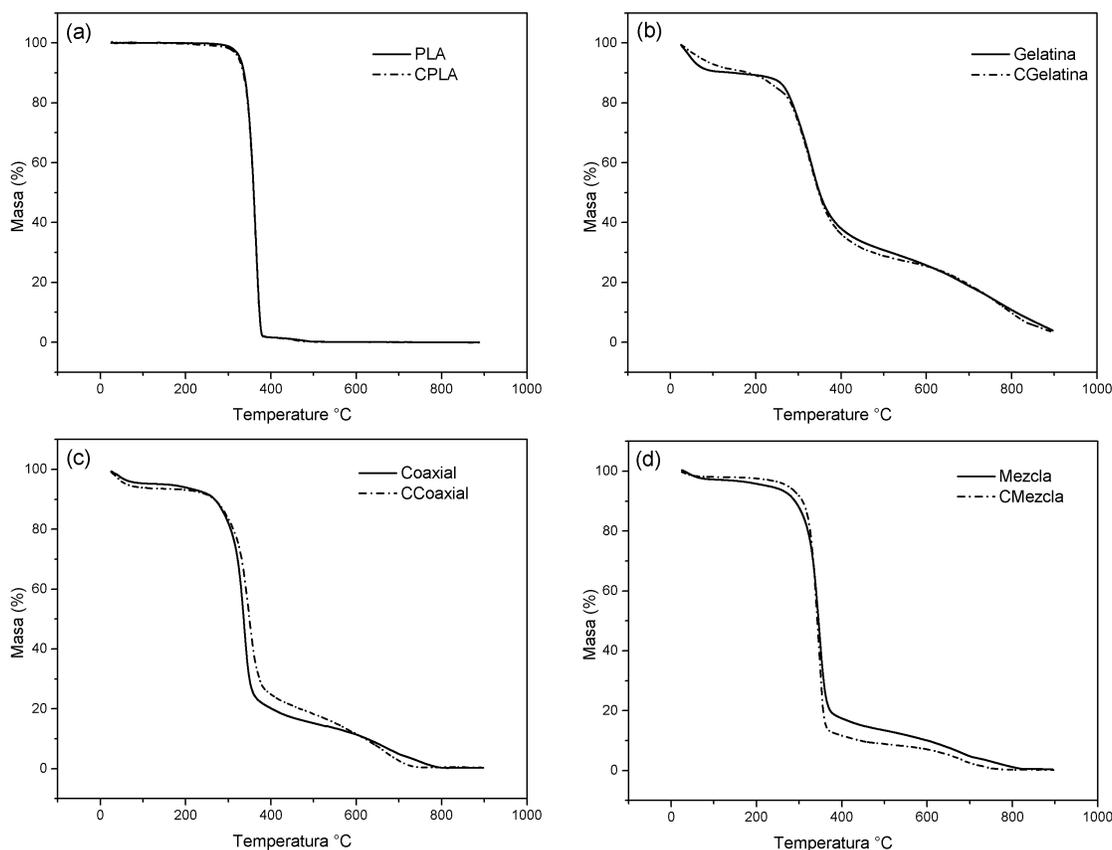


Figura 13 Curvas de termogravimetría de las muestras PLA y CPLA (a), Gelatina y CGelatina (b), Coaxial y CCoaxial (c) Mezcla y CMezcla (d).

5.5 ANÁLISIS DE LAS TRANSICIONES TÉRMICAS DE LOS MATERIALES POR LA TÉCNICA DE DSC

La figura 14 muestra los termogramas DSC de las muestras PLA y CPLA (a), Gelatina y CGelatina (b), Coaxial y CCoaxial (c) y, por último, Mezcla y CMezcla (d). El termograma de la muestra PLA presenta dos picos endotérmicos; el primero a 74 °C corresponde a una transición vítrea (T_g) y el segundo a 165 °C respresenta la transición por fusión del material, T_m ⁶¹. Por otra parte, la membrana CPLA no presenta transición de T_g posiblemente porque la presencia de genipina hace más rígidas las cadenas de PLA, como se discute abajo.

No se considera que el PLA y la genipina hayan reaccionado sin la presencia de gelatina puesto que el entrecruzante tiene efecto frente a los grupos amino de la gelatina. Sin embargo, la genipina tiene un efecto en la T_m del PLA, haciendo esta señal endotérmica más aguda, con un valor de 166 °C, es decir, un grado más que el PLA en pellets (gránulos).

La gelatina presenta una curva de desnaturalización amplia con un máximo de flujo de calor a 118 °C el cual no cambia cuando el material se entrecruza en contraste con el desplazamiento de 10 °C cuando este se entrecruza con glutaraldehído⁶². La curva DSC de la membrana Coaxial muestra cada una de las transiciones de sus componentes. En el caso de la muestra Mezcla no se observa una notoria T_D (temperatura de desnaturalización) y se plantea que esto es debido a que la interacción entre los materiales conduce a la desnaturalización de la proteína, caso similar se presenta en el trabajo de J. Bidone y colaboradores⁶³. La T_g de los materiales Coaxial and Mezcla sugieren que sus componentes están interactuando entre sí puesto que esta transición se encuentra desplazada 13 y 4 °C, respectivamente, con respecto a la de solo PLA⁶⁴. Cuando los materiales son tratados con genipina, la transición vítrea del PLA desaparece para todos los casos indicando que las cadenas de PLA no se relajan debido al tratamiento de entrecruzamiento químico de la gelatina. Por otra parte, el análisis DSC fue utilizado para calcular el grado de cristalinidad (X_c) del PLA. Fue posible observar una correlación entre la cristalinidad del PLA en las muestras tratadas y no tratadas con el entrecruzante. El X_c del PLA en las muestras CMezcla y CCoaxial es más alto que en las muestras Mezcla y Coaxial.

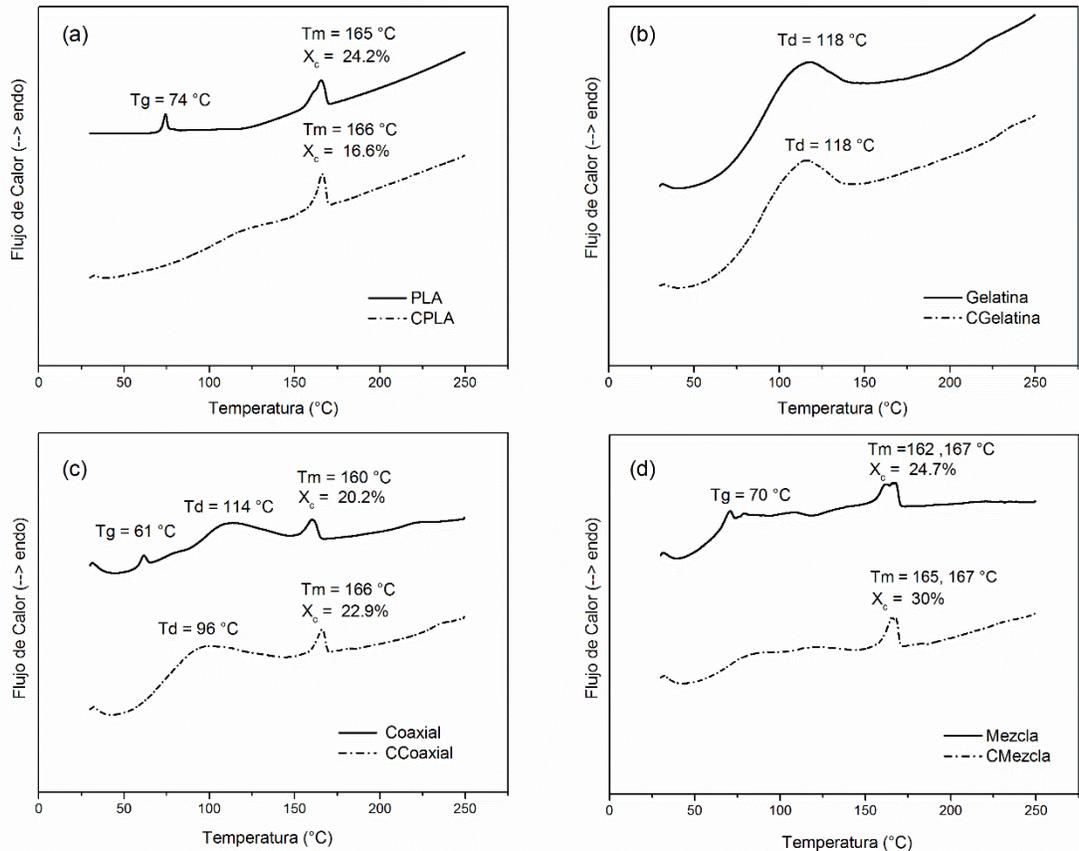


Figura 14. Termogramas DSC de las muestras PLA y CPLA (a), Gelatina y CGelatina (b), Coaxial y CCoaxial (c), Mezcla y CMezcla (d).

5.6 ANÁLISIS DE CRISTALINIDAD POR DRX

Los patrones de difracción de los pellets de PLA y el polvo de gelatina se muestran en la sección (a) y (b) de la Figura 15. Mientras que en la sección (c), (d), (e) y (f) se muestran los patrones de difracción de las membranas (PLA y EPLA), (Gelatina y CGelatina), (Mezcla y CMezcla) y (Coaxial y CCoaxial) respectivamente. En la sección (a) y se puede observar un patrón de difracción claro de un PLA semi-cristalino antes de ser electrohilado, mostrando los picos típicos a 16.56° y 19.01° (ángulo de Bragg)^{65,66}. En la sección (c) se observan patrones de difracción con señales muy anchas. En el caso del PLA la señal es ancha pero intensa en la región de cristalinidad del PLA en pellets. Esto

indica que durante el proceso de electrohilado el material solidificó muy rápidamente por evaporación del solvente, generando, en consecuencia, defectos en las estructuras cristalinas del PLA. Este efecto es más pronunciado en la gelatina pues la señal es más ancha y de menor intensidad que en la gelatina en polvo. Un efecto similar es esperado para las fibras Mezcla y coaxial.

El patrón de difracción resurge en las fibras CMezcla y CCoaxial sugiriendo que el proceso de entrecruzamiento con genipina hace más lenta la cinética de cristalización de las fibras, facilitando el autoensamblaje del PLA y de la gelatina. El patrón no aparece cuando el tratamiento de entrecruzamiento es aplicado a la membrana compuesta de solo PLA, sugiriendo que el entrecruzamiento de la gelatina es el que promueve un mayor grado de cristalinidad en el PLA. Esto correlaciona con los datos obtenidos en DSC puesto que el porcentaje de cristalinidad del PLA incrementa cuando las muestras son entrecruzadas como se muestra en la Figura 14.

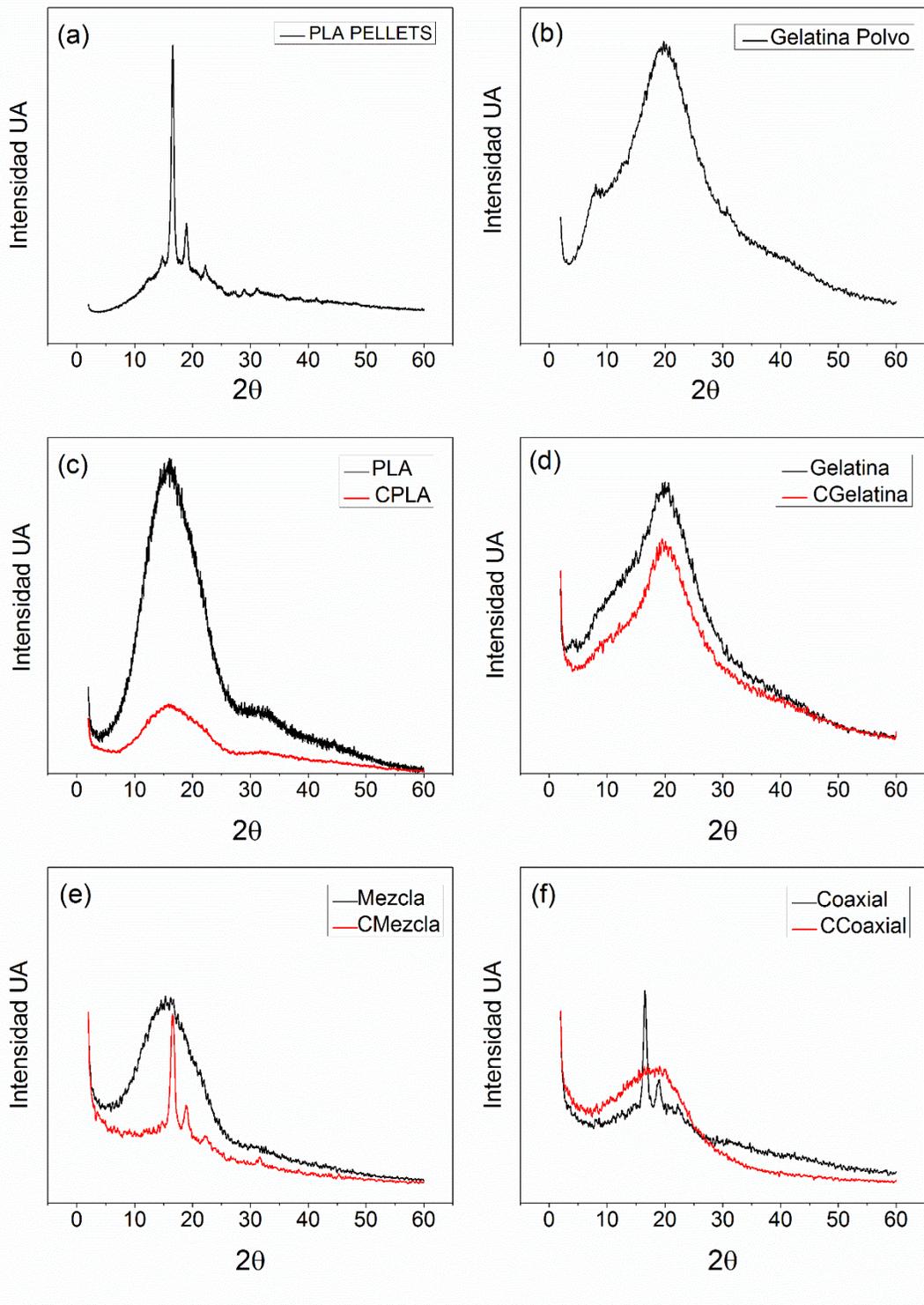


Figura 15. (a) Patrón DRX de los pellets de PLA, (b) polvo de gelatina, (c) muestras PLA y CPLA, (d) Gelatina y CGelatina, (e) Mezcla y CMezcla, (f) Coaxial y CCoaxial.

5.7 PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS MEMBRANAS TUBULARES BAJO TENSIÓN LONGITUDINAL, RADIAL Y ENSAYO DE RESISTENCIA A LA SUTURA

La Tabla 3 muestra las propiedades mecánicas de las membranas tubulares de PLA y de los materiales entrecruzados. La muestra CGelatina no pudo ser analizada porque esta perdió su forma cuando se sometió al proceso de entrecruzamiento. El Material CMezcla mostró el mayor módulo elástico, con un valor de 68 ± 2 KPa en deformación radial (DR) y 526 ± 78 kPa en deformación longitudinal (DL) seguido de la muestra CCoaxial con un módulo elástico de 25 ± 3 KPa (DR) y 119 ± 12 KPa (DL). Por último, el PLA mostró valores de 12.2 ± 0.3 KPa (DR) y 170 ± 40 KPa (DL). En el caso de esfuerzo de cedencia para la deformación radial, la muestra CMezcla mostró un esfuerzo más alto, seguido por las membranas Coaxial y PLA.

Por otra parte en el ensayo longitudinal se obtuvieron esfuerzos de cedencia análogos para las muestras CMezcla y PLA. La deformación a la ruptura resultó más alta para el material PLA en ambas orientaciones, radial y longitudinal, esto debido a la rigidez adquirida por la combinación de ambos materiales y el tratamiento con genipina. La muestra CMezcla presentó el valor de retención a la sutura más bajo 86 ± 3 gf, mientras que una conducta similar fue encontrada para las muestras PLA y CCoaxial donde los valores fueron 170 ± 10 y 169 ± 3 gf respectivamente, se sugiere que el comportamiento similar entre la muestra de PLA y la CMezcla sea debido a que los materiales que componen las membranas permanecen íntegros en toda la fibra, en cambio en el material CCoaxial pudieron haber existido zonas en donde la integridad núcleo coraza se perdía y por consiguiente el material se debilitaba. En resumen, los materiales no tienen las propiedades mecánicas de un vaso sanguíneo. Sin embargo, estas podrían ser modificadas manipulando el diámetro de fibra. En general la muestra CMezcla presentó las propiedades mecánicas más altas en comparación con PLA y CCoaxial, esto puede ser justificado por las interacciones químicas de sus componentes; mientras en el material CMezcla los materiales están interactuando en toda la estructura, en la muestra CCoaxial los materiales solo se encuentran interactuando en la interfaz del núcleo/coraza de la fibra.

Tabla 3. Resumen de las propiedades mecánicas de los materiales

	PLA	CCoaxial	CMezcla
Módulo Elástico (KPa)	12.2 ± 0.3 DR 170 ± 40 DL	25 ± 3 DR 119 ± 12 DL	68 ± 2 DR 526 ± 78 DL
Esfuerzo de cedencia (KPa)	340 ± 11 DR 2520 ± 390 DL	308 ± 22 DR 1370 ± 360 DL	982 ± 80 DR 2320 ± 390 DL
Deformación a la ruptura (%)	105 ± 3 DR 104 ± 6 DL	32 ± 5 DR 40 ± 3 DL	49 ± 4 DR 15 ± 3 DL
Retención de sutura (gf)	170 ± 10	86 ± 3	169 ± 3

(DR) Deformación Radial. (DL) Deformación longitudinal.

5.8 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Con la finalidad de comparar a los materiales basados en PLA y Gelatina en cuanto a su habilidad de fungir como anfitrión celular, se realizó un ensayo de viabilidad celular utilizando células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVECs). Las características físicas de la muestra CGelatina impidieron que este análisis se llevara a cabo sobre esta muestra. En la sección (a) de los gráficos de barras de la figura 16 se puede observar la viabilidad celular de las HUVECs interactuando con los materiales de solo PLA y gelatina. Para el caso de la gelatina, la membrana tuvo que disolverse en el medio de cultivo y las células se sembraron sobre la placa de poliestireno. La viabilidad celular permaneció por encima del 80% hasta después de 5 días de cultivo, esto sugiere que los materiales no presentan un comportamiento tóxico. La sección (b) de la figura 16 muestra el gráfico de barras de la viabilidad celular de las HUVECs sembradas sobre los materiales Mezcla, CMezcla, Coaxial y CCoaxial. Se puede observar que la actividad celular disminuyó por debajo del 75 % desde el primer día para aquellas células que fueron sembradas sobre la muestra Coaxial y Ccoaxial mientras que para las muestras Mezcla y CMezcla esta actividad permaneció por encima del 80%. Sobre la muestra CCoaxial se presentó mayor viabilidad que la membrana que no tenía el tratamiento de entrecruzamiento. Esto sugiere que la baja viabilidad celular se puede atribuir a la disolución de gelatina en el medio de cultivo.

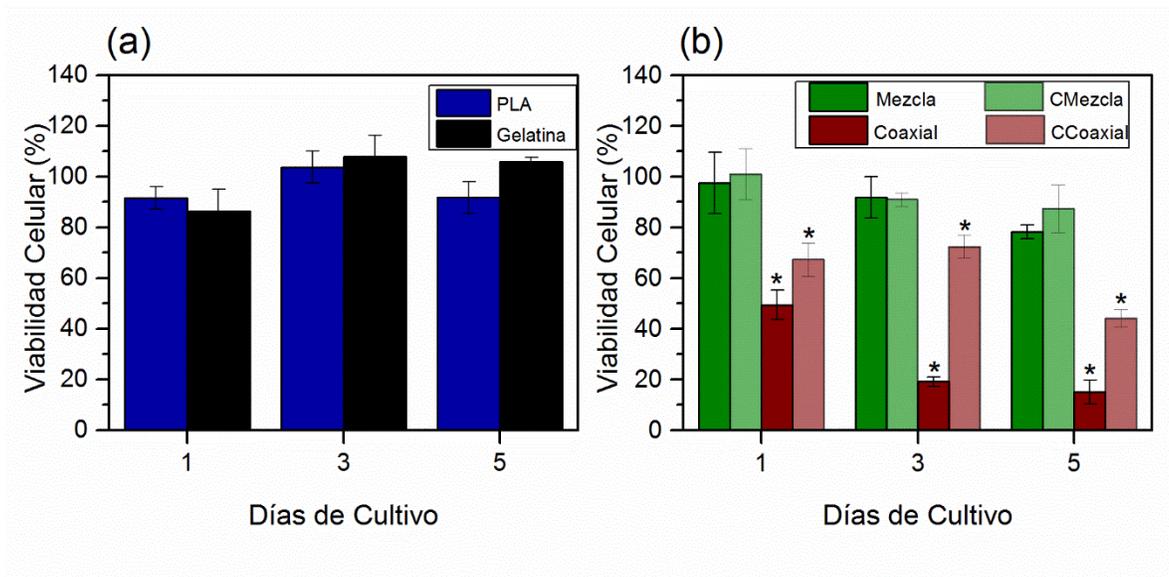


Figura 16. Gráficos de barra de la viabilidad de HUVECs sembradas sobre los materiales (a) PLA y Gelatina, (b) Mezcla, CMezcla, Coaxial y CCoaxial. Se realizó un ANOVA y una prueba múltiple de rango de Duncan utilizando el software statGraphics. El asterisco (*) indica los grupos estadísticamente diferentes a un nivel de ($p < 0.05$)

5.9 ANÁLISIS CELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL

La figura 17 muestra las micrografías de las células HUVECs después de 24 horas de haber sido sembradas sobre los materiales Coaxial, CCoaxial, Mezcla y CMezcla. Las células que estaban sobre el material Coaxial presentan una morfología redondeada indicando una débil capacidad de adhesión, mientras que en la muestra CCoaxial la estructura de las células muestra tendencia a extenderse. Por otra parte, las células sembradas sobre los materiales Mezcla y CMezcla mostraron una morfología más extendida y en dirección de las fibras. La tendencia a extenderse es más notoria en las muestras de la mezcla de materiales, puesto que en estos la gelatina permanece en ellos y no se disuelve eventualmente, como se indica en la Figura 18 del espectro de ATR-FTIR de las membranas después del proceso de cultivo. Las bandas amina I y amina II alrededor de 1630 y 1530 cm^{-1} (indicadas con una flecha) respectivamente decrecen por la disolución de gelatina.

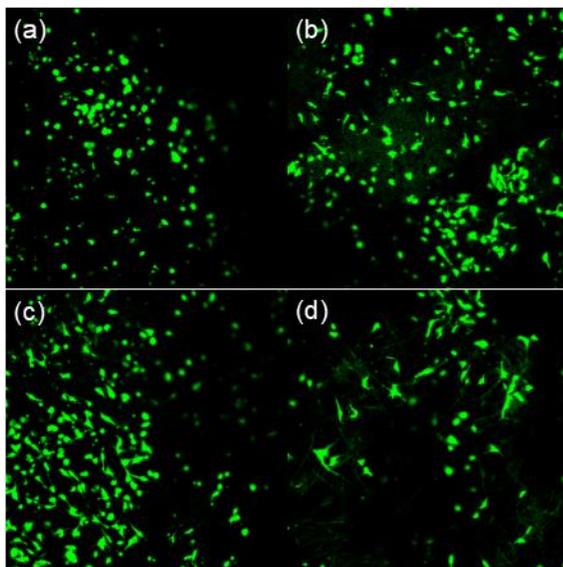


Figura 17. Micrografía confocal de HUVECs teñidas con calceína-AM y sembradas sobre las muestras (a) Coaxial, (b) CCoaxial, (c) Mezcla y (d) CMezcla.

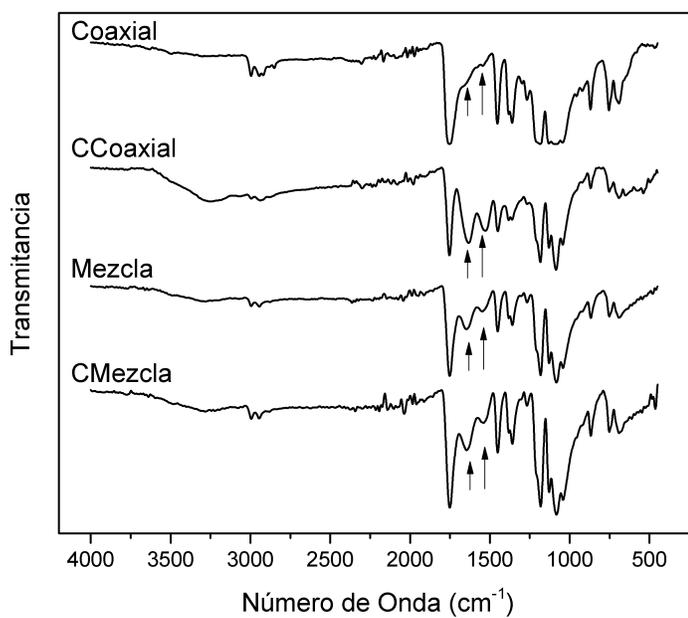


Figura 18. Espectros ATR-FTIR de las muestras Coaxial, CCoaxial, Mezcla y CMezcla después de haber estado 5 días en cultivo.

La técnica de electrohilado permitió generar fibras de distintos materiales, estos fueron analizados por diferentes técnicas y cada una reveló características del material en diferentes aspectos, por ejemplo, con la técnica SEM se observó la morfología de las membranas, donde se mostró que a excepción de la membrana Gelatina (compuesta por listones), todas estaban compuestas por fibras. Con la técnica de TEM se evidenció la presencia del arreglo núcleo coraza en la membrana Core/Shell. Con los resultados de la técnica de ATR-FTIR se apoya la hipótesis de que se presentó el entrecruzamiento entre la genipina y la gelatina; También se evidencia la interacción química entre los materiales PLA y Gelatina cuando estos formaron las fibras de las membranas Mezcla y Coaxial. Se realizó un análisis termogravimétrico con la intención de observar si el entrecruzamiento de la gelatina incrementaba la resistencia térmica de las membranas. Se observaron resistencias térmicas similares para todos los materiales antes de después del tratamiento químico.

Los ensayos de calorimetría de barrido diferencial se realizaron con la intención de observar las transiciones térmicas de los diferentes materiales y determinar si éstos se afectaron de alguna manera debido al tratamiento de entrecruzamiento. Se observó que la Tg del PLA no se presentaba cuando el material estaba en contacto con genipina y también cuando la gelatina de las muestras Mezcla y Coaxial fue entrecruzada, en el primer caso se sugiere que existen trazas de genipina que impiden que las cadenas en estado amorfo del PLA se laxen impidiendo que la transición vítrea se presente; en el segundo caso se propone que la rigidez aportada al material debido al entrecruzamiento químico de gelatina genera un efecto similar sobre las cadenas en estado amorfo del PLA. Por otra parte, se observa que en la membrana mezcla, la gelatina no presenta una transición de desnaturalización tan prolongada puesto que la interacción con el PLA ha hecho que aquella se desnaturalice. Los resultados de DRX arrojan datos interesantes, puesto que se observa que el autoensamblaje del PLA se presenta de una manera más ordenada cuando los materiales son sometidos al proceso de entrecruzamiento, lo cual correlaciona con los porcentajes de cristalinidad calculados por DSC.

En cuanto a las propiedades mecánicas de los materiales se observa que la muestra CMezcla presentó las propiedades mecánicas más altas en comparación con PLA y CCoaxial, esto puede ser justificado por las interacciones químicas de sus componentes; mientras en el material CMezcla los

materiales están interactuando en toda la estructura, en la muestra CCoaxial los materiales solo se encuentran interactuando en la interfaz del núcleo/Coraza de la fibra.

Los ensayos celulares revelan que la viabilidad celular de las HUVECs se ve altamente afectada debido a la incapacidad de adherirse al material Core/Shell, resultado de la constante disolución de la gelatina (las células no se adhieren y disminuyen su viabilidad al no tener una base sólida donde adherirse debido a que la gelatina se va disolviendo paulatinamente). Por otra parte, en donde la gelatina permanecía en el material las células se extendían y su viabilidad no se veía altamente afectada.

6 CONCLUSIONES

Mediante la técnica de electrohilado ha sido posible obtener membranas tubulares utilizando PLA y gelatina como materia prima.

La microestructura fibrosa y el cambio que estas presentaron debido al entrecruzamiento químico fue revelada por microscopía electrónica de barrido. Se observó que el tratamiento químico no afecta la estructura membranosa de los especímenes. Sin embargo, en la muestra CCoaxial la coraza de gelatina tendía a quebrarse.

Los diferentes análisis realizados comprueban la presencia e interacción de los materiales. No se observan cambios drásticos en las propiedades térmicas, sin embargo, la conducta mecánica de los materiales es modificada dependiendo de como estos interactúan entre sí.

Las células HUVEC en contacto con los tubos fibrosos PLA, Mezcla y CMezcla muestran una viabilidad por encima del 80 % al paso de 5 días, indicando que los materiales no afectan en gran medida el desarrollo de esta línea celular. Sin embargo, en cuanto a las que estuvieron en contacto con fragmentos de los tubos Coaxial y CCoaxial la viabilidad se afecta desde el primer día puesto que la gelatina tiende a disolverse cuando no está entrecruzada químicamente o mezclada con el PLA. La muestra que presenta mejores conductas como hospedero celular es la CMezcla.

Entre los materiales fabricados con ambos componentes (PLA y Gelatina) el material que mejores propiedades presentó fue el CMezcla, ya que en general conserva las propiedades mecánicas más altas y funge como mejor anfitrión celular que el Coaxial, CCoaxial y Mezcla

7 ANEXOS

Como producto de este trabajo se generó un artículo de investigación científica, Titulado: **Electrospun tubes based on PLA, gelatin and genipin in different arrangements for blood vessel tissue engineering**. Con número de registro DOI: <https://doi.org/10.1007/s00289-019-03057-7>.

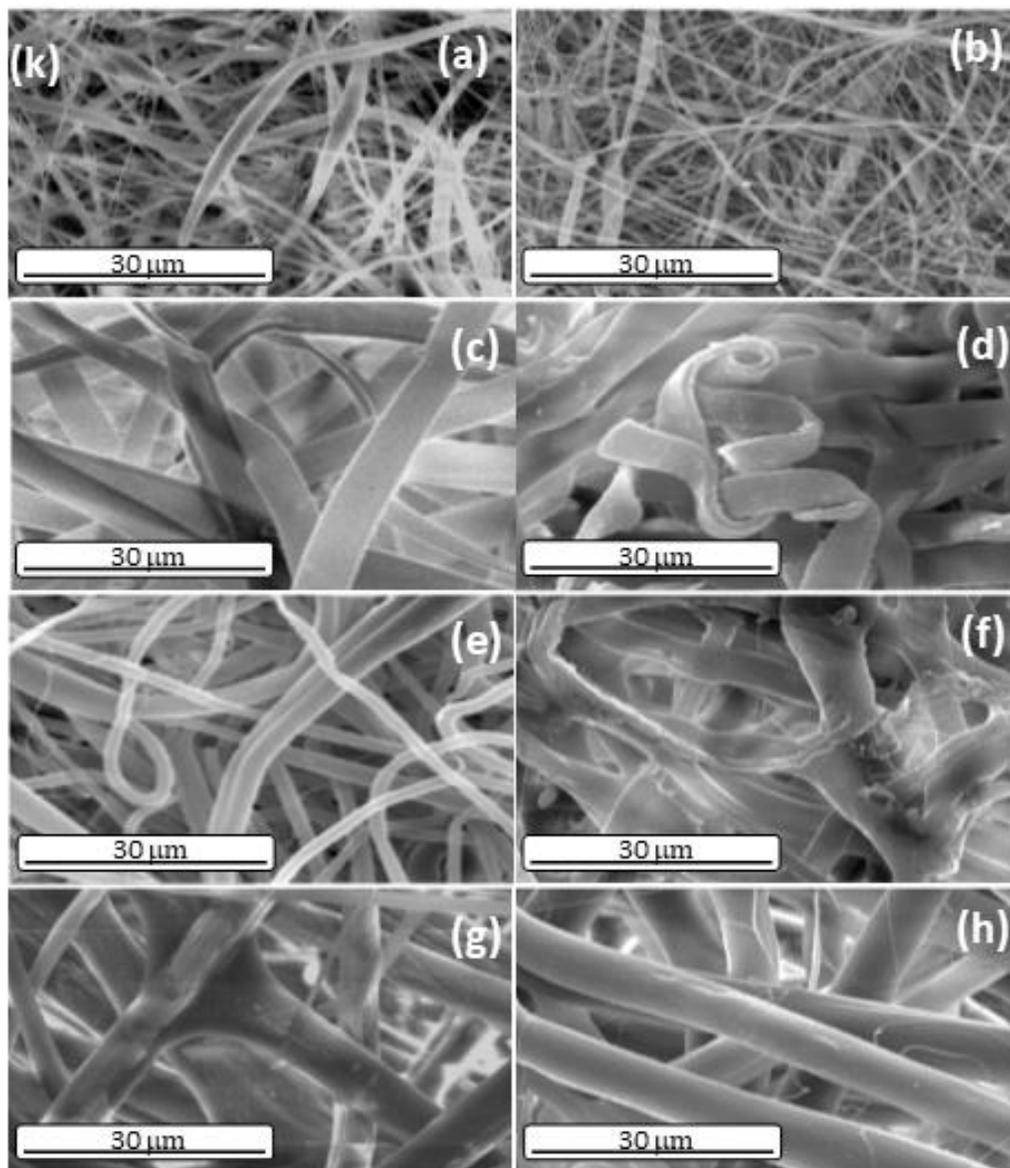
Ponencias presentadas:

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO, INSTITUTO TECNOLÓGICO DE HUATABAMPO
SIMPOSIO OnPlay 2016 PRESENTACIÓN ORAL “Electrohilado e ingeniería de Tejidos vasculares” 25
DE OCTUBRE DE 2016.

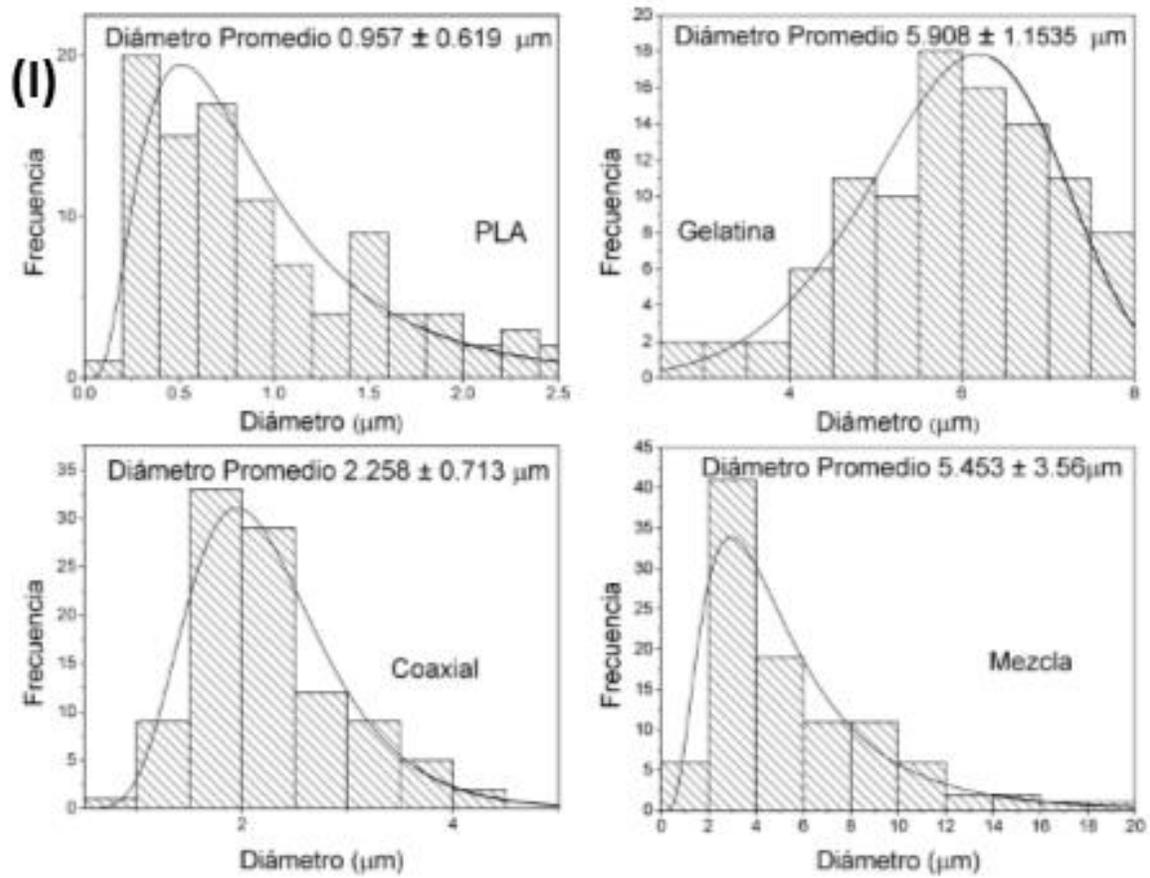
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO, INSTITUTO TECNOLÓGICO DE HUATABAMPO SIMPOSIO
OnPlay 2018 PRESENTACIÓN ORAL “POLÍMEROS” DE NOVIEMBRE DE 2018.

Enseguida, se muestran las figuras ampliadas que corresponden a la sección de “Resultados y discusión” de esta tesis.

Análisis Morfológico por SEM

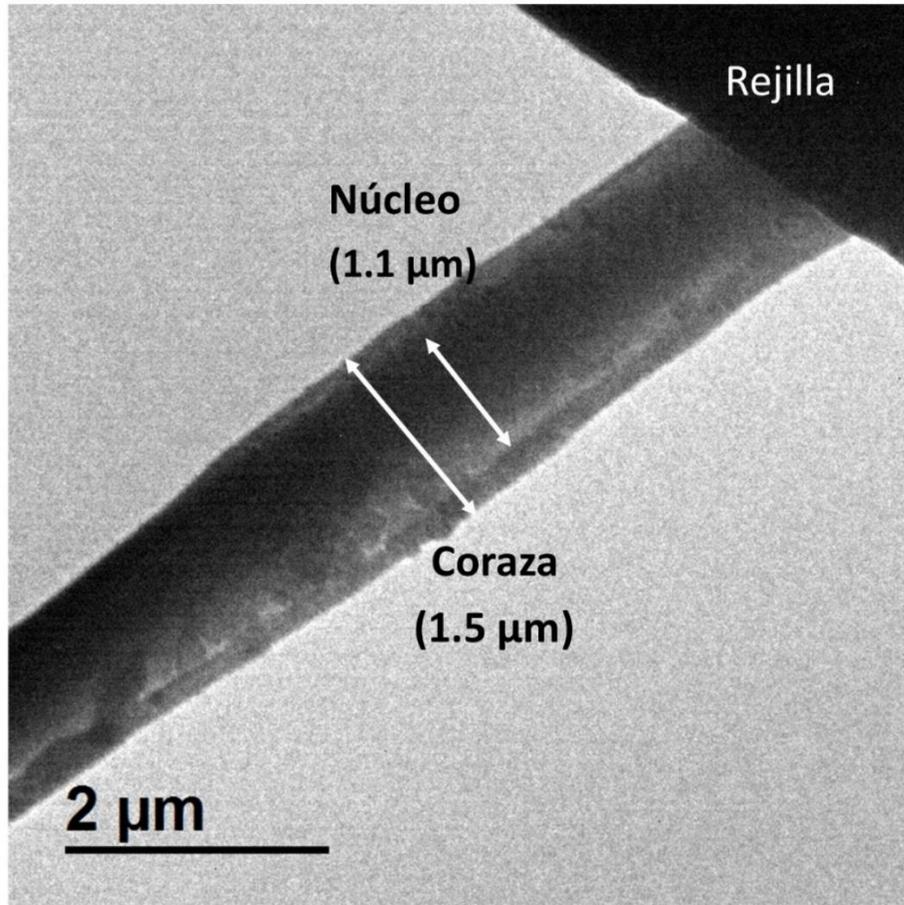


Micrografías SEM a 2000X de las muestras PLA (a), CPLA (b), Gelatina (c), CGelatina (d), Coaxial (e), CCoaxial (f), Mezcla (g) y CMezcla (h).



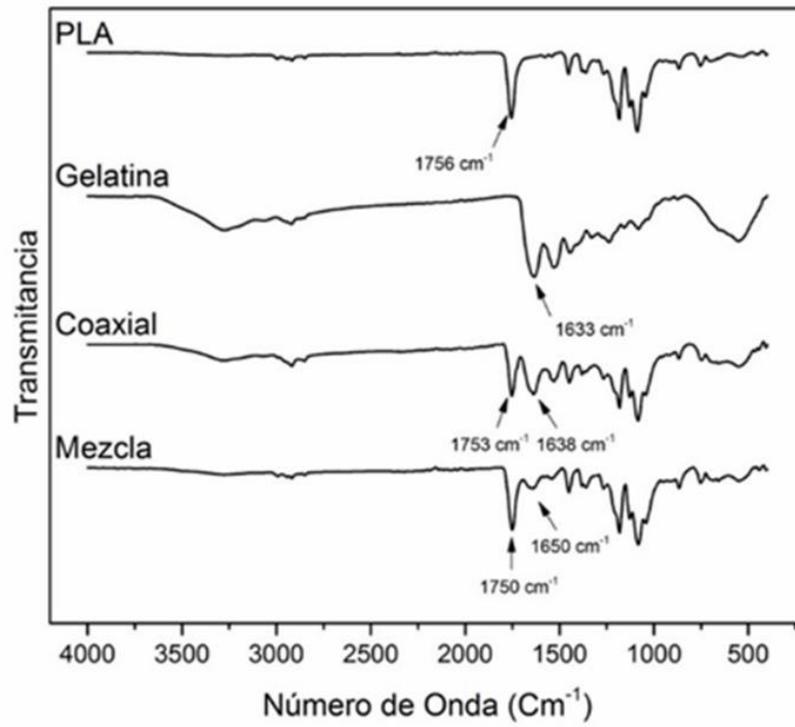
Distribución de diámetro de fibra de las muestras PLA, Gelatina, Coaxial y Mezcla.

Análisis de la Estructura Núcleo-Coraza por TEM

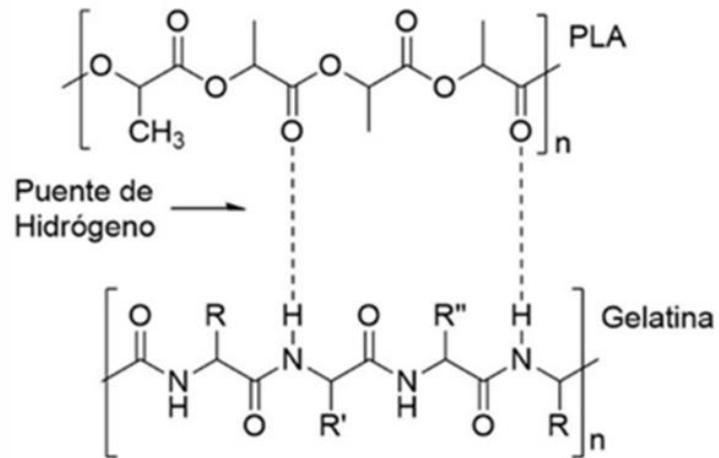


Micrografía TEM de una fibra con estructura núcleo-coraza proveniente del material Coaxial

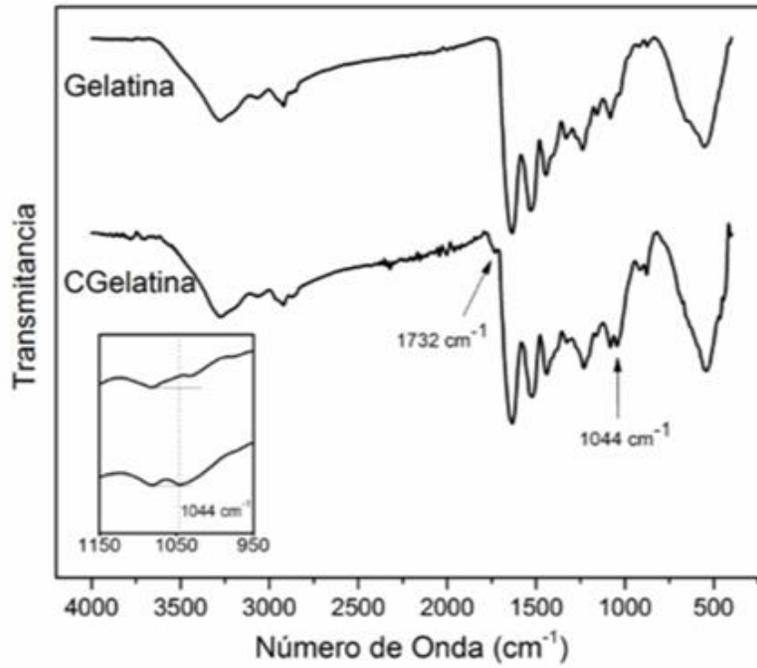
Análisis Químico por FTIR



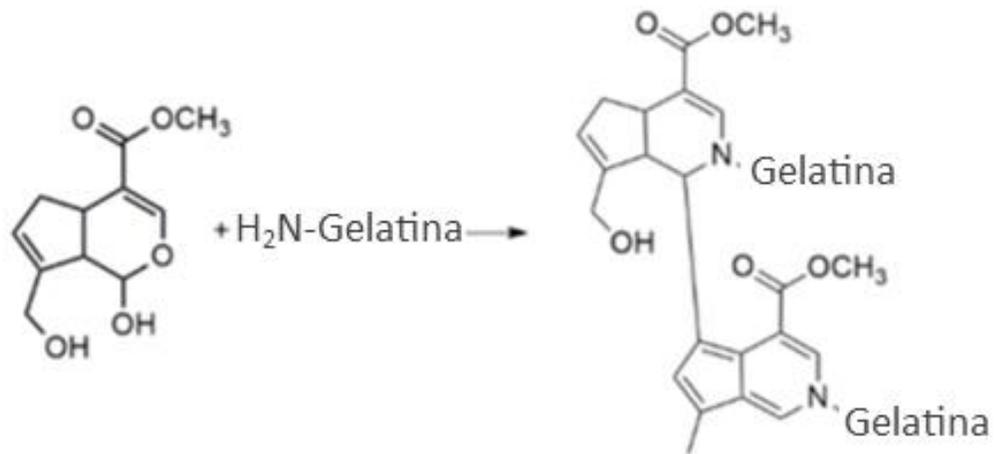
Espectro FTIR de las membranas PLA, Gelatina, Coaxial y Mezcla.



Representación molecular de la interacción entre PLA y Gelatina (b).

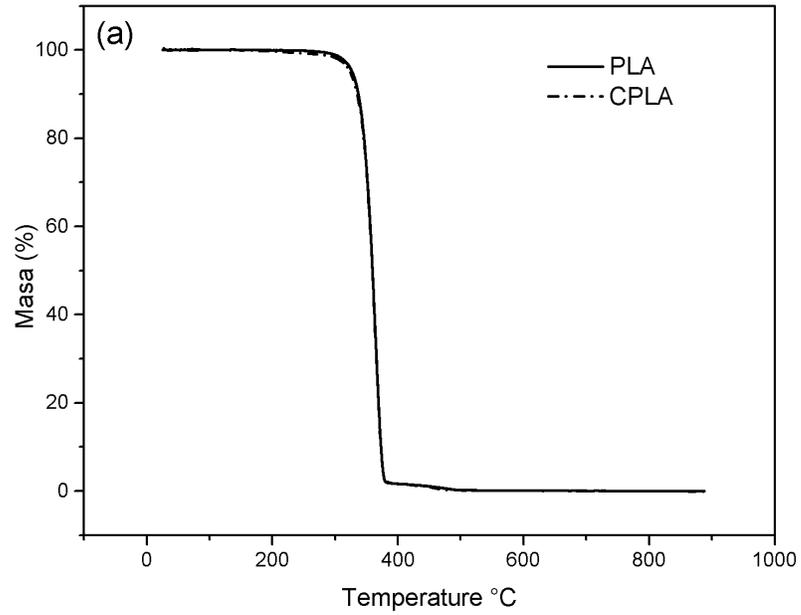


Espectro FTIR de las membranas Gelatina y CGelatina.

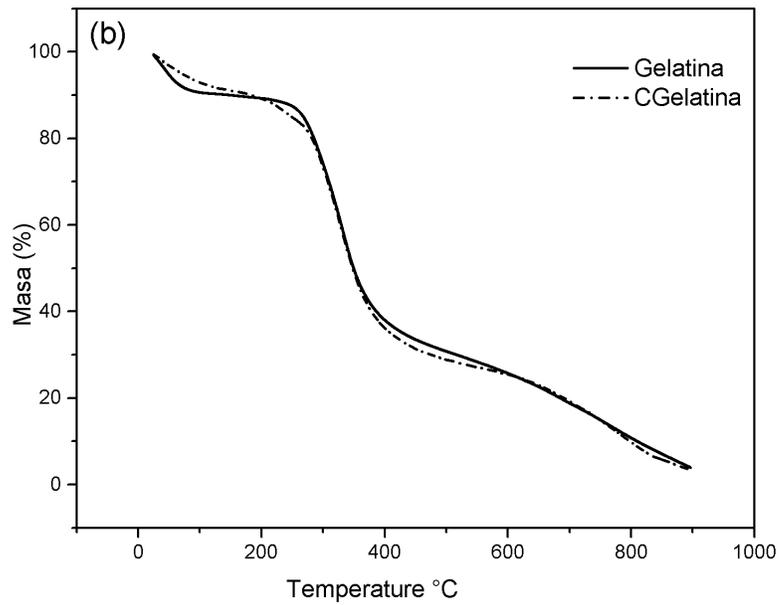


Representación gráfica de la reacción entre Gelatina y Genipina

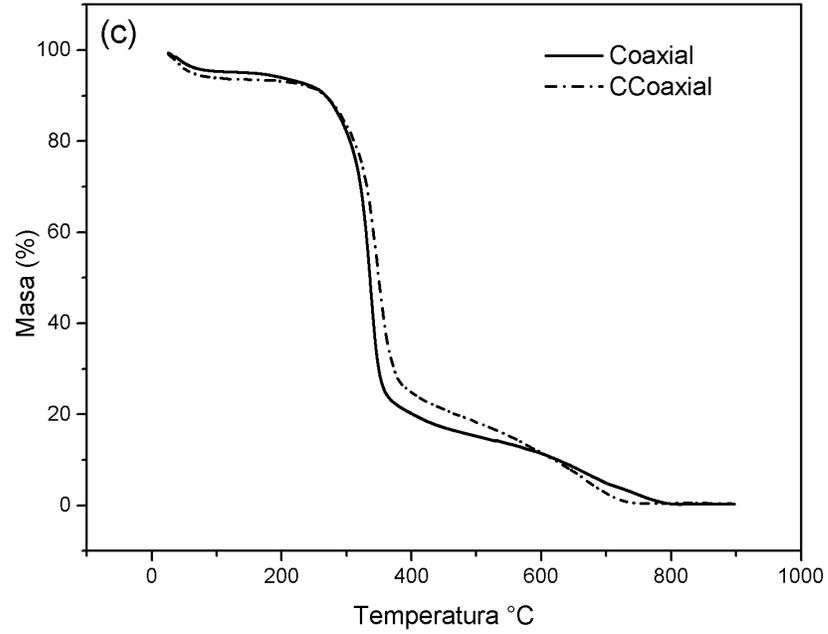
Análisis de la Estabilidad Térmica por la Técnica de TGA



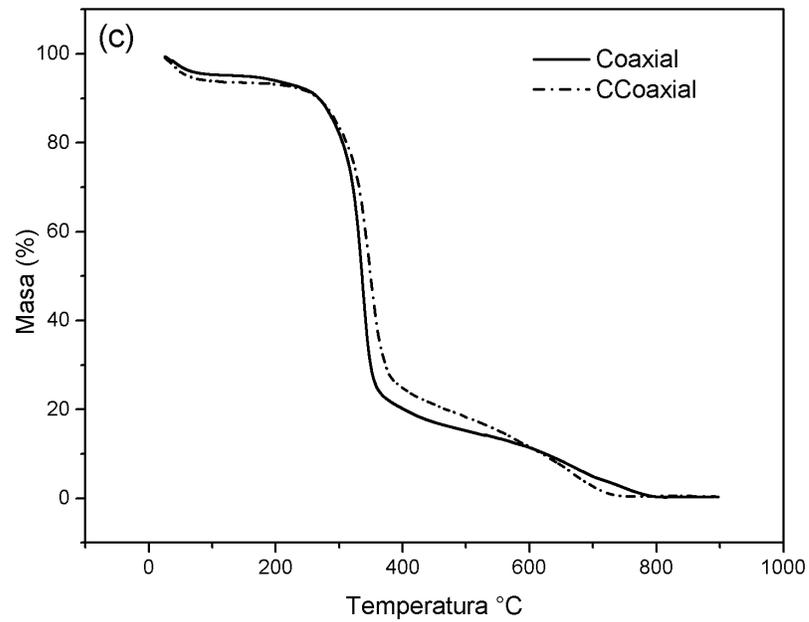
Curvas de termogravimetría de las muestras PLA y CPLA



Curva termogravimétrica de las membranas Gelatina y CGelatina

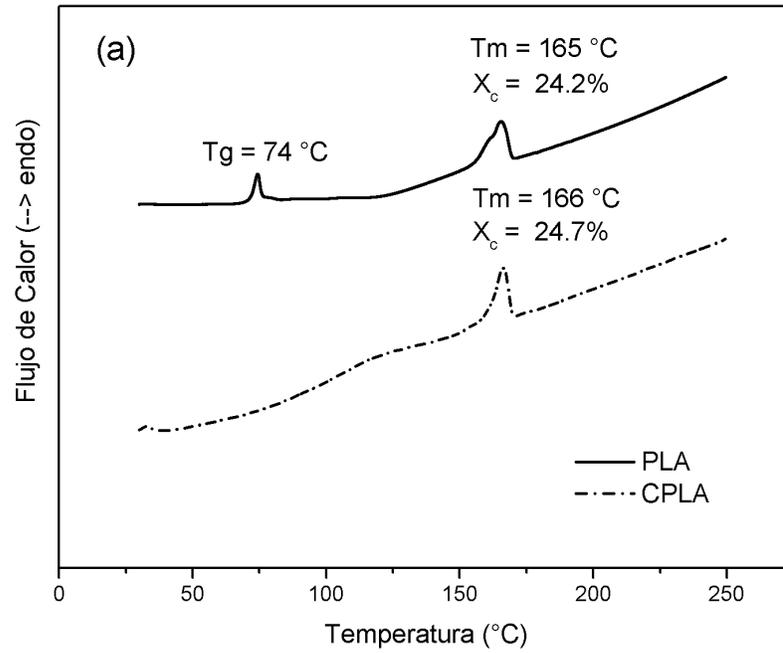


Curva termogravimétrica de la membrana Coaxial y CCoaxial

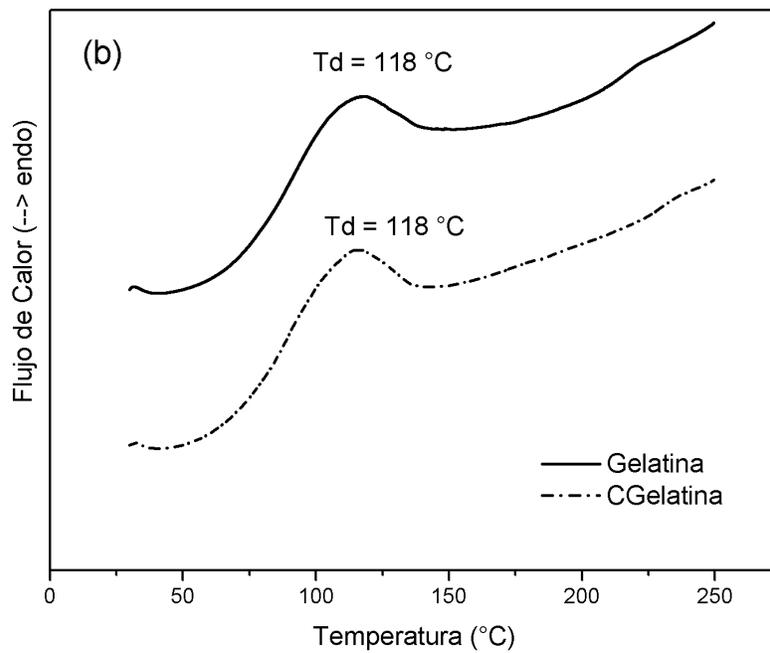


Curva termogravimétrica de la membrana Mezcla y CMezcla.

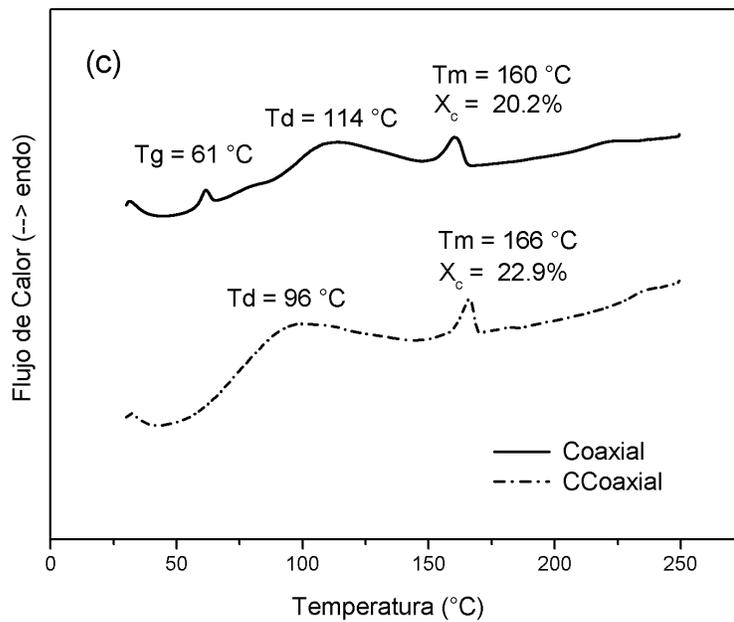
Análisis de las Transiciones Térmicas de los Materiales por la Técnica de DSC



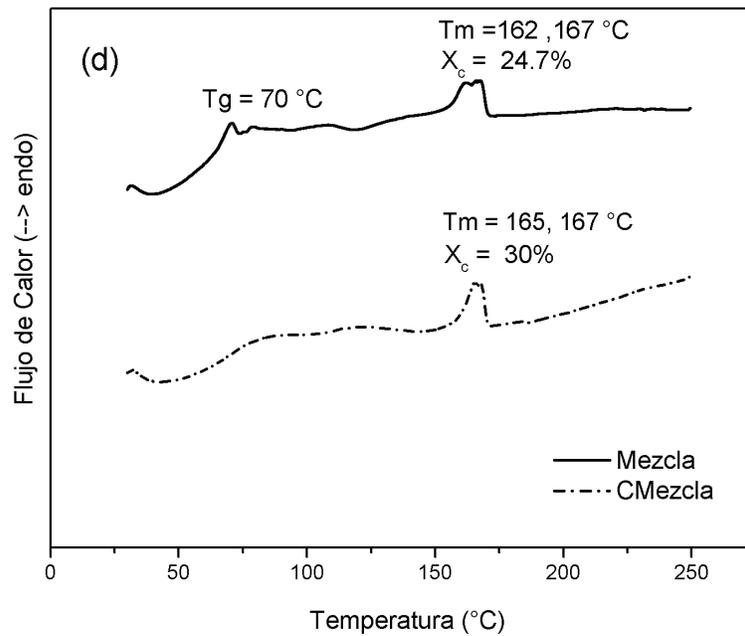
Termogramas DSC de las muestras PLA y CPLA



Termogramas DSC de las muestras Gelatina y CGelatina

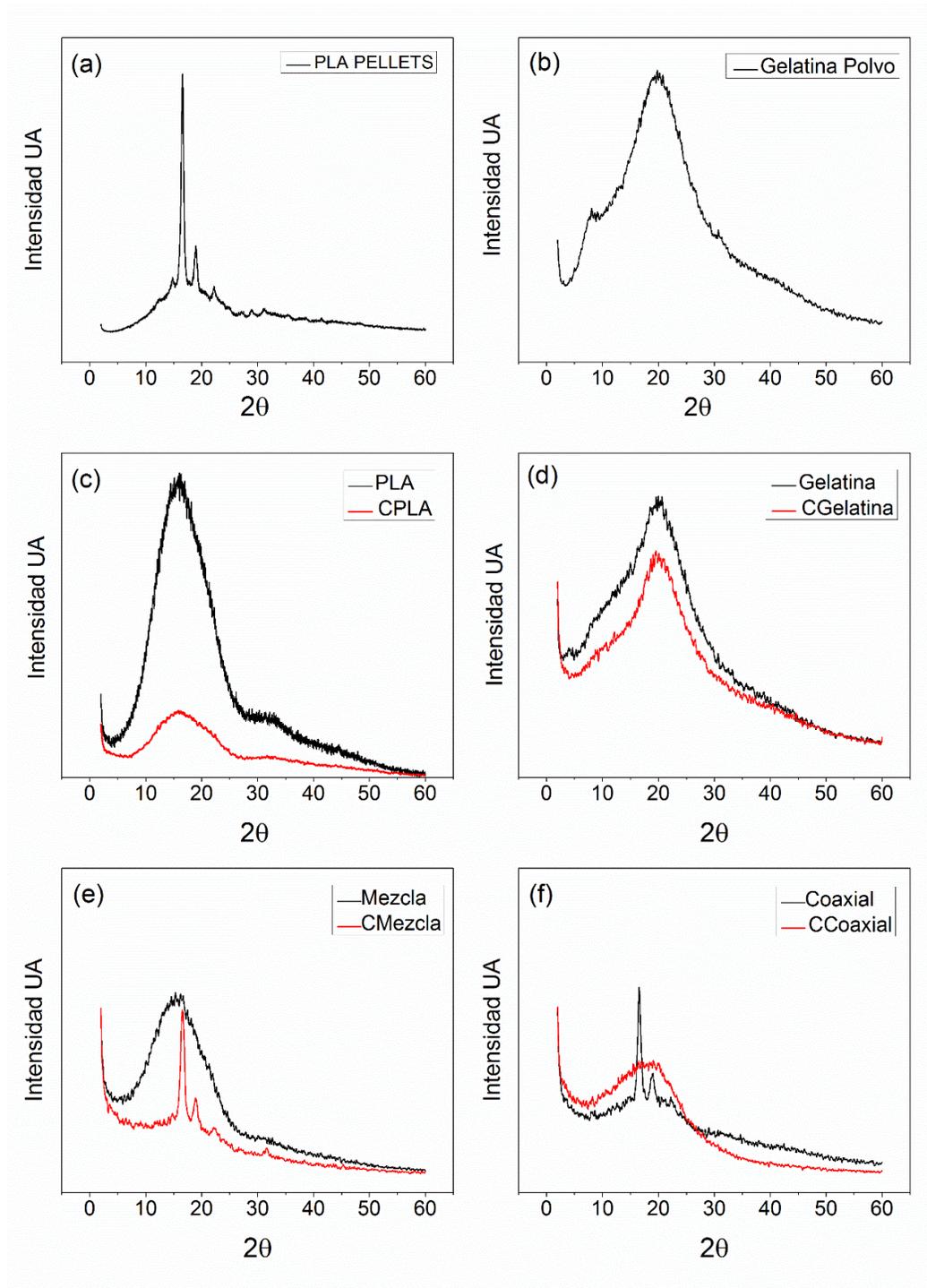


Termogramas DSC de las muestras Coaxial y CCoaxial



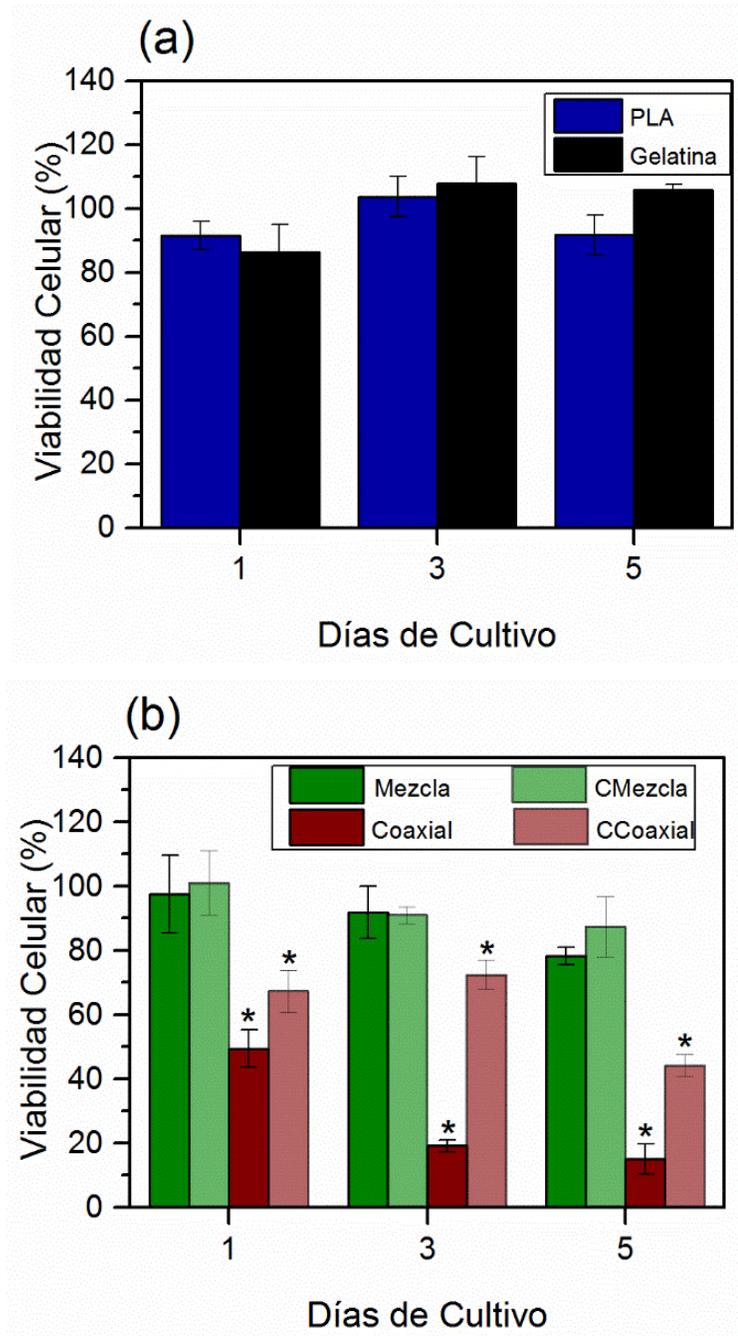
Termogramas DSC de las muestras Mezcla y CMezcla

Análisis de Cristalinidad por DRX



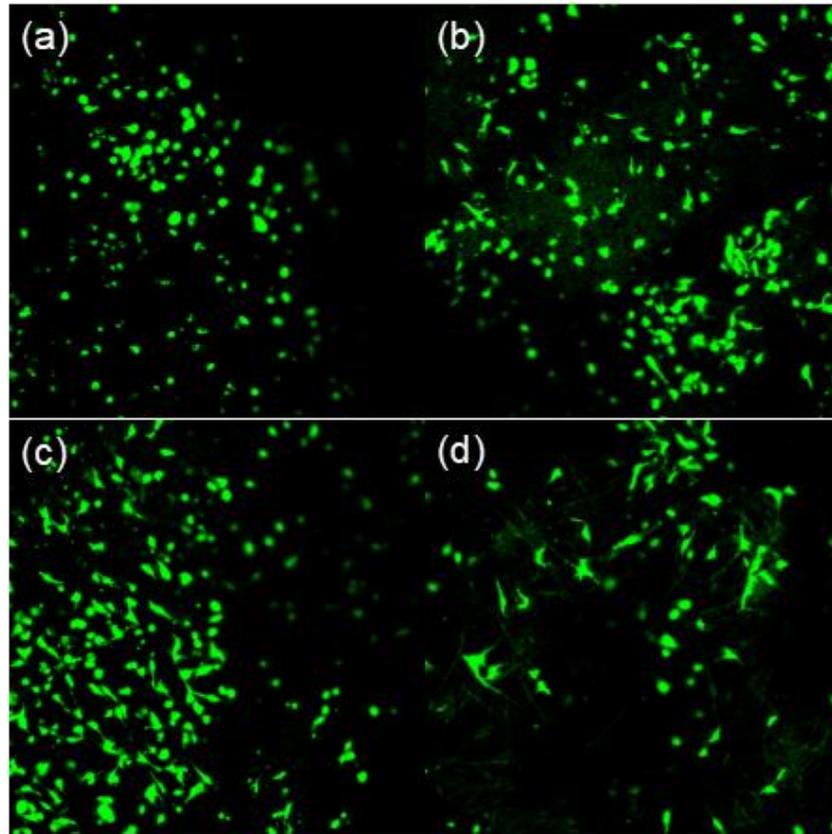
(a) Patrón DRX de los pellets de PLA, (b) polvo de gelatina, (c) muestras PLA y CPLA, (d) Gelatina y CGelatina, (e) Mezcla y CMexcla, (f) Coaxial y CCoaxial.

Ensayo de Viabilidad Celular

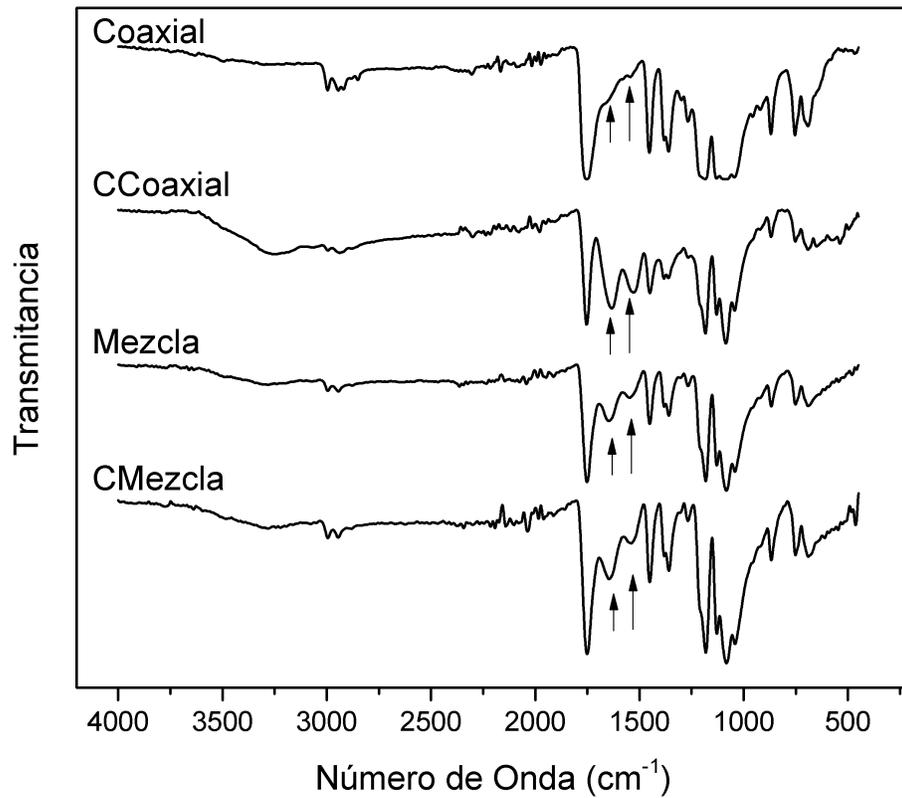


Gráficos de barra de la viabilidad de HUVECs sembradas sobre los materiales (a) PLA y Gelatina, (b) Mezcla, CMezcla, Coaxial y CCoaxial. Se realizó un ANOVA y una prueba múltiple de rango de Duncan utilizando el software statGraphics. El asterisco (*) indica los grupos estadísticamente diferentes a un nivel de ($p < 0.05$)

Análisis Celular por Microscopía Confocal



Micrografía confocal de HUVECs teñidas con calceína-AM y sembradas sobre las muestras
(a) Coaxial, (b) CCoaxial, (c) Mezcla y (d) CMezcla.



Espectros FTIR de las muestras Coaxial, CCoaxial, Mezcla y CMezcla después de haber estado 5 días en cultivo.

8 PERSPECTIVAS

Realizar modificaciones a los materiales elaborados para que estos puedan liberar diferentes agentes químicos. Por ejemplo, anticoagulantes, factores de crecimiento, antibióticos, extractos de plantas medicinales regionales, etc.

Realizar ensayos de optimización del proceso de entrecruzamiento de la gelatina en los materiales fabricados con el propósito de establecer un método de entrecruzamiento que permita obtener propiedades mecánicas mejoradas.

Realizar ensayos de biodegradación de los materiales fabricados con la intención de conocer las cinéticas de degradación de estos y saber si los tiempos de degradación coinciden con los de formación de diferentes tejidos.

Incluir otro tipo de técnicas con las que se puedan fabricar materiales tubulares, tales como, extrusión y sinterizado de láminas enrolladas.

Incluir otro tipo de materiales biodegradables (colágeno extraído de piel de tilapia) y no biodegradables (Teflón en combinación con otros materiales) en la fabricación de injertos vasculares con la intención de satisfacer las necesidades que hasta hoy se precisan.

Generar un biorreactor especializado para el cultivo de tejidos tubulares con la finalidad de poder ensayar los materiales en un ambiente con flujo pulsado.

Las posibilidades de trabajo se vuelven numerosas si tomamos en cuenta que existen una gran diversidad de biomateriales que se pueden utilizar.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Gaudino M, Benedetto U, Fremes S, Biondi-Zoccai G, Sedrakyan A, Puskas J, Angelini G, Buxton B, Frati G, Hare D, Hayward P, Nasso G, Moat N, Peric M, Yoo K, Speziale G, G. L. and T. D. Radial-Artery or Saphenous-Vein Grafts in Coronary-Artery Bypass Surgery. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2069–2077 (2018).
2. Cameron, A., Davis, K. B., Green, G. & Schaff, H. V. Coronary Bypass Surgery with Internal-Thoracic-Artery Grafts — Effects on Survival over a 15-Year Period. *N. Engl. J. Med.* **334**, 216–220 (1996).
3. Kharazi, A. Z., Atari, M., Vatankhah, E. & Javanmard, S. H. A nanofibrous bilayered scaffold for tissue engineering of small-diameter blood vessels. *Polym. Adv. Technol.* **29**, 3151–3158 (2018).
4. Awad, N. K., Niu, H., Ali, U., Morsi, Y. S. & Lin, T. Electrospun fibrous scaffolds for small-diameter blood vessels: A review. *Membranes (Basel)*. **8**, 1–26 (2018).
5. Heydarkhan-Hagvall, S. *et al.* Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials* **29**, 2907–2914 (2008).
6. Raines, E. W. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int. J. Exp. Pathol.* **81**, 173–82 (2000).
7. Tsuji, H. *Poly (Lactic Acid). Bio-Based Plastics: Materials and Applications* (2014). doi:10.1002/9780470649848
8. PARK, H., RADISIC, M., LIM, J. O., CHANG, B. H. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. a Novel Composite Scaffold for Cardiac Tissue Engineering. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **41**, 188 (2005).
9. Hao-Yang Mi , Xin Jing, Zhu-Tong Li, Yu-Jyun Lin, James A. Thomson, L.-S. T. Fabrication and modification of wavy multicomponent vascular grafts with biomimetic mechanical properties, antithrombogenicity, and enhanced endothelial cell affinity. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 1–12 (2019). doi:10.1002/jbm.b.34333

10. B. Swarnalathaa, S.L. Nairb, K.T. Shalumona, L.C. Milbauerc, R. Jayakumara, B. Paul-Prasantha, K.K. Menona, R.P. Hebbelc, A. Somanib, S. V. N. Poly (lactic acid)-chitosan-collagen composite nanofibers as substrates for blood outgrowth endothelial cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **58**, 220–224 (2013).
11. Lynn, A. K., Yannas, I. V. & Bonfield, W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **71**, 343–354 (2004).
12. Dreesmann, L., Ahlers, M. & Schlosshauer, B. The pro-angiogenic characteristics of a cross-linked gelatin matrix. *Biomaterials* **28**, 5536–5543 (2007).
13. Hong, Y., Gong, Y., Gao, C. & Shen, J. Collagen-coated polylactide microcarriers/chitosan hydrogel composite: Injectable scaffold for cartilage regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **85**, 628–637 (2008).
14. Mathew Petera, N.S. Binulala, S.V. Naira, N. Selvamurugana, H. Tamurac, R. J. Novel biodegradable chitosan-gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chem. Eng. J.* **158**, 353–361 (2010).
15. Aldana, A. A. & Abraham, G. A. Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications. *Int. J. Pharm.* **523**, 441–453 (2017).
16. Sandra Ullm, Anne Krüger, Christoph Tondera, Tim P. Gebauer, Axel T. Neffe, Andreas Lendlein, Friedrich Jung, J. P. Biocompatibility and inflammatory response in vitro and in vivo to gelatin-based biomaterials with tailorable elastic properties. *Biomaterials* **35**, 9755–9766 (2014).
17. M A Piris, M Mollejo, E Campo, J Mena´rguez, T Flores, P. G. I. A marginal zone pattern may be found in different varieties of non- Hodgkin’s lymphoma: The morphology and immunohistology of splenic involvement by B-cell lymphomas simulating splenic marginal zone lymphoma. *Histopathology* **33**, 230–239 (1998).
18. Manickam, B., Sreedharan, R. & Elumalai, M. ‘Genipin’ – The Natural Water Soluble Cross-linking Agent and Its Importance in the Modified Drug Delivery Systems: An Overview. *Curr. Drug Deliv.* **11**, 139–145 (2014).
19. Liang, H. C., Chang, W. H., Liang, H. F., Lee, M. H. & Sung, H. W. Crosslinking structures of

- gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide. *J. Appl. Polym. Sci.* **91**, 4017–4026 (2004).
20. Kai, D., Liow, S. S. & Loh, X. J. Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **45**, 659–670 (2015).
 21. Strobel, H. A., Calamari, E. L., Beliveau, A., Jain, A. & Rolle, M. W. Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone and gelatin composite cuffs for tissue engineered blood vessels. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **106**, 817–826 (2018).
 22. Luke Brewster, Eric M. Brey, H. P. G. *Blood Vessels. Principles of Tissue Engineering* (Elsevier Inc., 2007). doi:10.1016/B978-0-12-370615-7.50043-3
 23. Nerem, R. M., Vacanti, J. P. & Vacanti, C. A. The History and Scope of Tissue Engineering. in *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition* 3–8 (2013). doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00001-X
 24. Nerem, R. M. The challenge of imitating nature. *Princ. Tissue Eng.* 7–14 (2007). doi:10.1016/B978-012370615-7/50006-8
 25. Kobayashi, H., Kabuto, M., Ide, H., Hosotani, K. & Kubota, T. An artificial blood vessel with an endothelial-cell monolayer. *J. Neurosurg.* **77**, 397–402 (1992).
 26. Lee Y, Seol Y, Lim Y, Kim S, Han S, Rhyu I, Baek S, Heo S, Choi J, K. P. and C. C. Performance of a polyurethane vascular prosthesis carrying a dipyridamole (Persantin®) coating on its luminal surface. *J. Biomed. Mater. Res.* **54**, 224–233 (2001).
 27. LING-BO SUN, JUNICHI UTOH, SHUJI MORIYAMA, HIROFUMI TAGAMI, KEN OKAMOTO, A. N. K. Pretreatment of a Dacron graft with tissue factor pathway inhibitor decreases thrombogenicity and neointimal thickness: A preliminary animal study. *ASAIO J.* **47**, 325–328 (2001).
 28. Pashneh-Tala, S., MacNeil, S. & Claeysens, F. The tissue-engineered vascular graft - Past, present, and future. *Tissue Eng. - Part B Rev.* **22**, 68–100 (2016).
 29. M. S. Baguneid, A.M. Seifalian, H.J. Salacinski, D. Murray, G. Hamilton, M. G. W. Tissue

- engineering of blood vessels. *Br. J. Surg.* **93**, 282–290 (2006).
30. Devan Ohst, J. J. Development of Novel, Bioresorbable, Small-Diameter Electrospun Vascular Grafts. *J. Tissue Sci. Eng.* **06**, (2015).
 31. T, L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight T, Chronos N, Kyles A, Gregory C, Hoyt G, Robbins R, M. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat. Med.* **12**, 361–365 (2006).
 32. Yu, E., Zhang, J., Thomson, J. A. & Turng, L. S. Fabrication and characterization of electrospun thermoplastic polyurethane/fibroin small-diameter vascular grafts for vascular tissue engineering. *Int. Polym. Process.* **31**, 638–646 (2016).
 33. Jingwen Qin, Yanyan Jiang, Jiajia Fu, Y. W., Ruihua, Y., Gao, W. & Wang, H. Evaluation of drug release property and blood compatibility of aspirin-loaded electrospun PLA/RSF composite nanofibers. *Iran. Polym. J. (English Ed.)* **22**, 729–737 (2013).
 34. Valeria Chiono, Ettore Pulieri, Giovanni Vozzi, Gianluca Ciardelli, Arti Ahluwalia, P. G. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 889–898 (2008).
 35. Gerhardt Konig, Todd N McAllister, Nathalie Dusserre, Sergio A Garrido, Corey Iyican, Alicia Marini, Alex Fiorillo, Hernan Avila, Wojciech Wystrychowski, Krzysztof Zagalski, Marcin Maruszewski, Alyce Linthurst Jones, Lech Cierpka, Luis M de la Fuente, and N. L. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. **30**, 1542–1550 (2010).
 36. Robert Gauvin, Rémi Parenteau-Bareil, Danielle Larouche, Hugo Marcoux, Francis Bisson, Adrien Bonnet, François A. Auger, Stéphane Bolduc, L. G. Dynamic mechanical stimulations induce anisotropy and improve the tensile properties of engineered tissues produced without exogenous scaffolding. *Acta Biomater.* **7**, 3294–3301 (2011).
 37. Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S. & Gokhale, D. V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J. Appl. Microbiol.* **127**, 1612–1626 (2019).
 38. Alida Ospina-Orejarena, Ricardo Vera-Graziano, M. M. C.-O., Hinestroza, J. P., Rodriguez-Gonzalez, M. & Laura Palomares-Aguilera, Marissa Morales-Moctezuma, A. M.-C. Grafting

collagen on poly (lactic acid) by a simple route to produce electrospun scaffolds, and their cell adhesion evaluation. *Tissue Eng. Regen. Med.* **13**, 375–387 (2016).

39. Rasal, R. M., Janorkar, A. V. & Hirt, D. E. Poly(lactic acid) modifications. *Prog. Polym. Sci.* **35**, 338–356 (2010).
40. Bryan W. Tillman, Saami K. Yazdani, Sang Jin Lee, Randolph L. Geary, Anthony Atala, J. J. Y. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials* **30**, 583–588 (2009).
41. Al-Turaif, Tuerdimaimaiti Abudula, H. & Usman Saeed, Adnan Memic, Kalamegam Gauthaman, M. A. H. Electrospun cellulose Nano fibril reinforced PLA/PBS composite scaffold for vascular tissue engineering. *J. Polym. Res.* **26**, (2019).
42. Cheng, Y., Deng, S., Chen, P. & Ruan, R. Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: A review. *Front. Chem. China* **4**, 259–264 (2009).
43. Ranganathan, S., Balagangadharan, K. & Selvamurugan, N. Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **133**, 354–364 (2019).
44. Wanyao Xia, Wei Liu, Lei Cui, Yuanchun Liu, Wei Zhong, Deli Liu, Juanjuan Wu, Kienhui Chua, Y. C. Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **71**, 373–380 (2004).
45. Li, M., Guo, Y., Wei, Y., MacDiarmid, A. G. & Lelkes, P. I. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* **27**, 2705–2715 (2006).
46. Lien, S. M., Ko, L. Y. & Huang, T. J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* **5**, 670–679 (2009).
47. Liu, X., Smith, L. A., Hu, J. & Ma, P. X. Nano-fibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *8th World Biomater. Congr. 2008* **3**, 1646 (2008).
48. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H. & Ramakrishna, S. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials* **29**, 4532–4539 (2008).
49. João C. Silva, Ranodhi N. Udangawa, Jianle Chen, Chiara D. Mancinelli, Fábio F.F. Garrudo,

- Paiyz E. Mikael, Joaquim M.S. Cabral, Frederico Castelo Ferreira, R. J. L. Kartogenin-loaded coaxial PGS/PCL aligned nanofibers for cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **107**, 110291 (2020).
50. R. Brito-Pereira, D.M. Correia, C. Ribeiro, A. Franceskoa, Etxebarriac, L. Pérez-Álvarez, J.L. Vilasc, P. Martinsa, S. L.-M. Silk fibroin-magnetic hybrid composite electrospun fibers for tissue engineering applications. *Compos. Part B Eng.* **141**, 70–75 (2018).
51. Abdal-hay, A., Bartnikowski, M. & Hamlet, S. Materials Science & Engineering C Electrospun biphasic tubular scaffold with enhanced mechanical properties for vascular tissue engineering. **82**, 10–18 (2018).
52. Marta S. Carvalhoa, João C. Silvaa, Ranodhi N. Udangawac, Joaquim M.S. Cabrala, Frederico Castelo Ferreira, Cláudia L. da Silva, Robert J. Linhardt, D. V. Co-culture cell-derived extracellular matrix loaded electrospun microfibrillar scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **99**, 479–490 (2019).
53. David K. Wang, Srinivas Varanasi, Peter M. Fredericks, D. J. T. H. & Anne L. Symons, Andrew K. Whittaker, F. R. FT-IR characterization and hydrolysis of PLA-PEG-PLA based copolyester hydrogels with short PLA segments and a cytocompatibility study. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **51**, 5163–5176 (2013).
54. 2001 - Thomson Learning, Inc. - Pavia, Lampman, Kriz - Introduction to Spectroscopy third edition.pdf.
55. D.M. Hashim, Y.B. Che Man, R. Norakasha, M. Shuhaimi, Y. Salmah, Z. A. S. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins. *Food Chem.* **118**, 856–860 (2010).
56. Daniel-Da-Silva, A. L., Salgueiro, A. M. & Trindade, T. Effects of Au nanoparticles on thermoresponsive genipin-crosslinked gelatin hydrogels. *Gold Bull.* **46**, 25–33 (2013).
57. Di Tommaso, S., David, H., Gomar, J., Leroy, F. & Adamo, C. From iridoids to dyes: A theoretical study on genipin reactivity. *RSC Adv.* **4**, 11029–11038 (2014).
58. Ryouzuke Touyama, Yoshio Takeda, Kenichiro Inoue, Ikuo Kawamura, Masahiko Yatsuzuka, Takeshi Ikumoto, Tetsuro Shingu, T. Y. and H. I. Studies on the Blue Pigments Produced from

- Genipin and Methylamine. I. Structures of the Brownish-Red Pigments, Intermediates Leading to the Blue Pigments. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **42**, 668–673 (2011).
59. Devi, N. & Maji, T. K. Genipin crosslinked microcapsules of gelatin a and κ -carrageenan polyelectrolyte complex for encapsulation of neem (*azadirachta indica a.juss.*) seed oil. *Polym. Bull.* **65**, 347–362 (2010).
 60. Moshikul Alam, A. K. M., Beg, M. D. H., Mina, M. F., Mamun, A. A. & Bledzki, A. K. Degradation and stability of green composites fabricated from oil palm empty fruit bunch fiber and polylactic acid: Effect of fiber length. *J. Compos. Mater.* **49**, 3103–3114 (2015).
 61. Frone, A. N., Berlioz, S., Chailan, J. F. & Panaitescu, D. M. Morphology and thermal properties of PLA-cellulose nanofibers composites. *Carbohydr. Polym.* **91**, 377–384 (2013).
 62. Jalaja, K., Naskar, D., Kundu, S. C. & James, N. R. Fabrication of cationized gelatin nanofibers by electrospinning for tissue regeneration. *RSC Adv.* **5**, 89521–89530 (2015).
 63. Juliana Bidone, Ana Paula P. Melo, Giovana C. Bazzo, Françoise Carmignan, Marli S. Soldi, Alfredo T.N. Pires, E. L.-S. Preparation and characterization of ibuprofen-loaded microspheres consisting of poly(3-hydroxybutyrate) and methoxy poly (ethylene glycol)-b-poly (D,L-lactide) blends or poly(3-hydroxybutyrate) and gelatin composites for controlled drug release. *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 588–593 (2009).
 64. Feldstein, M. M., Roos, A., Chevallier, C., Creton, C. & Dormidontova, E. E. Relation of glass transition temperature to the hydrogen bonding degree and energy in poly(N-vinyl pyrrolidone) blends with hydroxyl-containing plasticizers: 3. Analysis of two glass transition temperatures featured for PVP solutions in liquid poly(ethyle. *Polymer (Guildf)*. **44**, 1819–1834 (2003).
 65. Mathew, A. P., Oksman, K. & Sain, M. The effect of morphology and chemical characteristics of cellulose reinforcements on the crystallinity of polylactic acid. *J. Appl. Polym. Sci.* **101**, 300–310 (2006).
 66. Inai, R., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibres. *Nanotechnology* **16**, 208–213 (2005).