



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA**



ÁREA DE BIOMATERIALES

**“SÍNTESIS DE NANOFIBRAS POR ELECTROSPINNING
APLICADA EN INGENIERÍA DE TEJIDOS DE LA PIEL”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
TECNOLOGÍA AVANZADA**

PRESENTA

I.B.T. JOSUÉ JIMÉNEZ VÁZQUEZ

**Directores: Dr. Eduardo San Martín Martínez
Dra. Rocío Guadalupe Casañas Pimentel**

México D. F. a 09 de diciembre 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 11 horas del día 07 del mes de Diciembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA Unidad Legaria para examinar la tesis titulada:

Síntesis de nanofibras por electrospinning aplicada en ingeniería de tejidos de la piel

Presentada por el alumno:

Jiménez

Apellido paterno

Vázquez

Apellido materno

Josué

Nombre(s)

Con registro:

A	1	4	0	6	5	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

 Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

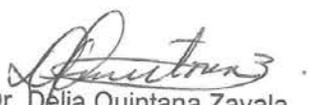
Directores de tesis


Dr. Eduardo San Martín Martínez


Dra. Rocio Guadalupe Casañas Pimentel

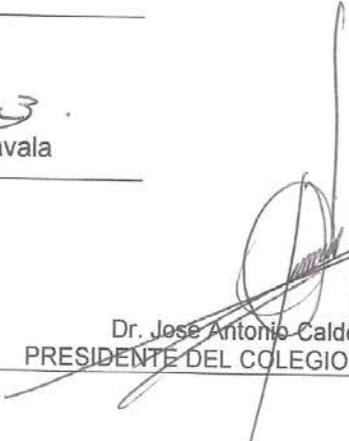

Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez


Dra. Monica Rosálía Jaime Fonseca


Dr. Délia Quintana Zavala



CICATA - I.P.N. U. LEGARIA
 Centro de Investigación en Ciencia
 Aplicada y Tecnología Avanzada
 del Instituto Politécnico Nacional


Dr. José Antonio Calderón Arenas
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 10 del mes de diciembre del año 2015, el que suscribe **Josué Jiménez Vázquez** alumno(a) del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada, con número de registro **A140659**, adscrito al **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Legaría**, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Eduardo San Martín Martínez** y la **Dra. Rocío Guadalupe Casañas Pimentel** y cede los derechos del trabajo titulado “**Síntesis de nano fibras por electrospinning aplicada en ingeniería de tejidos de la piel**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones josuejimv@hotmail.com o spippman_jjvultimate@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Josué Jiménez Vázquez
Nombre y firma del alumno

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biomateriales del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, unidad Cicata-Legaria.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional por ser la fuente de mi formación profesional desde la vocacional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante el estudio de la maestría.

A mis padres por su apoyo, comprensión y sus enseñanzas en la vida que me han llevado a ser la persona que soy ahora.

A mis hermanos Emmanuel y Johnny por servirme como ejemplo en la vida y formación. Y por sus aportaciones al proyecto.

A mi asesor el Dr. Eduardo San Martín por permitirme la realización de este proyecto y por su apoyo y orientación.

A mis profesores de la Maestría por sus enseñanzas y ampliarme en conocimiento durante mi formación.

A todos los miembros del laboratorio de Biomateriales. El Sr. Miguelito, Sr. Javier, Nath, Vivi, Oli, Saúl, Martín, Luis, Erich, Miguel, Alicia, Chio, Elba, Juan y Martha. Por su apoyo, ayuda, amistad, compañerismo y hacer mi estancia en el laboratorio más divertida.

A Héctor, Gustavo, Edgar, Monse, Jeni, Herlis, Juan y Alejandro por su amistad y compañerismo durante la maestría.

A Gustavo y Andrea, mis alumnos, por su ayuda y apoyo en la realización del proyecto.

I. ÍNDICE

I.	ÍNDICE	7
II.	ÍNDICE DE FIGURAS	10
III.	INDICE DE TABLAS.....	13
IV.	RESUMEN	14
V.	ABSTRACT.....	15
1.	INTRODUCCIÓN	16
2.	ANTECEDENTES.....	18
2.1	ELECTROSPINNING Y SU APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS	18
2.1.1	INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE ELECTROSPINNING.....	18
2.1.2	TEORÍA DEL ELECTROSPINNING	19
2.1.3	PARÁMETROS DEL PROCESO DE ELECTROSPINNING	19
2.1.3.1	VISCOSIDAD/ CONCENTRACIÓN	19
2.1.3.2	CONDUCTIVIDAD/ DENSIDAD DE CARGA DE LA SOLUCIÓN	21
2.1.3.3	PESO MOLECULAR POLIMÉRICO	21
2.1.3.4	TASA DE FLUJO	21
2.1.3.5	INTENSIDAD DEL CAMPO/VOLTAJE	21
2.1.3.6	DISTANCIA ENTRE LA PUNTA Y EL COLECTOR.....	22
2.1.3.7	DISEÑO Y COLOCACIÓN DE LA PUNTA DE AGUJA	22
2.1.3.8	COMPOSICIÓN Y GEOMETRÍA DEL COLECTOR.....	22
2.1.3.9	PARÁMETROS AMBIENTALES	23
2.1.4	INGENIERÍA DE TEJIDOS	24
2.1.5	ANDAMIOS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS: MATRICES EXTRACELULARES SINTÉTICAS.....	25
2.1.6	RESPUESTA CELULAR PARA ELEMENTOS NANOFASE.....	26
2.1.7	ELECTROSPINNING PARA APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	26
2.1.7.1	ANDAMIOS DE POLÍMEROS SINTÉTICOS	27
2.1.7.2	ANDAMIOS DE POLÍMEROS NATURALES.....	28
2.1.7.3	ANDAMIOS COMPUESTOS	28
2.1.7.4	ANDAMIOS FUNCIONALIZADOS	29
2.2	INGENIERÍA DE TEJIDOS DE LA PIEL.....	29
2.2.1	GENERALIDADES DE LA PIEL	31
2.2.1.1	LA PIEL ES EL ÓRGANO MÁS LARGO DEL CUERPO EN VERTEBRADOS.....	31

2.2.1.2	PRINCIPIOS DE LA RECONSTRUCCIÓN DE LA PIEL Y LA CICATRIZACIÓN	32
2.2.1.3	LA CURACIÓN DE UNA HERIDA CUTÁNEA	33
2.2.2	FUNCIONES DE LA PIEL	34
2.2.2.1	LA FUNCIÓN DE BARRERA DE LA PIEL	35
2.2.2.2	FIJACIÓN SEGURA A LA DERMIS	35
2.2.2.3	VASCULARIZACIÓN	35
2.2.2.4	ELASTICIDAD Y SOPORTE.....	36
2.2.3	REPARACIÓN DE HERIDAS, CURACIÓN SIN CICATRICES Y REGENERACIÓN FETAL EN MAMÍFEROS.	36
2.2.4	APROVECHAMIENTO DE MECANISMOS DE REGENERACIÓN PARA SUSTITUTOS DE PIEL TECNOLÓGICAMENTE AVANZADOS	38
2.2.5	FACTORES EN COMÚN EN LA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN	39
2.2.5.1	ACTIVACIÓN DE TROMBINA	39
2.2.5.2	MIEMBROS DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DEL COMPLEMENTO	39
2.2.5.3	ISOFORMAS DE LA FAMILIA TGF-B.....	39
2.2.5.4	EL PAPEL DE LA INFLAMACIÓN EN REPARACIÓN DE HERIDAS Y REGENERACIÓN	40
2.3.	BIOMATERIALES PARA CREAR UNA MATRIZ EXTRACELULAR ARTIFICIAL	40
2.3.1.	FUENTES NATURALES DE BIOMATERIALES PARA LA INGENIERÍA DE TEJIDOS	41
2.3.2.	COLÁGENO	41
2.3.3.	ELASTINA.....	42
2.4.	CULTIVO DE COMPONENTES DE LA PIEL <i>IN VITRO</i>	42
2.5.	INCORPORACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOQUINAS EN LA CREACIÓN DE UN SUSTITUTO DE PIEL INTELIGENTE.....	43
2.5.1.	FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)	43
2.5.2.	CITOQUINAS DE LA FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE B (TGF-B)	43
2.5.3.	PROTEÍNAS MORFOGÉNICAS DE HUESO (BMPS).....	43
2.5.4.	FACTORES DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFS).....	44
2.5.5.	FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF).....	44
2.5.6.	FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)	44
2.5.7.	FACTOR DE CRECIMIENTO/ FACTOR DE DISPERSIÓN DE HEPATOSITOS (HGF/SF).....	44
2.5.8.	EL ÁCIDO RETINOICO (RA)	45
2.5.9.	LOS GENES HOMEBOX (HOX)	45
2.6.	CÉLULAS MADRE Y SU APLICACIÓN A UNA CONSTRUCCIÓN DE INGENIERÍA DE TEJIDOS DE LA PIEL	46

2.7.	EVENTOS CLAVE EN EL DESARROLLO DE SUSTITUTOS DE PIEL	49
2.8.	SUSTITUTOS DE INGENIERÍA DE PIEL MEJORADOS PARA APLICACIONES CLÍNICAS.....	50
2.9.	APLICACIONES DE LOS MATERIALES DE INGENIERÍA DE TEJIDOS	51
2.10.	SUSTITUTOS DE PIEL DISPONIBLES.....	52
2.10.1.	COBERTURA EPIDÉRMICA	55
2.10.2.	REEMPLAZAMIENTO DERMAL	57
2.10.3.	REEMPLAZO EPIDÉRMICO/DERMAL	58
2.11.	DESAFÍOS DE LOS BIOMATERIALES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS DE LA PIEL	61
2.11.1.	SEGURIDAD DE LOS BIOMATERIALES.....	61
2.11.2.	MEJORAMIENTO DE LA UNIÓN DE CÉLULAS DE PIEL CULTIVADAS CON LOS LECHOS DE LAS HERIDAS	62
2.11.3.	MEJORAMIENTO DE LA NEOVASCULARIZACIÓN DE PIEL DE INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	63
2.11.4.	RESISTENCIA A LA CONTRACCIÓN Y LA FIBROSIS	63
3.	JUSTIFICACIÓN	64
4.	OBJETIVOS.....	65
4.3.	OBJETIVO GENERAL	65
4.4.	OBJETIVOS PARTICULARES	65
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
6.3.	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE ELECTROSPINNING.....	73
6.3.1.	DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO DE LAS FIBRAS POR SEM.....	73
6.3.2.	OPTIMIZACIÓN DEL DIÁMETRO POR CCD	80
6.3.2.1.	ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES EN UNA FUNCIÓN MATEMÁTICA POLINOMIAL	80
6.3.2.2.	EVALUACIÓN DEL PUNTO TEÓRICO ÓPTIMO	81
6.4.	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COLÁGENO.....	84
6.5.	SÍNTESIS DEL ANDAMIO DE INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	85
6.5.1.	SÍNTESIS DE NANOFIBRAS DE COLÁGENO Y ELASTINA POR ELECTROSPINNING	85
6.5.2.	ENTRECRUZAMIENTO DE LAS NANOFIBRAS DEL ANDAMIO	87
6.6.	CONSTRUCCIÓN DEL SUSTITUTO DE PIEL.....	88
6.6.1.	EVALUACIÓN DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR	88
6.6.2.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA POR SEM	100
7.	CONCLUSIONES.....	101
8.	BIBLIOGRAFIA	103

II. ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Dispositivo típico de electrospinning. Q, taza de flujo; d Distancia entre el plato y la aguja; V, voltaje aplicado.</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2. a) A altas concentraciones de polímero se producen fibras uniformes y con pocas cuentas y uniones. b) A bajas concentraciones de polímero se presentan defectos en forma de esferas y uniones.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3. Modificaciones del dispositivo típico de electrospinning usado para producir mallas con morfologías únicas. a) Una hilera de dos capilares coaxiales puede ser usada para electrohilar nanofibras huecas mostradas en b). Un colector rotatorio c) puede ser utilizado para producir fibras alineadas d).</i>	<i>24</i>
<i>Figura 4. Estructura de la piel humana. La piel humana consiste en tres capas. La capa más externa, la epidermis, mide alrededor de 0.1-0.2 mm. Los queratinocitos y melanocitos son los tipos de células prominentes de la epidermis. La membrana basal separa físicamente la epidermis de la dermis subyacente, sin embargo, funcionalmente este conecta ambos tejidos. Los componentes células principales de la dermis son los fibroblastos que producen una matriz extracelular. El sistema vascular dérmico rico provee a todos los tipos de células con nutrientes. Los apéndices de la piel como los folículos capilares, glándulas sebáceas y sudoríparas. El subcutis (hipodermis) consiste principalmente en tejido graso, que funciona como aislante y como fuente de energía. ..</i>	<i>32</i>
<i>Figura 5. Un esquema de los requerimientos para crear un sustituto de piel completamente funcional.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 6. La necesidad de una piel de ingeniería de tejidos. A) La situación grave. Paciente que sufre de una herida grande y profunda de quemadura después de escarotomía necesitando necroctomía y cobertura de piel. B) La situación electiva. Paciente con nervus gigante, expandido sobre el codo.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 7. Reconstrucción de una herida de quemadura de grosor completo. En la mayoría de los casos, a) un defecto de piel de grosor completo es tratado con b) un injerto de piel de grosor parcial tomado de cualquier parte del cuerpo. Cuando los injertos de piel no son suficientes, entonces los defectos de piel de grosor completo son tratados en dos etapas usando c) un sustituto dermal, el cual es entonces cubierto por d) un material epidermal, usualmente un injerto de piel muy delgado.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 8. La polimerización por plasma puede ser usada para producir superficies que sean adherentes o no adherentes para los queratinocitos. a) El cuarto bajo condiciones estériles en el cual las células de piel de los pacientes son expandidas de una pequeña biopsia de piel. b) Un plasma de ácido acrílico polimerizado con un acarreador de silicona (Myskin™). Las células de los pacientes son colocadas en la superficie recubierta con ácido acrílico y se mantiene en medio para ser transportada al paciente. La enfermera toma el Myskin y lo coloca con las células bocabajo dentro del lecho de la herida.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 9. a) Una ulcera neuropática que no ha podido sanar en 3 años, y b) después de ocho aplicaciones de las propias células del paciente liberadas en un acarreador Myskin.</i>	<i>57</i>

<i>Figura 10. a) Piel de espesor parcial es b) seccionado y teñido con haematoxylin. c) Una vez retiradas las células, la dermis acelular remanente desepidermizada es flexible y d) puede ser reconstruida con queratinocitos y fibroblastos expandidos en el laboratorio para uso experimental o clínico.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 11. a) El uso de piel de ingeniería de tejidos para tratar la extensa contracción seguido de una herida de quemadura. b) Contracción de los queratinocitos en contacto con una alodermis humana en el laboratorio.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 12. a) Electrospinning de fibras. Producción de fibras b) paralelas y c) aleatorias. d) Fibras polilacticas con fibroblastos sembrados.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 16. Micrografías de las fibras obtenidas en cada experimento.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 17. Histograma de frecuencias de los diámetros de las nanofibras de cada experimento....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 18. Graficas de superficie de respuesta del diámetro de las nanofibras: a) Efecto de la concentración de gelatina y distancia, b) voltaje y concentración de gelatina, c) tasa de flujo y concentración de gelatina d) distancia y voltaje e) voltaje y flujo y f) distancia y flujo y su interacción en el diámetro de las fibras.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 19. Superficie de respuesta del CCD manteniendo constante las variables de voltaje y distancia de la punta de la aguja al colector a 12.5 kV y 12.5 cm respectivamente.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 20. Micrografía de la muestra con las condiciones más apropiadas para un sustituto de piel.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 21. Histograma de frecuencias de las nanofibras en el punto óptimo determinado por RSM.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 22. Polvo de colágeno liofilizado obtenido.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 23. a) microfibras de colágeno sintetizadas, b) micrografía de las microfibras.</i>	<i>86</i>
<i>Figura 24. Micrografías de a) gelatina y b) combinación de gelatina y elastina 2:1.</i>	<i>86</i>
<i>Figura 25. Micrografía de la morfología de la combinación de colágeno y elastina electrohilados.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 26. Nanofibras de colágeno y elastina entrecruzados.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 27. Adhesión celular de a) queratinocitos humanos y b) fibroblastos humanos dentro de los andamios sintetizados medida en el día uno de cultivo. (A) Células adheridas a la superficie del andamio no entrecruzado, (B) células adheridas a la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células adheridas a la superficie del andamio entrecruzado con CDI, (D) células adheridas a la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células adheridas a la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (B) células adheridas a la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído.</i>	<i>89</i>
<i>Figura 28. Proliferación celular de a) queratinocitos humanos y b) fibroblastos humanos dentro de los andamios sintetizados al día cuatro del cultivo. (A) Células proliferantes en la superficie del andamio no entrecruzado, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con CDI, (D) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído.</i>	<i>92</i>

Figura 29. Proliferación celular de a) queratinocitos humanos y b) fibroblastos humanos dentro de los andamios sintetizados al día siete del cultivo. (A) Células proliferantes en la superficie del andamio no entrecruzado, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con CDI, (D) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído. 93

Figura 30. Proliferación celular de a) queratinocitos humanos y b) fibroblastos humanos dentro de los andamios sintetizados al día quince del cultivo. (A) Células proliferantes en la superficie del andamio no entrecruzado, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con CDI, (D) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído. 95

Figura 31. Microscopías ópticas de los cristales de formazan en a) los pozos control y b) dentro de los andamios. 96

Figura 32. Cinéticas de crecimiento celular dentro de los andamios. a) Queratinocitos en el andamio no entrecruzado, b) Queratinocitos en el andamio entrecruzado con CDI, c) Queratinocitos en el andamio entrecruzado con glutaraldehído, d) Fibroblastos en el andamio no entrecruzado, e) Fibroblastos en el andamio entrecruzado con CDI, f) Fibroblastos en el andamio entrecruzado con glutaraldehído. (A) Células proliferantes en la superficie del andamio no entrecruzado, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con CDI, (D) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído. 99

Figura 33. Sustitutos de piel de ingeniería de tejidos desarrollados. 100

III. INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Ejemplos de sustitutos de piel comercialmente disponibles.</i>	<u>54</u>
<i>Tabla 3. Experimentos realizados en el CCD.</i>	<u>76</u>
<i>Tabla 4. Análisis de varianza del modelo.</i>	<u>80</u>

IV. RESUMEN

El electrospinning ha ganado popularidad en los últimos años debido en gran parte al incremento del interés en las propiedades y tecnologías a nanoescala. Esta técnica permite la producción de fibras poliméricas con diámetros que varían de algunos nanómetros a varios micrómetros. Las aplicaciones potenciales del electrospinning incluyen membranas de filtración, nanofibras catalíticas, sensores basados en fibras, y andamios de ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos combina la ingeniería y las biociencias en la aplicación clínica para el desarrollo de sustitutos de tejidos y órganos. Esto puede permitir la inducción de regeneración real de tejidos defectuosos y también puede ayudar a mejorar el tratamiento en enfermedades crónicas y defectos en tejidos innatos y adquiridos reemplazando o apoyando la función de las partes del cuerpo defectuosas o dañadas. El enfoque clásico para la ingeniería de tejidos ha sido el cultivo de andamios más o menos biodegradables con células donantes y/o factores de crecimiento. Luego se cultiva e implanta el andamio para inducir y dirigir el crecimiento del tejido nuevo y sano. Hasta ahora las aplicaciones clínicamente exitosas incluye el reemplazamiento de piel, cartílago y huesos.

Se desarrolló un sustituto de piel utilizando la técnica de electrospinning y el enfoque clásico de la ingeniería de tejidos. Se diseñó un dispositivo básico de electrospinning y se optimizó el proceso de formación de nanofibras de gelatina, utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM). Se analizaron las morfologías de las nanofibras obtenidas en cada experimento realizado por microscopía electrónica de barrido (SEM) y se determinaron los parámetros óptimos para la síntesis de nanofibras.

Se extrajo el colágeno de un producto de desecho como lo es la piel de pollo. Las pieles de pollo fueron procesadas para obtener colágeno puro. Este colágeno fue combinado con elastina utilizando la técnica de electrospinning para obtener un andamio de ingeniería de tejidos con estructura muy similar a la matriz extracelular que se encuentra de forma nativa en la piel. A este andamio se le incorporaron queratinocitos y fibroblastos humanos y se evaluó la adhesión y proliferación celular utilizando en método estándar de MTT. Las pruebas *in vitro* mostraron adhesión, proliferación de las células y ausencia de citotoxicidad por parte del andamio; Las células al estar presentes en un ambiente muy similar al que se encuentran de forma natural no solo mostraron adhesión y proliferación, también mostraron una velocidad de crecimiento mayor que las células que no se encontraban en contacto con los andamios. Esta similitud del andamio con la matriz extracelular y su combinación con los queratinocitos y fibroblastos aumentarían la velocidad de regeneración y disminuirían la formación de cicatrices en el tratamiento de heridas graves de la piel en cualquier parte del cuerpo.

V. ABSTRACT

Electrospinning has gained popularity in the last years due in large part to an increased interest in nanoscale properties and technologies. The electrospinning enables the production of polymeric nanofibers with diameters ranging some nanometers to many micrometers. Potential applications of the nanofibers produced by electrospinning include filtration membranes, catalytic nanofibers, fiber-based biosensors, and scaffolds for tissue engineering.

Tissue engineering combines engineering and biosciences in the clinical application for the development of replacement tissues and organs. This may allow the induction of real regeneration in defective tissue and can also help to improve treatment replacing or supporting the function of defective or damaged parts of the body in chronic diseases and defects in innate and acquired tissue. The classical approach for engineering tissue has been the seeding of more or less biodegradable scaffolds with donor cells and/or growth factors, then culturing and implanting the scaffolds to induce and direct the growth of new, healthy tissue. So far, clinically successful applications include skin, cartilage and bone replacement.

In this work was developed a skin substitute using the electrospinning technique and the classical approach for engineering tissue. An electrospinning basic device was design and the gelatin nanofiber forming process was optimized using response surface methodology (RSM). The nanofiber morphology obtained in each developed experiment was analyzed by scanning electron microscope (SEM) and the optimal parameters were determined for the nanofiber synthesis.

The collagen was extracted from chicken skin, a waste product. The chicken skin were processed for obtain a pure collagen. This collagen was combined with elastin using the electrospinning technique for obtain a tissue engineering scaffold with very similar structure to the extracellular matrix that is found natively in the skin. To this scaffold were incorporated human keratinocytes and fibroblast and the attachment and proliferation was evaluated using the standard MTT method. The *in vitro* testing showed attachment, cell proliferation and cytotoxicity absence by the scaffold; the cells to be present in a very similar environment to the extracellular matrix, they not only showed attachment and proliferation, also showed a higher growth velocity that the cells that not were in contact whit the scaffolds. This scaffold similitude with the extracellular matrix and the combination with keratinocytes and fibroblast would increase the regeneration velocity and would decrease the scars formation in the serious injury treatment in any body part.

1. INTRODUCCIÓN

El electrospinning ha ganado popularidad en los últimos años debido en gran parte al incremento del interés en las propiedades y tecnologías a nanoescala. Esta técnica permite la producción de fibras poliméricas con diámetros que varían de algunos nanómetros a varios micrómetros. Las aplicaciones potenciales del electrospinning incluyen membranas de filtración, nanofibras catalíticas, sensores basados en fibras, y andamios de ingeniería de tejidos.

Como lo definió Langer y Vacanti en 1993, la ingeniería de tejidos es “un campo interdisciplinario que aplica los principios de ciencias de la vida e ingeniería hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido”.

La ingeniería de tejidos combina la ingeniería y las biociencias en la aplicación clínica para el desarrollo de sustitutos de tejidos y órganos. Esto puede permitir la inducción de regeneración real de tejidos defectuosos y también puede ayudar a mejorar el tratamiento en enfermedades crónicas y defectos en tejidos innatos y adquiridos reemplazando o apoyando la función de las partes del cuerpo defectuosas o dañadas.

El enfoque clásico para la ingeniería de tejidos ha sido el cultivo de andamios más o menos biodegradables con células donantes y/o factores de crecimiento. Luego se cultiva e implanta el andamio para inducir y dirigir el crecimiento del tejido nuevo y sano. Hasta ahora las aplicaciones clínicamente exitosas incluye el reemplazamiento de piel, cartílago y huesos.

En los humanos, la piel representa aproximadamente una décima parte de la masa del cuerpo, y defectos grandes de la piel de espesor completo resultado de quemaduras, trauma de tejidos blandos, nervus congénito gigante, cirugía de una parte de este órgano principal y enfermedades que conducen a la necrosis de la piel, representan un problema clínico importante que está lejos de ser resuelto. Los principales retos encontrados son los siguientes dos: Primero, se presenta escases de sitios donantes para el trasplante autólogo de la piel cuando el defecto es superior al 50 o 60% de la superficie total del cuerpo (TBSA). En segundo lugar, la mayoría de las técnicas convencionales de injertos de piel para proveer cobertura de defecto autólogo están basados en el trasplante de piel de grosor parcial. La piel de grosor parcial contiene todo lo de la epidermis, pero solo parte de la dermis y que frecuentemente conduce a cicatrices. Raramente, las cicatrices son leves e irrelevantes.

Teóricamente, ambos problemas principales, la escases de sitios de donación y la cicatrización, podrían ser reducidos si no es que eliminados si fuera posible crecer un análogo de la piel de grosor completo con propiedades anatómicas y funcionales cercanas a las normales: un sustituto cultivado de piel dermo-epidérmica.

La piel es una barrera eficiente contra influencias externas como lo son disturbios mecánicos, radiación UV, agentes microbianos patógenos; esta previene la pérdida sustancial de fluidos corporales y juega un rol importante en la termorregulación y defensa inmunológica. Diferentes

tipos de células como los queratinocitos, melanocitos, fibroblastos y células endoteliales constituyen la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo son necesarios para garantizar su función completa.

Los sustitutos dérmicos son un tratamiento eficaz para los procesos que destruyen la piel como las quemaduras que involucran el 60% o más de la superficie corporal total, traumatismos y enfermedades genéticas que involucran heridas crónicas. A diferencia del autoinjerto que depende de la disponibilidad de tejido sano en el paciente, los injertos sustitutos pueden adquirirse de otros humanos, animales o producirse en el laboratorio. Existen sustitutos de piel biológicos y sintéticos. Los primeros son más baratos y abundantes, en cambio los segundos no presentan membrana basal y a pesar de su falta de elementos orgánicos, han demostrado tener cualidades más específicas en el tratamiento de los pacientes. Dentro de los sustitutos para piel más populares están: TranCyte®, Biobrane®, Kollagen®, Matriderm®, Alloderm®, Apligraf®, Integra® y Dermagraft®; siendo este último el más aceptado. Lo que se busca con los sustitutos de piel es el tratamiento óptimo de las heridas cutáneas garantizando su durabilidad, elasticidad, impermeabilidad al agua, disponibilidad y su ausencia de reacción antigénica.

En este trabajo se desarrolló un sustituto de piel utilizando la técnica de electrospinning y el enfoque clásico de la ingeniería de tejidos. El sustituto de piel consiste en una matriz de colágeno y elastina, proteínas presentes en la piel, y queratinocitos y fibroblastos humanos, células también presentes en la piel.

Se presenta el diseño de un dispositivo básico de electrospinning y la optimización del proceso de formación de nanofibras de gelatina, utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM). Se analizaron las morfologías de las nanofibras obtenidas en cada experimento realizado y se determinaron los parámetros óptimos para la síntesis de nanofibras.

El colágeno puro es una proteína de muy alto costo. Para reducir los costos de producción de los sustitutos de piel, se extrajo el colágeno de un producto de desecho como lo es la piel de pollo. Las pieles de pollo fueron procesadas para obtener colágeno puro. Este colágeno fue combinado con elastina utilizando la técnica de electrospinning para obtener un andamio de ingeniería de tejidos con estructura muy similar a la matriz extracelular que se encuentra de forma nativa en la piel. A este andamio se le incorporaron queratinocitos y fibroblastos humanos y se evaluó la adhesión y proliferación celular. Las pruebas *in vitro* mostraron adhesión, proliferación de las células y ausencia de citotoxicidad por parte del andamio; Las células al estar presentes en un ambiente muy similar al que se encuentran de forma natural no solo mostraron adhesión y proliferación, también mostraron una velocidad de crecimiento mayor que las células que no se encontraban en contacto con los andamios. Esta similitud del andamio con la matriz extracelular y su combinación con los queratinocitos y fibroblastos aumentarían la velocidad de regeneración y disminuirían la formación de cicatrices en el tratamiento de heridas graves de la piel en cualquier parte del cuerpo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Electrospinning y su aplicación en ingeniería de tejidos

2.1.1 Introducción a la técnica de Electrospinning

El electrospinning ha ganado popularidad en los últimos años debido en gran parte al incremento del interés en las propiedades y tecnologías a nanoescala. Esta técnica permite la producción de fibras poliméricas con diámetros que varían de algunos nanómetros a varios micrómetros. Las aplicaciones potenciales del electrospinning incluyen membranas de filtración, nanofibras catalíticas, sensores basados en fibras, y andamios de ingeniería de tejidos.

Una característica atractiva del electrospinning es la simplicidad y naturaleza barata del dispositivo. El dispositivo de electrospinning clásico consiste en una bomba de jeringa, una fuente de alto voltaje y un colector (Figura 1). Durante el proceso de electrospinning una solución polimérica es mantenida en la punta de la aguja por tensión superficial. La aplicación de un campo eléctrico usando una fuente de alto voltaje causa una inducción de carga dentro del polímero, resultando en una repulsión de cargas dentro de la solución. Esta fuerza electrostática se opone a la tensión superficial; eventualmente, la repulsión de cargas supera la tensión superficial, causando la iniciación de un chorro. Este chorro viaja y por esto el solvente se evapora y un colector apropiado puede ser usado para atrapar la fibra polimérica. Esta técnica puede ser usada exitosamente para hilar un número de polímeros sintéticos y naturales en fibras de muchos kilómetros de longitud.

Recientemente, el electrospinning ha ganado popularidad con la comunidad de ingeniería de tejidos como un potencial medio de producción de andamios (Pham et al, 2006).

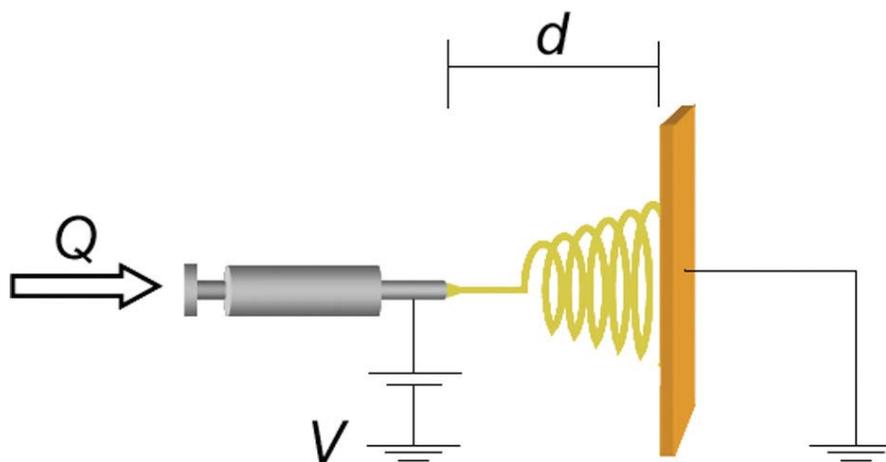


Figura 1. Dispositivo típico de electrospinning. Q , tasa de flujo; d Distancia entre el plato y la aguja; V , voltaje aplicado.

2.1.2 Teoría del Electrospinning

El chorro estable del electrospinning fue descrito con detalle por Reneker y Chun (1996), este está compuesto por cuatro regiones: La base, el chorro, el spray y el colector. En la región de la base, el chorro emerge de una aguja para formar un cono conocido como el cono de Taylor. La forma de la base depende de la tensión superficial del líquido y la fuerza del campo eléctrico; el chorro puede ser expulsado de superficies que son esencialmente planas si el campo eléctrico es lo suficientemente fuerte. El cargamento del chorro ocurre en la base, las soluciones de una conductividad más alta son más propicias para la formación del chorro. Después las fuerzas eléctricas aceleran y estiran el chorro de polímero, causando que el diámetro disminuya conforme aumenta su longitud. Adicionalmente, los solventes con altas presiones de vapor pueden ser evaporados, causando un decremento en el diámetro del chorro y velocidad. En la siguiente región, Reneker y Chun (1996) hipotetizaron que las repulsiones de carga radiales causan que el chorro se bisele en muchas fibras pequeñas de aproximadamente igual diámetro y carga por unidad de longitud. El diámetro final de las fibras electrohiladas sobre el colector depende del número de biselados creados.

2.1.3 Parámetros del Proceso de Electrospinning

El proceso de electrospinning puede ser manipulado por varias variables. Doshi y Reneker (1995) clasificaron los parámetros que controlan el proceso en términos de propiedades de la solución, variables controladas y parámetros ambientales. Las propiedades de la solución incluyen la viscosidad, conductividad, tensión superficial, peso molecular polimérico, momento dipolar y constante dieléctrica. Los efectos de las propiedades de la solución pueden ser difíciles de aislar ya que variando un parámetro generalmente puede afectar otras propiedades de la solución (por ejemplo cambiando la conductividad puede cambiar la viscosidad). Las variables controladas incluyen la tasa de flujo, fuerza del campo eléctrico, distancia entre la punta y el colector, diseño de la punta de aguja, y composición y geometría del colector. Los parámetros del ambiente incluyen a la temperatura, humedad y velocidad del aire.

2.1.3.1 Viscosidad/ concentración

Se ha encontrado que la viscosidad de la solución (controlada por medio de la concentración del polímero) es uno de los más grandes determinantes del tamaño y morfología de las fibras poliméricas que se hilan. La relación entre la viscosidad del polímero y/o concentración en fibras obtenidas por electrospinning han sido estudiadas en numerosos sistemas, incluyendo ácido poli DL-láctico (PDLA), ácido poli láctico glicólico (PLGA), óxido de polietileno (PEO), alcohol de polivinil (PVA), Polimetil metacrilato (PMMA), poliestireno, Ácido poli L-láctico (PLLA), gelatina, dextrosa y colágeno tipo I-PEO. A bajas concentraciones del polímero, se han observado defectos en la forma de cuentas y gotitas (Figura 2B). El proceso bajo estas condiciones fue característico de electro spraying antes que en spinning. Adicionalmente la presencia de uniones y paquetes han sido observados, indicando que las fibras estaban aún húmedas cuando llegaron al colector. Al incrementar la viscosidad de la solución por incremento de la concentración del polímero se

producen fibras uniformes con pocas cuentas y uniones (Figura 2A). En algunos casos, el incremento de la concentración de la solución polimérica puede también afectar la tensión superficial. Estos resultados indican que la variación en la viscosidad es responsable de los cambios morfológicos de las fibras. Para las soluciones que son muy concentradas (y por tanto demasiado viscosas), la gota se seca en la punta antes de que el chorro pueda ser iniciado impidiendo el electrospinning.

Se han hecho intentos para cuantificar las concentraciones y viscosidades mínimas requeridas para electrohilar fibras. Las soluciones con concentraciones de 2 a 2.5 veces la concentración de enredo han dado fibras libres de cuentas. Cuando la concentración de la solución es menor que la concentración de sobreposición esta es insuficiente para formar las cadenas sobrepuestas de las fibras poliméricas; en todas las condiciones se observa la formación de gotas. En las regiones semidiluidas, la formación de cuentas es observada ocasionalmente. En concentraciones aproximadamente dobles a la concentración de sobreposición, se obtienen fibras uniformes y libres de cuentas.

Se ha encontrado que el diámetro de las fibras producidas por electrospinning incrementa al incrementar la concentración de la solución.

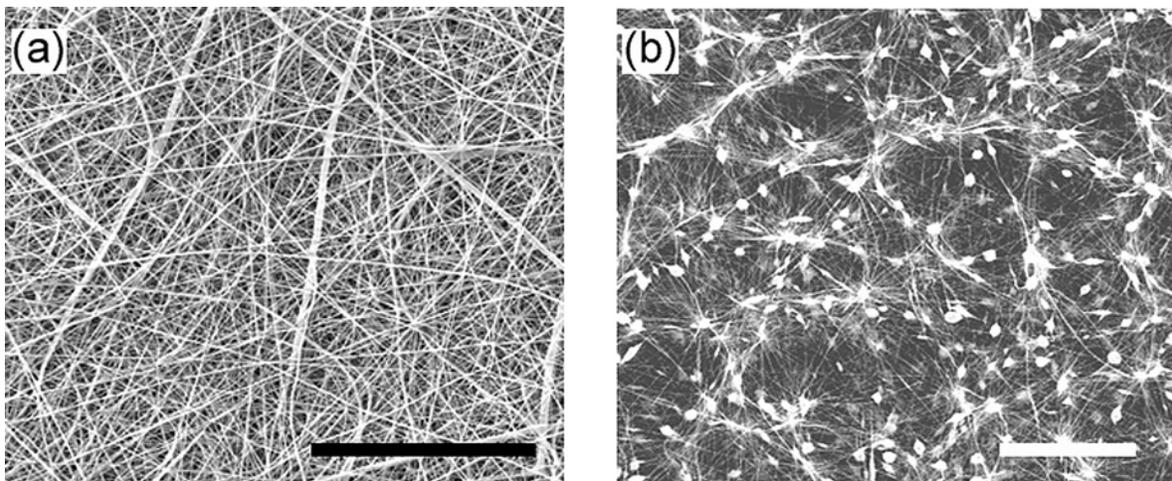


Figura 2. a) A altas concentraciones de polímero se producen fibras uniformes y con pocas cuentas y uniones. b) A bajas concentraciones de polímero se presentan defectos en forma de esferas y uniones.

Los investigadores se han dirigido a encontrar una relación entre la concentración de la solución y el diámetro de las fibras. Por ejemplo, se ha encontrado que incrementando la concentración de gelatina produce fibras con un incremento de diámetro de acuerdo con una relación potencial.

2.1.3.2 Conductividad/ densidad de carga de la solución

Se ha encontrado que incrementando la conductividad de la solución o densidad de carga puede ser usado para producir fibras más uniformes con pocas cuentas presentes. Una propuesta para incrementar la conductividad de la solución ha sido a través de la adición de sal. La conductividad también ha sido incrementada por la adición de alcohol al solvente. El uso de un surfactante no iónico, no previene completamente la formación de cuentas, así que se ha hecho la hipótesis de que los surfactantes cargados incrementan la conductividad de la solución y densidad de carga neta, causando un incremento en la inestabilidad de flagelación produciendo fibras más uniformes. También el incremento de la densidad de carga generalmente produce fibras más delgadas.

2.1.3.3 Peso Molecular Polimérico

Al incrementar el peso molecular se reduce el número de cuentas y gotas. En concentraciones de 6 veces o más grandes que la concentración de sobreposición se observan fibras uniformes, independientes del peso molecular.

2.1.3.4 Tasa de Flujo

Se han hecho pocos estudios sobre la relación entre la tasa de flujo y la morfología y el tamaño. En general, se ha encontrado que a bajas tasas de flujo producen fibras con diámetros pequeños. Tasas de flujo demasiado altas resultan en cuentas ya que las fibras no tienen oportunidad de secarse antes de llegar al colector.

2.1.3.5 Intensidad del campo/Voltaje

A voltajes bajos, una gota es típicamente suspendida en la punta de la aguja y un chorro será originado del cono de Taylor produciendo un hilado libre de cuentas (asumiendo que el campo eléctrico es suficiente para romper la tensión superficial). Cuando el voltaje es incrementado, el volumen de la gota en la punta decrece, causando que el cono de Taylor retroceda. El chorro se origina desde la superficie del líquido dentro de la punta y se observa un mayor número de cuentas. Cuando el voltaje es incrementado más, eventualmente el chorro se mueve alrededor del borde de la punta, con ningún cono de Taylor visible; en estas condiciones se presentan muchas cuentas.

Usando difracción laser, también se ha demostrado que el incremento de voltajes produce chorros con diámetros más grandes y definidos que conducen a la formación de varios chorros.

La presencia de cuentas y unidones a altos voltajes se ha observado en el hilado de soluciones de PEO, PDLA, bisofenol-A polisulfona, quitosan y gelatina. La relación entre el diámetro de la fibra y el voltaje es ambigua.

2.1.3.6 Distancia entre la punta y el colector

Se ha examinado el variar la distancia entre la punta y el colector como otra propuesta para controlar los diámetros y la morfología de las fibras. Se ha encontrado que se requiere un mínimo de distancia para darle a la fibra suficiente tiempo para secarse antes de llegar al colector. Se ha observado la formación de cuentas a distancias que están suficientemente cerca o suficientemente lejos. Para el hilado de PVA, gelatina, quitosan y floruro de polivinil, no se han observado efectos significantes de la distancia entre la punta y el colector en el tamaño o morfología de la fibra.

2.1.3.7 Diseño y colocación de la punta de aguja

Se han investigado varios diseños y configuraciones de los tipos de aguja para el proceso de electrospinning. Li y Xia (2004) desarrollaron una hilera coaxial de dos capilares (figura 3A). Usando fuentes que constan de dos líquidos inmiscibles, ellos fueron capaces de producir nanofibras huecas (Figura 3B). Ellos también usaron esta hilera para preparar mezclas de polímeros.

El uso de múltiples puntas fue investigado con el objetivo de incrementar el rendimiento y la tasa de producción del electrospinning del PEO. Múltiples puntas de aguja fueron usadas también para hacer mezclas de PVA y acetato de celulosa. El movimiento transversal del colector permite una mayor distribución uniforme de cada polímero.

2.1.3.8 Composición y geometría del colector

Varios materiales y geometrías han sido estudiados para electrohilar fibras poliméricas. Kim et al. (2005) hilo fibras de PLLA y PLGA en un colector de metal, un depósito de agua, y un colector de metanol. Ellos encontraron que se obtenían fibras lisas usando el colector de metal. La recolección en la superficie de agua causaba que las fibras de polímero hidrofóbico se encogieran, mientras que el metanol causaba un hinchamiento de las fibras. Acetato de celulosa fue recolectado usando malla de cobre, papel aluminio, agua y papel. Se encontró que la densidad de empaquetamiento era influenciada por la conductividad del colector: los colectores más conductivos disipaban la carga de las fibras. Cuando esta carga no es disipada (colectores no conductivos), las fibras se repelían una a la otra, obteniendo una estructura más porosa. También, conductores porosos, como el papel y la malla de cobre, produce una estructura menos compactada comparada con fibras colectadas en papel aluminio y agua. Alcohol de polietileno co vinilo fue incluso hilado directamente en una mano humana.

Colectores con varias geometrías también han sido diseñadas y usadas. Rutledge y colaboradores (2001) usaron dos platos paralelos cuando hilaban sus fibras para generar campos eléctricos uniformes. Colectores de marco mostraron la producción de fibras con un marco conductivo produciendo un mejor alineamiento que uno no conductivo. También, un arreglo de fibras electrohiladas ha sido producido usando como colector dos anillos conductores. Las fibras fueron suspendidas entre los anillos, y se obtuvieron fibras de arriba de 10 cm de largo. La rotación de

uno de los anillos colectores permitió la producción de un hilado multifilamento. PEO fue también hilado usando un método con múltiples campos en donde el chorro del polímero pasaba a través de tres anillos paralelos, cada uno conectado a una fuente de poder independiente. Este método produjo fibras más pequeñas y libres de cuentas que eran colectadas en un área más enfocada.

Las fibras también han sido colectadas usando un tambor cilíndrico rotatorio en lugar de un colector estacionario (figura 3C); Permitiendo un alineamiento de las fibras (Figura 3D). Un mejor alineamiento fue observado cuando se utilizó un tambor formado por hilos de cobre que estaban aterrizados. En otra variación, un delgado alfiler de acero fue utilizado como un contraelectrodo y fue colocado detrás de un colector cilíndrico no conductivo en rotación; Se obtuvieron fibras alineadas de más de 10cm de longitud. El tambor rotatorio también fue combinado con el método de múltiples campos para permitir la recolección de fibras en tiras finas o hilos.

2.1.3.9 Parámetros ambientales

Pocos estudios se han enfocado en examinar los efectos de los parámetros ambientales del proceso de electrospinning. Mit-Uppatham et al (2004) hilo fibras de 6-poliamina en un rango de temperaturas de 25 a 60°C. Ellos encontraron que incrementando la temperatura producía fibras con un diámetro menor, y ellos atribuyen este decremento del diámetro a la disminución de la viscosidad del polímero en temperaturas más altas. La humedad fue variada por Casper et al (2004) mientras hilaba soluciones de poliestireno. Su trabajo mostro que incrementando la humedad resultaba en la aparición de pequeños poros circulares en la superficie de la fibra; por lo que incrementando la humedad se favorece la coalescencia de poros. El hilado también se ha realizado al vacío con el fin de obtener campos eléctricos más grandes; haciendo esto se producen fibras e hilos con diámetros más grandes.

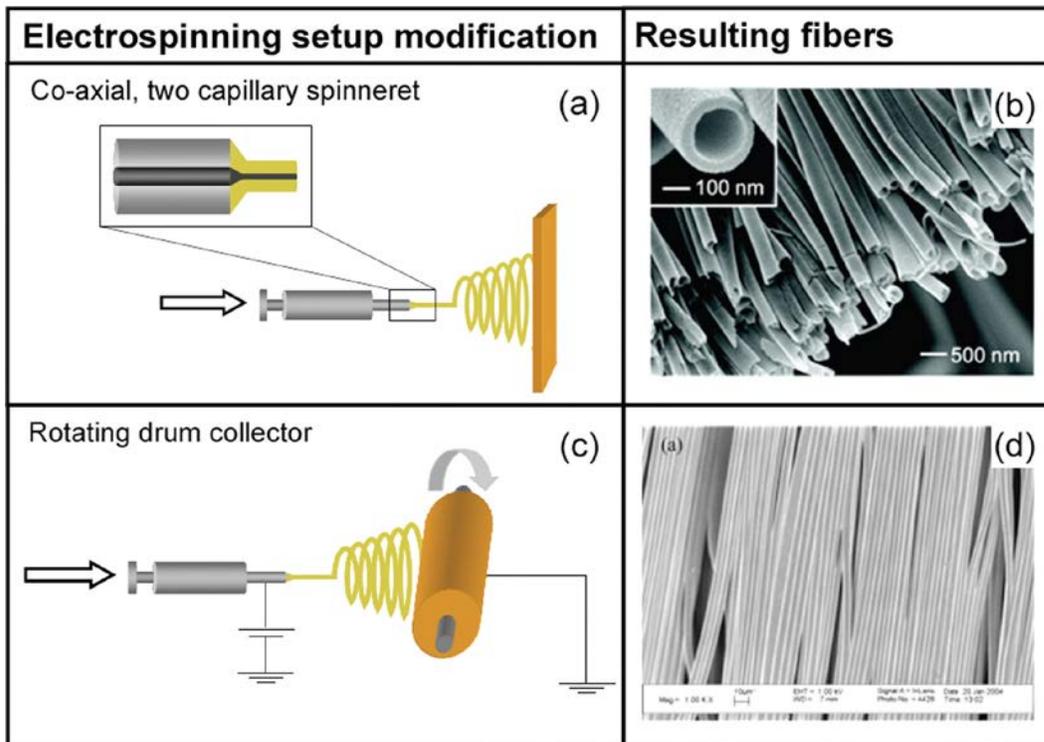


Figura 3. Modificaciones del dispositivo típico de electrospinning usado para producir mallas con morfologías únicas. a) Una hilera de dos capilares coaxiales puede ser usada para electrohilar nanofibras huecas mostradas en b). Un colector rotatorio c) puede ser utilizado para producir fibras alineadas d).

Estos estudios muestran el potencial de la técnica de electrospinning para producir mallas de fibras poliméricas. Estas mallas tienen un potencial tremendo como andamios para ingeniería de tejidos (Pham et al, 2006).

2.1.4 Ingeniería de Tejidos

Como lo definió Langer y Vacanti en 1993, la ingeniería de tejidos es “un campo interdisciplinario que aplica los principios de ciencias de la vida e ingeniería hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido”.

La ingeniería de tejidos (IT) es un nuevo campo interdisciplinario de investigación aplicada de rápido crecimiento que probablemente represente un prototipo de los futuros desarrollos de la ciencia.

Principalmente los campos separados de la ciencia como la ingeniería y las ciencias de la vida se han juntado para sobrepasar las barreras tradicionales en investigación médica. La ingeniería de tejidos involucra numerosas especialidades médicas y técnicas. Biología celular, biología molecular, ingeniería de biomateriales, microscopia de imagen, ingeniería robótica, diseño asistido por computadora y de equipos y finalmente los asesores legales e investigadores especialistas en

mercadotecnia (desarrollo de producto e implementación médica), están todas involucradas en un proceso práctico de Ingeniería de Tejidos.

La IT combina la ingeniería y las biociencias en la aplicación clínica para el desarrollo de sustitutos de tejidos y órganos. Esto puede permitir la inducción de regeneración real de defectos en tejidos y también puede ayudar a mejorar el tratamiento en enfermedades crónicas y defectos en tejidos innatos y adquiridos reemplazando o apoyando la función de las partes del cuerpo defectuosas o dañadas.

La clave para su progreso es un entendimiento entre las ciencias básicas, ingeniería bioquímica, clínica e industria. Los principales enfoques para su entendimiento hasta el momento han sido el entendimiento de las interacciones célula-célula, la selección de matrices apropiadas (interacción célula-matriz) y la señalización química (Factores de crecimiento).

El enfoque clásico para la ingeniería de tejidos ha sido el cultivo de andamios más o menos biodegradables con células donantes y/o factores de crecimiento. Luego se cultiva e implanta el andamio para inducir y dirigir el crecimiento del tejido nuevo y sano. Hasta ahora las aplicaciones clínicamente exitosas incluye el reemplazamiento de piel, cartílago y huesos. Hay investigaciones intensivas con el propósito de reconstruir nervios periféricos, tejido adiposo, músculos, estructuras tubulares urinarias, tejido conectivo (tendones), pared abdominal, cartílago, hueso y construcciones osteocartilagógenas (tendones), válvulas del corazón y vasos sanguíneos, de mama, intestino delgado, esófago, páncreas, hígado y construcciones traqueales (Horch, 2006).

2.1.5 Andamios de ingeniería de tejidos: matrices extracelulares sintéticas

La habilidad de las células para construir tejidos y mantener las funciones tejido-específicas depende críticamente de factores epigénéticos, como lo es el microambiente único entre células y tejido específico. Algunos de los factores principales que contribuyen a este microambiente único son las interacciones célula-célula y el tipo de la matriz extracelular (ECM) del órgano. Las interacciones entre las células y la ECM son cruciales para la diferenciación celular y en la modulación o redireccionamiento de las funciones celulares. Sin embargo, cuando las células son removidas de su microambiente y cultivadas en un ambiente *in vitro*, estas se diferencian típicamente, perdiendo de este modo algunas de sus características normales *in vivo*. Uno de los principales objetivos de la ingeniería de tejidos es recrear en un sistema de cultivo *in vitro* algunos de los factores esenciales en el microambiente celular que controlan y regulan las funciones celulares *in vivo* (Li et al, 2005).

Uno de los aspectos de la IT ha sido el diseño de andamios poliméricos con propiedades biológicas y mecánicas específicas similares a la matriz extracelular nativa para modificar el comportamiento celular. *In vivo*, una gran mayoría de las células están en contacto con la ECM, que está compuesta de una red de proteínas de tamaño nanométrico y glicosaminoglicanos. La intrigante complejidad de este ambiente dinámico espacio temporal influye en el fenotipo y otros comportamientos

celulares al proporcionar señales informacionales directas e indirectas. Estos tipos de interacciones entre célula y ECM pueden modular actividades celulares como la migración, proliferación, diferenciación, expresión genética y secreción de varias hormonas y factores de crecimiento. Así, para ser recreado el ambiente *in vivo* más cercano (composición química, morfología, grupos funcionales de superficie), la opción más probable para su éxito es un andamio de IT.

Los andamios de IT funcionan como matrices extracelulares hasta que la reparación o regeneración ocurre. Un andamio provee una estructura tridimensional para las células para unirse y desarrollarse *in vitro*. Subsecuentemente, la construcción del andamio y las células puede ser implantada en un sitio defectuoso para la reparación y regeneración de tejido. Aunque las características deseadas de un andamio varían ligeramente con el tejido que se trata de ser recreado, hay propiedades generales que son deseables para cualquier andamio. Primero y ante todo, los andamios deben de ser biocompatibles, esto significa que este debe de integrarse con el tejido hospedero sin provocar una respuesta inmune importante. El andamio también debe de ser poroso con una relación superficie/volumen amplia para permitir la unión de células y su crecimiento dentro de este con un buen intercambio de nutrientes durante el cultivo *in vitro* o *in vivo*. Además, la naturaleza porosa del andamio permitirá la angiogénesis tras la implantación en un sitio defectuoso (para tejidos vasculares). También, ya que el andamio actúa como un soporte temporal para las células para adherirse y proliferar, este debe de mimetizar la arquitectura y funcionalidad de la ECM. Finalmente, un andamio de ingeniería de tejidos debe ser biodegradable de manera que no se requiera una segunda cirugía para remover el implante. La tasa de degradación debe coincidir o al menos ser controlable para simular la tasa de formación de nuevo tejido.

2.1.6 Respuesta celular para elementos nanofase

Un aspecto importante de las ECM nativas son sus componentes a nanoescala, como el colágeno. De esto se deduce que un andamio de ingeniería de tejidos también debe contener elementos nanofase. Estudios han mostrado que los elementos de tamaño nanométrico pueden afectar el comportamiento celular. Por ejemplo, la arquitectura de una nanofibra ha mostrado promover selectivamente la proliferación de osteoblastos y su diferenciación sobre nano fibras de carbono. Esto es debido a que los diámetros de las fibras del andamio son de orden de magnitud más pequeño que el tamaño de las células, así las células son capaces de organizarse alrededor de las fibras o extenderse y unirse para absorber proteínas en múltiples puntos focales (Pham et al,2006).

2.1.7 Electrospinning para aplicaciones en ingeniería de tejidos

El proceso de electrospinning, bien conocido por muchos años en la industria textil y en la ciencia de polímeros orgánicos, recientemente ha re-emergido como una herramienta novedosa para generar andamios de biopolímeros para ingeniería de tejidos. Específicamente, el electrospinning provee un mecanismo para producir andamios de nanofibras de una variedad de materiales

poliméricos, incluyendo polímeros sintéticos y proteínas naturales. La topología de estos andamios electrohilados se asemeja mucho a la de la ECM nativa. Fibras con diámetros en el rango de varios micrómetros se reducen a menos de 100nm, estas tienen un área superficial alta por relación de masa, y pueden ser electrohiladas en andamios 3D con una muy alta porosidad. De esta forma, las matrices biomiméticas pueden ser fabricadas por electrospinning el cual facilita la adhesión celular, soporta el crecimiento celular y regular la diferenciación (Li et al, 2005).

2.1.7.1 Andamios de polímeros sintéticos

El método más típico de recolección de fibras electrohiladas es en un plato colector aterrizado. Debido a la aleatoriedad del chorro inestable de la fibra, se colecta una hoja de fibra no tejida, altamente porosa y con una gran superficie de volumen. Fibras electrohiladas de PLGA han mostrado tener porosidades superiores al 90%. Este material es ideal para andamios de ingeniería de tejidos debido a que su alta área superficial permite un gran porcentaje de acoplamiento celular, así como para múltiples puntos de adhesión focal en diferentes fibras debido a los diámetros nanométricos de las fibras. Adicionalmente, las fibras en el rango de nanómetros y submicras se asemejan más a la escala de tamaño de los componentes extracelulares. La versatilidad de la técnica ha permitido hilar diversos conjuntos de materiales sintéticos y naturales. Diseños innovadores para la recolección de fibras han ampliado la librería de andamios disponibles e incrementado la probabilidad de éxito de la ingeniería en tipos de tejido específicos. Además, las modificaciones funcionales de las matrices de nano fibras electrohiladas pueden mejorar la citocompatibilidad y biocompatibilidad de los polímeros.

Los andamios electrohilados de nano fibras son capaces de soportar una amplia variedad de tipos de células. Un ejemplo son las células endoteliales de vena umbilical humana que se acoplaron mejor y mostraron más proliferación al ser sembradas en fibras de 50:50 poli L-ácido láctico- ϵ -caprolactona (PLCL) con diámetros de 300 nm comparadas con fibras de 7 μ m. Las células unidas a microfibras fueron rodeadas de forma no proliferativa, mientras que en nanofibras, las células se propagaron y se anclaron en múltiples fibras. También se sembraron fibroblastos de ratón en nano fibras de PLGA donde se adhirieron y propagaron de acuerdo a la orientación de la fibra.

Las ECM sintéticas construidas con nanofibras electrohiladas han mostrado afectar el comportamiento fenotípico de una variedad de tipos de células. Estos estudios demuestran que los andamios de nanofibras no son únicamente citocompatibles sino que también pueden ser usados para estimular y favorecer la proliferación celular y el comportamiento fenotípico. Hasta la fecha, el uso de estos andamios ha sido investigado principalmente para la ingeniería de cartílago, hueso, tendón, ligamento y tejidos vasculares.

2.1.7.2 Andamios de polímeros naturales

Los polímeros naturales son también usados por sus biocompatibilidad aumentada y motivos biofuncionales. El colágeno, por ejemplo, es usado como andamio para células ya que es un componente principal de la ECM. Además, la incorporación de colágeno y otros componentes biológicos como el alginato, ácido hialurónico y almidón dentro de polímeros sintéticos puede mejorar la citocompatibilidad total del andamio. Así, el electrospinning de varias sustancias biológicas como el colágeno, la seda, el fibrinógeno y el quitosano han sido investigados para aplicaciones biomédicas. Comparado con los polímeros sintéticos, el electrospinning de materiales biológicos es menos versátil porque tiene que ser utilizado un solvente adecuado que no comprometa la integridad del polímero.

Un andamio de malla de nanofibras de colágeno puede tener la ventaja de no sólo asemejar la escala de tamaño sino también las funciones químicas y biológicas de la ECM. Se han obtenido fibras de colágeno con diámetros de 100 nm (tipo I) y 250 nm (tipo II); El cultivo de células de músculo liso aórtico bajo condiciones dinámicas condujo a la proliferación e infiltración celular dentro de la red de colágeno.

La elastina y el fibrinógeno son otras proteínas encontradas en el cuerpo que han sido electrohiladas en matrices de nano fibras. La elastina es el componente principal de las arterias y los pulmones, impartiendo resistencia y elasticidad a estos tejidos.

El fibrinógeno en plasma de proteínas séricas forma parte de la curación de las heridas y la cascada de coagulación de la sangre. Una malla de nanofibras de fibrinógeno puede ser utilizada como una gasa biomédica para la cicatrización de heridas. Adicionalmente, un andamio de fibrinógeno puede ser propicio para la reparación del cartílago, también un pegamento de fibrina ha sido sugerido como un material candidato para la formación de cartílago nuevo.

Otras moléculas naturales que han sido exitosamente hiladas son la seda, el quitosano, y el dextrano. La fibrina de la seda es un derivado del gusano de seda y tiene buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y una mínima respuesta inflamatoria cuando es implantada in vivo. Las nanofibras de la seda son capaces de soportar la conjugación y el crecimiento de células de estroma de médula ósea, a pesar de la presencia de PEO en la solución hilada. Las preparaciones de quitosano y dextrano también han sido investigadas, y a pesar de que su citotoxicidad no ha sido evaluada, estos materiales poseen propiedades funcionales que pueden ser de utilidad en estrategias de ingeniería de tejidos.

2.1.7.3 Andamios compuestos

Los andamios compuestos también pueden ser creados usando electrospinning. Por ejemplo, hilando secuencialmente diferentes soluciones poliméricas, puede ser creado un andamio con capas. Cada capa puede ser adaptada por una adhesión específica celular y podría ser potencialmente beneficiosa para la reparación de cartílago articular zonal o vasos arteriales. Alternativamente, dos o más soluciones poliméricas pueden ser hiladas concurrentemente,

resultando en un andamio con diferentes tipos de fibras mezcladas. Otra estrategia es el uso de un polímero que se degrade más rápido que el otro, incrementando de este modo los espacios de los microporos para el tejido en crecimiento.

En muchos de los estudios *in vivo*, la unión de células forma una monocapa en la cima del andamio, pero ésta es una pequeña evidencia que sugiere que las células migran dentro de las profundidades del andamio, ya que especialmente los tamaños de poro son pequeños comparados a el tamaño de las células. Se ha sugerido que las células no pueden migrar a través de poros más pequeños a 10 μm . Con el fin de que estos andamios de nano fibras sean útiles como andamios de ingeniería de tejidos, el cultivo de células dentro de una estructura 3D es crítico. Sin embargo, condiciones dinámicas de cultivo en estudios *in vivo* han mostrado que existe penetración celular y deposición matricial a lo largo de las construcciones de nano fibras aunque los mecanismos por los cuales esto ocurre no son claros. Se propone que en estas condiciones, las células son capaces de empujar contra las fibras durante sus rutas de migración y así optimizar los tamaños de poro para promover la infiltración celular.

2.1.7.4 Andamios Funcionalizados

Una estrategia común en ingeniería de tejidos es la funcionalización de un andamio con el fin de incrementar la biocompatibilidad o inducir una respuesta biológica específica de las células unidas. Por ejemplo, la prolongación *in vivo* de la actividad del TGF- β 2 fue observada cuando este fue ligado a colágeno fibrilar por medio del polietilenglicol (PEG) comparado con muestras no mezcladas. La funcionalización de fibras electrohiladas es también factible y es típicamente llevada a cabo ya sea por métodos de posprocesamiento para conjugar moléculas a la superficie de nano fibras o por la incorporación de factores bioactivos dentro de la solución a hilar (Pham et al,2006).

2.2 Ingeniería de tejidos de la piel

En los humanos, la piel representa aproximadamente una décima parte de la masa del cuerpo (Horch, 2006). Los defectos grandes de la piel de espesor completo, como es el resultado de quemaduras, trauma de tejidos blandos, nervus congénito gigante, cirugía de una parte principal y enfermedades que conducen a la necrosis de la piel, representan un problema clínico importante que está lejos de ser resuelto. Los principales retos encontrados son los siguientes: Primero, se presenta escases de sitios donantes para el trasplante autologo de la piel cuando el defecto es superior al 50 o 60% de la superficie total del cuerpo (TBSA). El ejemplo clínico típico es una quemadura profunda masiva. En segundo lugar, la mayoría de las técnicas convencionales de injertos de piel para proveer cobertura de defecto autologo están basados en el trasplante de piel de grosor parcial. La piel de grosor parcial contiene todo lo de la epidermis, pero solo parte de la dermis y que frecuentemente conduce a cicatrices no adecuadas. Raramente, las cicatrices son leves e irrelevantes. A menudo, particularmente en niños, hay cicatrices hipertróficas o formación de queloides que es con frecuencia incapacitante y desfigurante. Interesantemente, El trasplante de piel de grosor completo no es asociado usualmente con cicatrices, sin embargo la transferencia de piel de grosor completo solo puede ser realizada en áreas menores al 2% de la TBSA.

Teóricamente, ambos problemas principales, como la escases de sitios de donación y la cicatrización, podrían ser reducidos si no es que eliminados si fuera posible crecer un análogo de la piel de grosor completo con propiedades anatómicas y funcionales cercanas a las normales: un sustituto cultivado de piel dermo-epidérmica.

Hay retos importantes relacionados con el desarrollo de un sustituto de la piel como son:

1. Un sustituto dermo-epidermal debe tener una función de barrera inmediata o muy rápida después del trasplante. Una cuestión central que queda es que nivel mínimo de diferenciación (y función de barrera) debe ser obtenido en un sustituto de piel durante su crecimiento *in vitro* para tener la estructura y función óptima después de la implantación en el paciente.
2. En el camino a una estructura funcional, optimizada y de larga duración, un sustituto dermo-epidérmica debe ser vascularizado apropiada y eficientemente.
3. Todavía queda mucho por descubrir acerca de los mecanismos por los cuales los tejidos forman y sanan, investigaciones en biología de desarrollo y otras disciplinas biológicas están ya guiando el desarrollo de “materiales inteligentes” que trabajen con mecanismos naturales propios de organogénesis y reparación. Matrices apropiadas y biológicamente activas y factores en combinación con técnicas automatizadas (impresión de tejidos), diseñados para producir una nueva generación de sustitutos complejos de piel, en un número deseado y con calidad constante, son ahora las directrices de una moderna “ingeniería de piel” (Böttcher-Haberzeth, 2010).

La piel de ingeniería de tejidos ha estado en uso por los últimos 30 años y se ha desarrollado grandiosamente durante este tiempo. La mayoría de los biomateriales en uso clínico son a base de colágeno natural o extraído. Los retos clínicos más destacables del uso de estos materiales son cuestiones de seguridad específicas, la mejora de la toma de las células cultivadas en el lugar de la herida, mejorar la tasa de neovascularización de la piel por ingeniería de tejidos y el desarrollo de andamios que resistan la contracción y la fibrosis (MacNeil, 2008).

Hoy en día, no hay modelos de piel de bioingeniería que replique completamente la anatomía, fisiología, estabilidad biológica o naturaleza estética de la piel no lesionada. Los sustitutos de piel deben tener algunas características esenciales como lo son: Facilidad de manipulación y aplicación al sitio de la herida; proveer una función de barrera vital con flujo de agua apropiado; ser fácilmente adherente; tener propiedades físicas y mecánicas apropiadas; sufrir degradación controlada; ser estéril, no tóxica, no antigénica; y provocar una reacción mínima inflamatoria. Adicionalmente, este debe incorporarse dentro del hospedero sin dolor y cicatrizar, facilitando la angiogénesis, sin dejar de ser factible. La meta definitiva de la ingeniería de tejidos es satisfacer la mayoría o todos estos criterios produciendo inteligentes y nuevas terapias de remplazo de piel, como matrices que deben intentar imitar las propiedades de las ECM en que estas tienen la habilidad de liberar una multitud de factores de crecimiento, citocinas y fragmentos de péptidos bioactivos en una manera de evento impulsado temporal y espacialmente específica. Esta liberación programada y focal de citocinas, enzimas y agentes farmacológicos debe promover la reparación y regeneración óptima del tejido de heridas de espesor completo (Metcalfe y Ferguson, 2007).

La ingeniería de tejidos de la piel incluye células liberadas de su propietario, células liberadas dentro de biomateriales de dos o tres dimensiones, biomateriales para el remplazo de la capa dérmica de la piel (con o sin células), y biomateriales para apoyar la sustitución de la dermis y la epidermis. En la discusión de estos escenarios, es útil considerar primero el papel de la piel y determinar que funciones necesitan proveer los biomateriales (MacNeil, 2008).

2.2.1 Generalidades de la piel

2.2.1.1 La piel es el órgano más largo del cuerpo en vertebrados

La piel es una barrera eficiente contra influencias externas como lo son disturbios mecánicos, radiación UV, agentes microbianos patógenos; esta previene la pérdida sustancial de fluidos corporales y juega un rol importante en la termorregulación y defensa inmunológica. Diferentes tipos de células como los queratinocitos, melanocitos, fibroblastos y células endoteliales constituyen la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo son necesarios para garantizar su función completa (Böttcher-Haberzeth et al, 2010) (figura 4).

La epidermis es delgada y totalmente celular, pero tiene suficiente grosor para proveer la función de barrera fundamental. La epidermis mamífera y sus accesorios (cabello, uñas, glándulas sudoríparas y sebáceas) mantienen la homeostasis por el constante reciclamiento de la capa basal de células. La epidermis está también expuesta a la radiación ultravioleta y el daño resultante es uno de los factores que contribuyen al constante desprendimiento de células del estrato corneo, que es remplazado por células que migran de las capas basales. La dermis está situada justo debajo de la epidermis y constituye la mayoría de la piel y está compuesta de colágeno con algo de elastina y glicosaminoglicanos (GAGs). El tipo principal de células presente en la dermis son los fibroblastos, que son capaces de producir enzimas remodeladoras como proteasas y colagenasas, que juegan un papel importante en el proceso de curación de las heridas. La hipodermis es la capa localizada debajo de la dermis y contiene una cantidad considerable de tejido adiposo que está bien vascularizado y contribuye tanto a las propiedades mecánicas como termoreguladoras de la piel (Metcalf y Ferguson, 2007).

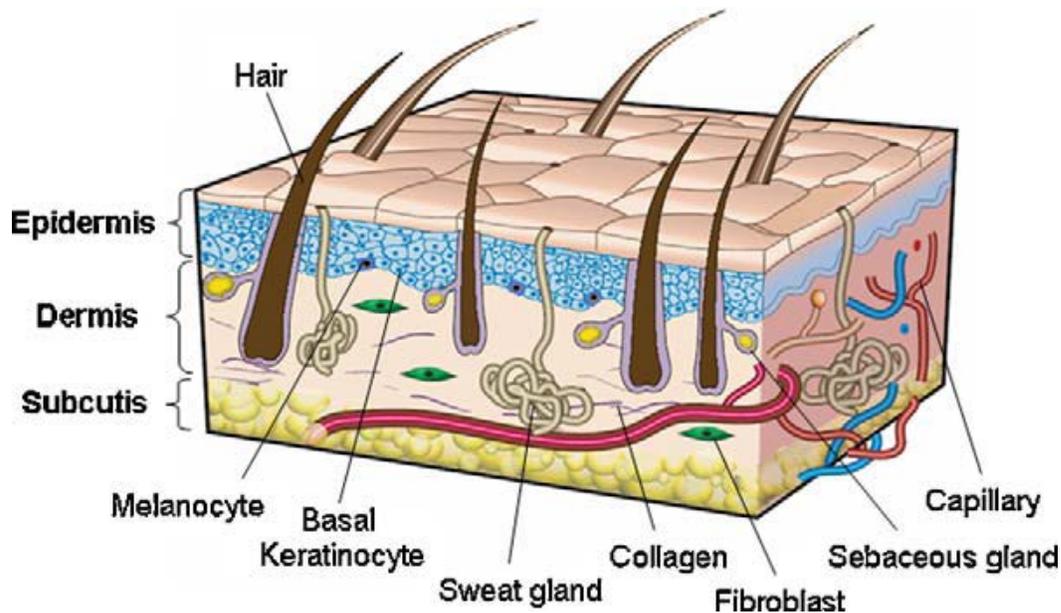


Figura 4. Estructura de la piel humana. La piel humana consiste en tres capas. La capa más externa, la epidermis, mide alrededor de 0.1-0.2 mm. Los queratinocitos y melanocitos son los tipos de células prominentes de la epidermis. La membrana basal separa físicamente la epidermis de la dermis subyacente, sin embargo, funcionalmente este conecta ambos tejidos. Los componentes células principales de la dermis son los fibroblastos que producen una matriz extracelular. El sistema vascular dérmico rico provee a todos los tipos de células con nutrientes. Los apéndices de la piel como los folículos capilares, glándulas sebáceas y sudoríparas. El subcutis (hipodermis) consiste principalmente en tejido graso, que funciona como aislante y como fuente de energía.

2.2.1.2 Principios de la reconstrucción de la piel y la cicatrización

Si esta barrera es destruida, diferentes medidas necesitan ser tomadas, dependiendo de la profundidad del defecto de la piel. Para arreglar el daño, el cuerpo tiene que producir nuevas fibras de colágeno. Sin embargo, ya que el cuerpo no puede reconstruir el tejido exactamente como este era, el nuevo tejido (la cicatriz) tendrá un patrón diferente de colágeno, una diferente textura y calidad que rodea la piel normal. Las heridas que envuelven solo la epidermis y las heridas que se extienden dentro de la capa superficial de la dermis, podrán regenerar una epidermis sin una intervención quirúrgica, siempre que haya un número suficiente de células madre de queratinocitos presentes en la epidermis restante o en la dermis residual. Si los queratinocitos epidermales han desaparecido, la regeneración podría ser mejorada por células madre epidermales derivadas de folículos capilares y/o glándulas sudoríparas.

Pacientes con defectos que se extiende dentro de la dermis profunda o incluso dentro de la hipodermis necesitan un tratamiento más complejo, ya que la superficie de la herida está agotada de sus células madre de queratinocitos. En este caso el enfoque “estándar de oro” es la aplicación de injertos de piel de espesor parcial que contenga toda la epidermis y las partes marginales de la dermis, transfiriendo de este modo la autoregeneración de las células madre de queratinocitos al área afectada. Con heridas de piel de grueso completo, involucra una escisión quirúrgica para el cierre de la herida obligatorio y las cicatrices son un hecho.

Por lo tanto, junto con la disponibilidad de las células madre, la cicatrización es otra característica principal en el proceso de reconstrucción de la piel. Debido a que la formación de cicatrices es única en los humanos en muchos aspectos, las investigaciones en animales son solo de un valor limitado y no han contribuido mucho al entendimiento del tratamiento de las cicatrices.

La característica principal del fenómeno de “cicatrización” es llamada “contracción de la herida”. La contracción de la herida es causada, al menos en parte, por la presencia de miofibroblastos que desarrollan características de células de músculo liso bajo la influencia de TGFβs. A diferencia de la sanación de las heridas embrionarias, las cuales ocurren sin cicatrización, la contracción de la herida es el modo general de curación de las heridas en humanos después del nacimiento.

Tomando esto junto se puede decir que una reconstrucción exitosa de la piel con sustitutos de piel depende crucialmente de dos factores: La presencia de células madre de queratinocitos autoregenerables para la reepitelialización y un sustituto dermal funcional constituido de los componentes celulares y no celulares apropiados que no permitan la cicatrización o esta sea limitada en la piel en desarrollo (Böttcher-Haberzeth et al, 2010).

El desafío que enfrenta la ingeniería de tejidos es el combinar materiales novedosos con células vivientes para producir un equivalente a la piel que sea funcional y durable, y permita la integración y manipulación de la biología celular de las células hospedadas y la multitud de señales que controlan su comportamiento. Convencionalmente, la ingeniería de tejidos de la piel existe como células cultivadas *in vitro* y subsecuentemente sembradas dentro de un andamio o algún material poroso el cual es luego colocado in vivo en el sitio de la herida (Metcalf y Ferguson, 2007).

2.2.1.3 La curación de una herida cutánea

La curación de una herida cutánea es un proceso dinámico y altamente organizado que envuelve 3 etapas: inflamación, formación de nuevo tejido y reorganización del tejido. El primer estado de inflamación empieza inmediatamente después de que la herida ha ocurrido cuando los vasos sanguíneos dañados liberan plaquetas en el sitio de la herida, el cual ayuda a mantener la homeostasis por medio de la formación de un coagulo rico en fibrina. En adicción, las plaquetas activadas juegan un rol vital en la etapa de inflamación por la secreción de proteínas adhesivas, GFs, y citocinas, las cuales reclutan y activan neutrófilos, monocitos y fibroblastos. Primero, los neutrófilos se infiltran en el área de la herida y remueven todos los contaminantes presentes. Cuando el área está limpia de partículas ajenas, los neutrófilos secretan quimioatrayentes que estimulan a los monocitos a invadir el espacio de la herida y unirse a las proteínas de la ECM por medio de los receptores que integran la membrana celular. Estas interacciones célula matriz estimulan la diferenciación de los monocitos en macrófagos, los cuales pueden entonces secretar una plétora de citocinas adicionales dentro del área de la herida, incluyendo el factor α de necrosis tumoral, el factor α de crecimiento transformante (TGF- α), TGF- β , interleucina-1, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) BB, y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

La formación del nuevo tejido, la segunda etapa de la curación de heridas cutáneas, coincide mucho con la primera etapa mientras ya que la reepitelialización comienza después de horas de

tener la herida. La reepitelialización está caracterizada por la migración de células epidermales de la epidermis envolvente sobre una cama de fibronectina y colágeno tipo I, por medio de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ $\alpha 2\beta 1$, respectivamente. La migración es facilitada por la secreción de enzimas degradadoras de ECM, como la colagenasa, que es la responsable de limpiar la ruta entre la dermis rica de colágeno y el coágulo rico en fibrina. Uno o dos días después de la herida, las células epiteliales comienzan a proliferar, posiblemente por la escasez de contactos célula – célula o la estimulación de varios GFs y citocinas en la matriz pericelular (PCM), como el factor de crecimiento semejante a la insulina, el factor de crecimiento epidermal de unión a heparina y el factor de crecimiento de queratinocitos. El proceso de reepitelialización ultimadamente resulta en la producción de una altamente ordenada membrana basal, la cual interbloquea las células epidermales al delimitado estroma del tejido por medio de hemidesmosomas. En respuesta a la abundancia de GFs y citoquinas presentes en el espacio de la herida cuatro días después de la herida, el tejido granular comienza a formarse por el influjo de monocitos, fibroblastos y vasos sanguíneos. Esta apariencia granular resulta de la infiltración de vasos sanguíneos. Como los queratinocitos de la herida y los fibroblastos migrantes también secretan una variedad de proteasas de matriz capaces de limpiar una ruta para el movimiento. Mientras que los fibroblastos migran, ellos reemplazan la primera “matriz provisional” compuesta del coágulo de fibrina y fibronectina. Después de que la migración está completa, los fibroblastos se convierten en “fabricas” de síntesis de colágeno y reemplazan la matriz provisional con fibras de colágeno durante los siguientes días. Los vasos sanguíneos brotan dentro de la herida concurrente con el crecimiento interno de los fibroblastos. Esta neovascularización ocurre en respuesta a factores proangiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y FGF liberados en grandes cantidades por medio de macrófagos infiltrados y células epidermales activadas.

La etapa final de la curación de la herida envuelve la contracción y reorganización de la recién sintetizada matriz y final apoptosis de fibroblastos innecesarios y vasos sanguíneos. La contracción de la herida ocurre dentro de la segunda y tercer semana después de la herida y esta principalmente mediada por los fibroblastos con un fenotipo miofibroblástico. Estas células contraen la herida por medio de cinchar las fibras de colágeno entrecruzando la herida. Similar a otras etapas de curación, la contracción en un proceso el cual también es dependiente de GF, por ejemplo, PDGF y TGF- β . Al final de la contracción de la herida, muchos fibroblastos se someten a apoptosis. Una futura reorganización de la matriz del colágeno en un proceso lento limitado por la baja tasa de colágeno disponible y está acompañado por el incremento de entrecruzamiento de colágeno que fortalecen la matriz sobre el curso de 6 a 9 meses (Macri y Clark, 2009).

2.2.2 Funciones de la piel

La ingeniería de tejidos de la piel necesita: a) proveer una capa de barrera de queratinocitos, b) que estén firmemente unidos a la dermis subyacente, c) bien vascularizado y d) proveer un soporte estructural elástico para la piel.

La fisiología de la piel ha sido investigada en profundidad desde el desarrollo de la piel y células madre, pigmentación de la piel, transducción sensorial, y el progreso de la ingeniería de tejidos en la piel.

2.2.2.1 La función de barrera de la piel

La piel normal proporciona una barrera a prueba de agua, electrolitos y bacterias del mundo exterior. Cuando esta función se pierde a través de quemaduras o úlceras crónicas que no sanan, entonces los pacientes son susceptibles a una infección bacteriana. En pacientes quemados con pérdidas extensas de la piel, la sepsia bacteriana puede ser fatal.

La función de barrera de la piel se consigue a través de capas de queratinocitos diferenciados fusionados juntos en una hoja epidérmica estrechamente integrada. La capa dérmica inferior más gruesa consiste de fibras de colágeno que, en su superficie superior, forman una zona basal de membrana (BM) especializada para una fijación segura de los queratinocitos a la dermis. La dermis esta vascularizada y contiene receptores para tacto, temperatura y dolor así como folículos capilares y conductos de sudor, este último forrados con queratinocitos que contribuyen con la regeneración epidérmica.

La capa epidérmica es relativamente delgada, 0.1-0.2 mm de profundidad, y consiste de una población autorrenovable de queratinocitos programada para ser reemplazada continuamente durante toda la vida de las células basales localizados en la zona 1 de la membrana basal (BM). La mayoría de los queratinocitos se mueven dentro de capas superiores de la epidermis, volviéndose progresivamente estratificados, perdiendo sus núcleos y eventualmente fundirse en las capas de barrera de las hojas de queratina que son desprendidas de forma rutinaria de la superficie de la piel.

2.2.2.2 Fijación segura a la dermis

La epidermis está fijada firmemente a las fibras de colágeno de la dermis por un complejo de estructuras de anclaje tridimensional de membrana basal llamadas hemidesmosomas (Estos son una colección de receptores de adhesión que se extienden a través de la membrana celular y actúan como filamentos de anclaje para unir a los queratinocitos a la BM inferior). Las proteínas que forman la BM, colágeno IV, colágeno VII y laminina son vitales para esta fijación y son sintetizados por los fibroblastos dermales (las células que forman la capa inferior de la piel esponjosa) bajo instrucciones de los queratinocitos. Problemas genéticos con los componentes de la membrana basal resultan en un rango de enfermedades ampollosas (colectivamente conocidos como Epidermiosis Bullosa) que varían en su severidad, pero algunas formaciones pueden ser fatales (si la capa de barrera epidérmica no puede ser mantenida, entonces los pacientes están ampliamente abiertos a infecciones bacterianas). La reconstrucción de esta zona de membrana basal en el paciente sigue siendo uno de los principales retos para la ingeniería de tejidos.

2.2.2.3 Vascularización

La piel está bien vascularizada y esto es esencial para su reparación, que es normalmente excelente en individuos con buena salud. Sin embargo, si hay una pérdida extensiva de la piel, como ocurre en lesiones de quemaduras, entonces el paciente no puede reparar su piel lo suficientemente rápido. Adicionalmente, si los mecanismos de curación de una herida normal

están comprometidos debido a una vascularización pobre (usualmente asociada a la edad o a la diabetes), entonces la reparación de la piel puede ser lenta o dejar de ocurrir. Este es el problema principal en el mundo con el envejecimiento de la población y con el aumento en la incidencia de la diabetes. Lograr una rápida neovascularización en materiales de ingeniería de tejidos es otro reto principal.

2.2.2.4 Elasticidad y Soporte

La dermis también provee soporte y elasticidad a través de una arquitectura compleja de enzimas entrelazadas de colágeno y fibras de elastina. Fallas de reparación pueden resultar en contracción de la piel, fibrosis (donde los fibroblastos producen un material similar a una cicatriz), y cicatrices. La contracción y fibrosis de materiales de ingeniería de tejidos están emergiendo como otro problema (MacNeil, 2008).

2.2.3 Reparación de heridas, curación sin cicatrices y regeneración fetal en mamíferos

Para el completo entendimiento de las diferencias entre la regeneración y el resultado normal de la reparación del tejido, es decir, la fibrosis y la cicatrización, es de utilidad revisar los procesos normales de reparación de heridas, el proceso de cicatrización y considerar algunos ejemplos de tejidos mamíferos, los cuales se someten a una curación sin cicatrices. En el diseño de un remplazo de piel inteligente para injerto, es obvio que el mecanismo de curación y regeneración debe estar a la vanguardia en la mente de los ingenieros de tejidos.

La reparación de tejidos es normalmente un proceso rápido que ha sido ideado a través de la evolución para permitir a los animales de escapar del peligro y recuperar rápidamente la integridad del tejido usando la cicatrización para unirse a los bordes de la herida o para rellenar huecos en el tejido. La curación de heridas también ha sido descrita como un mecanismo secuencial y este es más específicamente un proceso dirigido por eventos, por donde las señales de un tipo de células desencadenan cascadas en otros tipos de células, que impulsan a la herida a través de las fases de curación. La curación de heridas en adultos es esencialmente un proceso de reparación, el cual normalmente exhibe cicatrización. La reparación del tejido empieza inmediatamente con la deposición de coágulos de fibrina en el sitio de la herida, previniendo hemorragia de los vasos sanguíneos dañados. Luego las plaquetas circulantes son agregadas en el sitio de la herida y varios mediadores inflamatorios, como el PDGF, TGF- α y TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y FGFs también están relacionados. Se cree que estas moléculas tienen un papel importante en el proceso de reparación downstream de las heridas. La respuesta inflamatoria de tejidos adultos en heridas es característica por una afluencia temprana de neutrófilos cuyo número aumentara y llegara a un máximo en un periodo de 24 a 48 horas después de la herida. Cuando el número de neutrófilos comienza a descender, los macrófagos toman el control y repoblarán el sitio de la herida. La reepitelialización ocurre también al mismo tiempo, con los queratinocitos migrando a través del tejido de granulación desde lo profundo de la dermis y las células basales del borde de la herida. Tan pronto como los queratinocitos han restablecido la propiedad de barrera de la piel, estos reanudan un fenotipo de células basales de inhibición de contacto y se diferencian en una epidermis queratinizada, escamosa y estratificada.

Las fases finales de la respuesta inflamatoria y la epitelialización coincide con la migración de fibroblastos y células endoteliales y la formación de tejido granular. La angiogénesis y fibroplasia entonces toman lugar, con los fibroblastos convirtiéndose en el tipo celular dominante, estableciendo el colágeno y la ECM. El remodelamiento del colágeno ocurre usando metaloproteinasas de la matriz producidas por los fibroblastos y macrófagos, y esta es una fase que puede tardar varios meses y, en los adultos, es caracterizada por la formación de cicatrices. El balance de colágeno recién formado con la destrucción del viejo colágeno establece las características físicas finales de la cicatriz.

La cicatriz es el punto final de la continuidad normal de la reparación de tejidos en mamíferos y surgen después de casi todas las lesiones dérmicas. Uno de los objetivos principales de la medicina regenerativa es el producir un remplazo novedoso de la piel el cual no solo tenga propiedades estructurales y funcionales de la original también pueda ser incorporado dentro del tejido hospedero sin ninguna cicatrización. La cicatrización puede ser evaluada clínicamente usando la escala de cicatriz de Vancouver o el proforma de cicatriz de Manchester. Hay tres tipos de cicatrices: atrófica, hipertrófica y queloide. Cicatrices atróficas son deprimidas y causan un valle o depresión en la piel. Cicatrices hipertróficas son elevadas y pueden desaparecer con el tiempo. Queloides es tejido de cicatriz que se comporta como un tumor benigno. Las cicatrices queloides son elevadas, expansivas y continúan creciendo más allá del margen de la herida original. Además de la apariencia, ubicación y orientación es también importante considerar el tipo de la cicatriz. Todos los tipos de cicatriz puede ocurrir en todas las áreas del cuerpo, pero algunas áreas como el pecho, las rodillas y los codos son más susceptibles a las cicatrices.

La reparación fetal de heridas es esencialmente un proceso regenerativo, caracterizado por la ausencia de cicatrización y fibrosis. Estas diferencias con el proceso de cicatrización han provocado gran interés y han conducido al desarrollo de varios modelos de animales en donde la curación fetal sin cicatrices ha sido descrita. Estos incluyen a ovejas, cerdos, conejos, ratones, ratas, cobayos, pollos, tlacuaches y monos. Las heridas hechas en tejidos fetales son curadas por diferentes mecanismos y resultan en mucho menos cicatrización que una herida equivalente en tejidos adultos.

Las características de la curación libre de cicatrices después de la herida incisional han sido mostradas en varios estudios. Estos incluyen una inflamación mínima y una completa restauración de la estructura normal de la piel, con deposiciones normales de colágeno y folículos pilosos, vasos capilares y glándulas regularmente distribuidas. Se cree que tal curación solo ocurre a través de una edad de gestación equivalente al primer tercio de desarrollo humano; después de este tiempo, la cicatrización normal como es evidente en los adultos ocurre.

Originalmente, se pensó que el ambiente acuoso estéril proveído por el fluido amniótico era importante en la curación libre de heridas; sin embargo, estudios realizados en marsupiales como la zarigüeya donde estos se crían en la bolsa de la madre demostraron lo contrario. La reparación y regeneración de la piel, por lo tanto, parece estar correlacionada con el grado de diferenciación y la respuesta inflamatoria a la herida.

La clave del proceso de curación libre de cicatrices es la correcta deposición de moléculas de ECM tales como ácido hialurónico, varios tipos de colágeno y tenacina-C. Las heridas embrionarias con curación sin cicatrices exhiben varias diferencias con respecto a la curación de heridas de adultos como lo son las siguientes:

- Carecen de coágulos de fibrina y desgranulación de plaquetas,
- Respuesta inflamatoria marcadamente reducida, consistiendo de pequeños números de células inflamatorias pobremente diferenciadas, y
- Niveles marcadamente elevados de moléculas involucradas en la morfogénesis y crecimiento de la piel.

Una consecuencia de esto es que el perfil del factor de crecimiento de curación de heridas embrionarias es muy diferente al de un adulto. Heridas embrionarias libres de cicatrices muestran reducidos niveles de TGF- β 1, TGF- β 2 y PDGF (Relacionado en los adultos con las plaquetas desgranuladas y células inflamatorias) y elevados niveles de TGF- β 3 (una molécula morfogenética de la piel). La manipulación experimental del perfil de factor de crecimiento de heridas de adulto por adición exógena de TGF- β 3 o neutralización de TGF- β 1, TGF- β 2 y PDGF, etc., resulta en cicatrices marcadamente reducidas o ausentes. Tales consecuencias pueden ser muy importantes en sustitutos artificiales de la piel o injertos para mejorar la toma del hospedero y minimizar la cicatrización en el perímetro y base del injerto.

2.2.4 Aprovechamiento de mecanismos de regeneración para sustitutos de piel tecnológicamente avanzados

Intereses médicos acerca de la regeneración se ha enfocado a menudo en la reparación de tejidos adultos dañados. El desafío encarado aquí podría ser incorporar moléculas asociadas con el proceso de regeneración dentro en una matriz inteligente. Clásicamente, cuando se considera la regeneración en mamíferos, se piensa en la regeneración del hígado, la regeneración de las orejas de los conejos, regeneración de extremidades de ajolote y xenopus, regeneración de cuerno, de la punta de los dedos de un niño, o la regeneración de la papila interdental.

La regeneración usualmente se describe comprendiendo uno o ambos de los dos procesos siguientes:

- 1) Regeneración epimórfica: donde el remplazo de células surgen a partir de células no diferenciadas (cualquier célula madre o células indiferenciadas) que forman un blastema de donde derivan las nuevas estructuras.
- 2) Regeneración morfoláctica: donde nuevas células se derivan de tejidos existentes por diferenciación celular y/o migración.

La regeneración puede tener vínculos importantes con el desarrollo de células madre indiferenciadas que son la fuente de donde surgen tipos de células diferenciadas para crear (o recrear) tejidos adultos funcionalmente organizados.

El proceso de regeneración involucra la remodelación compleja de tejidos provocada por la formación de blastema durante la cicatrización, tiempo después, cartílago, glándulas sebáceas, folículos capilares y las redes de sangre son reformados. Así, la curación de heridas sin cicatrización acompaña la formación y rebrote de varios tejidos como el cartílago y otras estructuras diferenciadas. Entendiendo y caracterizando las moléculas que están involucradas en esta regeneración desde una perspectiva de ingeniería de tejidos podría conducir a cambios fundamentales en el diseño de sustitutos de piel.

2.2.5 Factores en común en la Reparación y regeneración

Un problema general en la investigación de la regeneración es entender como los acontecimientos del tejido herido, que normalmente resultaría en una reparación simple, se acoplan sutilmente y son capaces de divergir hacia la activación de la plasticidad en las células progenitoras residuales. Lo más probable es que la reparación y regeneración de tejidos no son tan diferentes y, en realidad, estos muestran muchos mecanismos en común que se diferencian muy sutilmente.

2.2.5.1 Activación de trombina

La regulación del sistema fibrinolítico es de importancia crítica durante la hemostasia, reparación de la herida, neoplasia, inflamación y una variedad de otros procesos biológicos. Una hemostasia y reparación de la herida exitosa es dependiente de la adhesión y agregación de plaquetas. El activador de Protrombina convierte plasma de protrombina en trombina, que es integrada en el proceso de coagulación de la sangre. Las plaquetas liberan fibrinógeno que una vez convertido a fibrina por la trombina se agrega al coágulo de fibrina. Adicionalmente a la activación de la fibrina, la trombina facilita la migración de células inflamatorias al sitio de la herida por incremento de permeabilidad bascular. Por este mecanismo, los factores y células necesarios para la curación de la herida fluyen del espacio intravascular y dentro del espacio extravascular.

2.2.5.2 Miembros de la familia de proteínas del complemento

El sistema complementario juega un papel importante en la reparación de la piel como una defensa del huésped contra agentes infecciosos y el proceso de inflamación. La ruta del complemento es activada durante la fase inflamatoria de la curación de la piel. C5a, C6 y C7 son agentes quimiotácticos para la migración de neutrófilos. C3a, C4a y C5a causan la degranulación de los mastocitos, conduciendo a la liberación de histamina e incrementando la permeabilidad vascular. El complejo de ataque de membrana compuesto de C5b, C6, C7, C8 y C9 es responsable de la citólisis.

Ciertos miembros de la familia de complemento también parecen tener un papel en la regeneración. C5 juega un papel importante en la regeneración de hígado de mamíferos, probablemente por mediar la liberación de IL-6 de las células de Kupffer. C3 y C5 son expresados en la blasfema de extremidad del tritón y C5 en la regeneración de lentes. La memoria posicional es un aspecto crítico para la autonomía de la regeneración del hígado, porque este especifica la población inicial de células blásticas en relación a la extensión del eje para ser regenerado. Un entendimiento de esta base molecular es importante para la apreciación de cómo las células madre son especificadas para dar lugar a diferentes estructuras, en lugar que a diferentes tipos de células.

2.2.5.3 Isoformas de la familia TGF- β

Como consecuencia de una respuesta inflamatoria alterada y morfogénesis de la piel, el perfil del factor de crecimiento de una curación de herida embrionaria es muy diferente cualitativamente, cuantitativamente y temporalmente comparada con una herida de adulto. Heridas embrionarias expresan muy altos niveles de TGF- β 3 y muy bajos niveles de TGF- β 1 y TGF- β 2. En contraste, las

heridas de adulto contienen predominantemente TGF- β 1 y TGF- β 2, que son derivados inicialmente de las plaquetas de degranulación y subsecuentemente de las células inflamatorias como los monocitos y macrófagos.

2.2.5.4 El papel de la inflamación en reparación de heridas y regeneración

La piel es la estructura principal del cuerpo con inmunidad innata, actuando como barrera para los microorganismos. La respuesta inflamatoria, iniciada en la herida de la piel, está caracterizada por una serie de eventos que envuelven a los neutrófilos, macrófagos y monocitos que son todos importantes para el correcto cierre de las heridas y los mecanismos adecuados de reparación y formación de cicatrices. Otros receptores innatos de la piel (células dendríticas) son también activados en la curación. Estos están localizados a lo largo del epitelio de la piel, donde en su forma madura son unidos por procesos citoplasmáticos largos. La principal función de las células dendríticas es capturar y presentar antígenos proteínicos a los linfocitos T vírgenes. Las células dendríticas fagocitan microorganismos y otros materiales y son degradados con sus lisosomas. Los péptidos de proteínas microbianas son después ligados a una ranura de moléculas de MHC-II producidas por macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Los epítomos de péptidos unidos a las moléculas de MHC-II entonces son colocados en la superficie de la célula dendrítica, donde estas pueden ser reconocidas de forma complementaria por receptores de células T y moléculas en linfocitos T4 sencillos.

Los mamíferos tienen una muy alta inmunidad adaptativa desarrollada y una relativamente pobre capacidad de regenerarse, mientras que los urodelos regeneran estructuras más fácilmente pero tienen un sistema inmune robusto inferior. El resultado de la reparación de una herida y la regeneración son profundamente diferentes, pero pueden ser ligados mecánicamente por diferencias sutiles en rutas de señalización.

Entendiendo estas alteraciones sutiles entre las varias moléculas y sus rutas usando sistemas modelo puede comenzar a descubrirse los mecanismos base de reparación y regeneración. Lo más probable es que el ambiente permisivo necesario para la que la regeneración ocurra es similar al proceso observado durante el desarrollo embrionario. Una mayor apreciación comprensiva de estas condiciones permisivas tiene implicaciones importantes para futuros avances en la ingeniería de tejidos.

2.3. Biomateriales para crear una matriz extracelular artificial

Las matrices usadas rutinariamente en aplicaciones terapéuticas estas hechas de polímeros que a menudo son reabsorbidos o degradados en el cuerpo. Aquí existen dos desafíos clave. Primero, la generación principal de polímeros degradables ampliamente usados en ingeniería de tejidos fue adaptada de otros usos quirúrgicos y tienen deficiencias en términos de propiedades mecánicas y degradación. Para superar esto, nuevas clases de materiales degradables han sido desarrollados. El segundo reto principal es como fabricar estos polímeros en andamios que tienen formas definidas y una compleja arquitectura interna porosa que puede dirigir el crecimiento del tejido. Nuevas tecnologías están emergiendo para la fabricación precisa, creando materiales de tamaño de poro definido usando tecnologías novedosas como impresión en tres dimensiones y electrospinning.

La mayor desventaja de materiales sintéticos es que carecen de señales de reconocimiento celular.

2.3.1. Fuentes naturales de biomateriales para la ingeniería de tejidos

La adhesión de células y su interacción con el ambiente usando integrinas, adhesión focal y su habilidad de estimular las rutas de señalización de downstream. Como las señales de mecanotransducción transmitidas a las células a través de su adhesión a la matriz también regula claramente el desarrollo de varios tejidos, y esto se está convirtiendo en un punto de enfoque en el diseño de matrices inteligentes. Hay muchos biomateriales diferentes naturalmente derivados que podrían ser considerados para su uso en el contexto de ingeniería de tejidos (Metcalf e Ferguson, 2007).

El colágeno y la elastina son dos de las proteínas clave encontradas en las matrices extracelulares de muchos tejidos. Estas proteínas son moduladores importantes de las propiedades físicas de cualquier andamio de ingeniería, afectando el adherimiento celular, crecimiento y respuestas a estímulos mecánicos (Li et al, 2005).

2.3.2. Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano, un elemento principal en la matriz extracelular (ECM), e imparte integridad estructural y Resistencia a la tensión a los tejidos. Una disrupción seguida de una herida requiere colágeno para la reparación y restauración de la estructura y función. Una deposición excesiva en el sitio de la herida resulta en una pérdida de estructura anatómica, función y fibrosis. Convencionalmente, si cantidades insuficientes de colágeno son depositados, la herida es débil y puede sufrir una ruptura.

La súper familia del colágeno incluye más de 30 productos diferentes de genes que se unen en al menos 20 tipos genéticamente diferentes de colágeno, los cuales pueden ser homotrimericos o heterotrimericos en la naturaleza. Todos los tipos de colágeno muestran la estructura molecular de triple hélice. Los colágenos mas involucrados en formar estructuras fibrilares incluyen los tipos I, II, III, V y XI, con la forma de fibrilla los colágenos tipos I,II y III son los más abundantes. Las cadenas α que forman estos polímeros están arregladas dentro de un motivo repetitivo que forma una estructura en espiral, exhibiendo un intervalo de 67nm que imparte el patrón característico de bandas de la estructura del colágeno. El colágeno tipo I consiste de dos cadenas α_1 y una cadena α_2 que forman fibrillas de 50nm de diámetro, y está presente en los huesos, piel, dentina, cornea, vasos sanguíneos, fibrocartilago y tendón. El colágeno tipo III está presente en la piel, los ligamentos vasos sanguíneos y órganos internos y está compuesto de tres cadenas $\alpha_1(\text{III})$ resultando en fibrillas con un diámetro de entre 30 a 130 nm. El colágeno tipo III también contribuye a la flexibilidad de los vasos sanguíneos y es expresado durante el periodo inicial de curación de heridas.

El colágeno ha sido usado en una variedad de aplicaciones de ingeniería de tejidos porque es predominante en la ECM, no presenta inmunogenicidad y hay varios métodos de extracción de una variedad de fuentes. Sin embargo, los métodos típicos de extracción y ser reprocesado en un material de ingeniería puede comprometer muchas de sus propiedades biológicas y estructurales.

Adicionalmente el colágeno es reabsorbible, tiene una alta afinidad al agua, baja antigenicidad, muy buena compatibilidad celular y la habilidad de promover la regeneración de tejidos. Estos factores combinados hacen al colágeno uno de los polímeros mas ideales disponibles para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

2.3.3. Elastina

In vivo, la elastina es químicamente inerte, un polímero altamente insoluble compuesto de moléculas covalentemente entrecruzadas de su precursor, la tropoelastina, una proteína soluble, no glicosilada y altamente hidrofóbica. La expresión de tropoelastina y subsecuente síntesis de la elastina ocurre típicamente en FBs, SMCs vasculares, ECs y condrocitos.

Como biomaterial, la elástina se está volviendo más y más popular para aplicaciones de ingeniería de tejidos como uno de los componentes principales de la ECM vascular. La incorporación de elastina dentro de los biomateriales ha sido usada en varias formas diferentes, incluyendo elastina insoluble ocurriendo en autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos, ECM descelurizadas y en preparaciones purificadas de elastina donde la elastina insoluble es hidrolizada a una forma soluble de elastina α , β y κ . Además la elastina insoluble en estas formas diferentes de injertos podría ser considerado un estado “más natural”, esta es una ventaja a su solubilidad, la cual hace un manejo y análisis del material más sencillo. Adicionalmente, los péptidos de elastina influyen en el señalamiento, quimiotaxis, proliferación, y liberación de la proteasa por medio del receptor de la elastina. La elastina solubilizada induce la angiogénesis, también incremento la síntesis de fibras elásticas y no mostro señales de calcificación cuando son comparadas con injertos que contienen su forma insoluble (Sell et al, 2009).

2.4. Cultivo de componentes de la piel *in vitro*

La piel de grosor completo severamente dañada es incapaz de regenerarse espontáneamente en mamíferos. Para crear un sustituto de piel totalmente funcional, la recapitulación completa de la ontogénesis debe ocurrir y esto aún no es posible *in vitro*. Sin embargo, el fenotipo expresado por las células de piel humana en cultivos se parece mucho a la fisiología de regeneración de las heridas, que incluye la citogénesis, morfogénesis e histogénesis pero no la organogénesis. El reto no es solo que las células puedan ser guiadas a seguir el proceso de curación de las heridas, pero también, más importantemente, para que ellas conduzcan el proceso de regeneración en desarrollo. Esto puede ser posible para proveer la función completa a un sustituto de piel artificial producido de esta manera.

Se sabe que los queratinocitos y fibroblastos pueden producir una amplia variedad de citocinas incluyendo varios factores de crecimiento y mediadores inflamatorios así como diferentes polímeros de matriz y enzimas catabólicas que pueden ser incorporados en andamios de ingeniería de tejidos para lograr un reemplazo de piel completamente funcional.

2.5. Incorporación de factores de crecimiento y citoquinas en la creación de un sustituto de piel inteligente

La regeneración está caracterizada por un cambio constante de ambiente en el cual las células están expuestas a un complejo patrón de indicaciones y señales, las cuales imparten información posicional necesaria para el correcto desarrollo. Estas señales celulares desencadenan una serie de eventos que en combinación controlan la proliferación celular, diferenciación y muerte celular, de tal manera que un tejido específico puede ser delineado y sus bordes específicamente definidos. Ya que estas moléculas son a menudo los componentes principales de las primeras rutas de desarrollo para la especificación celular, incorporando estas dentro de un producto de ingeniería a de tejidos podría producir avances importantes en la regeneración de estructuras adultas como la piel. El número de morfógenos que existen y son usados en los procesos de desarrollo y regeneración son obviamente demasiado numerosos para ser completamente catalogados.

Unos pocos factores de crecimiento y moléculas de señalización celular claves están siendo considerados para su integración dentro de un material de bioingeniería que podrían ser críticos para crear un reemplazo completamente funcional de la piel.

2.5.1. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

Es un potente activador para células de origen mesenquimal, y una estimulador de quimiotaxis, proliferación y la expresión de nuevos genes en monocitos, macrófagos y fibroblastos, acelerando la deposición de la ECM. También se ha sugerido que a niveles reducidos de PDGF puede tener un papel importante en el mecanismo de reparación cutánea sin cicatrices. Esta familia de factores de crecimiento existe en formas homo- y heterodiméricas.

2.5.2. Citoquinas de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

Son reguladores multifuncionales de crecimiento celular, diferenciación y formación de ECM. En los mamíferos, hay tres isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, y aunque estas tienen más del 85% de homología en la secuencia de aminoácidos, hay diferencias conocidas en sus potencias y actividades biológicas in vivo. TGF- β es conocido por ser el factor de crecimiento más potente involucrado en la reparación de heridas en todo el cuerpo. En particular en relación con la curación de heridas de la piel, TGF- β 1 y TGF- β 2 están implicados en la cicatrización cutánea, mientras que TGF- β 3 es conocido por tener un efecto anti-cicatrices.

2.5.3. Proteínas morfogénicas de hueso (BMPs)

Son miembros de la súper familia de los TGF- β . Hay 15 miembros y aunque estos son conocidos por su papel en la formación de hueso y cartílago, estos tienen diversos papeles en muchos otros procesos de desarrollo como los son la especificación neuronal y dorsal/ventral.

2.5.4. Factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)

Son una familia de 21 isoformas con un amplio espectro de actividades, incluyendo la regulación de proliferación celular, diferenciación y migración. FGFs 1, 2, 5, 7 y 10 son regulados positivamente durante la curación de una herida cutánea de adulto. Diferentes FGFs son expresados a lo largo de la embriogénesis donde estos actúan como morfógenos. Los FGFs también son necesarios para un correcto desarrollo de miembros. La inactivación de FGF-4 y FGF-8 en la cresta epidérmica apical (AER) produce severas deformaciones en los fenotipos de las extremidades. FGF-2 también está implicada en la curación libre de cicatrices. FGF-7 y FGF-10 son secretados por fibroblastos pero actúan en queratinocitos para estimular la migración y proliferación. Sin embargo, la expresión de FGFs durante el desarrollo fetal y la curación de heridas sin cicatrices no han sido caracterizadas propiamente. Por lo tanto en un sustituto de ingeniería, es necesario balancear los niveles de FGFs para asegurar que no haya cicatrices pero si suficiente angiogénesis.

2.5.5. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El VEGF es inducido durante la fase inicial del injerto de piel, donde se sabe que los coágulos de fibrina endógenos forman una matriz provisional y promueven la angiogénesis. Los factores de crecimiento como los VEGF se incrementan en tales heridas para estimular la angiogénesis.

La hipoxia es un potente estimulador de la síntesis de VEGF. Posterior a la angiogénesis conduce a la migración de nuevos capilares dentro de la matriz provisional entre los bordes de la herida, inicialmente un coagulo de fibrina que es reemplazado por tejido conectivo recién sintetizado. Angiopoyetina-1 (Ang-1), otro factor de crecimiento endotelial específico, se une y activa el receptor de Tie-2, promoviendo la supervivencia de células endoteliales y regula la capacidad de respuesta del endotelio de otras citocinas. La angiogénesis terapéutica requiere un entendimiento de cómo VEGF y Ang-1 interactúan para iniciar la neovascularización. Así, la adición de la combinación de estos factores para un reemplazo de bioingeniería de piel podría tener efectos profundos en la neovascularización exitosa y en la toma del injerto.

2.5.6. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

Está implicado en la curación de heridas y la homeostasis en una variedad de tejidos incluyendo colon, piel, glándulas mamarias e hígado. También se sabe que está presente en altos niveles en la saliva y puede acelerar la curación de lesiones en la piel de animales cuando estos lamen sus heridas. La aplicación tópica de EGF a sitios donantes humanos también parece acelerar la curación de las heridas y también se cree que estimulan a los queratinocitos a producir ácido hialurónico.

2.5.7. Factor de crecimiento/ Factor de dispersión de hepatocitos (HGF/SF)

Son factores de crecimiento pleiotrópico producidos principalmente por células de origen mesenquimal. HGF/SF son mitógenos, morfógenos y motógenos conocidos por tener un papel importante en la tumorigénesis y desarrollo fetal a través del receptor c-Met tirosina quinasa. La asociación entre HGF y el receptor c-Met es conocido por estar involucrado en la morfogénesis y

organización del tejido durante el desarrollo embrionario y la regeneración después de una herida en el tejido.

2.5.8. El ácido retinoico (RA)

Induce la “súper regeneración” de órganos que ya pueden ser regenerados, como las extremidades de los anfibios urodelos, logrado por la información posicional reespecifica en la extremidad. En los órganos que no pueden regenerarse normalmente como el pulmón mamífero adulto, el RA induce la completa regeneración de alvéolos que han sido destruidos por varios tratamientos nocivos. Otro tejido que falla al regenerarse es el sistema nervioso central mamífero (CNS). RA no induce el crecimiento de neuritas como se hace en el CNS embrionario, ya que uno de los receptores del ácido retinoico no esta sobrerregulado. Por lo tanto el RA puede ser un candidato molecular para su incorporación en un sustituto moderno de piel de ingeniería de tejidos donde la especificación posicional de las células en adición a la regeneración es necesaria.

2.5.9. Los genes Homeobox (Hox)

Aunque no son estrictamente morfógenos, son una familia conservada evolutivamente de factores de transcripción y son candidatos atractivos para la inclusión a un producto de bioingeniería. La actividad de la proteína Hox es esencial durante la embriogénesis para la diferenciación y especificación del destino celular a lo largo del eje del cuerpo y la familia de genes Hox también han estado implicadas como factores importantes en la regeneración de miembros. Una gran cantidad de genes Hox son expresados en piel de raton y humano fetal y adulto así como en uñas y folículos capilares. Ha llamado la atención particularmente Hoxb13, conocido por estar regulado negativamente durante la curación de heridas sin cicatrices fetal.

La lista de factores de crecimiento, citocinas y factores de transcripción que podrían ser incorporados dentro de un sustituto de piel como parte de un diseño inteligente para facilitar la regeneración de la piel es larga; lo anterior es solo algunos ejemplos. Sin embargo, estos representan un grupo atractivo de factores, que si una matriz adecuada pudiera ser encontrada para definir la liberación en las dimensiones de espacio y tiempo podría facilitar la regeneración e integración de la piel.

Alternativamente un enfoque minimalista de ingeniería podría ser adoptado para simular el desarrollo embrionario. Aquí, interacciones normales célula - célula, por ejemplo interacciones epiteliales-mesenquimales, ocurren con cascadas de señalización resultando en la diferenciación de la piel. Si los tipos celulares apropiados pudieran ser identificados y permitir su interacción, entonces la diferenciación podría resultar. Para este fin, recientemente mucho interés se ha enfocado en células madre.

2.6. Células madre y su aplicación a una construcción de ingeniería de tejidos de la piel

Se creía que las células madre mesenquimales adultas (MSC) estaban restringidas en su habilidad de producir un amplio rango de células de reemplazo, pero sin embargo funcionan como una fuente de células para la reparación del tejido y homeostasis. Las células madre embrionarias, por otro lado, son totipotentes y son capaces de diferenciarse en muchos tipos diferentes de células. Las células madre embrionarias representan una propuesta atractiva y viable para la terapia de reemplazo celular. Las células ES se derivan de la masa celular interna de los blastocitos embrionarios. Estas células pueden ser mantenidas indefinidamente *in vitro* sin perder su potencial de diferenciación. Hasta ahora, muchos de los estudios en células ES han estado limitadas a modelos de ratón, ya que las líneas celulares humanas recientemente se han vuelto disponibles. Sin embargo, hay muchos problemas controversiales y éticos que necesitan ser superados antes de que pueda descubrirse el completo potencial de este tipo de células.

La piel representa un sistema modelo ideal en el cual se puede investigar el uso de células madre como una fuente de terapia de reemplazamiento celular, ya que este contiene uno de los pocos tipos de células madre adultas bien caracterizadas, los queratinocitos.

Las células madre somáticas adultas podrían resolver los problemas que las células ES tendrían potencialmente, si las células madre adultas son trasplantadas de regreso al mismo individuo, entonces no debería haber ningún problema inherente con el rechazo. Tratando pacientes con sus propias células también evitaría las objeciones éticas y morales. A menos que estas respondan a un trauma, las células madres adultas típicamente se dividen con poca frecuencia para mantener la homeostasis dentro de sus tejidos residentes. Ya que estas son responsables de todo el reemplazamiento celular dentro de un tejido, estas son esenciales para la reparación del tejido, curación de heridas y regeneración. Las células madre adultas residen en nichos específicos y el nicho expone a las células madre a señales diferentes de diferenciación –importante en el mantenimiento del estado de las células madre. Cada división de las células madre produce un reemplazo de célula madre y una célula hija. Esta última destinada para la diferenciación y regeneración del tejido.

Una de las características atractivas de la piel desde un punto de vista de bioingeniería es que los queratinocitos de la piel pueden ser mantenidos y propagados en el laboratorio. Las células que están contenidas en estos cultivos primarios tienen una habilidad remarcable de proliferación, porque estas son capaces de pasar por muchos cientos de generaciones sin sufrir senescencia. Del trabajo de Morris & Potten (1994) se conoce que el ciclo celular lento *in vivo* es más clonogénico que la división celular activa cuando son colocadas en un cultivo, sugiriendo que las células menos proliferarías pueden ser células madre. La habilidad de mantener y hacer crecer estas células ha conducido a importantes avances en las tecnologías de injertos de piel. Desafortunadamente, en el presente, los sustitutos de piel que son usados no son completamente funcionales ya que carecen de folículos capilares, glándulas sebáceas y sudoríparas así como nervios y suministros de sangre. El problema para la ingeniería de tejidos es que aunque la existencia de las células madre de la piel es altamente probable dentro de estos cultivos de células primario, su aislamiento y caracterización están demostrando ser un reto.

Otra fuente de células madre multipotentes de la piel reside en la protuberancia del folículo capilar. Este lugar reside en la base de la porción permanente epitelial del folículo capilar que es el lugar más profundo y protegido dentro del compartimiento contiguo epitelial.

Cuando la piel sufre un trauma como una quemadura o herida, se piensa que las células pretuberantes migran a la superficie para ayudar a la reepitelialización. Así, el papel regenerativo de las células pretuberantes (o células disociadas) de la piel es múltiple; no solo se piensa que contribuye a la producción de glándulas sebáceas y epidermis, sino también son clave en la formación de folículos capilares.

Al definir células para una piel de bioingeniería, aparte de los queratinocitos y las células foliculares de brote de cabello, la medula ósea es otro candidato para obtener células y ser sembradas en un sustituto de piel. La medula ósea es conocida por contener células inflamatorias progenitoras y células madre multipotentes. La plasticidad de células madre derivadas de medula ósea significa que estas podrían tener la capacidad inherente de producir nuevas células de piel si las condiciones de crecimiento fueran las correctas. Ya que la medula ósea es una clave en el proceso de hematopoyesis, también es probable que contenga hormonas como el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos que se piensa aceleran la reparación de heridas.

Otra fuente potencial importante de MSCa, conocidas por ser derivadas de la medula ósea, es encontrada en la sangre periférica circulante.

La consideración final con respecto al reabastecimiento de células es si las células son autologas o heterologas. Un producto listo para usarse de ingeniería de tejidos favorece los tipos celulares heterologos y hasta la fecha uno de los productos de bioingeniería más exitosos ha sido Dermagraft. Este ha sido un clásico ejemplo de un producto de bioingeniería que ha sido exitoso y, al mismo tiempo, distribuido por tres compañías por separado, Advanced Tissue Sciences, Smith and Nephew y Advanced Biohealing, Inc. Diferente a muchos de los otros sustitutos de piel, Dermagraft tiene una vida útil razonable; las células criopreservadas dentro de la construcción sobrevive por seis meses. Esta persistencia celular relativamente larga, combinada con un mejor entendimiento de técnicas de criopreservación, es un buen augurio para la persistencia de células madre en un producto de ingeniería "listo para usarse". La meta definitiva de la ingeniería de tejidos podría ser el combinar los diferentes tipos de células, discutidos anteriormente, con o sin una matriz natural o sintética en presencia de factores de crecimiento y citocinas conocidas para mejorar la regeneración (Metcalf y Ferguson, 2007).

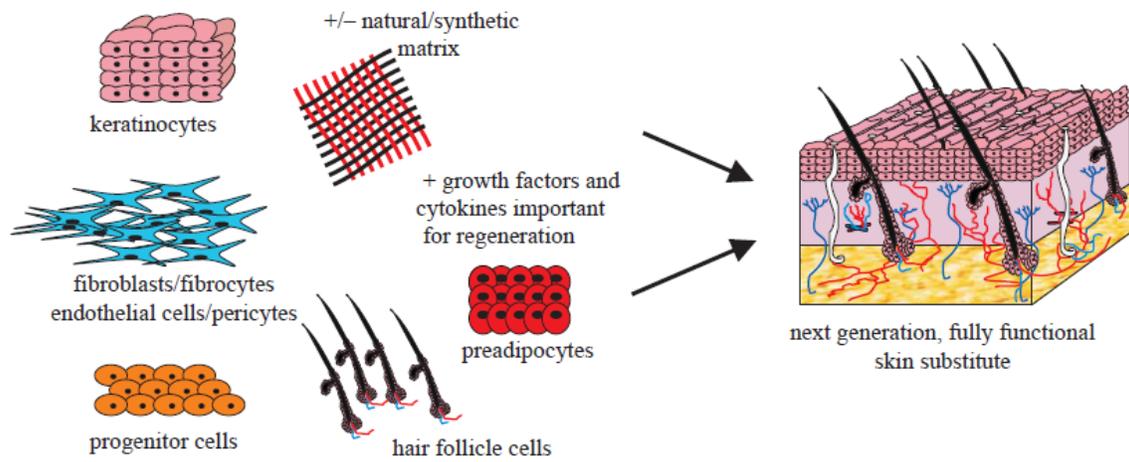


Figura 5. Un esquema de los requerimientos para crear un sustituto de piel completamente funcional.

2.7. Eventos clave en el desarrollo de sustitutos de piel

El primero hito en la investigación de la piel y la ingeniería de tejidos de la piel fue una separación enzimática de la dermis y la epidermis y el cultivo *in vitro* de los queratinocitos.

Un avance mayor fue hecho en 1975, donde Rheinwald y Green lograron hacer crecer células epidérmicas primarias humanas en un cultivo en serie en una capa de fibroblastos murinos 3T3 letalmente irradiados. Estas investigaciones mostraron que las limitaciones observadas previamente en el cultivo de células epidérmicas en cultivos de superficie no fueran intrínsecos, pero debida a la compleja relación entre los queratinocitos y los fibroblastos. Tomando el avance de la técnica de sembrar capas de células de 3T3, un injerto epidérmico podría ser expandido a más de 500 veces su tamaño en 3 o 4 semanas. Después de la primera aplicación clínica, cultivos de autoinjertos epidérmicos (CEAs) fueron probados en casi todos los principales centros de quemaduras en todo el mundo. Sin embargo, presentaban desventajas que incluían un CEA ampliamente variable de tomar, dependiendo del sitio y el estado de la herida, la edad del paciente y el conocimiento y experiencia del operador.

Bell et al. (1981) generó un sustituto dermo-epidérmico que fue probado en un modelo animal. Posteriormente esta técnica fue transformada en el producto Apligraf[®], la cual es preparada usando fibroblastos alogénicos humanos y queratinocitos (Tabla 1). A base de este desarrollo también sustitutos de piel dermo-epidérmico consistentes de queratinocitos autólogos humanos y fibroblastos en colágeno bovino fueron aplicados a pacientes severamente quemados.

Interesantemente, debido al esfuerzo de crear injertos de piel dermo-epidermal, los investigadores revelaron la importancia de las interacciones mesenquimal-epitelial. Ellos observaron que la diafonía entre los fibroblastos y los queratinocitos era esencial para el establecimiento de una membrana basal funcional.

Otro progreso importante fue el desarrollo de una “piel artificial” bicapa. Este sustituto de piel acelular basado en colágeno y glicosaminoglicano está comercialmente disponible hoy como Integra Artificial Skin[®] (comúnmente referido como Integra). Integra[®] Fue desarrollado en la década de 1980 y lanzado comercialmente en los Estados Unidos en 1996. La atractiva idea de combinar cultivos de queratinocitos con Integra[®] ha generado un nuevo y fascinante campo de investigación y mucho optimismo para finalmente proveer a los pacientes con una dermis de estantería y una epidermis crecida en un laboratorio, así eliminando la necesidad de sitios donadores. Sin embargo la realidad ha mostrado que un simple autoinjerto de cultivo epidérmico no trabaja bien en la neodermis producida por Integra[®].

La intervención de Integra Artificial Skin fue indudablemente el principal paso en la ingeniería de tejidos de la piel. Sin embargo, el tiempo ha llegado a explorar nuevas avenidas para el desarrollo de una aplicación clínica para un sustituto de piel dermo-epidermal novedoso. Esto no solo por el incremento de los costos de hospitalización (incremento de los costos de seguro de salud y el aumento de las restricciones presupuestarias) sino también, y predominantemente, para optimizar la sustitución clínica de la piel con resultados cosméticos y funcionales superiores.

2.8. Sustitutos de ingeniería de piel mejorados para aplicaciones clínicas

Hay dos principales grupos de pacientes que podrían beneficiarse de un sustituto de ingeniería de tejidos de piel. El primer grupo incluye pacientes quemados, que sufren de una situación que amenaza su vida (Figura 6a). Heridas de quemaduras grandes y profundas dejan pequeñas cantidades de piel saludable para ser usada como injerto de grosor parcial. El reto en esta situación es producir rápidamente grandes cantidades de sustitutos dermo-epidérmicos autólogos. El segundo grupo denota la situación electiva o la crónica. Inhabilitación de cicatrices, nevus gigante o úlceras crónicas (Figura 6b) son idealmente sustituidas por injertos de piel de tamaño, textura y color correspondientes.

Los injertos de piel de grosor parcial y completo pueden no siempre estar disponibles en suficiente cantidad. El reto en lo que esto respecta es la ingeniería de un sustituto de piel ajustado cosmética y funcionalmente, listo para ser trasplantado en una cita previamente programada.

Existen varios tratamientos “comerciales” que se aproximan a un injerto de piel. Estos pueden o no ayudar a mejorar la estructura y función del injerto de piel, como algunos sustitutos dermales o sprays de queratinocitos. En cualquier caso, varios problemas básicos siguen existiendo.

Para un sustituto de piel que se pretenda fijar rápidamente después del trasplante, se requiere un lecho de la herida bien preparado y vascularizado. Esto no es fácil de obtener en heridas de quemaduras profundas. Si un sustituto dermal alcanza un umbral de espesor, la vascularización es demasiado lenta para asegurar la nutrición de la epidermis subyacente y esto resulta en la necrosis epidérmica o la pérdida del injerto. Por lo tanto, la mayoría de los sustitutos dermales más gruesos a 1mm (Integra, Matriderm) son aplicados usando un planteamiento de dos pasos. Esto evita la necrosis epidérmica, ya que el sustituto dermal proporciona suficiente tiempo para la vascularización. Sin embargo, una operación adicional es necesaria para el trasplante de un componente epidérmico. Este procedimiento es largo, no da garantía de éxito y es un factor de estrés adicional para el paciente. Los componentes epidérmicos trasplantados producen piel de calidad variada y exhibe propiedades que son diferentes del original. Las características presentadas por los trasplantes pueden ser la pérdida de elasticidad, contracción del injerto, carencia de pigmentación y de este modo carecer de protección contra la radiación UV. Todos estos factores nos permiten concluir que aún existe un gran potencial para el desarrollo de un significativamente mejorados y novedosos sustitutos de piel (Böttcher-Haberzeth et al, 2010).

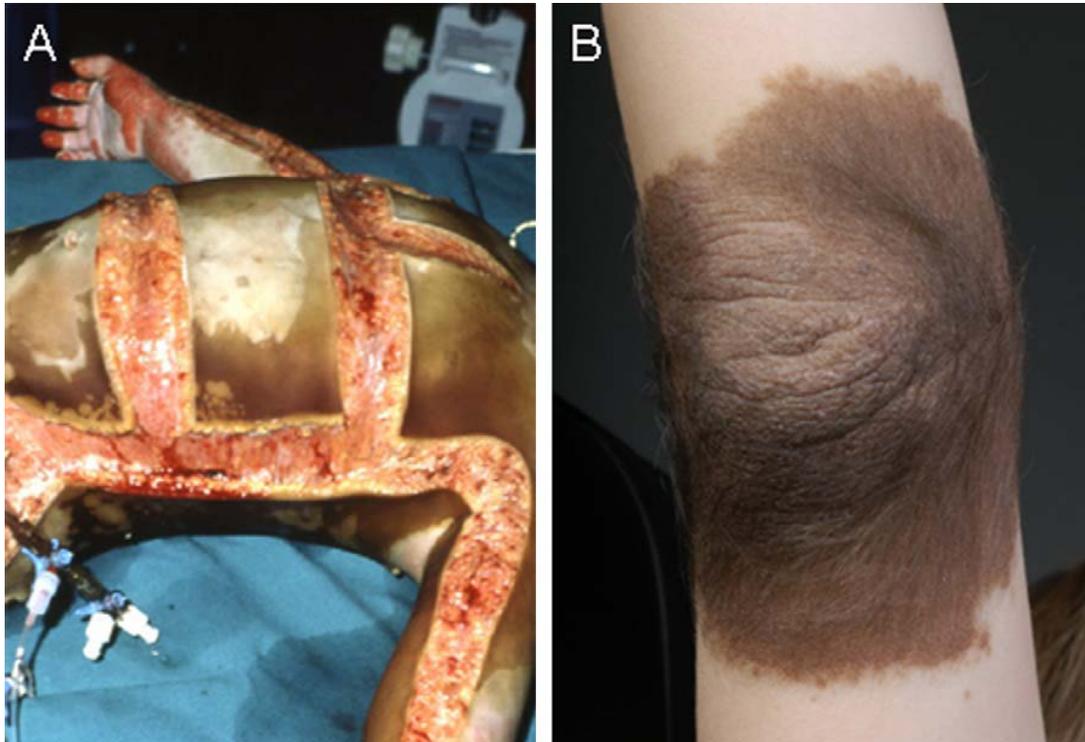


Figura 6. La necesidad de una piel de ingeniería de tejidos. A) La situación grave. Paciente que sufre de una herida grande y profunda de quemadura después de escarotomía necesitando necroctomía y cobertura de piel. B) La situación electiva. Paciente con nervus gigante, expandido sobre el codo.

2.9. Aplicaciones de los materiales de ingeniería de tejidos

En quemaduras de grosor parcial, en donde la capa superior epidermal es completamente pérdida pero se conserva parte de la dermis, los queratinocitos epidérmicos que forran las inclusiones dérmicas (las glándulas sudoríparas y folículos capilares) migraran rápidamente fuera de la dermis y formaran un nuevo epitelio. Sin embargo, si la epidermis y toda la dermis se pierden, entonces esto representara un mayor problema. Cualquier pérdida de piel de un espesor total de más de 4cm de diámetro no se curara bien sin una intervención quirúrgica. Cuando este es el caso, A menudo es necesario reconstruir la piel en dos etapas teniendo dos operaciones separadas (figura 7).

Idealmente si una herida de quemadura no es demasiado excesiva, entonces los cirujanos tomaran un injerto de piel de grosor medio (todos de la capa epidérmica superior de la piel y algunos de la capa dérmica subyacente) desde otra parte del cuerpo y lo usaran como injerto en el área dañada (figura 7a y 7b). El sitio de donde el injerto de piel ha sido removido sanara por los queratinocitos dentro de la dermis que migraran a la parte superior y proliferaran.

Sin embargo, si la extensión de la lesión por quemadura es extensa, entonces a menudo es necesario reconstruir la piel en dos etapas. Un material es usado para proveer un equivalente dérmico que debe convertirse en vascularizado antes de un material epidérmico (muy a menudo un injerto de espesor parcial muy delgado, pero ocasionalmente células cultivadas o piel de ingeniería de tejidos) puede ser colocada en la parte superior (figura 7c y 7d).

En adición a las heridas de quemaduras, los materiales de ingeniería de tejidos pueden beneficiar a pacientes con úlceras crónicas y los que requieren cirugía reconstructiva (MacNeil, 2008).

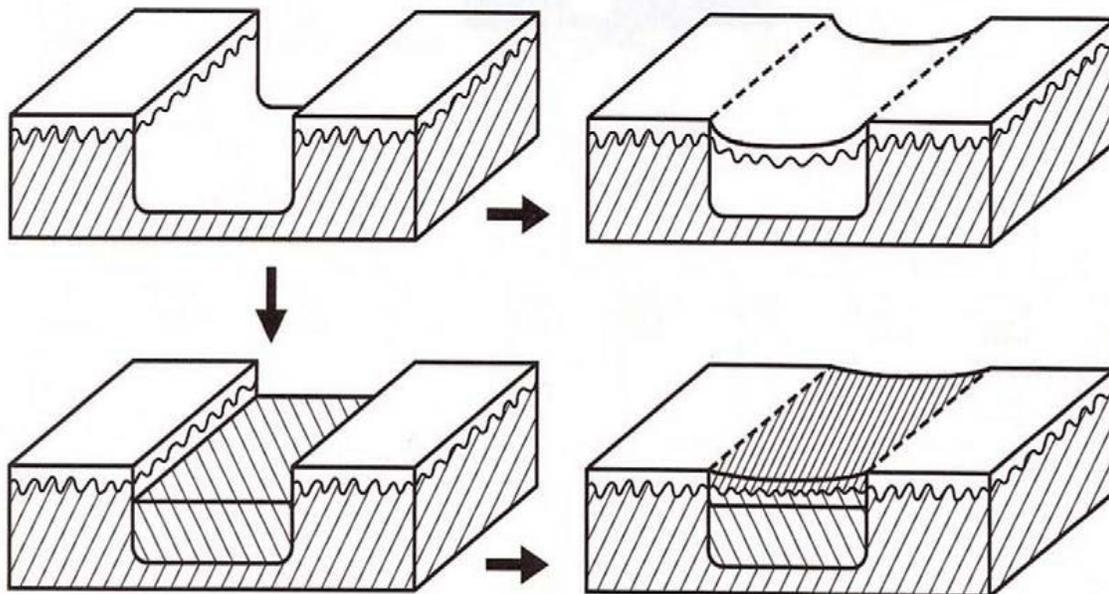


Figura 7. Reconstrucción de una herida de quemadura de grosor completo. En la mayoría de los casos, a) un defecto de piel de grosor completo es tratado con b) un injerto de piel de grosor parcial tomado de cualquier parte del cuerpo. Cuando los injertos de piel no son suficientes, entonces los defectos de piel de grosor completo son tratados en dos etapas usando c) un sustituto dérmico, el cual es entonces cubierto por d) un material epidérmico, usualmente un injerto de piel muy delgado.

2.10. Sustitutos de piel disponibles

Varios productos comerciales se han desarrollado durante los últimos 30 años. Muchos de estos fueron diseñados para su uso permanente, algunos de estos como sustitutos temporales. Estos contienen células de diferentes orígenes (autólogo, alogénico o xenogénico) y materiales biodegradables (de origen natural o polímeros sintéticos) como andamios para fijar células y fácil manipulación. Para dar un panorama general, se han clasificado estos en sustitutos epidérmicos, dermales y dermo-epidérmicos (tabla 1).

Los sustitutos epidérmicos contienen queratinocitos autólogos, a menudo crecidos en presencia de fibroblastos murinos. La mayoría de los productos pertenecen a la categoría de “autoinjertos epidérmicos cultivados” también llamados CEAs (Epicel[®], Epidex[™], Myskin[™]), para los cuales se

cultivan queratinocitos en láminas de células estratificadas. Partiendo de una biopsia de piel, la producción del sustituto final tarda alrededor de 3 semanas. Esto es porque el lecho de la herida inicialmente necesita ser tratado con vendajes para la herida. Una vez aplicado al lecho de la herida, los CEAs pueden ser aplicados directamente o en combinación con otros métodos. Muchos estudios y ensayos multicéntricos en los últimos años mostraron un amplio rango de tasas tomadas con un rango promedio de 50% o menos y declaraciones sobre los resultados cualitativos no son concluyentes por la diversidad de métodos aplicados. Las desventajas son principalmente su tiempo lento de preparación, tasas variables de injertos, difícil manipulación debido a la delgadez, capas celulares frágiles y sus altos costos de producción.

Otro enfoque para reemplazos celulares epidérmicos es el uso de queratinocitos autólogos cultivados en suspensión (ReCell[®]). Con este método los queratinocitos pueden ser rociados dentro del lecho de la herida directamente después de haber sido preparado a partir de una biopsia en una sala de operación. Aunque este método ha mostrado una epitelialización y maduración epidérmica más rápida en modelos de heridas, este método no es adecuado para tratar heridas de quemaduras de tercer grado. La calidad y el beneficio del paciente de este método en práctica clínica aún son debatidos.

Como con estos métodos hay pérdida de un componente dermal, el grado de unión epidérmica y cicatrización es altamente dependiente de la calidad y condición del lecho dermal subyacente de la herida. Los resultados insatisfactorios adicionales con respecto a la estabilidad mecánica y cicatrización conducen a otro enfoque en el desarrollo de sustitutos de piel.

La ingeniería de sustitutos dermales restauran el tejido dermal promoviendo el crecimiento de nuevo tejido y optimizando las condiciones de curación. Estos necesitan ser cubiertos por una superficie o sustituto epidérmico permanente. Algunos de estos consisten en matrices acelulares y son incorporados permanentemente dentro del lecho de la herida del paciente (AlloDerm[®], Integra[®], Matriderm[®]). Después de la aplicación a la dermis preparada, estos sustitutos son colonizados y vascularizados por células subyacentes. Finalmente una neodermis autóloga es formada. Tan pronto la vascularización a avanzado lo suficiente (usualmente 3-4 semanas después de la aplicación), un injerto de piel de grosor parcial puede ser colocado en la neodermis. Otros incluyen células alogénicas humanas y son aplicados como vendajes transitorios para las heridas que estimulan la curación de las heridas (Dermagraft[®]). Dermagraft[®] consiste de fibroblastos alogénicos sembrados en una malla polimérica. Estos secretan factores de crecimiento y depositan proteínas dermales de la matriz y se piensa que facilitan el proceso de curación. Una evaluación histológica de biopsias no mostro alguna evidencia de respuesta inmunológica, sin embargo, el producto es mayormente usado para úlceras crónicas de pie diabéticas o venosas.

La aplicación de sustitutos dermales usando el procedimiento quirúrgico de dos etapas ha mostrado mejorar la cicatrización, pero recientes enfoques están utilizando capas dermales más delgadas, con el objetivo de trasplantar el sustituto dermal junto con el injerto epidérmico en un solo paso. Estudios clínicos han mostrado resultados prometedores con una matriz dermal delgada (1mm) (Matriderm[®]) limitada a la región de la mano y muñeca. Futuras aplicaciones clínicas y estudios mostraran si este método puede ser aplicado más ampliamente.

Pocos sustitutos dermo-epidérmicos “off-the-shelf” han sido producidos. Queratinocitos y fibroblastos neonatales alogénicos humanos combinados con un andamio para formar una cubierta temporal (Apligraf[®], Orcel[®]) y se utilizan sobre todo para heridas crónicas. Estudios han

reportado principalmente sobre su uso en heridas y úlceras crónicas y han mostrado una mayor incidencia de cierre de la herida. Un estudio reportó un mejor resultado clínico para pacientes quemados. Para sustitutos cultivados dermo-epidermales autólogos, los queratinocitos y fibroblastos son colectados de una biopsia de un paciente quemado y se añaden a un sustrato de colágeno-glicosaminoglicano. El tiempo de cultivación después de la biopsia necesita alrededor de 4 semanas antes de que el sustituto pueda ser trasplantado. Hasta el momento se han realizado pocos ensayos clínicos. En términos de la toma del injerto y la apariencia de la cicatriz, los resultados parecen superiores a las técnicas convencionales, pero futuros estudios clínicos necesitan confirmar estos resultados (Böttcher-Haberzeth, 2010).

Tabla 1. Ejemplos de sustitutos de piel comercialmente disponibles.

	Producto comercial	Compañía	Capas
Remplazos epidérmicos celulares	Epicel ^R	Genzyme Corp.	Autoinjerto epidérmico cultivado (queratinocitos autologos cultivados en presencia de fibroblastos murinos)
	Epidex TM	Euroderm GmbH	Autoinjerto epidermal cultivado (Laminas externas fundamentales de Células de folículos capilares autologas)
	Myskin TM	Celltran Ltd.	Auto injertos epidérmicos cultivados (Queratinocitos autologos cultivados en presencia de fibroblastos murinos irradiados)
	ReCell ^R	Clinical Cell Culture (C3), Ltd.	Suspension de células epidérmicas autologas
Sustitutos dermales de ingeniería	AlloDerm ^R	LifeCell Corp.	Aloinjerto donado acelular de dermis humana
	Dermagraft ^R	Advanced BioHealing Inc.	Andamio de malla Bioabsorbable de poliglactina sembrado con fibroblastos neonatales alogenicos humanos
	Integra ^R	Integra LifeSciences Corp.	Delgada capa de polisiloxano (silicon); Tendon bovino

			entrelazado colágeno tipo I y glicosaminoglicano de tiburón (condroitina-6-sulfato)
	Matriderm ^R	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG	Colageno dermal bovino tipo I, III, IV y elastina.
Sustitutos dermo-epidermales de ingeniería	Apligraf ^R	Organogenesis Inc.	Queratinocitos neonatales alogenicos humanos; Colageno bovino tipo I conteniendo fibroblastos neonatales alogenicos humanos
	Orcel ^R	Forticell Bioscience, Inc.	Queratinocitos neonatales alogenicos humanos en un lado de esponja recubierto de gel no poroso; Esponja de colágeno bovino conteniendo fibroblastos neonatales alogenicos

2.10.1. Cobertura epidérmica

En la década de 1970, se realizó un cultivo de células de piel adulta humana, a partir de una pequeña biopsia de la piel de los pacientes, mediante la expansión de queratinocitos en fibroblastos de ratón irradiados letalmente en presencia de mitógenos (péquelas proteínas que estimulan la división celular) y suero de ternera fetal bovino. Esto funciona bien y da una expansión fiable de los queratinocitos incluso para los ancianos. A principios de 1980, pequeñas hojas de queratinocitos (denominados como autoinjertos de cultivos epiteliales, CEAs) eran usados para tratar a pacientes con heridas de quemaduras extensivas. Estas células eran crecidas en una capa alimentada de fibroblastos de ratón irradiados letalmente (usados para proveer una buena superficie para la fijación de las células, y también proveen factores de crecimiento para estimular la proliferación de los queratinocitos) hasta que había 2 o 3 capas de células de grosor y las células se habían unido una con otra en una lámina delgada. Para separar las células, era necesario adicionar una enzima para que se perdiera la fijación de las células a la base del plástico del cultivo del tejido y luego raspar suavemente la hoja de plástico usando fuerza mecánica. Las hojas de células eran envueltas alrededor de un soporte inerte de vendaje para entregarse al paciente.

Hay problemas prácticos en entregar queratinocitos en pequeñas hojas. Las hojas con queratinocitos son frágiles y muchos ya están diferenciados más allá del punto en el cual ellos pueden tomar una parte activa en proveer un nuevo epitelio. No obstante, esta fue una metodología innovadora y está disponible comercialmente como Epicel[®]. Las células son colocadas con la superficie celular hacia abajo sobre el lecho de la herida, y los queratinocitos que aún son capaces de dejar esta hoja integrada de células entran al lecho de la herida y forman un nuevo epitelio. Los vendajes de recubrimiento con cualquier residuo de células diferenciadas son removidos de 7 a 10 días después.

La manipulación de células en esta forma es bastante difícil, enfoques alternativos para el desprendimiento y la entrega de células han sido desarrollados. Para el desprendimiento celular, se recomienda crecer las células en un poli N-isopropilacrilamida (PNIPAM) sensible a la temperatura. Las células crecen en láminas sobre placas de cultivo de tejido recubiertas con PNIPAM, entonces la temperatura es disminuida para colapsar las cadenas poliméricas y liberar la lámina de células. Los queratinocitos también pueden ser expandidos en cultivos, hechos en suspensiones, y rociados dentro del lecho de la herida o con fibrina. Alternativamente, los queratinocitos son expandidos y luego sembrados en varios soportes portadores y de transferencia, que van desde membranas recubiertas de colágeno bovino a un soporte de polímero químicamente definido (Myskin[®], Figura 8).



Figura 8. La polimerización por plasma puede ser usada para producir superficies que sean adherentes o no adherentes para los queratinocitos. a) El cuarto bajo condiciones estériles en el cual las células de piel de los pacientes son expandidas de una pequeña biopsia de piel. b) Un plasma de ácido acrílico polimerizado con un acarreador de silicona (Myskin[™]). Las células de los pacientes son colocadas en la superficie recubierta con ácido acrílico y se mantiene en medio para ser transportada al paciente. La enfermera toma el Myskin y lo coloca con las células bocabajo dentro del lecho de la herida.

Myskin[™] es un polímero sintético de ácido acrílico recubierto de un silicón, de grado médico, por polimerización por plasma. Este evita el uso de colágeno bovino. Las células se adhieren fácilmente a esta superficie (después de una expansión convencional en el laboratorio), pero para que las células en el soporte de transferencia sean colocados en el lecho de la herida, la superficie ha sido diseñada para que las células puedan liberarse sin la necesidad del tratamiento con

tripsina (usando una enzima para separar las células del sustrato), cambio de temperatura o cualquier intervención externa. La figura 9 muestra un ejemplo de una ulcera diabética que se resistió a sanar por tres años pero sano después de ocho aplicaciones de las propias células del paciente liberadas en un acarreador de Myskin[®] en consultas externas.



Figura 9. a) Una ulcera neuropática que no ha podido sanar en 3 años, y b) después de ocho aplicaciones de las propias células del paciente liberadas en un acarreador Myskin.

Así los biomateriales pueden asistir el transporte y la liberación de queratinocitos al lecho de una herida. Dependiendo del diseño del material, las células pueden dejar el soporte acarreador de una forma pasiva o activa. Sin embargo, un problema mayor que ninguno de estos materiales directamente colocados puede resolver es como mejorar la unión de queratinocitos a la base del lecho de la herida, dado que los lechos de heridas que requieren el uso de células cultivadas son a menudo menos ideales.

2.10.2. Reemplazamiento Dermal

Actualmente, hay tres tipos de biomateriales que son usados para reemplazamiento dermal: Colágeno dermal natural obtenido de la alodermis humana (dermis provenientes de pieles donadas a bancos de piel) o dermis porcina (Permacol), extracto de colágeno bovino, y andamios de ácido poligaláctico no tejido (Dermagraft[®] y Transcyte[®]).

La piel donada obtenida de bancos de piel acreditados puede ser usada como un vendaje temporal para las heridas o proveer una alodermis permanente. Permacol es colágeno porcino entrelazado que algunas veces es usado como un vendaje temporal de la piel.

Integra[®] fue desarrollado para el tratamiento de heridas de quemadura de espesor total. Este consiste de un material de sustitución dérmica, compuesto de colágeno bovino de tendón con un glicosaminoglicano (condroitina-6-sulfato) adherido a este, en donde una membrana de silicona es sellada en la superficie superior para actuar como un sustituto temporal de la capa epidérmica.

Esta membrana artificial está diseñada únicamente para un uso temporal (en ausencia de células vivas, es muy difícil ver como una podría crear una barrera dermal artificial permanente). Este controla la pérdida de humedad de la herida y la entrada de bacterias a la herida. La función más importante de Integra^R es que sirve como una plantilla para generar una neodermis. Siguiendo la vascularización del material del lecho de la herida del paciente, el cual normalmente toma 3 semanas, la capa de silicona es retirada y se provee una capa epidérmica, usualmente usando un injerto de piel muy delgado.

La neodermis que se forma debajo de cualquier Integra^R o piel donada proporciona un mejor lecho de la herida para llevar futuros injertos de piel que si a la herida se le permitiera sanar a través de la formación de tejido de granulación desordenada. Integra^R ha sido evaluado en un estudio económico para su uso en heridas crónicas comparado con el uso de piel de espesor parcial. Piel de donantes ha sido usada por más de 20 años con buenos resultados. Las ventajas de ambos, piel de donantes e Integra^R, son que estos pueden dar una inmediata barrera de protección.

Dermagraft^R es un sustituto dermal de fibroblastos humanos criopreservado para heridas crónicas que ha mostrado el incremento en la tasa de curación. En este producto, fibroblastos donados son sembrados en un andamio de malla de poliglactina bioabsorbible. Transcyte^R es similar en diseño a Dermagraft^R en que este contiene fibroblastos humanos donados que han sido cultivados en un andamio de colágeno porcino recubierto de poliglactina bioabsorbible. Pero este producto también tiene una membrana de silicona unida a este para actuar como una barrera temporal (como en Integra^R). Transcyte^R es recomendada para ser usada en quemaduras mayores para proveer una alternativa dermal y una barrera epidérmica temporal.

2.10.3. Reemplazo epidérmico/dermal

El colágeno es el biomaterial favorito para la ingeniería de tejidos, ya sea en la formación de colágeno entrelazado humano maduro (piel donada obtenida de bancos de sangre) o colágeno extraído de piel o tendón bovino o porcino. Sin embargo, estos tres problemas deben ser abordados en el uso de este biomaterial: seguridad, neovascularización y contracción.

Con respecto a la seguridad, actualmente el colágeno bovino está aprobado por la US Food and Drug Administration (FDA) para su uso clínico ya que los riesgos son bajos, si el colágeno proviene de vacas se sabe que están libres de la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). La otra fuente principal de sustituto de colágeno dermal es la dermis natural de piel de cadáveres. Aquí donantes seleccionados de los bancos de tejidos acreditados deben ser usados para reducir el riesgo de la transmisión de enfermedades virales.

La figura 10 ilustra la ingeniería de tejidos de la piel basado en la dermis natural. La figura 10a muestra la apariencia de la piel normal antes del procesamiento y la figura 10b es una sección manchada con hematoxilina y eosina (H & E) a través de la piel visualizada usando microscopia de luz. Figura 10c muestra el aspecto macroscópico de la dermis que permanece después de que las células dérmicas y epidérmicas han sido removidas por un lavado a partir de una mezcla de NaCl y buffer salino de fosfato. Figura 10d muestra la apariencia de una piel reconstruida en donde la

dermis acelular deepidermizada es reconstruida con queratinocitos y fibroblastos aislados a partir de una biopsia de piel del paciente. Estas células son expandidas en la superficie en el laboratorio y después son adicionadas de regreso a la dermis acelular. Sin embargo, cuando esta piel reconstruida es llevada a la clínica (como se muestra en la figura 11), entonces los problemas con la vascularización retardada puede conducir a una pérdida relativa de grosor de los injertos de piel por ingeniería de tejidos reconstruidos y los injertos que sobreviven, algunos pueden sufrir una contracción significativa.

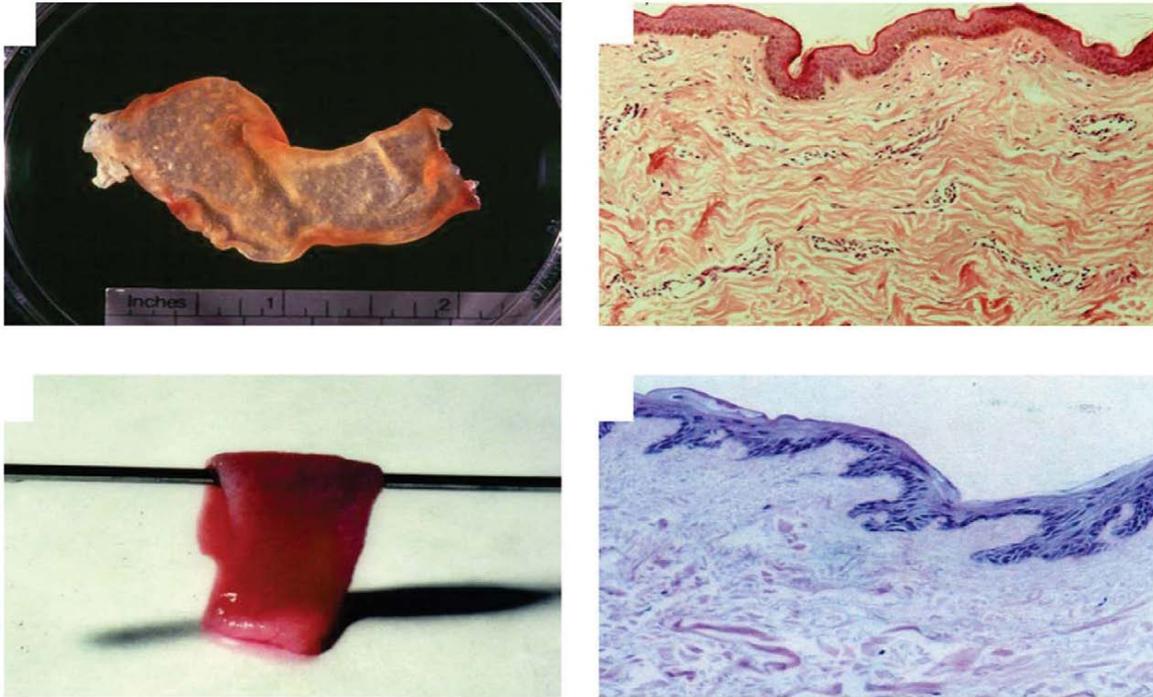


Figura 10. a) Piel de espesor parcial es b) seccionado y teñido con haematoxylin. c) Una vez retiradas las células, la dermis acelular remanente deepidermizada es flexible y d) puede ser reconstruida con queratinocitos y fibroblastos expandidos en el laboratorio para uso experimental o clínico.

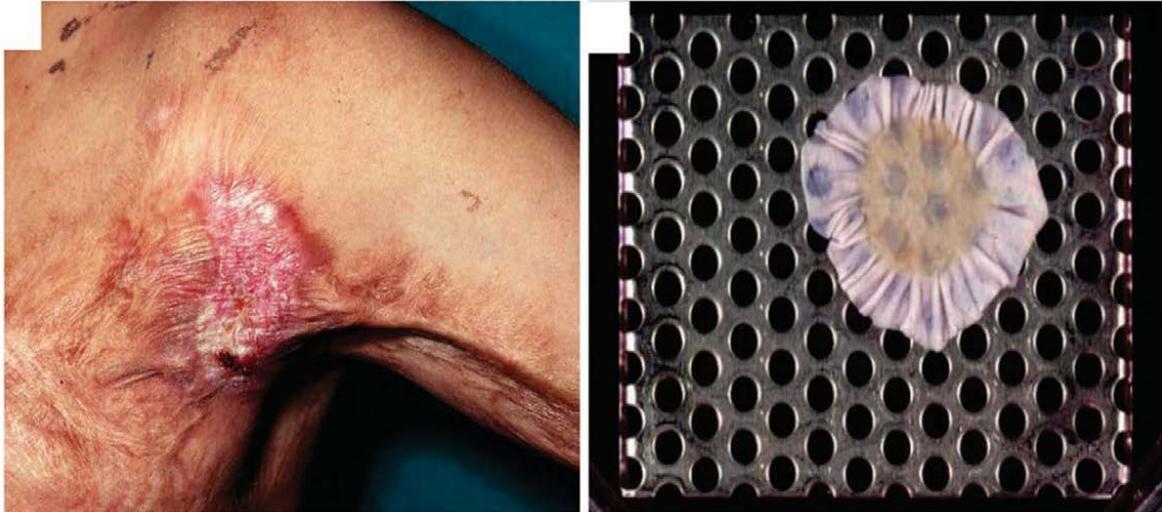


Figura 11. a) El uso de piel de ingeniería de tejidos para tratar la extensa contracción seguida de una herida de quemadura. b) Contracción de los queratinocitos en contacto con una alodermis humana en el laboratorio.

La neovascularización ha sido identificada como un problema para las construcciones de ingeniería de tejidos, no solo para la piel. Las construcciones que carecen de cualquier vasculatura pueden ser lentas para vascularizarse y fallar al integrarse. Este es uno de los principales problemas en el campo presente. Nuevos enfoques para mejorar la tasa de neovascularización de piel de ingeniería de tejidos son muy necesarios.

El problema de la contracción es también un reto. Es posible de alterar el entrecruzamiento de la estructura de un andamio dermal para que así este resista la contracción (como se ha visto en el caso del Permacol[®]) pero esto conduciría a otro interesante e importante problema. Los materiales usados como andamios que son están ampliamente entrelazados pueden iniciar la fibrosis, encapsulación (formación de una capa gruesa de tejido conectivo alrededor de un implante), y una respuesta inmunológica relativamente extrema. Una reciente teoría de esto ha sido propuesta por Badylak y otros, y es que a menos que los neutrófilos y macrófagos puedan degradar las estructuras implantadas de colágeno, estos activarán las células linfocíticas TH2, que provocan una reacción inflamatoria extrema, en lugar de la inducción de las células inmunes TH1 auxiliares, que conducen a la remodelación constructiva de andamios naturales.

La figura b ilustra la habilidad de las células de la piel de contraer la dermis natural. Esto sugiere que las células de la piel, particularmente los queratinocitos, usan una enzima para entrecruzar el colágeno, la lisil oxidasa, que reúne y entrecruza las fibras de colágeno. Un inhibidor de la lisil oxidasa encontrada en guisantes dulces, la beta-aminopropionitrilo (β -APN), puede reducir esto.

2.11. Desafíos de los biomateriales en ingeniería de tejidos de la piel

Los problemas de los materiales existentes pueden ser resumidos como sigue:

- Problemas de seguridad –evitar materiales derivados de animales-;
- La mejora de la “toma” de queratinocitos cultivados en los lechos de la herida;
- Mejorar la tasa de neovascularización de la piel de ingeniería de tejidos; y
- Desarrollar materiales para andamios que resistan la contracción y la fibrosis.

2.11.1. Seguridad de los biomateriales

Aunque los andamios de colágeno natural pueden trabajar bien, el problema en esto es el detalle de cómo este es extraído, procesado y esterilizado para ser apto para el propósito y con un bajo riesgo para el paciente. El riesgo de transmisión de enfermedades de piel humana puede ser reducido con buenas prácticas en los bancos de piel, especialmente si se combina con la esterilización de la piel, pero no puede ser completamente eliminado. El colágeno bovino aprobado por la FDA es actualmente percibido como un bajo riesgo, pero este depende de que los rebaños no fueran previamente expuestos a BSE. En consecuencia, el desarrollo de andamios sintéticos alternativos es bienvenido. Algunos materiales son el poli-L-lactido (PLLA), policaprolactona (PCL) y el ácido poliglicólico (PGA). Estos han sido aprobados por la FDA y usados clínicamente en diversas aplicaciones, como suturas reabsorbibles, placas de fractura y stents. (Dermagraft^R y Transcyte^R ambos están basados en andamios sintéticos y han sido usados clínicamente por varios años).

Hay mucho interés en la producción de andamios por electrospinnig figura 12a. Este método versátil puede producir estructuras porosas abiertas en tres dimensiones que se aproximan a la estructura del colágeno de la dermis. Los materiales naturales, como el colágeno y el quitosano, pueden ser hilados por su cuenta o junto con polímeros sintéticos. Uno puede ser hilado en paralelo (Figura 12b), o aleatoriamente (figura 12c) fibras, dependiendo de la velocidad del hilado. Estas fibras pueden ser utilizadas *in vitro* para determinar el diámetro óptimo de las fibras y los espacios entre las fibras que las células pueden recorrer.

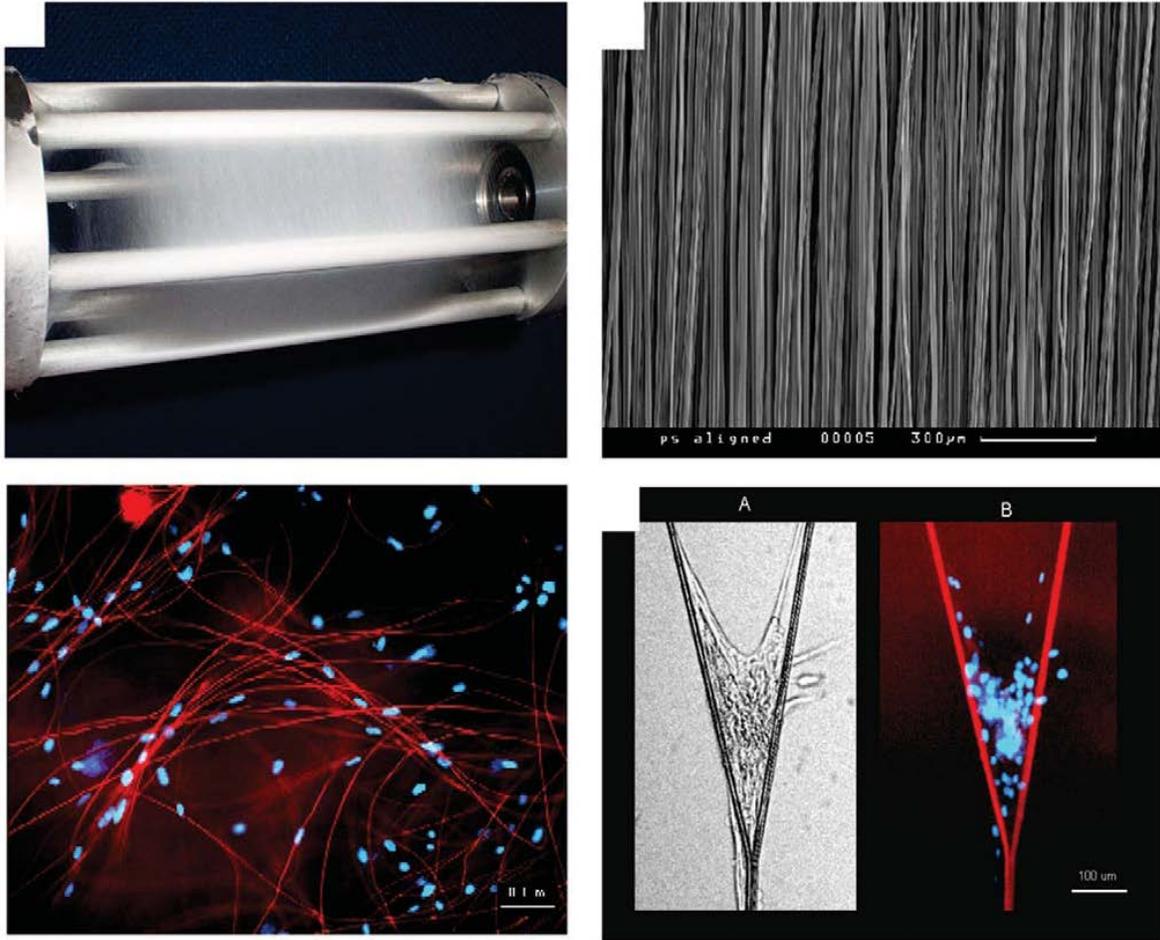


Figura 12. a) Electrospinning de fibras. Producción de fibras b) paralelas y c) aleatorias. d) Fibras polilacticas con fibroblastos sembrados.

Otros enfoques alternativos para tener células que generen su propio andamio *in vitro* se pueden lograr ya sea con el apoyo de un andamio existente como soporte (como Dermagraft[®] y Transcyte[®]) o como se ha demostrado recientemente, sembrando fibroblastos en fibrina humana y esperando más de siete semanas para que produzcan su propia matriz, que después será liofilizada y esterilizada para ser usada como andamio para la repoblación con células vivas para su futuro uso clínico.

2.11.2. Mejoramiento de la unión de células de piel cultivadas con los lechos de las heridas

Queratinocitos liberados por sí mismos, como hojas, como spray o en forma de vendajes acarreadores carece de componente de la membrana basal y tienen una lucha cuesta arriba en la buena unión en lechos de heridas desafiantes. Una investigación para mejorar la toma de las células por unión de avidina (una proteína natural con una extremadamente alta afinidad para

unirse a la vitamina natural biotina) a las células y biotina a un sustrato de colágeno mostrando que esta propuesta puede mejorar la unión.

Un reto mayor es que lo que sea usado en los lechos de las heridas debe ser algo clínicamente aceptable. En años recientes se han considerado investigaciones en el desarrollo de matrices biomiméticas, sintéticas y de automontaje incorporando secuencias de adhesión celulares naturales como microambientes para dirigir la morfogénesis del tejido. La tarea de hacer un pegamento sintético equivalente a la membrana basal que uno pueda rociar idealmente en el lecho de la herida antes de liberar los cultivos celulares (por sí mismas o en andamios) es un reto mayor, pero uno de estas nuevas generaciones de andamios sintéticos tridimensionales podría permitir.

2.11.3. Mejoramiento de la neovascularización de piel de ingeniería de tejidos

Los biomateriales comúnmente en uso, como la piel donada o Integra^R a menudo toman dos o tres semanas en estar bien vascularizadas. Un número de biomateriales han sido desarrollados para mejorar la angiogénesis, que van desde la introducción de grandes tamaños de poro en andamios para promover una vascularización más rápida, a la liberación de potentes factores angiogénicos como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) de un andamio tridimensional inyectable de péptido-anfifilo, y biomateriales sintéticos representando componentes simplificados de la matriz extracelular (ECM).

2.11.4. Resistencia a la contracción y la fibrosis

Como las células de la piel afectan las propiedades biofísicas de la dermis es pobremente entendido pero la elasticidad natural de la piel está basada en el contenido de elastina. Este es un creciente campo de investigación de la elastina como un biomaterial para la ingeniería de tejidos que debería ofrecer nuevas insignias y propuestas para producir andamios mejor capacitados para resistir la contracción (MacNeil, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

Las quemaduras constituyen un importante problema de salud pública que causa severa discapacidad física, psicológica, social y laboral, con un alto índice de mortalidad y con graves secuelas derivado de la cicatrización que produce desfiguramiento facial y corporal, con contracturas y deformidades de las extremidades que ocasionan limitación funcional con grave repercusión psicológica, social y económica, ya que los gastos tanto de atención y como de rehabilitación son demasiado elevados.

Hoy en día, las personas que sufren quemadura de más del 90% de la superficie de su cuerpo pueden sobrevivir, aunque con secuelas permanentes. El tratamiento de las quemaduras ha tenido grandes avances en los últimos años permitiendo una gran reducción de la mortalidad y la restauración funcional y cosmética, así como la rehabilitación integral con incorporación a la vida social, escolar y laboral (INR, 2011).

Los sustitutos dérmicos son un tratamiento eficaz para los procesos que destruyen la piel como las quemaduras que involucran el 60% o más de la superficie corporal total, traumatismos y enfermedades genéticas que involucran heridas crónicas. A diferencia del autoinjerto que depende de la disponibilidad de tejido sano en el paciente, los injertos sustitutos pueden adquirirse de otros humanos, animales o producirse en el laboratorio. Existen sustitutos de piel biológica y sintética. Los primeros son más baratos y abundantes, en cambio los segundos no presentan membrana basal y a pesar de su falta de elementos orgánicos, han demostrado tener cualidades más específicas en el tratamiento de los pacientes. Dentro de los sustitutos para piel más populares están: TranCyte®, Biobrane®, Kollagen®, Matriderm®, Alloderm®, Apligraf®, Dermagraft® e Integra®; siendo este último el más aceptado. Lo que se busca con los sustitutos de piel es el tratamiento óptimo de las heridas cutáneas garantizando su durabilidad, elasticidad, impermeabilidad al agua, disponibilidad y su ausencia de reacción antigénica. Se debe de tener en cuenta que hay limitaciones al momento de elegir un sustituto de piel como su costo, disponibilidad, calidad e incluso la capacidad del paciente para admitir la prótesis. El avance biotecnológico de estos sustitutos promete mejorar la calidad, así como disminuir el precio de los mismos (Álvarez et al, 2012).

4. OBJETIVOS

4.3. Objetivo General

Sintetizar nano fibras a partir de la técnica de electrospinning para ser usadas en ingeniería de tejidos de la piel

4.4. Objetivos Particulares

- Montar la técnica de electrospinning para la síntesis de nanofibras
- Optimizar el proceso de electrospinning en la obtención de nanofibras de gelatina por la metodología de superficie de respuesta (RSM)
- Extraer colágeno de piel de animal para sintetizar el andamio de ingeniería de tejidos
- Sintetizar y caracterizar el andamio de ingeniería de tejidos
- Formar el sustituto de piel de ingeniería de tejidos

Este capítulo es omitido por derechos de autor.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

***Este capítulo
es omitido por
derechos de
autor.***

**Este capítulo
es omitido por
derechos de
autor.**

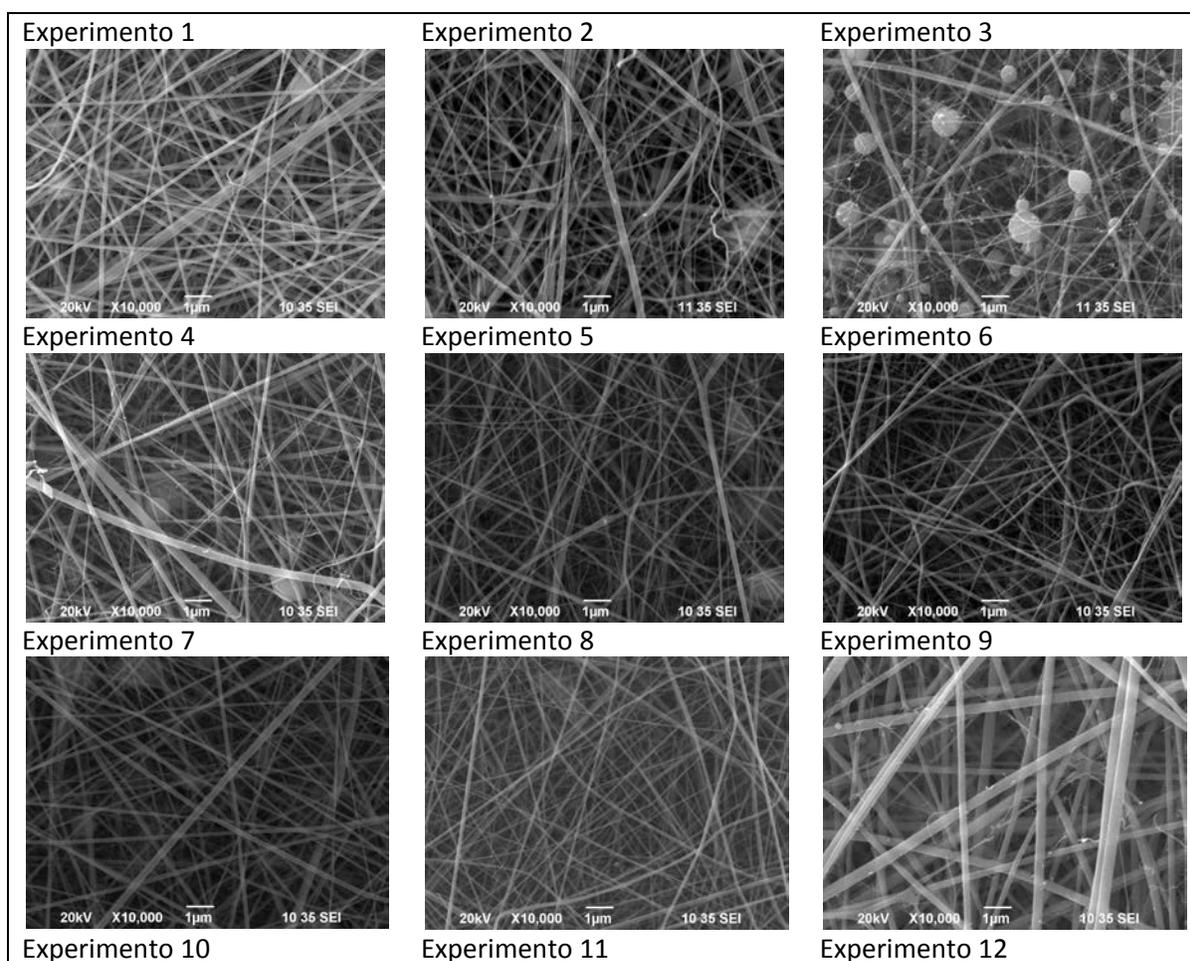
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

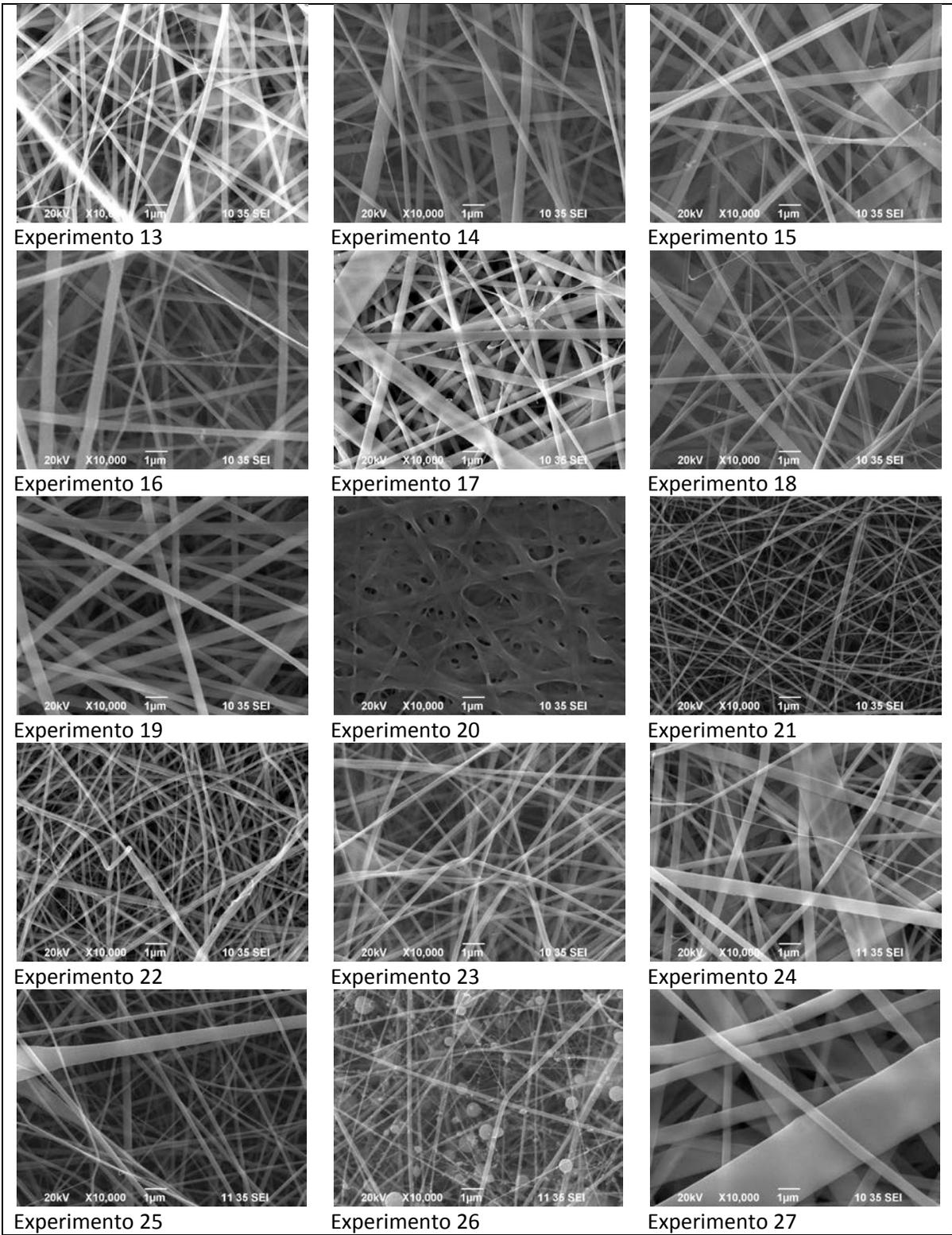
6.3. Optimización del proceso de Electrospinning

6.3.1. Determinación del diámetro de las fibras por SEM

El diseño central compuesto desglosado donde se observan los parámetros propios de cada experimento se muestra en la tabla 3.

Se electrohilieron nanofibras de gelatina siguiendo los parámetros de los experimentos mostrados en la tabla 3. Se realizaron 30 experimentos de forma aleatoria y, como se mencionó antes, todas las muestras fueron estudiadas por SEM para determinar su diámetro y observar su morfología. La morfología de las nanofibras obtenidas en cada experimento se observa en la figura 16.





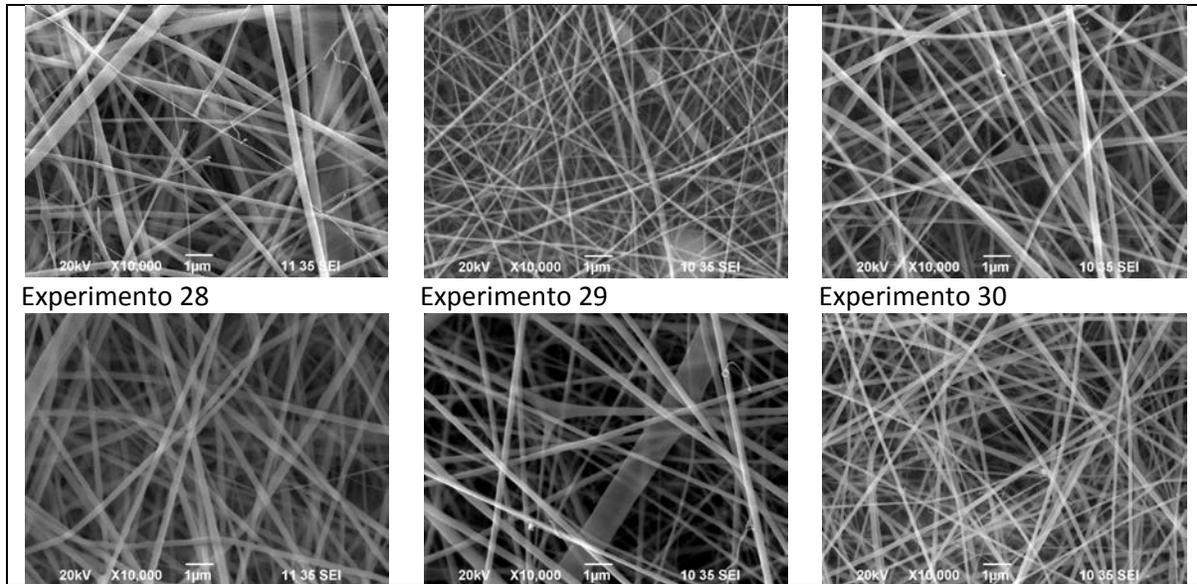


Figura 13. Micrografías de las fibras obtenidas en cada experimento.

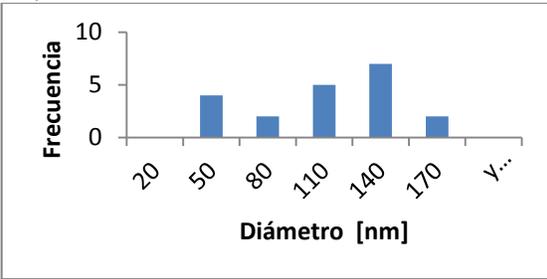
Para obtener datos más confiables, se analizaron 20 puntos de cada muestra, se determinó el diámetro promedio (Tabla 3) y se realizó un histograma de frecuencias (figura 17). El diámetro promedio menor fue de 76 nm mientras que el mayor fue de 840 nm (tabla 3).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Chang et al en 2005. En su trabajo se estudió el efecto de la viscosidad de la solución de gelatina en la morfología de las nanofibras. Las morfologías y diámetros de nanofibras obtenidas se asemejan a las obtenidas por Chang et al. A bajas concentraciones, la viscosidad de la solución es baja, mientras que la tensión superficial es relativamente alta. Por lo tanto, el chorro de la solución, el cual puede formar una nanofibra, podría no mantener su propia forma al final de la punta por su alta tensión superficial y formar una pequeña cuenta entre las fibras. Además, la solución puede esparcirse por su baja viscosidad. Estos efectos causan la aparición de cuentas dentro de la formación de fibras y esto reduce la uniformidad de la red de gelatina.

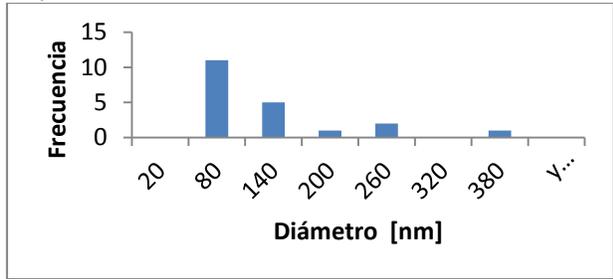
Tabla 2. Experimentos realizados en el CCD.

Experimento	Voltaje [kV]	Distancia [cm]	Flujo [ml/hr]	Concentración %	Diámetro Promedio [nm]
1	10	10	3	10	97
2	15	10	3	10	105
3	10	15	3	10	76
4	15	15	3	10	92
5	10	10	5	10	95
6	15	10	5	10	88
7	10	15	5	10	112
8	15	15	5	10	79
9	10	10	3	20	244
10	15	10	3	20	211
11	10	15	3	20	179
12	15	15	3	20	285
13	10	10	5	20	327
14	15	10	5	20	431
15	10	15	5	20	280
16	15	15	5	20	367
17	7.5	12.5	4	15	284
18	17.5	12.5	4	15	79
19	12.5	7.5	4	15	135
20	12.5	17.5	4	15	164
21	12.5	12.5	2	15	181
22	12.5	12.5	6	15	141
23	12.5	12.5	4	5	74
24	12.5	12.5	4	25	840
25	12.5	12.5	4	15	178
26	12.5	12.5	4	15	89
27	12.5	12.5	4	15	167
28	12.5	12.5	4	15	222
29	12.5	12.5	4	15	209
30	12.5	12.5	4	15	128

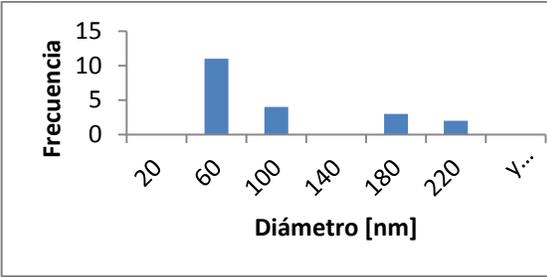
Experimento 1



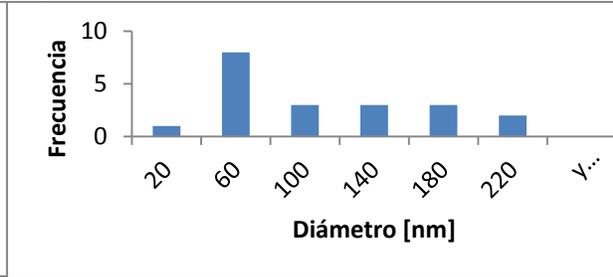
Experimento 2



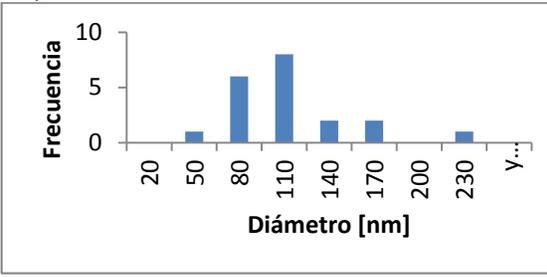
Experimento 3



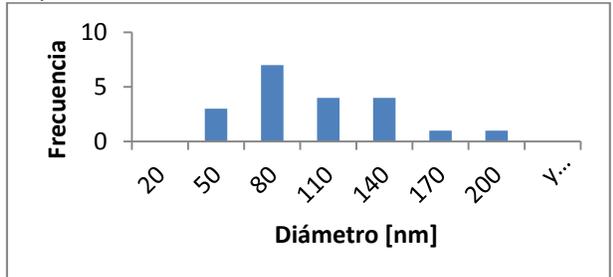
Experimento 4



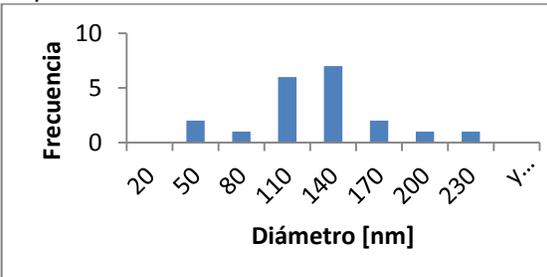
Experimento 5



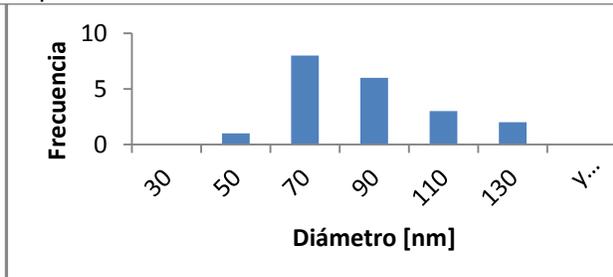
Experimento 6



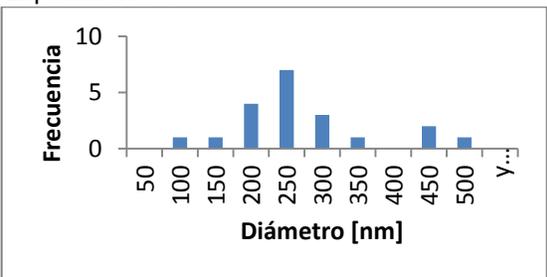
Experimento 7



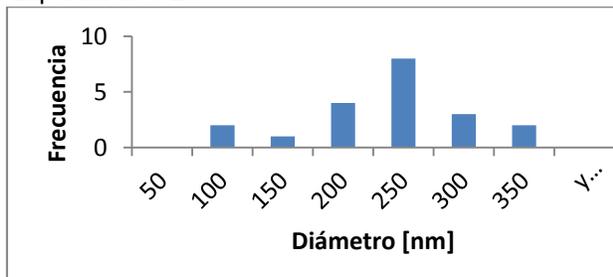
Experimento 8



Experimento 9

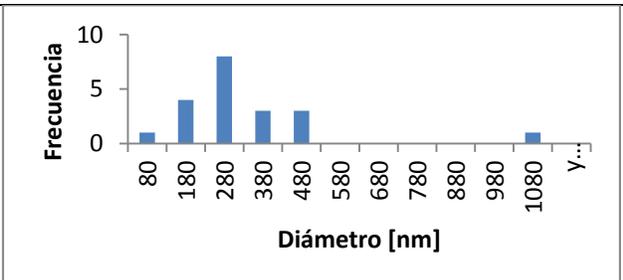
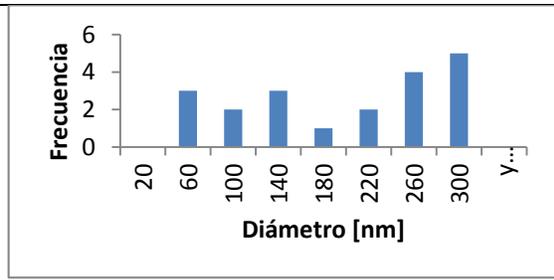


Experimento 10



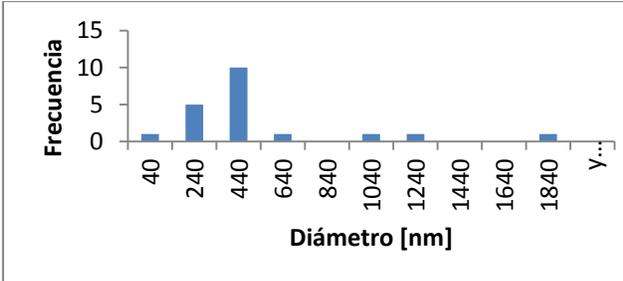
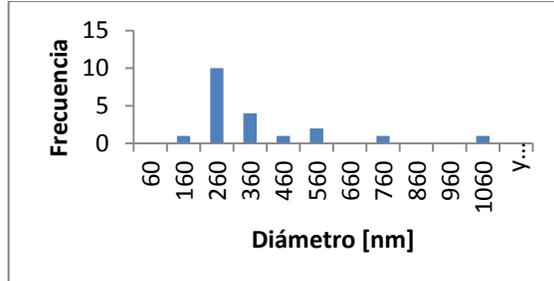
Experimento 11

Experimento 12



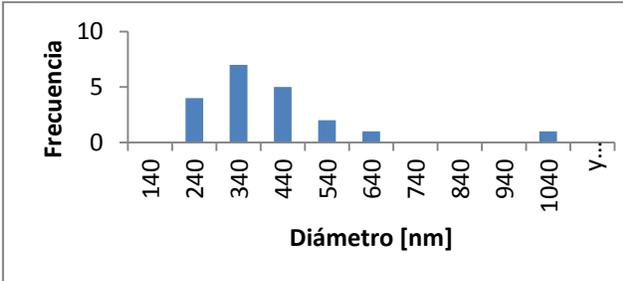
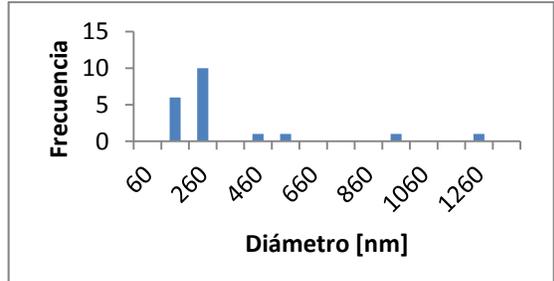
Experimento 13

Experimento 14



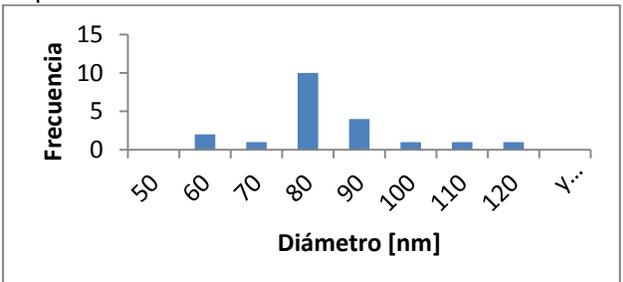
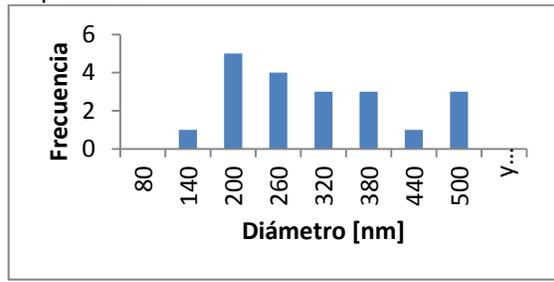
Experimento 15

Experimento 16



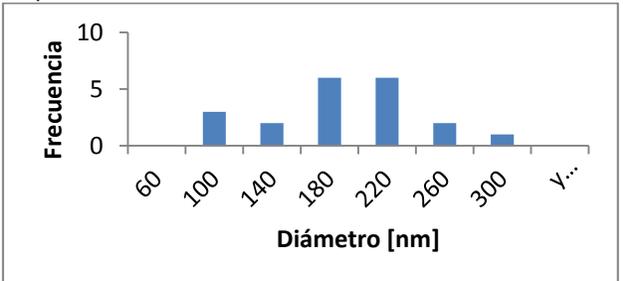
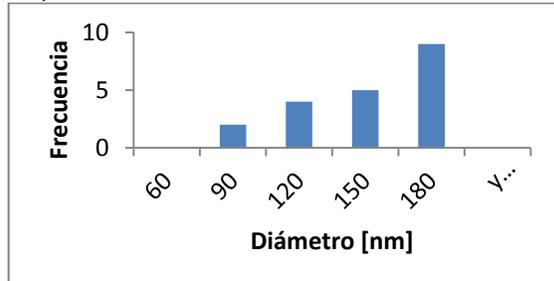
Experimento 17

Experimento 18



Experimento 19

Experimento 20



Experimento 21

Experimento 22

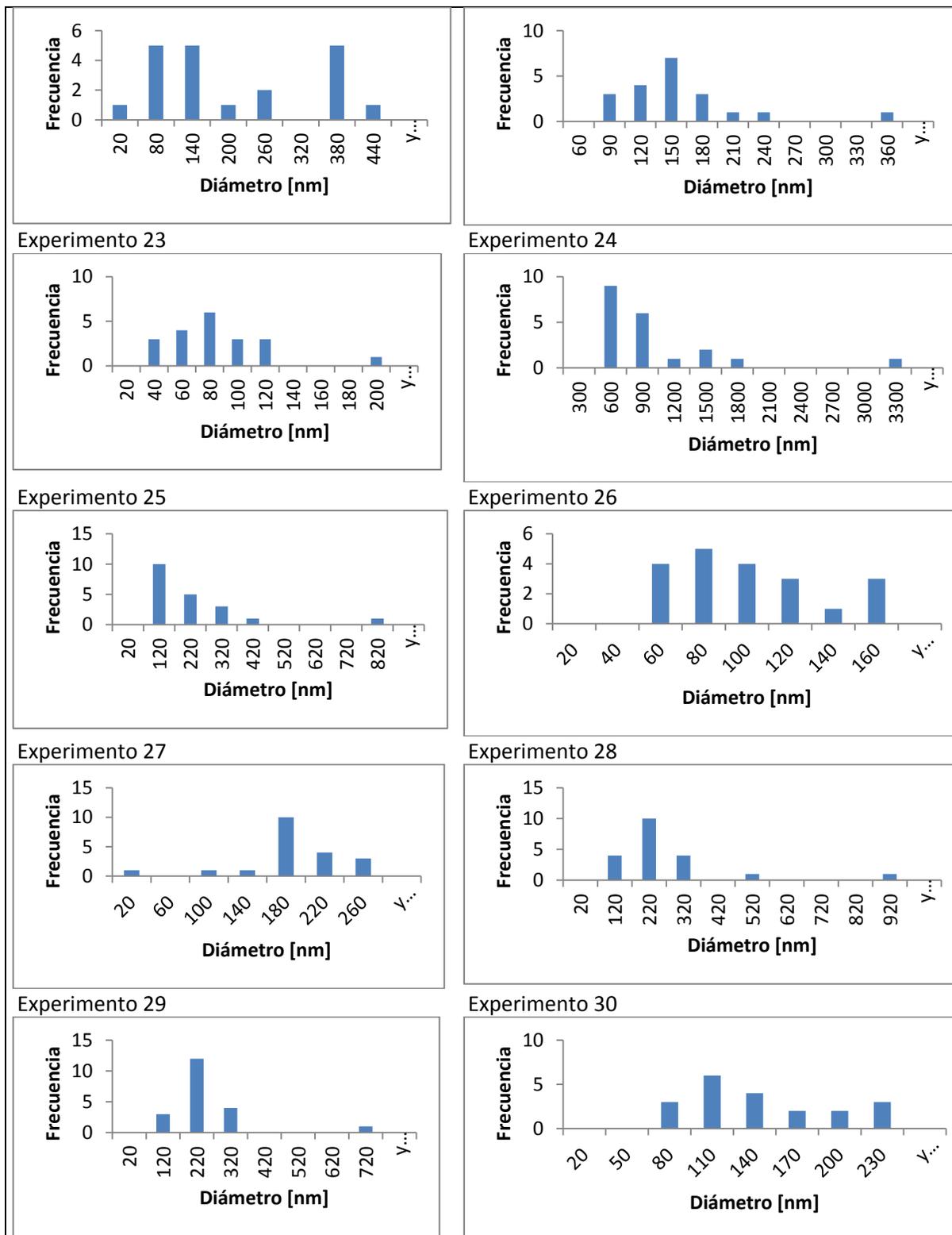


Figura 14. Histograma de frecuencias de los diámetros de las nanofibras de cada experimento.

6.3.2. Optimización del Diámetro por CCD

6.3.2.1. Estimación de los coeficientes en una función matemática polinomial

Después de realizar los experimentos se evaluó la respuesta de acuerdo con el diseño experimental, ajustando a un modelo polinomial apropiado.

La función polinomial típica de superficie de respuesta se representa por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Donde β_i son los coeficientes de regresión para los términos de primer orden, β_{ii} son los coeficientes para los términos cuadráticos, los β_{ij} son los coeficientes para las interacciones de los factores y ε es el término de error aleatorio.

Los resultados del modelo apropiado en la forma de ANOVA de la superficie de respuesta son mostrados en la tabla 4.

Tabla 3. Análisis de varianza del modelo.

	Sum of squares	Mean square	F value	p-value (Prob>F)
Model	5.705E+005	40746.73	5.49	0.0011
Residual error	1.114E+005	7428.33		
Lack of fit	98918.46	9891.85	3.95	0.0712
Pure Error	12506.42	2501.28		

La prueba F que tiene un valor debajo del 0.0500 ($p > F = 0.0011$) demuestra que el modelo es altamente significativo para la regresión del modelo, con coeficiente de determinación de $R^2 = 0.8366$ que indica que los valores experimentales tienen un buen ajuste al modelo matemático. La aplicación de la metodología de superficie de respuesta dio como resultado la siguiente ecuación en términos de valores reales.

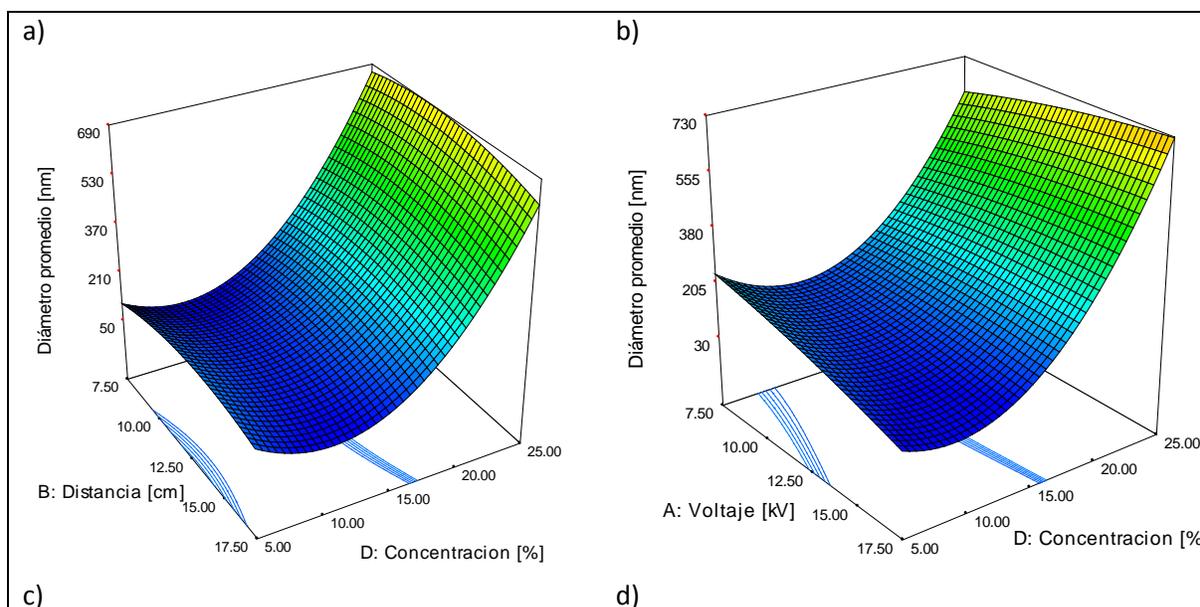
$$Y = + 512.77267 - 27.65675 A + 45.52949 B + 3.48154 C - 89.32224 D + 1.04895 AxB + 1.37635 Ax C Flujo + 1.40593 Ax D - 1.90112 BxC - 0.38292 BxD + 6.02506 CxD - 0.59023 A^2 - 1.85895 B^2 - 8.77679 C^2 + 2.61157 D^2$$

Donde Y es la respuesta (diámetro de la fibra) y A,B,C,D son los valores de los factores seleccionados en la Tabla 4. Esta ecuación sugiere que los parámetros menos significativos en el CCD fueron el voltaje y la distancia de la punta de la aguja al colector. Los parámetros que presentan más diferencias significativas son la concentración de la solución y flujo del biopolímero.

Yördem y colaboradores (2008) realizaron un estudio de los efectos de los parámetros en el proceso de electrospinning de poliacrilonitrilo. En este estudio se determinó que los parámetros más significativos eran el peso molecular y el voltaje aplicado. Yazdanpanaha et al (2014) determinó que el parámetro que más afectaba el diámetro de nanofibras de poli vinilalcohol era la concentración del polímero en la solución. La comparación de estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo demuestra una congruencia con el factor más significativo el cual es la concentración del polímero. También se observa que la significancia de los parámetros puede variar dependiendo del polímero que sea tratado.

6.3.2.2. Evaluación del punto teórico óptimo

Los valores predichos de Y (diámetro de las fibras) basado en el rango de variables en RSM fueron estimado como una gráfica de superficie de respuesta, el cual es un esquema teórico tridimensional que explica visualmente la relación entre la respuesta y los factores independientes (Yazdanpanaha et al, 2014) (figura 18).



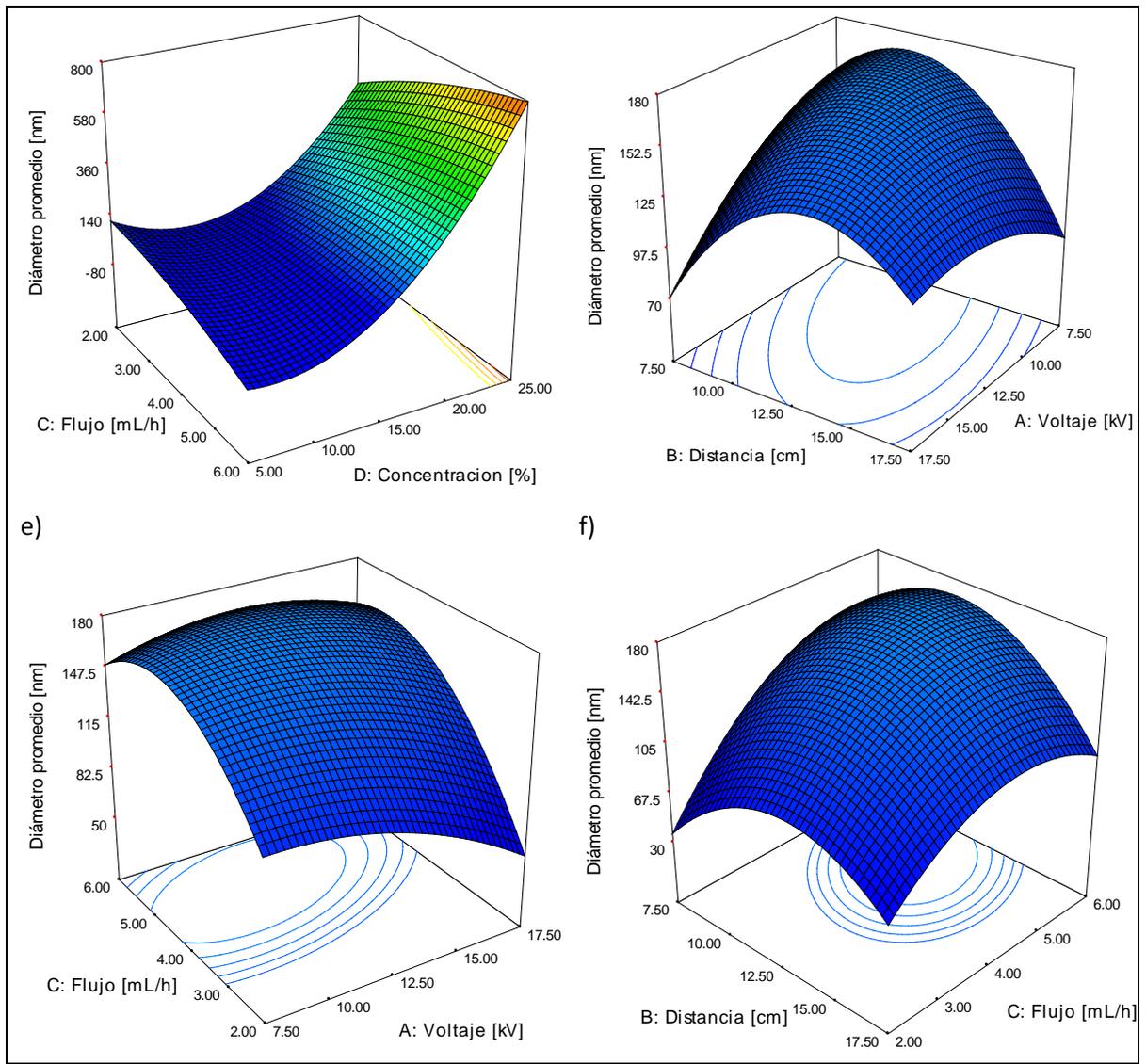


Figura 15. Graficas de superficie de respuesta del diámetro de las nanofibras: a) Efecto de la concentración de gelatina y distancia, b) voltaje y concentración de gelatina, c) tasa de flujo y concentración de gelatina d) distancia y voltaje e) voltaje y flujo y f) distancia y flujo y su interacción en el diámetro de las fibras.

La máxima o mínima respuesta se consigue en el centro del sistema si la gráfica de contornos muestra elipses o círculos. Si el término cuadrático es efectivo en la gráfica de superficie de respuesta, puede haber una curvatura y en esta situación el punto estacionario es llamado punto silla (Montgomery, 2002). Cada superficie de respuesta presenta el efecto de cualquiera de los dos factores sobre el diámetro de las nanofibras mientras los otros factores están en un valor constante. Debido a que los parámetros menos significativos según el ANOVA fueron el voltaje y la distancia de la punta de la aguja al colector, estos se mantuvieron constantes para determinar la morfología óptima de las nanofibras (figura 19).

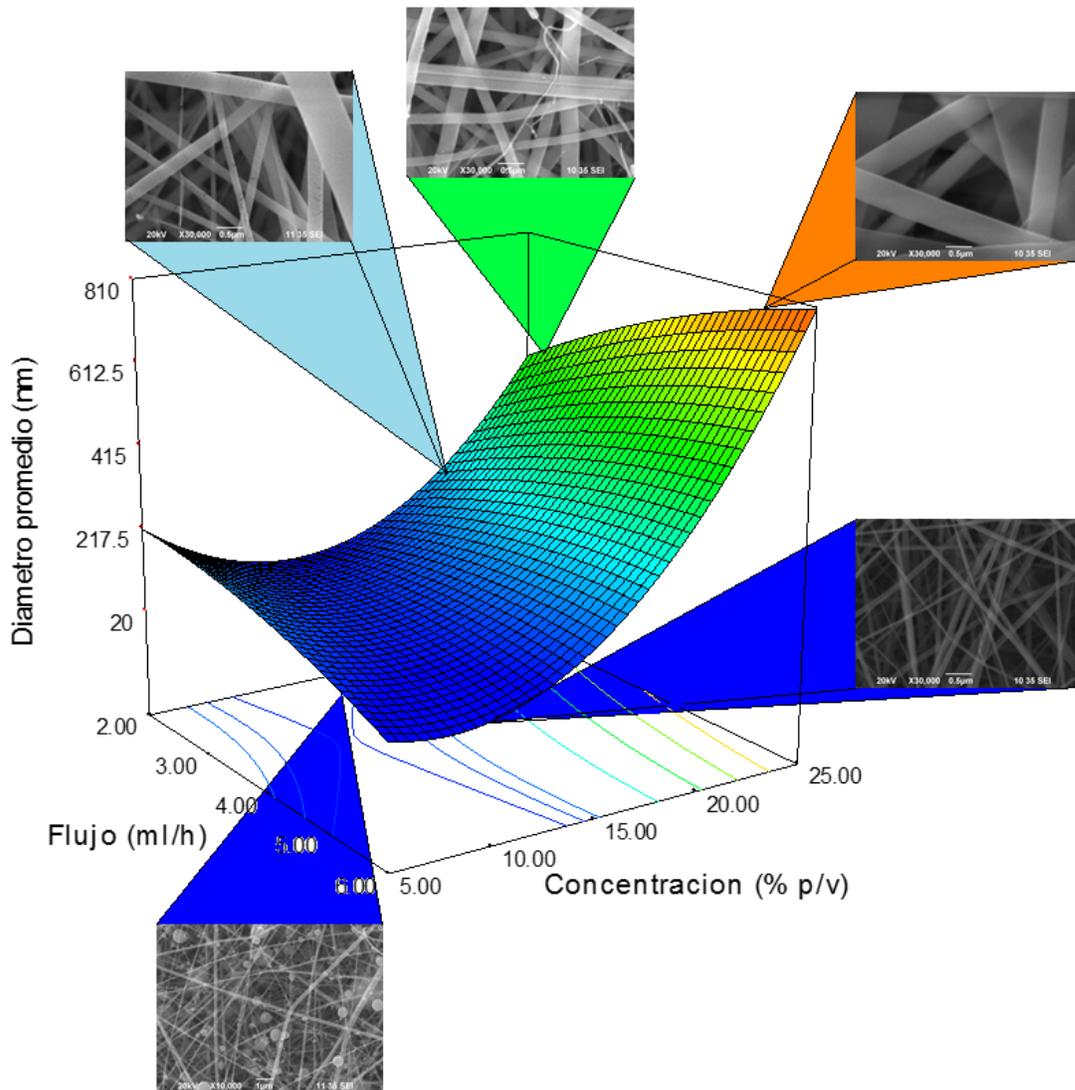


Figura 16. Superficie de respuesta del CCD manteniendo constante las variables de voltaje y distancia de la punta de la aguja al colector a 12.5 kV y 12.5 cm respectivamente.

Se determinó por medio de la gráfica de superficie de respuesta que el diámetro promedio de las nanofibras de gelatina aumenta al incrementar la concentración de esta en la solución (Figura 19). Se encontró que el diámetro menor de las nano fibras (76 nm) se puede obtener a una concentración de 10% (p/v) de gelatina y un flujo de 4 mL/h. A partir de las gráficas de superficie de respuesta se encontró que teóricamente a una concentración de 13% de gelatina se obtienen las condiciones más apropiadas para un sustituto de piel. Se sintetizaron nanofibras a las condiciones encontradas, se observó la morfología en SEM (figura 20), se determinó el diámetro promedio y se realizó un histograma de frecuencias (figura 21) para comparar los resultados teóricos con los prácticos. En la práctica se obtuvieron fibras con la morfología deseada pero con un diámetro ligeramente mayor al obtenido teóricamente. Esto indica que el modelo obtenido simula correctamente el proceso de electrospinning de gelatina y puede ser útil para encontrar los parámetros adecuados para diferentes diámetros según se necesite.

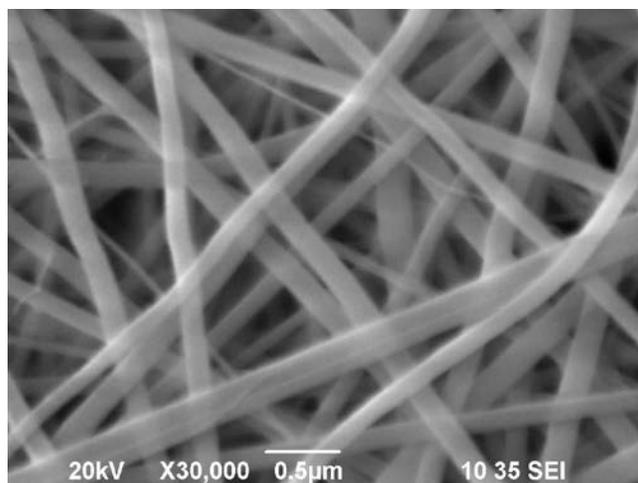


Figura 17. Micrografía de la muestra con las condiciones más apropiadas para un sustituto de piel.

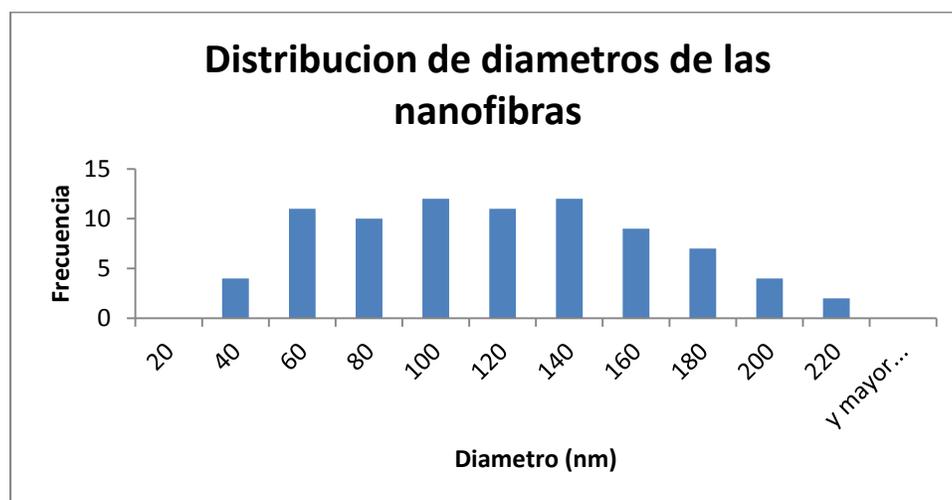


Figura 18. Histograma de frecuencias de las nanofibras en el punto óptimo determinado por RSM.

6.4. Extracción y purificación de colágeno

La piel de pollo es un sustrato económicamente y tecnológicamente viable de donde es posible extraer colágeno. La baja antigenicidad del colágeno aviar y la creciente demanda de colágeno no bovino son dos razones valiosas para futuras aplicaciones de las propiedades funcionales del colágeno aviar (Cliche et al, 2003).

Se realizaron varias extracciones para tener colágeno disponible para la construcción de los andamios. Se obtuvo polvo de colágeno liofilizado puro como se muestra en la figura 22.



Figura 19. Polvo de colágeno liofilizado obtenido.

Se obtuvo un rendimiento en la extracción de colágeno húmedo del 43.86 % y un rendimiento de colágeno seco liofilizado del 1.45%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Lin y Liu (2006). En su trabajo se trataron pies de aves y se obtienen rendimientos que van del 0.7 al 1.6%. Castro Vargas (2012) extrajo colágeno de crestas de pollos y obtuvo un rendimiento del 2.45%. Este rendimiento es mayor al obtenido en este trabajo y al reportado por Lin y Liu. Considerando que la piel es el órgano más grande del cuerpo es más rentable su procesamiento, con el rendimiento aquí encontrado, que el de las crestas y pies de pollo.

6.5. Síntesis del andamio de ingeniería de tejidos

6.5.1. Síntesis de nanofibras de colágeno y elastina por Electrospinning

El colágeno obtenido de la extracción fue electrohilado exitosamente utilizando los parámetros determinados en la optimización del proceso con gelatina. En un principio se obtuvieron microfibras de colágeno (figura 23) ya que, como se mencionó antes, el tamaño del diámetro puede variar dependiendo del polímero que sea electrohilado. Al haber estudiado el proceso de electrospinning en el capítulo 6.1 fue más fácil determinar los parámetros en los cuales se obtendría la morfología deseada. Sabiendo que la morfología de las fibras puede ser variada con aumentando o disminuyendo la viscosidad de la solución se obtuvo el diámetro requerido de nanofibras de colágeno.

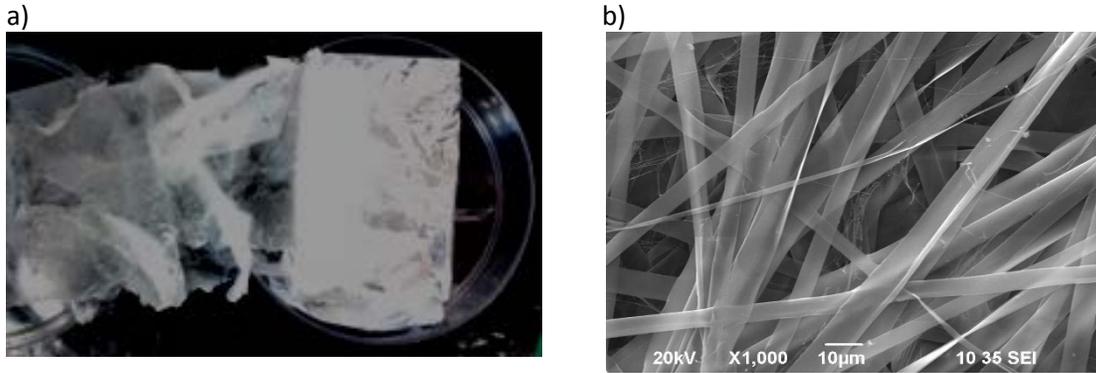


Figura 20. a) microfibras de colágeno sintetizadas, b) micrografía de las microfibras.

Li y colaboradores en 2004 electrohilaron elastina y determinaron que a una concentración de 20% se obtenían fibras de elastina uniformes. A concentraciones menores se obtienen fibras fragmentadas y hay presencia de cuentas. Las fibras de elastina tienen mayores diámetros que las de gelatina y colágeno. Rnjak-Kovacina et al (2012) reporta una formación de fibras de elastina exitosa también a una concentración del 20%. En este trabajo se intentó la síntesis de fibras de elastina a la concentración mencionada pero no hubo ninguna formación de fibras, se incrementó y decremento la concentración y en ningún caso se obtuvo la formación de fibras. Debido a este fallo, se optó por electrohilar la elastina en conjunto con las soluciones ya electrohiladas. Primero se probó la capacidad de ser electrohilada en combinación con gelatina. Se combinó gelatina con elastina con una proporción de 2:1 y se comparó la morfología con las fibras de gelatina electrohiladas a la misma concentración (figura 24). Se obtuvo la formación de fibras con la combinación de ambos biopolímeros e interesantemente al comparar con la solución que solo contenía gelatina se observó una disminución en el diámetro de las fibras al agregarse la elastina.

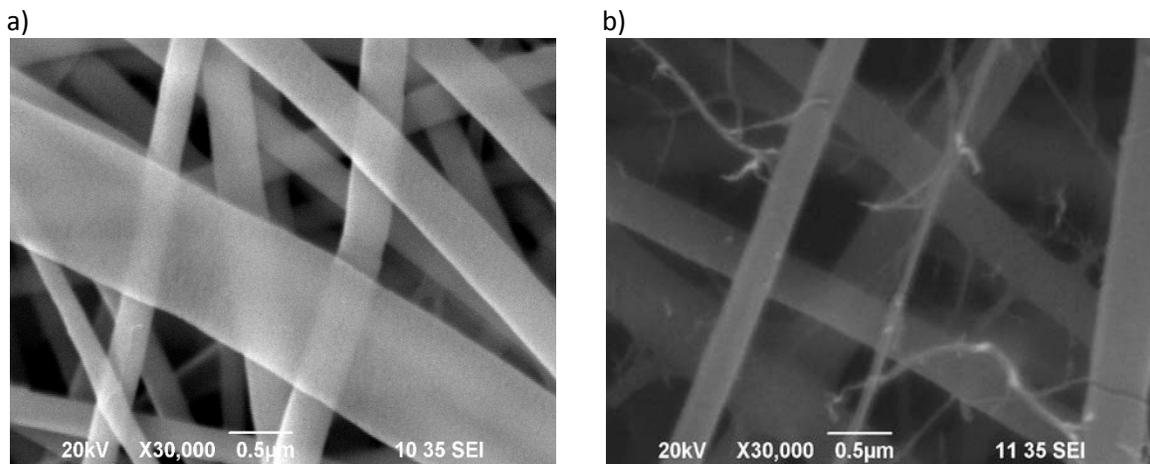


Figura 21. Micrografías de a) gelatina y b) combinación de gelatina y elastina 2:1.

Finalmente se realizaron diferentes combinaciones de colágeno con elastina hasta obtener la morfología requerida (Figura 25). La combinación adecuada fue seleccionada para ser utilizada en las siguientes pruebas.

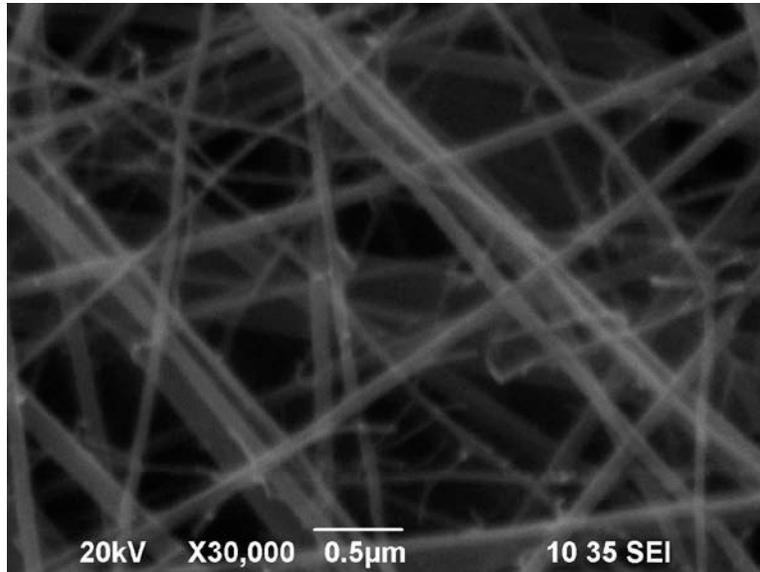


Figura 22. Micrografía de la morfología de la combinación de colágeno y elastina electrohilados.

6.5.2. Entrecruzamiento de las nanofibras del andamio

Las pobres propiedades mecánicas y rápidas tasas de degradación de los andamios de colágeno pueden causar inestabilidad del injerto y dificultad de manejo. El entrecruzamiento de los andamios de colágeno por medio de métodos químicos ha sido ampliamente usado para disminuir las tasas de degradación y optimizar las propiedades mecánicas. El glutaraldehído ha sido el agente químico entrecruzador más usado históricamente (Powell y Boyce, 2006). Se logró el entrecruzamiento del andamio de nanofibras de colágeno y elastina con glutaraldehído (figura 26) para así mejorar sus propiedades mecánicas y disminuir su tasa de degradación.

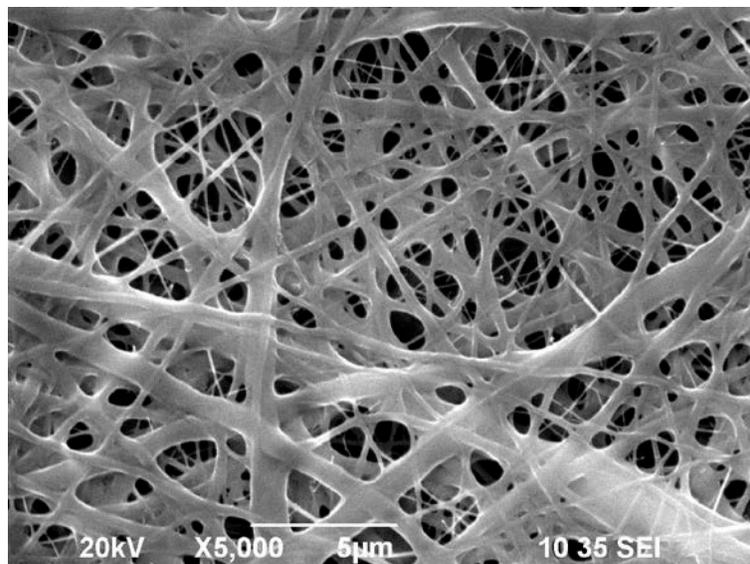


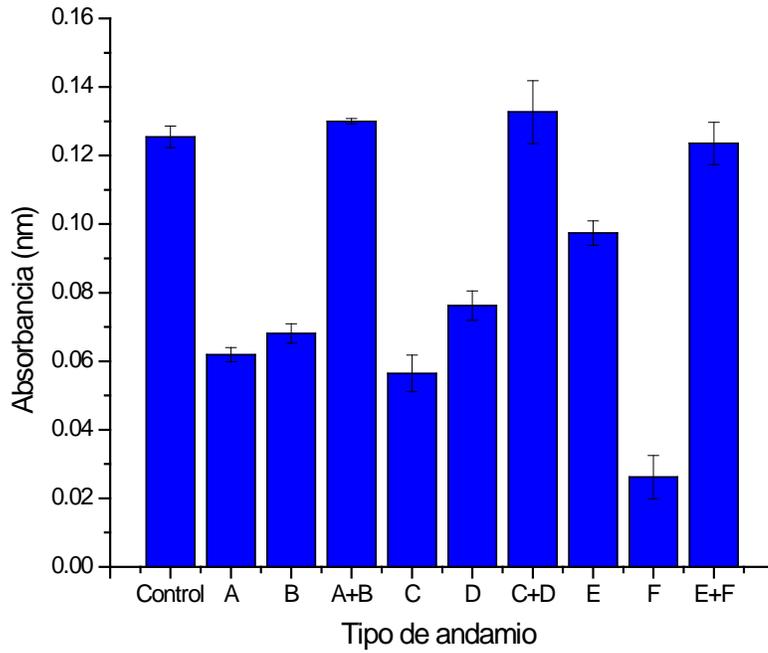
Figura 23. Nanofibras de colágeno y elastina entrecruzados.

6.6. Construcción del sustituto de piel

6.6.1. Evaluación de adhesión y proliferación celular

Los andamios de ingeniería de tejidos deben promover el crecimiento celular y su función fisiológica y deben mantener las fases normales de la diferenciación celular (Rhoa et al, 2006). En este trabajo se estudiaron las propiedades biológicas y citotoxicidad de la matriz de colágeno y elastina con experimentos de cultivo celular. La ausencia de citotoxicidad del colágeno ya fue demostrada por Matthews en 2002 por lo que se estudió la adhesión celular y proliferación de estas en el andamio sintetizado. Se evaluó la adhesión de queratinocitos y fibroblastos humanos por medio del ensayo estándar de MTT al día uno de la incorporación de las células en el andamio. Se tomaron como blancos la superficie de los pozos de poliestireno de las placas. Se colocaron andamios no entrecruzados y andamios entrecruzados con CDI y glutaraldehído dentro de los pozos y las células se sembraron sobre estos. Para hacer la medición de las células adherentes y no adherentes al andamio, el día de la medición, se retiró el andamio y se colocó en un pozo limpio y para no cuantificar las células que no se habían adherido a las nanofibras pero si a la superficie del pozo. El andamio después fue lavado con PBS para retirar las células poco adherentes. La adhesión celular en los andamios se muestra en la figura 27. Se reporta la absorbancia de los blancos, las células adheridas y las no adheridas y la suma de ambas para comparar el total con el blanco que en teoría debería ser la misma absorbancia. A diferencia de Kyong et al (2006), donde obtuvieron una baja adhesión celular, en este trabajo se obtuvo una buena adhesión celular dentro de los andamios. Considerando que para el caso de los andamios no entrecruzados y los andamios entrecruzados con CDI el área de estos era menor al de los andamios entrecruzados con glutaraldehído. El área de los andamios entrecruzados con glutaraldehído tenían un área de aproximadamente 1.5 cm^2 la cual cubría casi toda la superficie del pozo mientras que los andamios no entrecruzados tenían un área de 1 cm^2 y los andamios entrecruzados con CDI un área menor a 1 cm^2 debido a que estos se redujeron al ser sometidos al entrecruzamiento químico. En la figura 27a se observa la influencia del área del andamio en la cantidad de células adheridas, los andamios con menos área tuvieron menos células adherentes comparados con los de mayor área en donde casi se obtuvo una adherencia total. En todos los casos se observa una cantidad total de células similar a las encontradas en los blancos. Las células crecidas junto con los andamios no entrecruzados y entrecruzados con CDI muestran un crecimiento ligeramente mayor mientras que el andamio entrecruzado con Glutaraldehído muestra un crecimiento un poco menor al control. En la figura 27b se observa el adherimiento de los fibroblastos dentro de los andamios. Los blancos mostraron una baja absorbancia, probablemente debido a una falta de agitación de las células antes de ser sembradas provocando una sedimentación y esto conllevó a una baja concentración de células al momento de ser sembradas. Las células crecidas con los andamios entrecruzados con CDI y Glutaraldehído presentan absorbancias similares a las vistas en los queratinocitos.

a)



b)

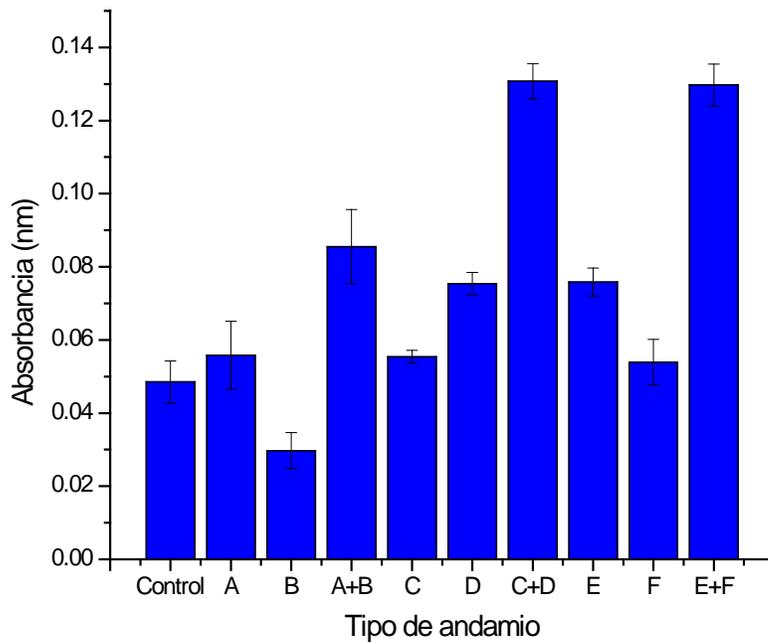


Figura 24. Adhesión celular de a) queratinocitos humanos y b) fibroblastos humanos dentro de los andamios sintetizados medida en el día uno de cultivo. (A) Células adheridas a la superficie del

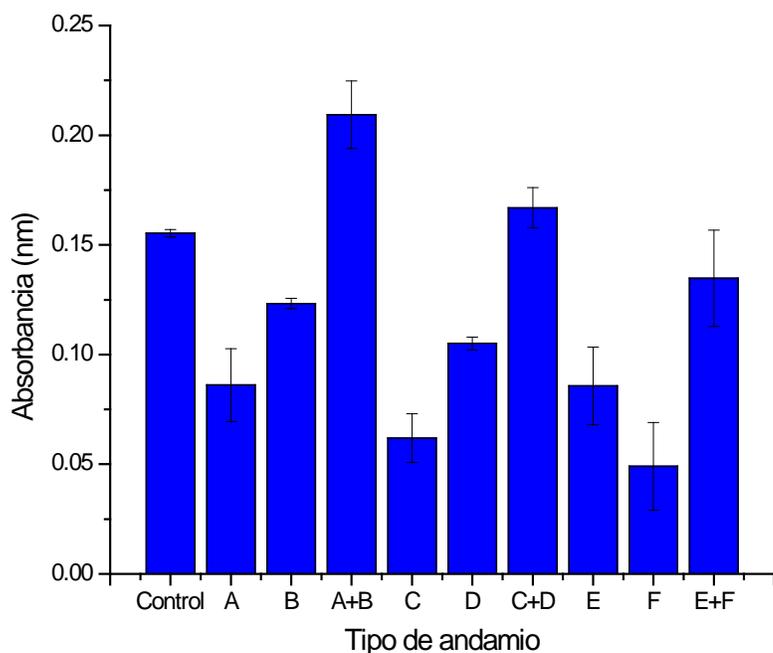
andamio no entrecruzado, (B) células adheridas a la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células adheridas a la superficie del andamio entrecruzado con CDI, (D) células adheridas a la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células adheridas a la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (B) células adheridas a la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído.

La proliferación celular se monitoreo los días 4,7 y 15 midiendo la actividad mitocondrial de las células por el ensayo MTT como se hizo con la adhesión celular. Los primeros ensayos se realizaron únicamente con el andamio entrecruzado con glutaraldehído y los pozos control. Estos ensayos mostraron una alta citotoxicidad y baja proliferación dentro de los andamios entrecruzados. Los resultados coincidieron con los obtenidos por Lee y colaboradores en 2006 donde andamios entrecruzados presentaron un decremento en la actividad mitocondrial después del día 2 de cultivo. Esta citotoxicidad también fue obtenida por de Kyong et al (2006), donde también se utilizaba como entrecruzador químico al glutaraldehído. Kyong et al (2006) le atribuye esta citotoxicidad a una probable desnaturalización de la proteína al ser expuesta al proceso de electrospinning. En 2004, Min y colaboradores creció fibroblastos y queratinocitos en un andamio electrohilado de fibrina. En su trabajo, Min también demostró que el colágeno, uno de los ligandos de la integrina, es funcionalmente activo en términos de la adhesión celular. Estos resultados demuestran que la citotoxicidad no es producida por una desnaturalización del colágeno. Para demostrar esto se realizaron cultivos celulares en andamios no entrecruzados y se observó crecimiento celular. Bustamante Osorno (2007) menciona que el glutaraldehído reacciona con los grupos amino de los radicales de lisina en las proteínas como el colágeno, induciendo la formación de entrecruzamiento químico y estabilizando el tejido contra la degradación química y enzimática. Debido a su característica mixta hidrofóbica e hidrofílica, le permite a las moléculas penetrar rápidamente medios acuosos y membranas celulares. El entrecruzamiento químico obtenido con el glutaraldehído también ha mostrado la reducción del reconocimiento inmunológico del tejido, controlando la estabilidad de la triple hélice del colágeno y suprimiendo la viabilidad de las células tisulares, previniendo la aparición de reacciones antigénicas. Las células endoteliales generalmente no crecen sobre el tejido tratado de una bioprótesis implantada, y los efectos citotóxicos del glutaraldehído presumiblemente contribuyen a esta falta de endotelización. La solución de glutaraldehído contiene formas monoméricas, hemiacetales poliméricos y aldehídos poliméricos. Estos últimos han mostrado liberarse lentamente del tejido de la bioprótesis, produciendo efectos citotóxicos. Esta información indica que la citotoxicidad del andamio es provocada por el entrecruzador utilizado. Bustamante también menciona que algunos grupos químicos han demostrado beneficios durante el proceso de detoxificación, entre estos el tratamiento con ácido L-glutámico con bajo pH ha sido usado para extraer y neutralizar grupos aldehídos del tejido tratado, mejorando la habilidad de dichos tejidos para soportar el crecimiento de células endoteliales. Otros tratamientos han incluido el uso de protamina, difosfonatos y ácido homocisteico. Para reducir la citotoxicidad del andamio se realizó un tratamiento con glicina para desactivar los grupos aldehídos residuales. También se cambió el entrecruzador por CDI y se realizaron los cultivos para comparar el crecimiento celular de los tres andamios.

En la figura 28a y 28b se observa la citotoxicidad del andamio entrecruzado con glutaraldehído al día 4 del cultivo. Esta citotoxicidad afecta tanto a las células que se adhirieron al andamio como a las que no se adhirieron. Estos andamios al ser de mayor área presentaron una mayor adhesión al día 1 comparado con los otros dos pero su citotoxicidad se hizo presente a este día de cultivo

presentando una menor actividad mitocondrial que los controles incluso en la suma de las células adherentes y no adherentes. Por otro lado, los andamios no entrecruzados y entrecruzados con CDI no presentaron citotoxicidad en las células adherentes y no adherentes. Sorprendentemente, estos andamios no solo soportaron la adhesión y proliferación celular sino que también mejoraron el crecimiento de estas. En ambas figuras (28a y 28b) se observa una mayor absorbancia en la suma de las células que estaban dentro del pozo con los andamios comparados con la absorbancia obtenida en los controles.

a)



b)

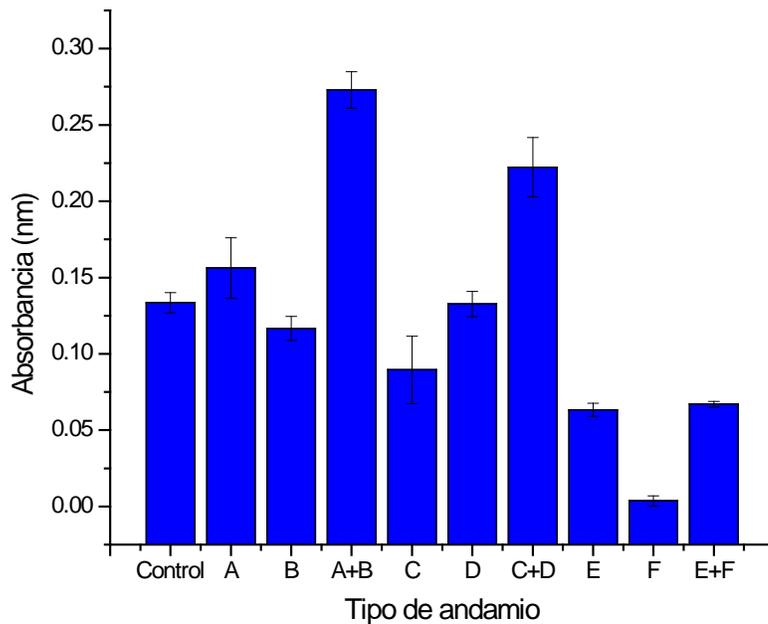
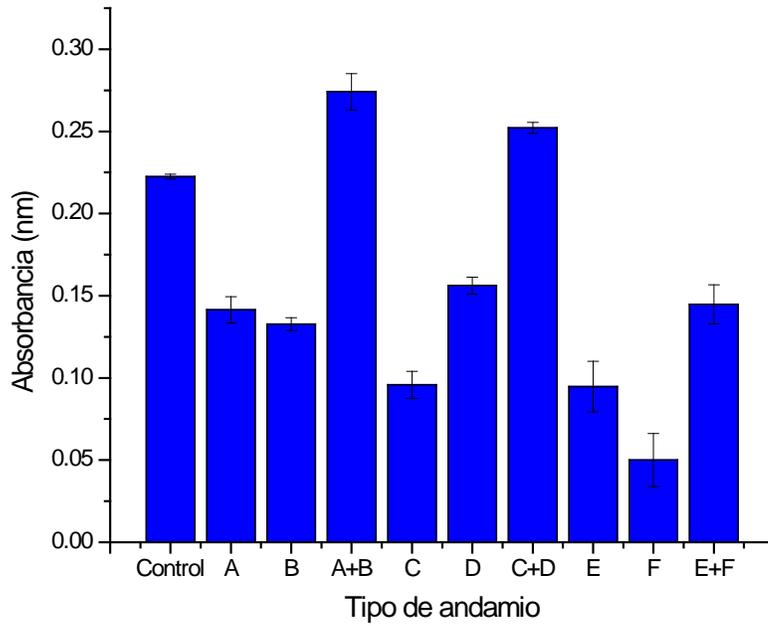


Figura 25. Proliferación celular de a) queratinocitos humanos y b) fibroblastos humanos dentro de los andamios sintetizados al día cuatro del cultivo. (A) Células proliferantes en la superficie del andamio no entrecruzado, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con CDI, (D) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (F) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído.

La figura 29a y 29b muestran el crecimiento celular al día 7 después de iniciado el cultivo dentro de los andamios. El andamio entrecruzado con glutaraldehído presenta un crecimiento menor comparado con los controles en ambos casos. Los andamios no entrecruzados y entrecruzados con CDI continuaron mostrando un mayor crecimiento celular que los controles en ambos casos.

a)



b)

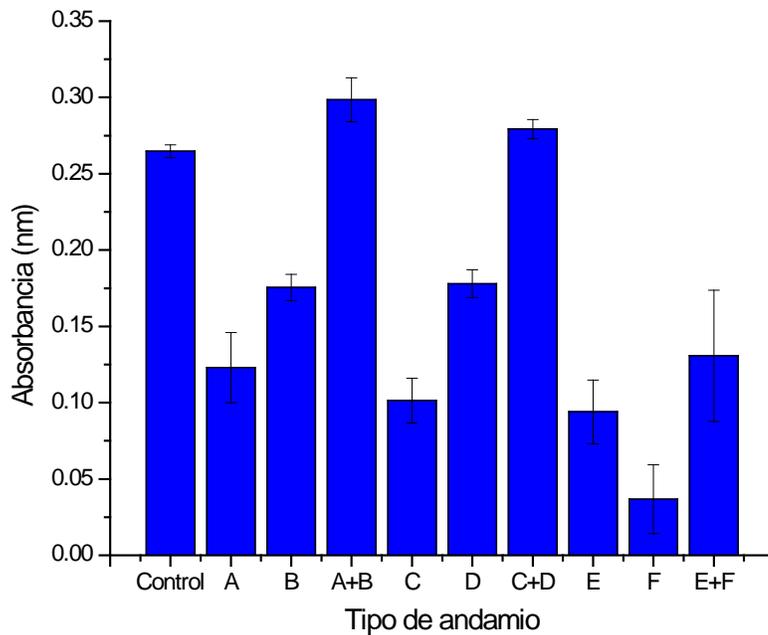
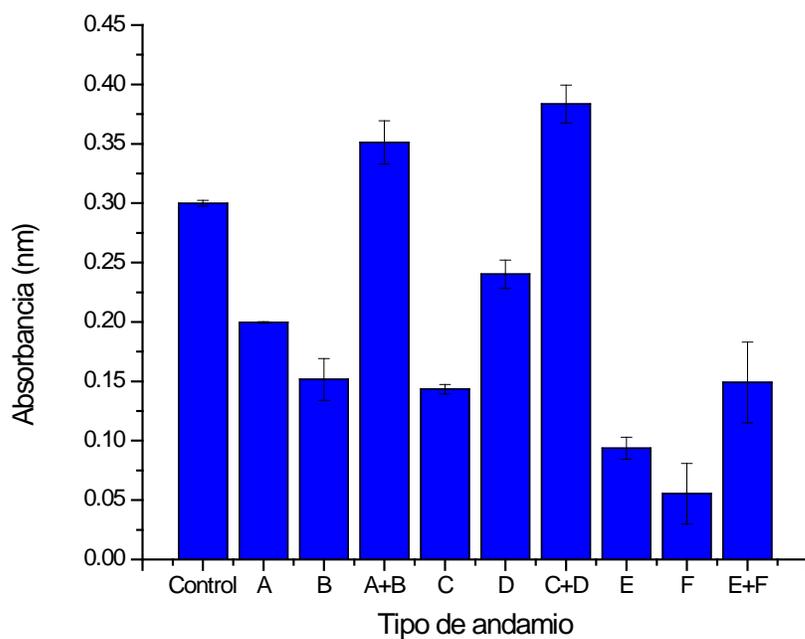


Figura 26. Proliferación celular de a) queratinocitos humanos y b) fibroblastos humanos dentro de los andamios sintetizados al día siete del cultivo. (A) Células proliferantes en la superficie del andamio no entrecruzado, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con

CDI, (D) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído.

Al día quince del cultivo celular las absorbancias continuaron mostrando un comportamiento similar a las mediciones anteriores. A este día, las células en contacto con los grupos aldehído continuaban sin crecer pero mantenían casi la misma absorbancia de días anteriores. El andamio no entrecruzado presentó un marcado crecimiento comparado con el control. Los andamios entrecruzados con CDI, a pesar de en días anteriores haber mostrado un mayor crecimiento que el control este era menor al que tenía el andamio no entrecruzado, en esta medición su crecimiento fue mayor al de los andamios no entrecruzados para los dos tipos de células (figura 30a y 30b).

a)



b)

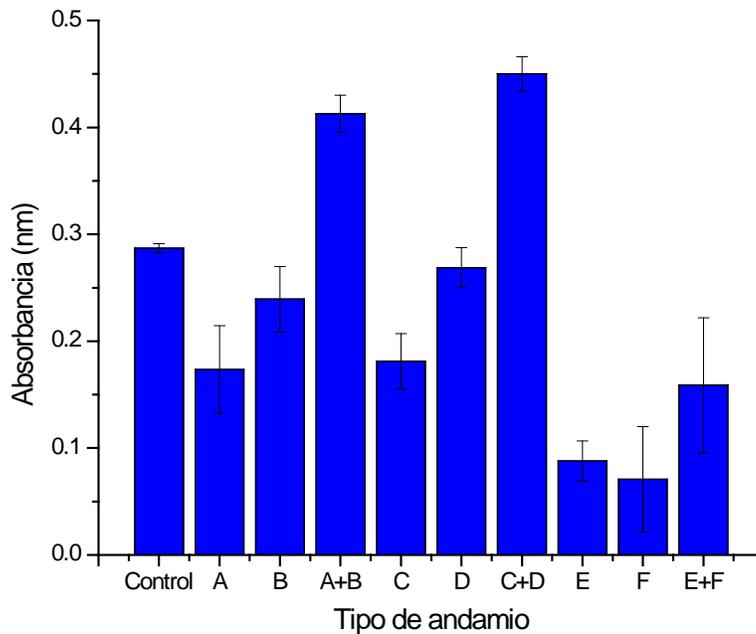


Figura 27. Proliferación celular de a) queratinocitos humanos y b) fibroblastos humanos dentro de los andamios sintetizados al día quince del cultivo. (A) Células proliferantes en la superficie del andamio no entrecruzado, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con CDI, (D) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (F) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído.

En el día quince de cultivo se observó por microscopía óptica los cristales de formazan sintetizados por las células durante el ensayo MTT para observar a las células dentro del andamio (figura 31).

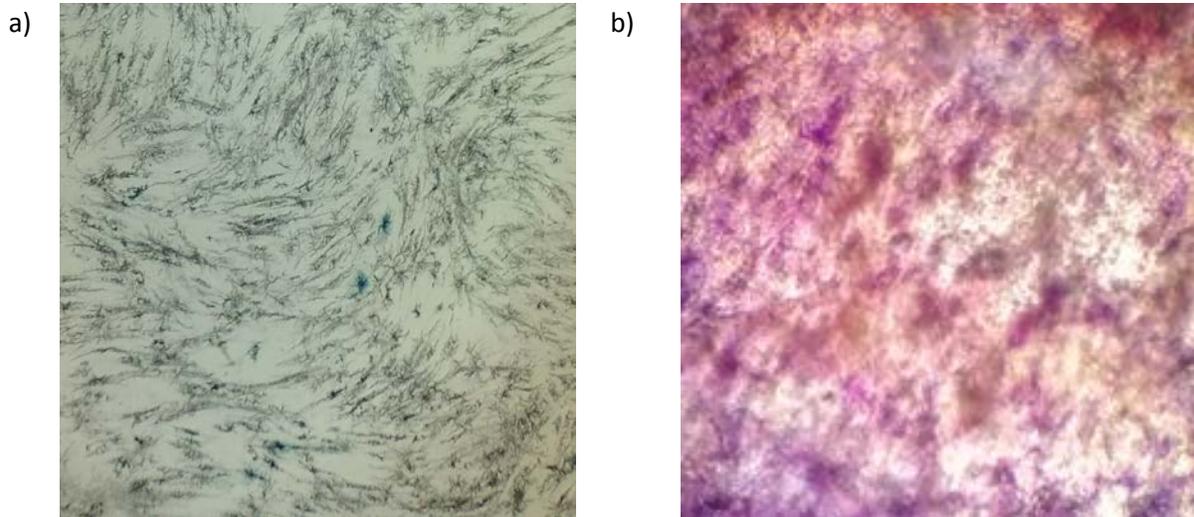
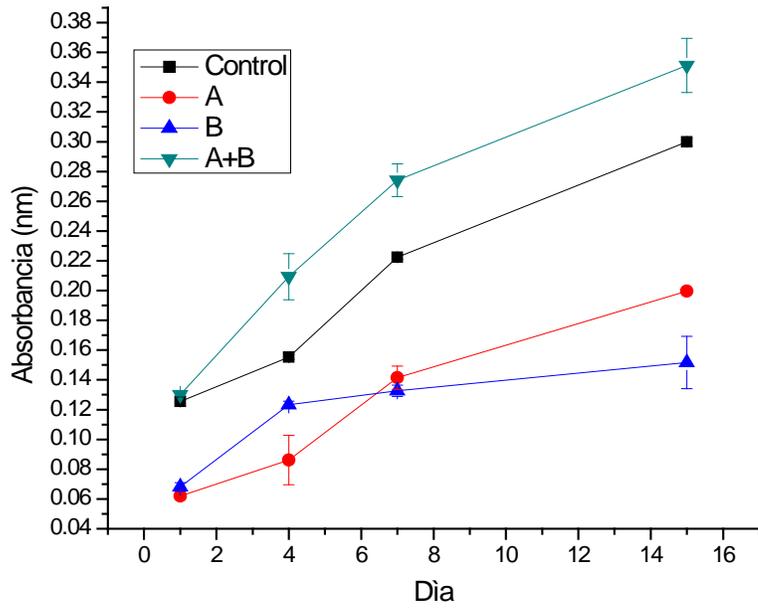


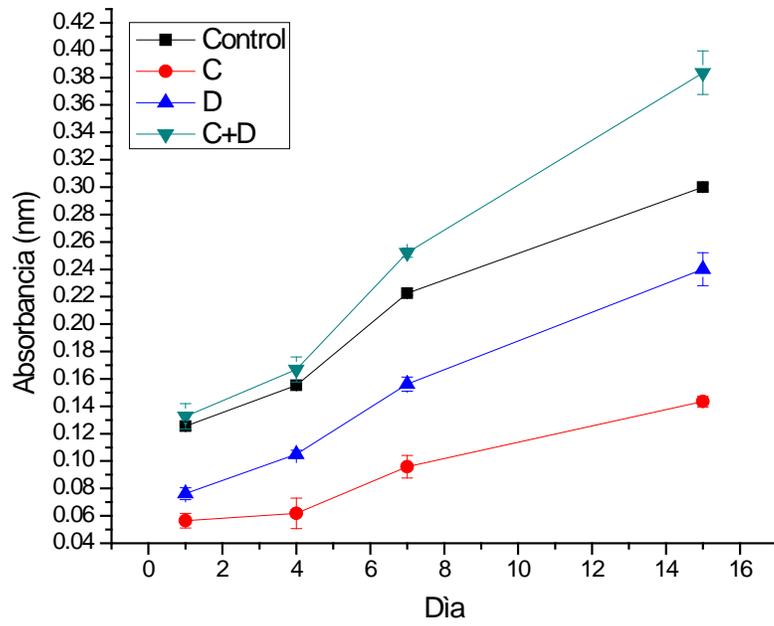
Figura 28. Microscopias ópticas de los cristales de formazan en a) los pozos control y b) dentro de los andamios.

Para observar como fue el crecimiento de las células en cada andamio por el periodo de cultivo se realizaron las cinéticas de cada uno. La figura 32 muestra el crecimiento de las células en cada andamio. En los queratinocitos y fibroblastos hubo citotoxicidad por parte del andamio entrecruzado por glutaraldehído. En los andamios no entrecruzados y los entrecruzados con CDI hubo un crecimiento marcadamente mayor después del día siete. En ambas células para el día quince hubo mayor crecimiento en el andamio entrecruzado con CDI, siendo este el que presento mejores propiedades mecánicas y una mayor velocidad de crecimiento.

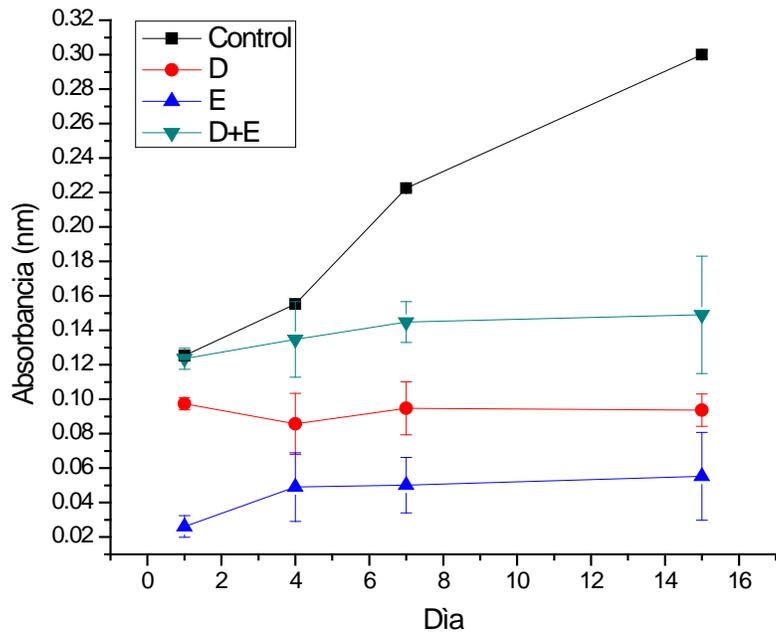
a)



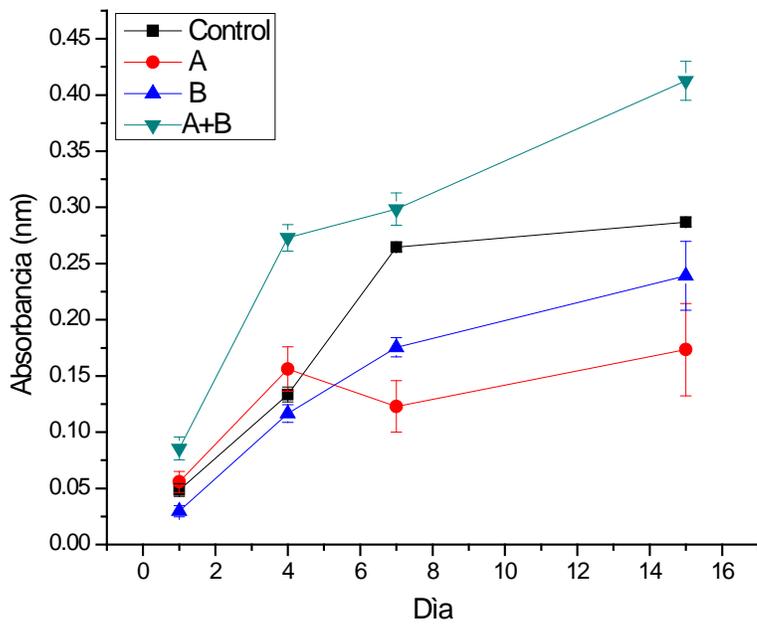
b)



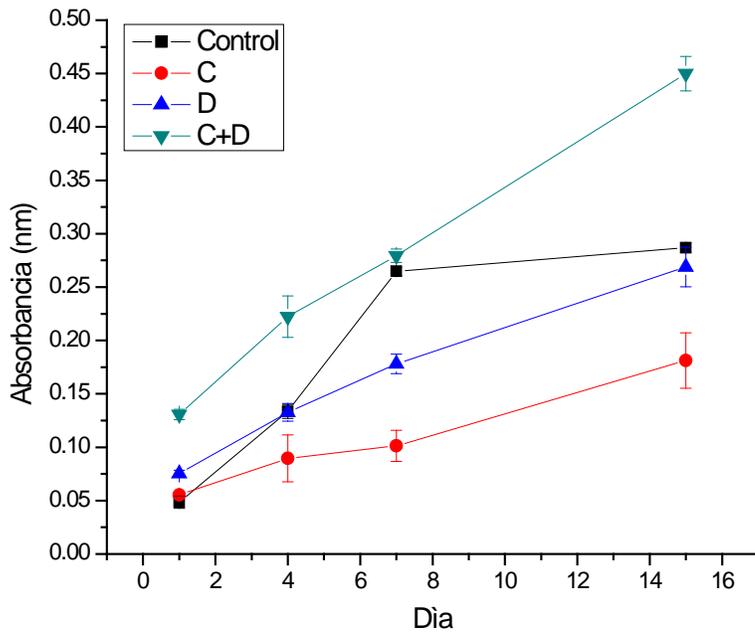
c)



d)



e)



f)

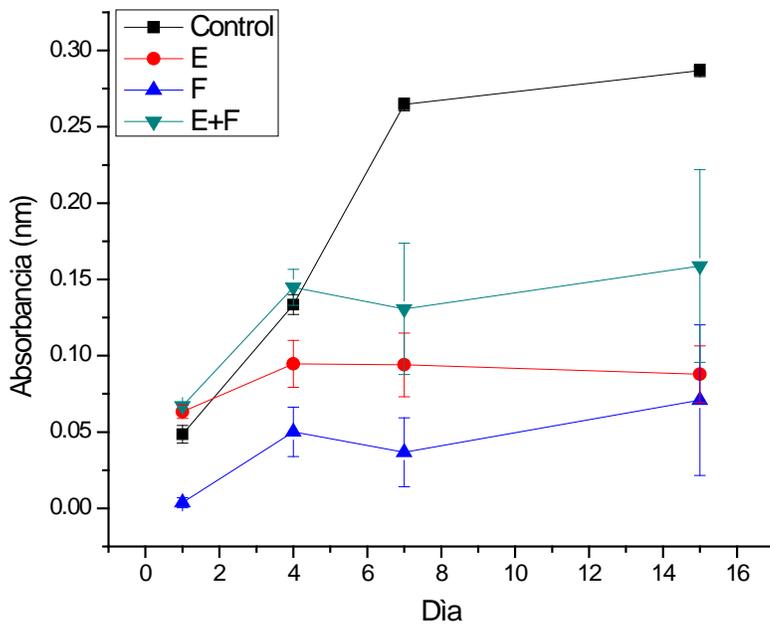


Figura 29. Cinéticas de crecimiento celular dentro de los andamios. a) Queratinocitos en el andamio no entrecruzado, b) Queratinocitos en el andamio entrecruzado con CDI, c) Queratinocitos en el andamio entrecruzado con glutaraldehido, d) Fibroblastos en el andamio no entrecruzado, e) Fibroblastos en el andamio entrecruzado con CDI, f) Fibroblastos en el andamio

entrecruzado con glutaraldehído. (A) Células proliferantes en la superficie del andamio no entrecruzado, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio no entrecruzado, (C) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con CDI, (D) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con CDI, (E) células proliferantes en la superficie del andamio entrecruzado con glutaraldehído, (B) células proliferantes en la superficie del pozo donde se encontraba el andamio entrecruzado con glutaraldehído.

6.6.2. Caracterización morfológica por SEM

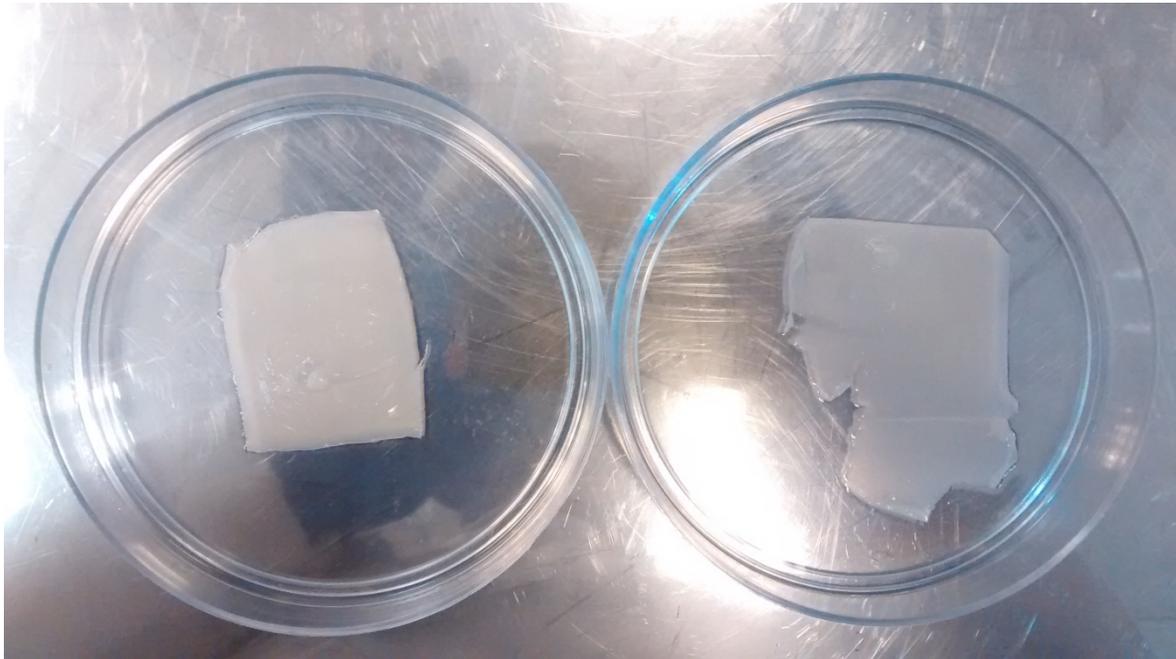


Figura 30. Sustitutos de piel de ingeniería de tejidos desarrollados.

7. CONCLUSIONES

- Experimentalmente se determinó que dentro de los parámetros estudiados con la metodología de superficie de respuesta se pueden obtener nanofibras de gelatina con diámetros promedio que van desde los 76 nm hasta los 840 nm.
- Las bajas concentraciones de polímero causan la aparición de cuentas dentro de la formación de fibras y esto reduce la uniformidad de la red.
- Los parámetros que menos afectan en la formación de nanofibras según el ANOVA, fueron el voltaje y la distancia de la punta de la aguja al colector y el más significativo fue la concentración ($p < 0.05$). Haciendo comparaciones con otros trabajos de determino que la significancia de los parámetros puede variar dependiendo del polímero que sea tratado.
- A partir de las gráficas de superficie de respuesta se determinó que el diámetro promedio de las nanofibras de gelatina aumenta al incrementar la concentración de esta en la solución.
- El diámetro menor de las nanofibras se puede obtener a una concentración del 10% de gelatina en la solución y a un flujo de 4mL/h.
- Las nanofibras más apropiadas para un sustituto de piel se obtienen a una concentración de 13 % de gelatina.
- El modelo obtenido simula correctamente el proceso de electrospinning de gelatina y puede ser útil para encontrar los parámetros adecuados para diferentes diámetros de manera teórica para simplificar el trabajo.
- Por 1 Kg de piel de animal se obtienen 438.6 g (43.86%p/p) de colágeno húmedo y 14.5 g de colágeno liofilizado seco (1.45% p/p) con el procedimiento de extracción realizado.
- El colágeno extraído se electrohilo exitosamente presentando un diámetro promedio mayor al de la gelatina. El diámetro puede ser reducido disminuyendo la concentración de colágeno y manteniendo constantes los otros parámetros.
- La síntesis de fibras de elastina por electrospinning no se logró en este trabajo. Se obtuvo la formación de fibras con la combinación de la elastina con los biopolímeros ya electrohilados. En combinación se observó una disminución en el diámetro de las nanofibras.
- Se logró el entrecruzamiento del andamio de nanofibras de colágeno y elastina con glutaraldehído para así mejorar sus propiedades mecánicas y disminuir su tasa de degradación.
- La evaluación al día uno del cultivo celular dentro de los andamios mostro una buena adhesión en todos los tipos de andamios.

- El área del andamio influyo en la cantidad de células adheridas, los andamios con menos área tuvieron menos células adherentes comparados con los de mayor área en donde casi se obtuvo una adherencia total.
- Los andamios entrecruzados con glutaraldehido presentaron una alta citotoxicidad y baja proliferación celular.
- Los andamios no entrecruzados y entrecruzados con CDI no presentaron citotoxicidad en las células adherentes y no adherentes.
- Los andamios no entrecruzados y entrecruzados con CDI no solo soportaron la adhesión y proliferación celular sino que también mejoraron el crecimiento de estas comparadas con los controles.
- En ambas células para el día quince hubo mayor crecimiento en el andamio entrecruzado con CDI, siendo este el que presento mejores propiedades mecánicas y una mayor velocidad de crecimiento. Estas pruebas indican que este andamio es el apropiado para ser utilizado como sustituto de piel el cual no solo presenta buenas propiedades mecánicas sino que también incrementa la reproducción de las células presentes en la piel. Este incremento en el crecimiento podría proporcionar un cierre de la herida más rápido y el arreglo de las fibras más ordenado y uniforme produciría una cicatrización menos evidente asemejando al tejido no afectado por una herida.

8. BIBLIOGRAFIA

Raymund E. Horch, Future perspectives in tissue engineering, *J. Cell. Mol. Med.* Vol 10, No 1, 2006 pp. 4-6

QUYNH P. PHAM, UPMA SHARMA and ANTONIOS G. MIKOS, Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review, *TISSUE ENGINEERING* Volume 12, Number 5, 2006

Sheila MacNeil, Biomaterials for tissue engineering of skin, *Materials today* MAY 2008 | VOLUME 11 | NUMBER 5

Sophie Böttcher-Haberzeth, Thomas Biedermann, Ernst Reichmann, Tissue engineering of skin, *burns* 36 (2010) 450–460

Anthony D Metcalfe and Mark W.J Ferguson, Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration, *J. R. Soc. Interface* 2007, 22 June 2007

Mengyan Li, Mark J. Mondrinos, Milind R. Gandhi, Frank K. Ko, Anthony S. Weiss, Peter I. Lelkes, Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, *Biomaterials* 2005

Scott A. Sell, Michael J. McClure, Koyal Garg, Patricia S. Wolfe, Gary L. Bowlin, Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1007–1019

L. Macri, R.A.F. Clark, Tissue Engineering for Cutaneous Wounds: Selecting the Proper Time and Space for Growth Factors, Cells and the Extracellular Matrix, *Skin Pharmacol Physiol* 2009;22:83–93

Teo WE y Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, 2006 17: 89–106. DOI: 10.1088/0957-4484/17/14/R01.

S.B. Mitchell, J.E. Sanders, A unique device for controlled electrospinning, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, DOI 10.1002/jbm.a

www.syringepump.com

Mina Yazdanpanaha, MohammadReza Khanmohammadia, Ruhollah Mehdiavaz Aghdamb, Keyvan Shabanib and Masoud Rajabia, Optimization of electrospinning process of poly(vinyl alcohol) via response surface methodology (RSM) based on the central composite design, *Current Chemistry Letters* 3 (2014) 175–182.

Yung Kai Lin, Deng Cheng Liu, Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet, *Food Chemistry* 94 (2006) 621–625

Castro Vargas, Obtención de colágeno a partir de crestas de pollos, 2012.

Heather M. Powell, Steven T. Boyce, EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability, *Biomaterials* 27 (2006) 5821–5827.

Jelena Rnjak-Kovacina, Steven G. Wise, Zhe Li, Peter K.M. Maitz, Cara J. Young, Yiwei Wang, Anthony S. Weiss, Electrospun synthetic human elastin:collagen composite scaffolds for dermal tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 3714–3722.

Primary Dermal Fibroblasts; Normal, Human, Adult (ATCC® PCS-201-012™)

Primary Epidermal Keratinocytes; Normal, Human, Adult (ATCC® PCS-200-011™)

Begüm Zeybeka, Mert Dumanb, Aylin Şendemir Ürkmeza, Electrospinning of nanofibrous polycaprolactone (PCL) and collagen-blended polycaprolactone for wound dressing and tissue engineering, *Usak University Journal of Material Sciences* 1 (2014) 121 – 134

Ying-Hui Shana, Li-Hua Penga, Xin Liub, Xi Chena, Jie Xiongb, Jian-Qing Gaoa, Silk fibroin/gelatin electrospun nanofibrous dressing functionalized with astragaloside IV induces healing and anti-scar effects on burn wound, *International Journal of Pharmaceutics* 479 (2015) 291–301

Mengyan Li, Mark J. Mondrinos, Xuesi Chen, Milind R. Gandhi, Frank K. Ko, Peter I. Lelkes, Co-electrospun poly(lactide-co-glycolide), gelatin, and elastin blends for tissue engineering scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, DOI 10.1002/jbm.a

Álvarez-Longoria J, Flores-Ochoa M, Hernández-García R, Martínez-Menchaca HR, Escamilla-Ocañas CE, Rivera-Silva G, Una segunda piel: tratamiento con sustitutos dérmicos, *Revista Médica MD*, Vol 4(1), 2012.

www.inr.gob.mx

Reneker, D.H., and Chun, I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 7, 216, 1996.

Doshi, J., and Reneker, D.H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J. Electrostat.* 35, 151, 1995.

Li, D., and Xia, Y.N. Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning. *Nano. Lett.* 4, 933, 2004.

Kim, B., Park, H., Lee, S.H., and Sigmund, W.M. Poly(acrylic acid) nanofibers by electrospinning. *Mater. Lett.* 59, 829, 2005.

Shin, Y.M., Hohman, M.M., Brenner, M.P., and Rutledge, G.C. Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer* 42, 9955, 2001.

Mit-Uppatham, C., Nithitanakul, M., and Supaphol, P. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. *Macromol. Chem. Phys.* 205, 2327, 2004.

Casper, C.L., Stephens, J.S., Tassi, N.G., Chase, D.B., and Rabolt, J.F. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* 37, 573, 2004.

Langer, R., and Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science* 260, 920, 1993.

Morris, R. J. & Potten, C. S. 1994 Slowly cycling (labelretaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell Prolif.* 27, 279–289.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331–44.

Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 1981;211:1052–4.

Chang Seok Kia, Doo Hyun Baeka, Kyung Don Ganga, Ki Hoon Leea, In Chul Umb, Young Hwan Parka, Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution, *Polymer* 46 (2005) 5094–5102

O.S. Yördem 1, M. Papila, Y.Z. Mencilođlu, Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology, *Materials and Design* 29 (2008) 34–44

Myer, R. H., Montgomery, D. C., & Cook, C. M. A. (2002) *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. NJ, USA: 2nd ed., John Wiley and Sons Inc.,

Yung Kai Lin, Deng Cheng Liu, Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet, *Food Chemistry* 94 (2006) 621–625.

S. Cliche, J. Amiot, C. Avezard, and C. Gariepy, Extraction and Characterization of Collagen with or Without Telopeptides from Chicken Skin, 2003 *Poultry Science* 82:503–509

Mengyan Lia, Mark J. Mondrinosa, Milind R. Gandhia, Frank K. Kob, Anthony S. Weissc, Peter I. Lelkesa, Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, *Biomaterials*] (]]]])]]]–]]]

Jelena Rnjak-Kovacina , Steven G. Wise , Zhe Li , Peter K.M. Maitz, Cara J. Young, Yiwei Wang, Anthony S. Weiss, Electrospun synthetic human elastin:collagen composite scaffolds for dermal tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 3714–3722

Heather M. Powella, Steven T. Boycea, EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability, *Biomaterials* 27 (2006) 5821–5827

Kyong Su Rhoa, Lim Jeongb, Gene Lee, Byoung-Moo Seo, Yoon Jeong Parka, Seong-Doo Hong, Sangho Roh, Jae Jin Cho, Won Ho Park, Byoung-Moo Min, Electrospinning of collagen nanofibers:

Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing, *Biomaterials* 27 (2006) 1452–1461

Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 2002;3:232–8.

Sang Jin Lee, James J. Yoo, Grace J. Lim, Anthony Atala, Joel Stitzel, In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* DOI 10.1002/jbm.a

Byung-Moo Min, Gene Leea So Hyun Kim, Young Sik Nam, Taek Seung Lee, Won Ho Park , Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials* 25 (2004) 1289–1297.

John Bustamante Osorno, *Biomateriales de uso cardiovascular, MÉDICAS UIS* 2007; 20:53-59