



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Fabricación de andamios con polímeros de policaprolactona y quitosano
mediante electrohilado y su caracterización**

Campaña Lujé, Hitler Alexis

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Seqqat, Rachid, PhD.

26 de enero del 2022



Trabajo de titulación Hitler Alexis Campaña Luje .pdf

Scanned on: 0:16 January 26, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	18
Words with Minor Changes	12
Paraphrased Words	47
Ommited Words	0



Firmado electrónicamente por:
RACHID SEQQAT



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Fabricación de andamios con polímeros de policaprolactona y quitosano mediante electrohilado y su caracterización**” fue realizado por el señor **Campaña Luje, Hitler Alexis** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de enero del 2022



Firmado electrónicamente por:
RACHID SEQQAT .

Dr. Rachid Seqqat, Ph.d.

C.C. 17156503221



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Campaña Luje, Hitler Alexis**, con C.C. **1715988281**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Fabricación de andamios con polímeros de policaprolactona y quitosano mediante electrohilado y su caracterización”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de enero del 2022

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del autor, Campaña Luje, Hitler Alexis. La firma está sobre una línea horizontal punteada.

Campaña Luje, Hitler Alexis

C.C.: 1715988281



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Campaña Luje, Hitler Alexis**, con C.C. 1715988281, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Fabricación de andamios con polímeros de policaprolactona y quitosano mediante electrohilado y su caracterización”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 27 de enero del 2022

Firma:

Campaña Luje, Hitler Alexis

C.C.: 1715988281

Dedicatoria

Para mis padres Carlos Campaña y Margarita Lujé, quienes siempre me alentaron a ser mejor. Es gracias a su arduo sacrificio que pude culminar este logro.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi padre Carlos, a quien le debo en parte mi amor por la ciencia y a quien considero mi primer profesor y amigo.

A mi madre, que con su continuo esfuerzo, dedicación y amor ha sacado adelante la familia, siendo el pilar de nuestra familia. Sin ella ningún logro mío sería posible.

A mi hermana Isabel, por siempre cuidar de mí como una segunda madre. Gracias por siempre estar para mí.

A todos mis amigos que he conocido a lo largo de esta trayectoria: Anita, Yady, Cesar, Renato, Michelle, Olguita, Soledad, Neo, y Alejandro quienes han hecho de mi tiempo en la universidad un recuerdo preciado y que, a pesar de haber tomado caminos distintos con la mayoría, han dejado su huella que siempre atesorare.

A Víctor y Fabricio, a quienes más que amigos considero hermanos, los momentos vividos juntos desde los buenos hasta los no tan buenos no los cambiaría por nada. Espero poder seguir siendo vuestro amigo y compartiendo aventuras por mucho más tiempo.

A Nathaly, por su cariño, apoyo y optimismo siempre has sabido sacar lo mejor de mí, te has convertido inesperadamente en mi mejor amiga y confidente. Gracias a ti he tenido momentos inolvidables durante esta etapa de mi vida y he podido crecer como persona.

A Rachid Seqqat Ph.d. director de mi proyecto por su guía y compartir sus conocimientos conmigo. Gracias por su apoyo a lo largo de este trabajo.

A Marbel Torres Ph.d., por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto y toda la paciencia que ha tenido a lo largo del desarrollo del mismo.

Al Ing. Narváez, Ing. Alex, Dr. Debut y Ing. Alfredo por todos sus conocimientos compartidos y colaboración con el proyecto.

Índice de contenidos

Índice de tablas	11
Índice de figuras.....	12
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción	16
Antecedentes.....	16
Justificación del problema.....	17
Objetivos del trabajo de titulación	19
<i>Objetivo general</i>	19
<i>Objetivos específicos</i>	19
Hipótesis.....	19
Capítulo II: Marco teórico	20
Andamios	20
<i>Propiedades de los andamios</i>	21
<i>Tipos de andamios</i>	23
<i>Aplicaciones de los andamios</i>	24
<i>Fabricación de andamios</i>	26
Polímeros como biomateriales para andamios	33
<i>Policaprolactona</i>	35
<i>Quitosano</i>	36
Fabricación de andamios mediante electrohilado	37
Preparación de las soluciones poliméricas.....	37

	10
Electrohilado con bombeador de jeringa automático	37
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	38
Cultivo celular sobre los andamios	39
Esterilización de los andamios	39
Proliferación de la línea celular HEK 293T	39
Plaqueo.....	40
Observación de células HEK 293T por microscopía confocal de fluorescencia	40
Análisis estadístico.....	41
Capítulo IV: Resultados.....	42
Fabricación de andamios mediante electrohilado	42
Medición de los diámetros de las nanofibras con ImageJ	46
Adhesión celular	47
Capítulo VI: Discusión	50
Capítulo VII: Conclusiones	55
Capítulo VIII: Recomendaciones	56
Referencias.....	57

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Tamaño del poro requerido según el tipo de célula</i>	22
Tabla 2. <i>Tipos de andamios y sus aplicaciones</i>	23
Tabla 3. <i>Aplicaciones biomédicas de andamios con ejemplos de patentes existentes</i>	25
Tabla 4. <i>Listado de algunos polímeros con aplicaciones biomédicas aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)</i>	33
Tabla 5. <i>Cantidades para la preparación del medio de tinción con DAPI y PI</i> .	41
Tabla 6. <i>Condiciones de electrohilado de las nanofibras de quitosano y PCL</i> .	44
Tabla 7. <i>Rango de distribución de los diámetros y diámetro promedio de las nanofibras de quitosano y PCL</i>	46
Tabla 8. <i>Rango de distribución de las áreas celulares y área celular promedio adherido a las nanofibras de quitosano y PCL</i>	49

Índice de figuras

Figura 1. <i>Fabricación de andamios por liofilización.....</i>	27
Figura 2. <i>Fabricación de andamios por fundición con disolvente y lixiviación .</i>	28
Figura 3. <i>Fabricación de andamios por espumado con gas.....</i>	28
Figura 4. <i>Fabricación de andamios por espumado con gas.....</i>	29
Figura 5. <i>Fabricación de andamios por estereolitografía</i>	30
Figura 6. <i>Fabricación de andamios por sinterización selectiva por láser.....</i>	31
Figura 7. <i>Fabricación de andamios por bioimpresión.....</i>	31
Figura 8. <i>Fabricación de andamios por electrohilado.....</i>	32
Figura 9. <i>Esquema del proceso de electrohilado de las nanofibras</i>	38
Figura 10. <i>Fotos de microscopio de barrido electrónico a escala 5 μm de nanofibras de quitosano/PVA con beads.....</i>	42
Figura 11. <i>Fotos de microscopio de barrido electrónico de nanofibras de quitosano/PVA al 3% con PVA 7% 1:3.....</i>	43
Figura 12. <i>Fotos de microscopio de barrido electrónico de nanofibras de PCL al 10%.....</i>	44
Figura 13. <i>Fotos de microscopio de barrido electrónico de nanofibras de quitosano/PVA sobre las microfibras de gas quirúrgica.....</i>	45
Figura 14. <i>Histograma de distribución de los diámetros de nanofibras de quitosano y PCL.....</i>	46
Figura 15. <i>Fotos de microscopio de fluorescencia con lente 40x del cultivo de células HEK 293T sobre los andamios.....</i>	47
Figura 16. <i>Fotos de microscopio confocal a vista 40x μm del cultivo de células HEK 293T sin andamios y sobre andamios de PCL y quitosano</i>	48

Figura 17. *Histograma de distribución de las áreas celulares adheridas sobre los andamios de quitosano y PCL 49*

Resumen

La ingeniería de tejidos tiene como principal función el generar sustitutos de tejidos para el tratamiento de tejidos dañados u órganos, teniendo aplicaciones en diversos tejidos como el cutáneo, óseo, cartilagosos, tendón/ligamento o tejidos cardiovasculares. Para el tratamiento de los diversos tejidos se ha hecho uso de los andamios que corresponden a estructuras tridimensionales o hidrogeles móviles que cumplen con la finalidad de brindar un soporte físico para el desarrollo de los tejidos. El presente trabajo tuvo como finalidad fabricar andamios con polímeros de policaprolactona (PCL) y quitosano mediante la técnica de electrohilado y su caracterización. La caracterización de los andamios se realizó mediante microscopía de barrido electrónico y posteriormente se realizó un cultivo celular de células HEK 293T por 24 horas sobre los andamios de quitosano y PCL. La síntesis de las nanofibras de quitosano se realizó en conjunto con el polímero de alcohol polivinílico (PVA). Los resultados indicaron que se generó nanofibras uniforme libre de grumos con una concentración de quitosano 3 % p/v y PVA 7 % p/v en proporción 1:3 respectivamente mientras que las nanofibras de PCL se generaron con una solución al 10 % p/v. Los andamios de quitosano/PVA presentaron un diámetro promedio de 123.9 nm mientras que los andamios de PCL un diámetro promedio mayor de 1231.6 nm. Finalmente se obtuvo una adherencia celular mayor sobre los andamios de quitosano debido a su nanofibras de menor diámetro y carácter hidrofílico en comparación a la adherencia celular sobre los andamios de PCL.

Palabras clave:

- **ELECTROHILADO**
- **BEADS**
- **ADHERENCIA CELULAR**

Abstract

The main function of tissue engineering is to generate tissue substitutes for the treatment of damaged tissues or organs, with applications in various tissues such as skin, bone, cartilage, tendon/ligament or cardiovascular. For the treatment of different tissues, scaffolds have been used, which correspond to three-dimensional structures or mobile hydrogels that fulfill the purpose of providing a physical support for the development of the tissues. The aim of this work was to fabricate scaffolds with polycaprolactone (PCL) and chitosan polymers using the electrospinning technique and to characterize them. The characterization of the scaffolds was performed by scanning electron microscopy, followed by cell culture of HEK 293T cells for 24 hours on the chitosan and PCL scaffolds. The synthesis of chitosan nanofibers was in conjunction with polyvinyl alcohol (PVA) polymer. The results indicated that uniform bead-free nanofibers were generated with a concentration of chitosan 3 % w/v and PVA 7 % w/v at 1:3 ratio respectively while PCL nanofibers were generated with 10 % w/v solution. The chitosan/PVA scaffolds presented an average diameter of 123.9 nm while the PCL scaffolds presented a larger average diameter of 1231.6 nm. Finally, a higher cell adhesion was obtained on chitosan scaffolds due to their smaller diameter nanofibers and hydrophilic character compared to cell adhesion on PCL scaffolds.

Keywords:

- **ELECTROSPINNING**
- **BEADS**
- **CELL ADHESION**

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

La ingeniería de tejidos o medicina regenerativa desarrolla sustitutos biológicos para mejorar las funciones de los tejidos o restaurar tejidos y órganos. Al ser la ingeniería de tejidos un área multidisciplinaria, varias áreas han contribuido a su evolución como la biología celular o ingeniería de materiales (Chaudhari et al., 2016). El campo de la ingeniería de tejidos busca solucionar problemas relacionados al daño de tejidos por enfermedades o traumas, rechazo de los tejidos en trasplantes y escasez del tejido donante (Bakhshayesh et al., 2018).

Varios hitos han ayudado a la evolución de la medicina regenerativa a lo largo del tiempo, tenemos como ejemplo los injertos los cuales fueron un pilar importante para la ingeniería de tejidos en donde los estudios realizados en animales y de manera clínica por el cirujano Johann Friedrich Dieffenbach (1792-1847) dieron origen a este concepto (Meyer, 2009), luego se desarrollaron técnicas para la conservación de células y tejidos. Howard Green y colegas en la Facultad de medicina de Harvard desarrollaron técnicas para proliferar células de la epidermis obtenidos a partir de una biopsia, los queratinocitos proliferaron mediante el cultivo con una capa de alimentaria hecha de células mesenquimales de ratón, el resultado fue uno de los primeros productos de ingeniería tisular (Berthiaume et al., 2011).

En 1970 el Dr. W. T. Green pediátrico del Hospital Infantil de Boston llevó estudios para a partir de condrocitos cultivados en espículas de hueso e implantados en ratones generar nuevo cartílago. No se obtuvieron resultados óptimos, pero se concluyó que mediante el uso de biomateriales se podría generar andamios donde cultivar células para generar nuevos tejidos. Posteriormente el Dr. John Burke del Hospital General de Massachusetts en conjunto con el Dr. Iannas Yannos del MIT generaron un sustituto de piel mediante el crecimiento de fibroblastos utilizando una

matriz de soporte de colágeno. Ya en 1980 el Dr. Joseph Vacanti tuvo el enfoque de cultivar células viables en redes de polímeros sintéticos formando andamios que fueran biocompatibles y biodegradables (Vacanti, 2006).

La finalidad de los andamios es proporcionar un microambiente que simula condiciones *in vivo* para la incorporación de las células o de factores de crecimiento (Rahmani Del Bakhshayesh et al., 2018). Estos andamios deben de poseer el soporte mecánico, estímulos físicos y químicos para que las células puedan adherirse y proliferar de manera óptima. Existen varios métodos para la fabricación de los andamios como la lixiviación de sales, separación de fases, liofilización, impresión en 3D o electrohilado (Loh & Choong, 2013).

Justificación del problema

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, capaz de estimular la regeneración en casos de heridas; pero en casos de heridas graves como quemaduras el proceso de cicatrización no se da en una forma óptima. Como solución a estas se opta por los injertos de piel para el tratamiento sin embargo este presenta varios problemas como es que en muchos casos crónicos las heridas no se curan llevando a posibles amputaciones o fallecimientos, en procedimientos operatorios para injertos de piel existe una limitada disponibilidad de tejido donante y riesgos a infecciones o rechazo inmunológico (Vig et al., 2017).

Como respuesta a la problemática se propone el uso de la ingeniería de tejidos ya que tiene la capacidad de restaurar o reparar tejidos dañados mediante el uso de andamios biodegradables generados a partir de polímeros sintéticos o naturales para la regeneración de tejidos. Un andamio ideal debe cumplir con las características de promover la absorción del exudado, mejorar la epitelización y de inhibir el crecimiento de microorganismos infecciosos externos; como por ejemplo Dermograft™, que es un sustituto dérmico estéril, criopreservado, extraído de fibroblastos humanos, que se

produce mediante el cultivo de fibroblastos dérmicos neonatales en un andamio absorbible el cual se usa para reparaciones de úlceras de pie diabético (Wong et al., 2012), otro ejemplo de producto es Transcyte TM, un sustituto temporal de piel, hecho de membrana epidérmica de polímero sintético y fibroblastos usado para tratamiento de quemaduras de espesor parcial medio e intermedio. Ambos productos siendo ya aprobados su uso por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) (Kumar et al., 2004).

Varios polímeros se han propuesto como materia prima para la fabricación de los andamios como el quitosano o serina que son polímeros naturales que poseen una alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Kenry & Lim, 2017), o polímeros sintéticos como la policaprolactona (PCL) ya aprobado con varios usos biomédicos por la FDA (Wong et al., 2012).

La aplicación de andamios fabricados por electrohilado de igual forma se extiende a varios tejidos como la ingeniería de tejido óseo, cartilagosos, tendón/ligamento y cardiovasculares (Nemati et al., 2019). Adicionalmente los andamios también han servido como sistemas de entrega de fármacos a sitios específicos los cuales han sido agregados durante el proceso de electrohilado (Ye et al., 2019) y finalmente el uso de andamios para el estudio cultivo celular presentan la ventaja de imitar un entorno más cercano a condiciones *in vivo* a comparación del cultivo celular tradicional.

Por ello la propuesta de la fabricación de andamios a partir de PCL y quitosano mediante electrohilado resulta de interés para generar posibles sustitutos biológicos aplicables a terapias médicas, estableciendo un protocolo de elaboración mediante electrohilado el cual tiene la ventaja de ser un proceso relativamente simple en cuanto a manejo, barato, versátil y eficiente ya que permite obtener una gran cantidad de nanofibras a partir de poca materia prima (Khorshidi et al., 2016).

Objetivos del trabajo de titulación

Objetivo general

Fabricar andamios con polímeros de policaprolactona y quitosano mediante electrohilado y caracterizarlos.

Objetivos específicos

- Obtener nanofibras de policaprolactona y de quitosano mediante la técnica de electrohilado.
- Caracterizar los andamios de policaprolactona y quitosano mediante microscopía electrónica de barrido.
- Determinar la capacidad de adherencia celular a nivel *in vitro* sobre los andamios de policaprolactona y quitosano.

Hipótesis

La policaprolactona y quitosano pueden usarse como polímeros para la fabricación y caracterización de andamios.

Capítulo II: Marco teórico

Andamios

La ingeniería de tejidos genera sustitutos biológicos para mejorar las funciones de los tejidos o restaurar tejidos y órganos (Chaudhari et al., 2016). Los andamios en el área de ingeniería de tejidos hacen referencia a estructuras tridimensionales o hidrogeles móviles los cuales están diseñados con la finalidad de proporcionar el espacio físico para el desarrollo de nuevos tejidos, proporcionar soporte mecánico o también proporcionar factores solubles (Irvine et al., 2008).

Uno de los aspectos primordiales de los andamios es que deben proporcionar un microambiente similar a la matriz extracelular (MEC) *in vivo* en un espacio 3D aislado. Determinar que materiales que pueden emular las características de la matriz extracelular específica del tejido deseado son las principales consideraciones a la hora de fabricar andamios. La MEC está compuesta por varios factores de crecimiento, proteínas características y glicoproteínas; teniendo un papel básico en el control de la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular (Dutta et al., 2017).

Las características específicas de cada andamio dependen del tipo de tejidos que se necesita reparar ya sean tejidos duros o blandos, en la ingeniería de tejidos duros, los andamios biológicos se utilizan para rellenar los defectos óseos y deben ser capaces de soportar altas cargas para conducir el desarrollo de hueso (Bose et al., 2012). De igual forma siguiendo con ejemplo de la regeneración ósea, este depende de otras propiedades del andamio, como el tamaño, la forma, el grosor de la pared, la interconectividad y la superficie de la pared del poro del andamio, así como la cinética de absorción, la porosidad, la morfología de la superficie, la química de la superficie y la tasa de degradación (Eltom et al., 2019).

Propiedades de los andamios

Los andamios a fabricarse deben cumplir con características determinadas para su correcto funcionamiento tanto los andamios fabricados con polímeros naturales como con polímeros sintéticos. Algunas de estas características a tomarse en cuenta al rato de fabricar los andamios son su biodegradabilidad, porosidad, fuerza mecánica y técnica de fabricación entre algunos de los más importantes (Shick et al., 2019).

Biocompatibilidad. La biocompatibilidad de los materiales en el cuerpo humano juega un papel vital en la ingeniería de tejidos, ya que garantiza el uso seguro de los materiales en el cuerpo humano. Los andamios por ende deben ser biocompatibles, es decir, no deben producir ninguna respuesta inflamatoria a las células, ser extremadamente inmunogénicos o citotóxico para células, tejidos u órganos in vivo. De igual forma los productos resultantes de la degradación del andamio tampoco deben de ser dañinos para el cuerpo y poder ser absorbidos por el cuerpo humano (Cheung et al., 2007).

Biodegradabilidad. Los andamios biodegradables permiten que los componentes extracelulares fisiológicos reemplacen los tejidos biológicos sin dejar productos de degradación tóxicos. Su tasa de degradación debe coincidir con la tasa de regeneración del tejido nuevo para mantener la integridad estructural y proporcionar una transición suave de la transferencia de carga desde el andamio al tejido (Yusop et al., 2012).

Porosidad. Los poros se pueden definir como espacios vacíos dentro del andamio y la porosidad se puede considerar como un conjunto de poros. Existe una relación directa entre la porosidad y propiedades mecánicas de un andamio; por ejemplo una alta porosidad del 90 % puede proporcionar un mayor volumen para la infiltración celular al andamio y la formación de la matriz extracelular, sin embargo la integridad mecánica se ve reducida (Hutmacher et al., 2014). Los andamios utilizados

para la ingeniería de tejidos deben fabricarse en un rango de tamaño de poro de 50 a 900 μm y una porosidad de no menos del 70 %. Hay que considerar que la estructura porosa variará según el tipo de células o tejidos al cual va dirigido como se indica en la Tabla 1 (Shick et al., 2019).

Tabla 1.

Tamaño del poro requerido según el tipo de célula

Tamaño del poro (μm)	Tipo de célula
100-150	fibroblastos
100-400	diferenciación condrogénica
200-450	diferenciación osteogénica
75-750	regeneración de axones periféricos
20-50	crecimiento axonal y gliales
100	trasplante y diferenciación de células madres neuronales
50-200	células musculares lisas
<38	células endoteliales microvasculares

Nota. Adaptado de “Porosity parameters in biomaterial science: Definition, impact, and challenges in tissue engineering”, por M. Ebrahimi, 2021, *Frontiers of Materials Science*

Integridad mecánica. Cuando se implanta en el cuerpo, el andamio debe soportar la estructura interna de la matriz celular recién formada. Por lo tanto, debe mantener la resistencia mecánica del órgano que se va a construir hasta que se degrade, se reabsorba en el cuerpo y forme un órgano completamente funcional. Por ello se debe considerar propiedades mecánicas como el módulo elástico, resistencia a la compresión, resistencia a la tracción, deformación máxima y módulo de flexión deben ser lo más parecido al del tejido que se formará (Deb et al., 2018).

Tipos de andamios

Los andamios se pueden categorizar en grupos debido a su morfología o constitución siendo estos: andamios porosos, fibrosos, hidrogeles, microesferas y de polímero con biocerámica.

Tabla 2.

Tipos de andamios y sus aplicaciones

Tipo de Andamio	Característica	Aplicaciones	Referencia
Andamios porosos	Presentan una alta porosidad, estos poros están interconectados homogéneamente, con una apariencia de esponja.	Se han usado principalmente para el crecimiento de tejidos óseos o vascularización de tejidos	(Cheng et al., 2019)
Andamios fibrosos	Conformados por nanofibras, el tamaño del poro formado de la matriz también afecta la organización y actividad celular.	Utilizadas en tejidos musculo esqueléticos, incluyendo hueso, cartílago, ligamento y músculo esquelético, piel, vascular, neuronales, y para la entrega controlada de fármacos, proteínas y ADN.	(Dhandayuthapani et al., 2011)
Hidrogeles	Redes tridimensionales de cadenas poliméricas entrecruzadas con un alto contenido de agua.	Se utilizan en los tejidos como el cartílago, óseo, vendaje de heridas y administración de fármacos.	(Onuwaje & Phillips, 2020)

Tipo de Andamio	Característica	Aplicaciones	Referencia
Microesferas	Conformado por partículas esféricas orgánicas o inorgánicas con un diámetro entre 1 y 1.000 μm .	Administración de fármacos debido a su gran relación de superficie y volumen del fármaco. Además, poseen un gran control espacial y temporal en la liberación del fármaco.	(Gupta et al., 2017)
De polímero y biocerámica	Conformados por cerámicas y vidrios biodegradables y bioactivos como vidrios de silicato y fosfatos de calcio.	Aplicados principalmente a tejidos óseos, también se usan como vehículo para la liberación de fármacos.	(Venugopal & Ramakrishna, 2005)

Aplicaciones de los andamios

Los andamios poseen un gran potencial de aplicaciones: desde vendaje para heridas, suministro de fármacos, ingeniería de distintos tipos de tejidos hasta modelos para estudios de cultivos celulares.

Las aplicaciones de los andamios en vendaje para heridas e ingeniería en distintos tipos de tejidos se deben a su alta porosidad, superficie y capacidad de emular las condiciones de la matriz extracelular promoviendo el crecimiento y proliferación celular (Sandri et al., 2020).

De igual forma un andamio biodegradable y reabsorbibles también puede ser usado como vehículo de administración de fármacos, en donde los componentes del andamio se fusionan con la ECM mientras liberan lentamente el contenido de fármacos que contienen (Kretlow et al., 2007).

Para estudios de cultivo celular, un sistema de cultivo celular 3D usando andamios resulta mucho más ventajoso que un cultivo celular 2D convencional ya que las condiciones *in vitro* se asemejan mucho más a las condiciones *in vivo*. Es así que se puede usar para estudios más acertados como estudios de diferenciación celular, respuesta a fármacos, modelos tumorales, expresión de genes y proteínas entre algunos a mencionar (Ravi et al., 2015).

Tabla 3.

Aplicaciones biomédicas de andamios con ejemplos de patentes existentes

Aplicación	Producto	Patente	País
Vendaje para heridas	Apósito nanofibroso para el tratamiento de heridas agudas/quemaduras. Conformado por un andamio de una capa nanofibrosa y otra capa más compacta de PCL recubierto de colágeno derivado de escamas de pescado.	IN201831001151	India
Administración de fármacos	Nuevo nanocompuesto de magnesio basado en un cemento óseo (andamio hidrogel) inyectable listo para la regeneración ósea que se puede combinar con la administración controlada de fármacos.	IN201741006829	India

Aplicación	Producto	Patente	País
Ingeniería de tejidos: vasculares, óseos, cardiacos, cartilago	Andamio de colágeno de escamas de pescado de agua caliente para la ingeniería del tejido óseo y fabricados mediante la técnica de liofilización. El andamio desarrollado presenta mayor resistencia mecánica en comparación a los andamios de colágeno de piel y hueso de pescado	IN202141001147	India
Estudios de cultivo	Andamio de grafeno multicapa para cultivo celular que promueve la diferenciación de células madre que es capaz de promover la diferenciación osteogénica de células madre sin necesidad de un compuesto adicional.	WO2019198986	Corea del Sur

Fabricación de andamios

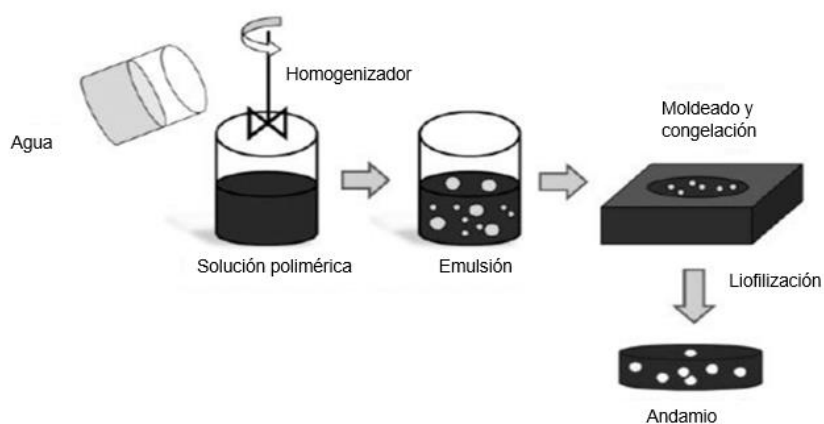
Varias técnicas comúnmente utilizadas en la ingeniería de tejidos pueden producir andamios con estructuras aleatorias, diámetros de poros impredecibles e interconexiones de poros reducidos. Entre estas tecnologías, están la fundición con disolventes, la liofilización, la inversión de fase, la unión de fibras, las tecnologías basadas en fusión y los métodos basados en alta presión (Carletti et al., 2011).

Métodos convencionales

Liofilización. Una solución polimérica se congela y el disolvente de la solución se elimina por liofilización bajo el alto vacío que fabrica el andamio con alta porosidad e interconectividad (Skoog et al., 2014).

Figura 1.

Fabricación de andamios por liofilización

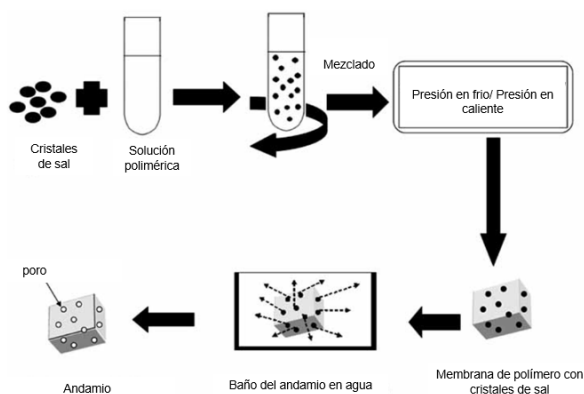


Nota. Adaptado de “Preparation of PVA/Bioactive Glass nanocomposite scaffolds. In vitro studies for applications as biomaterials. Association with active molecules” (p.37), por M. Mostafa, 2014, Université de Rennes.

Fundición con disolvente y lixiviación con sal. En esta técnica, se utiliza un disolvente combinado con partículas de sal para disolver la solución de polímero. El disolvente se evapora dejando una matriz que contiene partículas de sal. Luego la matriz se sumerge en agua y la sal se lixivia para formar una estructura de gran porosidad (Tan et al., 2003).

Figura 2.

Fabricación de andamios por fundición con disolvente y lixiviación

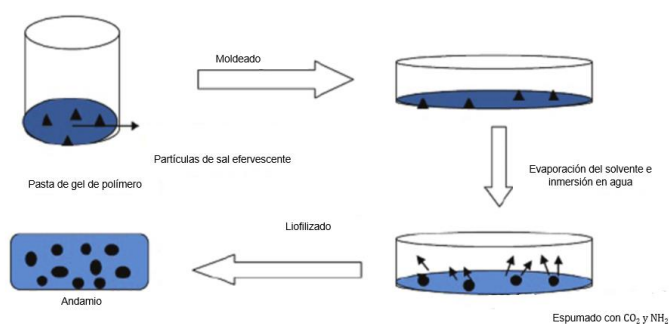


Nota. Adaptado de “Recent Progress on the Development of Porous Bioactive Calcium Phosphate for Biomedical Applications” (p.213), por L. Sopyan, 2008, *Recent Patents on Biomedical Engineering*.

Espumado con gas. Esta técnica utiliza agentes espumantes gaseosos como el dióxido de carbono para presurizar polímeros biológicamente degradables modelados con agua hasta que se saturan o se llenan de burbujas de gas. Una vez completado el proceso de espumado se forma un andamio 3D (Rider et al., 2018).

Figura 3.

Fabricación de andamios por espumado con gas

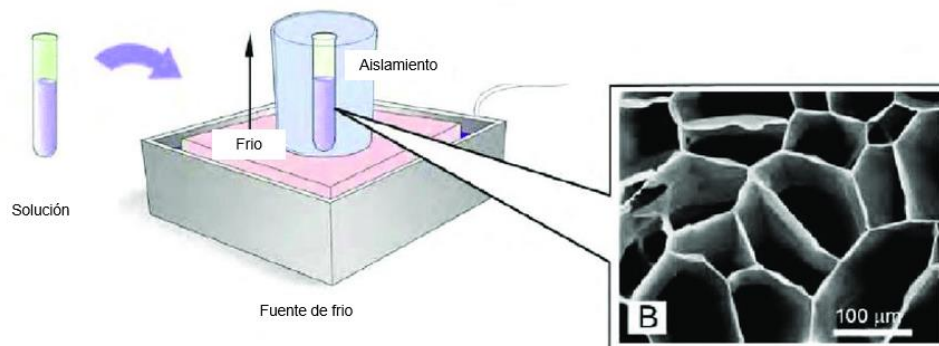


Nota. Adaptado de “Scaffold: A Novel Carrier for Cell and Drug Delivery” (p.213), por T. Garg, 2012, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 29 (1).

Separación de fases Inducida por el calor. Basado en el cambio de temperatura para inducir la separación de una solución polimérica, creando así un sistema multifásico. Cuando se produce la separación de la solución, la solución homogénea se separa en una fase rica en polímeros y otra fase pobre de polímeros (Tan et al., 2003).

Figura 4.

Fabricación de andamios por separación de fases inducida por el calor



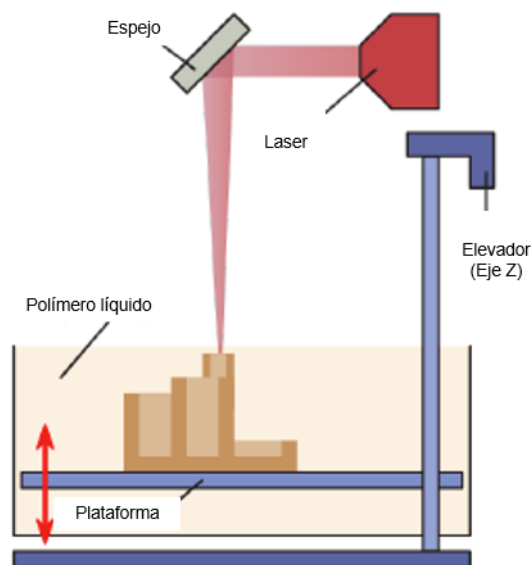
Nota. Adaptado de “Role of Anisotropy in Tissue Engineering” (p.121), por G. Mitchell, 2013, *Elseiver*, 59.

Prototipado rápido

Estereolitografía. Utilizado para crear estructuras sólidas complejas mediante la impresión por capas que se basa en la solidificación espacialmente controlada de resinas de base líquida mediante fotopolimerización (Zein et al., 2002).

Figura 5.

Fabricación de andamios por estereolitografía

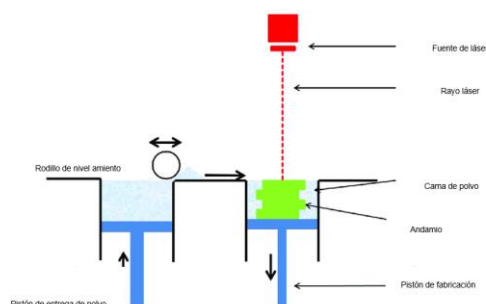


Nota. Adaptado de *Stereolithography*, OpenWetWare, 2016, (https://openwetware.org/wiki/Stereolithography#bibkey_Machine)

Sinterización selectiva por láser. Se emplea un rayo láser de dióxido de carbono para sintetizar finas capas de materiales poliméricos en polvo para formar objetos sólidos tridimensionales. El objeto se construye capa a capa a partir de archivos de datos creados en un diseño asistido por ordenador (Conoscenti et al., 2017).

Figura 6.

Fabricación de andamios por sinterización selectiva por láser

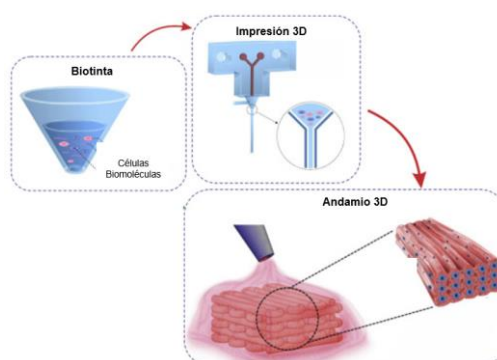


Nota. Adaptado de “Additive Manufacturing for Guided Bone Regeneration: A Perspective for Alveolar Ridge Augmentation” (p.10), por P. Rider, 2018, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (11).

Bioimpresión. Técnica de impresión 3D, basado en el uso de procesos de transferencia de materiales para desarrollar un patrón biológico y el ensamblaje de materiales relevantes como células, tejidos y biomateriales biodegradables con una estructura prescrita para cumplir funciones biológicas (Rider et al., 2018).

Figura 7.

Fabricación de andamios por bioimpresión

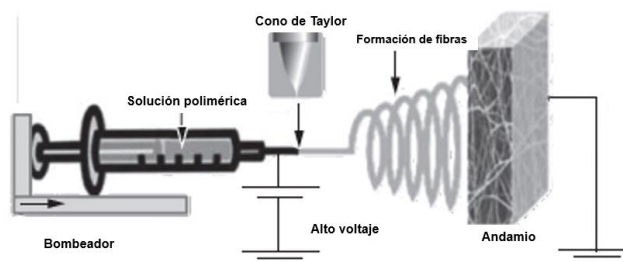


Nota. Adaptado de “Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs” (p.3), por N. Ashammakhi, 2019, *Materials Today Bio*.

Electrohilado. Este método convencional se basa en el principio de llenar una aguja conductora con líquido, que se encuentra en un campo eléctrico con respecto a un electrodo conectado a tierra o con carga opuesta. En condiciones estables, la diferencia de potencial entre los electrodos formará un cono de líquido a la salida de la aguja y emitirá un chorro desde su vértice. El chorro se descompondrá en una columna de pulverización cónica tridimensional. El electrohilado produce fibras que forman un andamio o membrana (Jayasinghe, 2017).

Figura 8.

Fabricación de andamios por electrohilado



Nota. Adaptado de “Fabrication and Characterization of Nanofibrous Scaffold Developed by Electrospinning” (p.317), por B. Dhandayuthapani, 2011, *Materials Materials Research*, 14 (3).

Bajo un campo electrostático, el polímero disuelto bombeado desde la matriz a una velocidad controlada está sometida a dos fuerzas principales, la fuerza de tracción proporcionada por un campo eléctrico suficientemente alto y la tensión superficial de la solución de polímero (Yang et al., 2010). Cuando la fuerza de tracción excede la tensión superficial, un fino chorro de líquido volará hacia la placa colectora. Por tanto, los parámetros que pueden afectar la fuerza de estiramiento (como el voltaje, la conductividad de la solución, la distancia entre la punta y el colector de corriente) y la tensión superficial (viscosidad, concentración, humedad y temperatura ambiente) afectarán la morfología diámetro de las nanofibras (Jin et al., 2018).

Polímeros como biomateriales para andamios

Los polímeros utilizados como base para los andamios pueden ser tanto naturales como sintéticos (Carletti et al., 2011). Los polímeros naturales son biocompatibles y bioactivos, por lo que ayudan a mejorar el rendimiento celular (adhesión y proliferación). Sin embargo, debido a su limitada capacidad de procesamiento, es difícil de diseñar y el riesgo de contaminación es alto. Entre algunos ejemplos tenemos el quitosano, colágeno, gelatina, fibrinógeno, elastina, queratina, actina y miosina. Los polímeros sintéticos poseen características favorables como una estructura química definida, fáciles de procesar, se pueden modificar para conseguir propiedades específicas, tienen una buena rentabilidad al ser fácilmente producibles a grandes escalas y mayor tiempo de conservación. Sin embargo, estos polímeros no tienen actividad biológica, por lo que pueden provocar una respuesta inflamatoria en el huésped. Entre los materiales sintéticos, el PCL ha atraído recientemente mucha atención en aplicaciones biomédicas (incluida la ingeniería de tejidos óseos) (Dwivedi et al., 2020).

Tabla 4.

Listado de algunos polímeros con aplicaciones biomédicas aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)

	Polímero	Aplicaciones aprobadas	Patente o producto	Farmacéutica o País
Polímeros sintéticos	Policaprolactona	Implantes quirúrgicos de largo periodo de tiempo, dispositivos de administración de fármacos	Parche de malla médica para la reparación de hernias. CN104758984	China

	Polímero	Aplicaciones aprobadas	Patente o producto	Farmacéutica o País
Polímeros sintéticos	Ácido poliláctico	Reconocido como generalmente seguro (GRAS) usado en dispositivos quirúrgicos reabsorbibles	Método de preparación de material para reparación ósea basado en ácido poliláctico de liberación controlada. CN110787324	China
	Ácido poli (láctico-co-glicólico)	Implante de medicamentos, producción de micropartículas y nanopartículas biodegradables y biocompatibles.	Sistemas portadores de nanopartículas basados en el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) para la terapia fotodinámica. EP2509633	BIOLITEC PHARMA IP & INVEST LTD
Polímeros naturales	Ácido hialurónico	Este polímero tiene usos como rellenos dermatológicos y viscosuplementos para el tratamiento de la artrosis.	Hylagan es una solución inyectable compuesto por ácido hialurónico para el tratamiento de artrosis en la rodilla. VISTASEAL™ Sellador de fibrina	Fidia Farmaceutici spa.
	Fibrina	Hemostático y fijador adhesivo del injerto de piel para heridas por quemaduras.	indicado como complemento de la hemostasia para su uso en pacientes sometidos a cirugía	Johnson & Johnson

	Polímero	Aplicaciones aprobadas	Patente o producto	Farmacéutica o País
Polímeros naturales	Colágeno	Equipo quirúrgico a base de colágeno hemostático y antibacteriano, vendajes, escudo de colágeno corneal, rellenos dérmicos, suplementos orales de colágeno	Apósitos de colágeno con plata Puracol	Plus Medline Industries.

Policaprolactona

Policaprolactona (PCL) es un miembro del poliéster biodegradable. Es un polímero alifático semicristalino con un rango de temperatura de fusión de 59 a 64 °C. Por ello, a temperatura fisiológica, el PCL semicristalino alcanza un estado con alta tenacidad y excelentes propiedades mecánicas (alta resistencia y elasticidad son función de su peso molecular) (Mkhabela & Ray, 2014).

No es tóxico y es compatible con los tejidos, por lo que se utiliza ampliamente como apósitos absorbibles, terapias regenerativas y aplicaciones de administración de fármacos. El tiempo de degradación del PCL es mayor (2-3 años). Debido a que hay cinco moléculas hidrofóbicas -CH₂ en su unidad repetitiva, la tasa de degradación del PCL es más rápida que la de todos los poliésteres (Dwivedi et al., 2020). Además, la capacidad de los polímeros PCL para adaptarse a otros polímeros sintéticos y naturales permite lograr las propiedades deseadas del andamio, proporcionando ventajas adicionales por su practicidad en el proceso de fabricación del andamio (Siddiqui et al., 2018).

Quitosano

El quitosano es un polisacárido extraído como un derivado desacetilado de la quitina y está compuesto de copolímeros lineales enlazados β - (1 \rightarrow 4) distribuidos aleatoriamente, que incluyen N-acetil-D-glucosamina y D- glucosamina. La quitina es abundante en los exoesqueletos de crustáceos, insectos y varios hongos. La extracción de quitosano de la quitina implica un mecanismo de desacetilación que implica la eliminación de grupos acetilo mediante el tratamiento de la quitina con hidróxido de sodio. El peso molecular y el grado de desacetilación afectan a las propiedades físicas y mecánicas del polímero (Ahmed et al., 2018).

El quitosano es barato, biocompatible, biodegradable, bioactivo, no tóxico, no inmunogénico, antibacteriano, y puede estimular la actividad de los factores de crecimiento. De igual forma el quitosano de bajo peso molecular tiene propiedades antitumorales e inmunoestimulantes (Aranaz et al., 2021). Cuando se usa como un apósito biológico semipermeable, el quitosano puede prevenir la deshidratación y la contaminación de la herida. Puede aumentar la producción de osteopontina, promoviendo así la infiltración y adhesión de varios tipos de células, y juega un papel en la inflamación granulomatosa (Dai et al., 2011), y también puede inhibir la infección al estimular a los macrófagos para que liberen citocinas (Oryan & Sahvieh, 2017).

Capítulo III: Metodología

Fabricación de andamios mediante electrohilado

Preparación de las soluciones poliméricas

Para la solución polimérica de quitosano a usarse en el proceso de electrohilado se usó el alcohol polivinílico (PVA) como copolímero por lo que se preparó dos soluciones previas como constituyentes. En la primera solución se hizo uso del quitosano de marca Chemsavers que presenta un porcentaje de desacetilación mayor al 90%, se preparó una solución de 10mL al 3% p/v de quitosano para lo cual se disolvió el quitosano en ácido acético al 90 % v/v, la solución se dejó en agitación por 2 hr a temperatura ambiente. Para la segunda solución del copolímero de PVA se usó PVA de la marca Sigma Aldrich de alto peso molecular (146-186 g/mol), se disolvió el PVA en 10 mL de agua destilada para obtener una solución al 7 % p/v, la solución se dejó en agitación por 2 hr a una temperatura de 90 °C. Se mezcló ambas soluciones de quitosano y de PVA en una proporción 1:3 y se dejó en agitación por 30 min.

Para la solución de PCL se disolvió pellets de 3 mm de PCL de 80.000 g/mol de peso molecular de la marca Sigma-Aldrich en 10 mL de acetona para obtener una solución al 10 % p/v y se dejó en agitación por 1 hr con temperatura de 60 °C.

Electrohilado con bombeador de jeringa automático

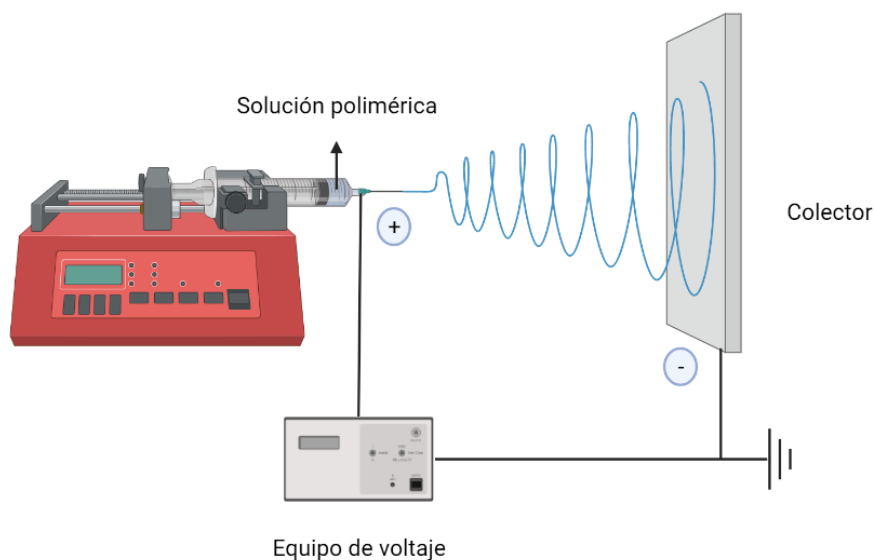
Se realizó el montaje del equipo de electrohilado y se cargó las soluciones poliméricas en jeringuillas de 10 mL con una aguja de acero inoxidable acopladas al equipo de electrohilado en el cual la aguja se conectó al polo positivo de una fuente de voltaje mientras que el polo negativo se conectó a un plato recolector. Al plato recolector se lo recubrió de papel aluminio o gasa quirúrgica para la recolección de las fibras. Se realizó 5 repeticiones para la fabricación de andamios de quitosano y 4

repeticiones para los andamios de PCL y el electrohilado se lo realizó en sentido horizontal.

En el proceso de electrohilado de la solución de quitosano se usó un caudal de 0.5 mL/h, un voltaje de 14-17 kV y el plato recolector se situó a 14 cm de distancia de la aguja. Para la solución polimérica de PCL se usó un caudal de 0.1 mL/min, un voltaje de 8-10 kV y el plato recolector se situó a 14 cm de distancia. Se recolectó por media hora las nanofibras de ambas muestras sobre el plato colector. Se almacenó las muestras de fibras en cajas Petri selladas con film a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Figura 9.

Esquema del proceso de electrohilado de las nanofibras



Caracterización física de las nanofibras

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La visualización de las fibras para determinar el diámetro y calidad de las mismas se realizó mediante el SEM. Para ello se cortó las muestras en cuadrados de 1x1 cm y se recubrió con una película de oro por 10 segundos para el análisis por

microscopía electrónica de barrido a 5kV con el equipo MIRA₃ TESCAN. Para determinar la distribución del diámetro se hizo uso del software Image J a partir de 100 recuentos por foto.

Cultivo celular sobre los andamios

Se realizó la proliferación celular de la línea HEK-293T sobre los andamios de quitosano y PCL para determinar la adherencia celular sobre las mismas.

Esterilización de los andamios

Primero se esterilizó los andamios para lo cual se recortó en cuadrados de 1cmx1cm y se retiró cuidadosamente el film de andamios de la gasa mediante pinzas, Se sumergió en etanol absoluto las muestras y se sometió a 30 min de luz UV por ambos lados del film.

Proliferación de la línea celular HEK 293T

Un stock de células criopreservadas en nitrógeno líquido se descongeló en baño maría a 37°C por alrededor de dos minutos. Se tomó 1mL y resuspendió en un tubo de 15mL con 1mL de medio de cultivo DMEM con suero fetal bovino al 10% y 1% de penicilina y estreptomycinina y posterior se centrifugó a 1200 RPM por 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y se resuspendió el pellet nuevamente en 1mL de medio de cultivo. Se colocó 1mL de la suspensión en un flask de cultivo F75, se cubrió la superficie del flask con medio de cultivo y se homogeneizó el medio. El flask se incubó a 37 °C y 5 CO₂% y cada 48hrs se verificó el medio de cultivo y en caso de ser necesario se realizó un cambio de medio de cultivo basado en los cambios de pH visibles (cambio de color) esto se realizó hasta llegar a la fase de confluencia el cual se revisó mediante microscopía óptica invertida.

Plaqueo

Luego de verificar la confluencia celular se agregó 3 mL de tripsina con EDTA 1X para la finalidad de despegar las células del flask y se incubó por 3 min a 37°C y 5 CO₂%. Se verificó luego que todas las células no estuvieran adheridas al flask mediante microscopio invertido. Se pasó las células a un tubo de 15 mL, se agregó 1 mL de suero fetal con el propósito de neutralizar la tripsina ya que puede llegar a dañar las células y se procedió a centrifugar a 1200 RPM por 5 min el tubo. Luego de centrifugar el sobrenadante se desechó y se resuspendió en 1 mL de cultivo.

Se realizó un conteo con una cámara de Neubauer usando una dilución 1/10 para lo cual se agregó 90 uL de azul de tripan y 10 uL de la muestra de células. Para el conteo se tomó 10 uL de la solución, se agregó a la cámara de Neubauer en donde se realizó el conteo de los 4 cuadrantes y se determinó la cantidad de células por mililitro con la fórmula descrita a continuación.

$$\# \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{\# \text{células contadas} * 10000}{\text{número de cuadrantes}} * \text{factor de dilución} \quad (1)$$

Habiendo determinado el número de células, se colocó 1 mL de muestra en una placa de cultivo celular de 6 pocillos colocando 500000 células por pocillo junto con el andamio esterilizado. Se trabajó con un total de 6 grupos siendo estos: 2 grupos de control (células cultivadas sin andamios), 2 muestras de quitosano y 2 muestras de PCL.

Observación de células HEK 293T por microscopía confocal de fluorescencia

La visualización de los cultivos celulares sobre los andamios se realizó luego de 24 horas de cultivo de la placa a 37°C y 5 CO₂%. La tinción se realizó con diacetato de fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (PI). Se trabajó con las soluciones stock de 5 mg/mL de FDA conservada en DMSO a -20°C, 2mg/mL de PI conservada en PBS a 4°C. El medio de tinción se realizó según las cantidades determinadas en la Tabla 5.

Tabla 5.

Cantidades para la preparación del medio de tinción con DAPI y PI

Reactivo	Cantidad
FDA	8 uL
PI	50 uL
Medio de cultivo	5 mL

El medio de cultivo se retiró de los pocillos, se realizó un lavado con PBS 1x para posterior agregar la solución de tinción por 1 min para volver a lavar con PBS 1x dejando luego del lavado una pequeña cantidad de PBS para humedecer la muestra. Finalmente, la muestra teñida se visualizó mediante el equipo Olympus fluvium con lente 40x.

Análisis estadístico

Para el análisis de las variables que corresponden al diámetro de las fibras y el área celular se usó la prueba de U de Mann-Whitney para evidenciar que las medias de entre las muestras de quitosano y policaprolactona fueran distintas usando el software Infostat. Posteriormente las medias y errores estándar de la media fueron determinadas tanto para los diámetros de las nanofibras como para el área celular sobre los andamios mediante Excel.

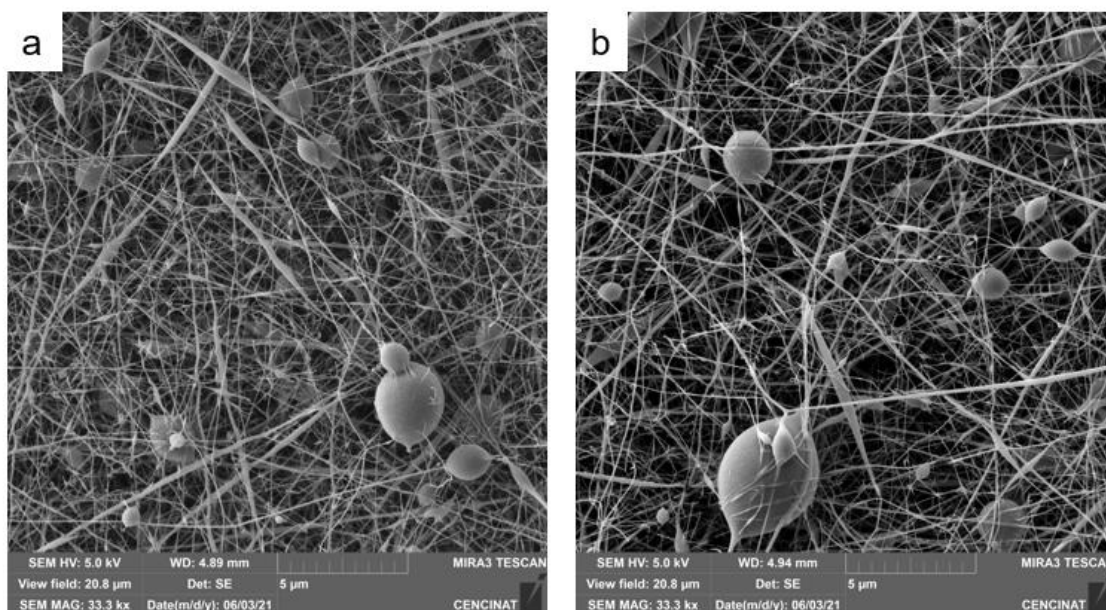
Capítulo IV: Resultados

Fabricación de andamios mediante electrohilado

Las nanofibras de quitosano/PVA con quitosano al 3% p/v y PVA al 7% p/v en proporción 1:1 y 1:2 respectivamente no generaron nanofibras uniformes y presentaron gran cúmulo de grumos (beads) a lo largo de las muestras como se indica en la Figura 10.

Figura 10.

Fotos de microscopio de barrido electrónico con amplificación 33.3kx de nanofibras de quitosano/PVA con beads:(a) 1:1 quitosano 3% con PVA 7%, (b) 1:2 quitosano 3% con PVA 7%



Se realizó 5 repeticiones para la fabricación de andamios de quitosano/PVA con quitosano al 3% p/v y PVA al 7% p/v en proporción 1:3 y 4 repeticiones para la fabricación de andamios de PCL al 10 % p/v. En todas las repeticiones se pudo obtener nanofibras sin la presencia de grumos tanto para las nanofibras de quitosano/PVA como se observa en la Figura 11 como para las nanofibras de PCL

observadas en la Figura 12. Los parámetros adicionales como temperatura y humedad al igual que el voltaje aplicado durante el proceso de electrohilado se detallan en la Tabla 6.

Figura 11.

Fotos de microscopio de barrido electrónico con amplificación 33.3kx de nanofibras de quitosano/PVA al 3% con PVA 7% 1:3

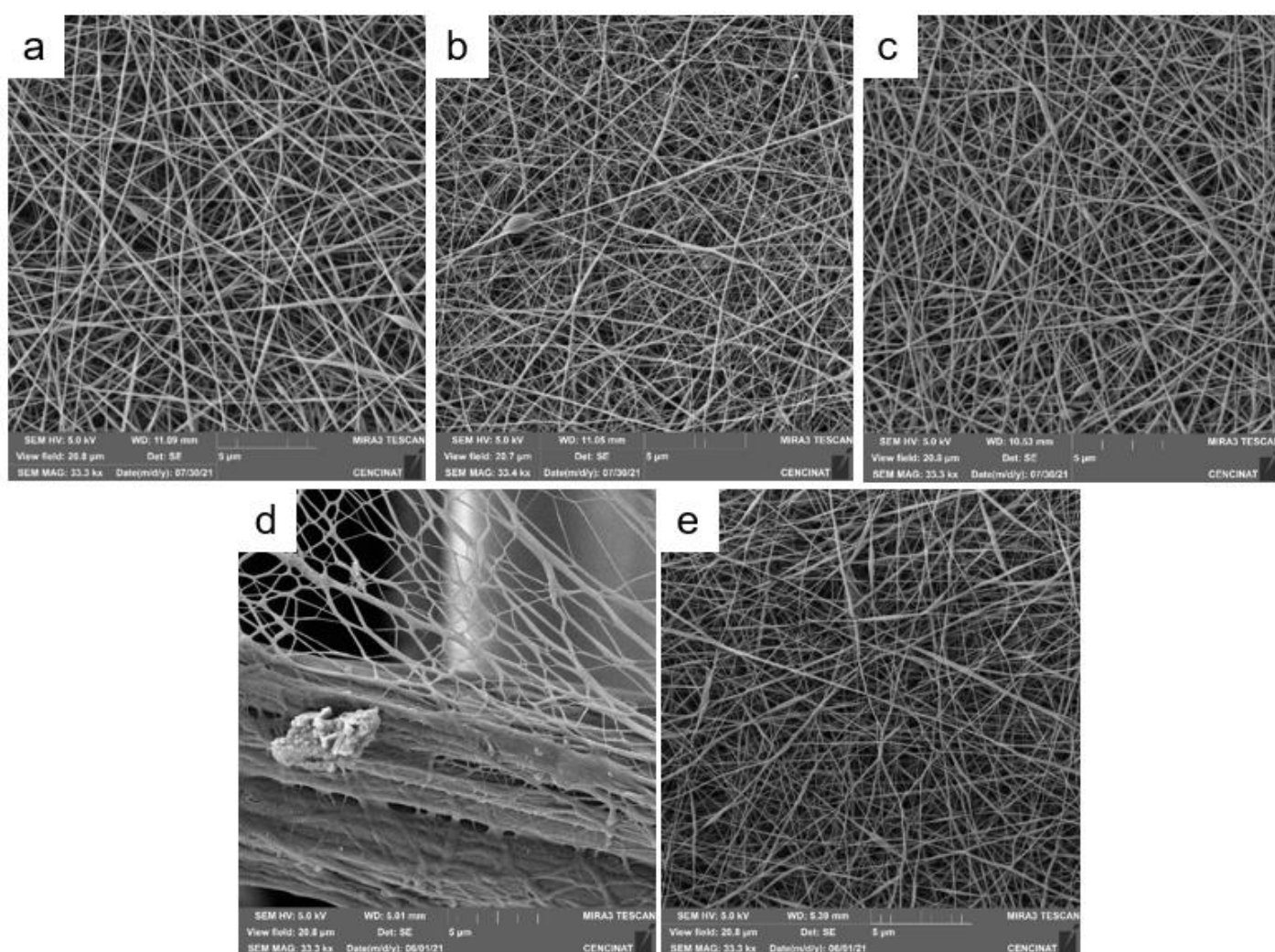
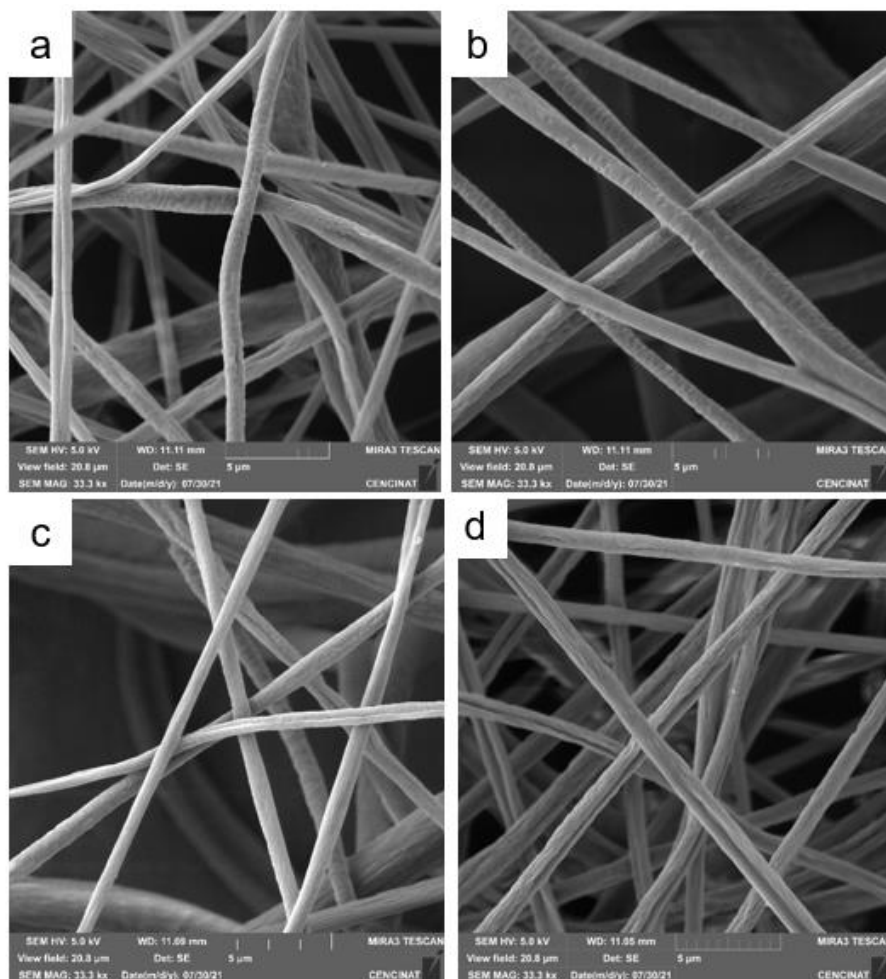


Figura 12.

Fotos de microscopio de barrido electrónico con amplificación 33.3kx de nanofibras de PCL al 10%

**Tabla 6.**

Condiciones de electrohilado de las nanofibras de quitosano y PCL

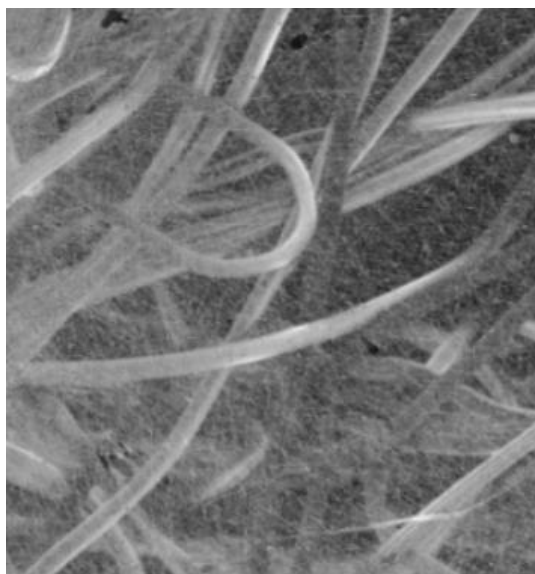
Muestra	Caudal	Voltaje (KV)	Distancia del colector	Temperatura	Humedad	Depositado
Quitosano 1	0.5mL/h	12.88+, 1-	14 cm	20.7°C	51 %	Aluminio
Quitosano 2	0.5mL/h	15.04+, 1-	14 cm	20.9°C	48 %	Aluminio
Quitosano 3	0.5mL/h	12.25+, 1.6-	14 cm	19.5°C	54 %	Gasa
Quitosano 4	0.5mL/h	14.28+, 1.03-	14 cm	19.6°C	60 %	Gasa

Muestra	Caudal	Voltaje (KV)	Distancia del colector	Temperatura	Humedad	Depositado
Quitosano 5	0.5mL/h	14.28+,1.03-	14 cm	19.6°C	60 %	Aluminio
PCL 1	0.1 mL/min	10.44+	14 cm	20.5°C	50 %	Aluminio
PCL 2	0.1 mL/min	10.28+	14 cm	20.8°C	48 %	Aluminio
PCL 3	0.1 mL/min	9.72+	14 cm	20.2°C	53 %	Gasa
PCL 4	0.1 mL/min	8.44+	14 cm	20°C	54 %	Gasa

Las nanofibras fueron recogidas sobre un plato recolector metálico recubierto de aluminio o gasa quirúrgica, en la Tabla 6 se detalla sobre qué material fueron recogidas las muestras. En el caso de la muestra quitosano/PVA ilustrada en la Figura 11d y Figura 13 se puede diferenciar entre las fibras de quitosano/PVA y la fibra de la quirúrgica.

Figura 13.

Fotos de microscopio de barrido electrónico con amplificación 33.3kx de nanofibras de quitosano/PVA sobre las microfibras de gas quirúrgica



Medición de los diámetros de las nanofibras con ImageJ

De las fotos obtenidas por SEM se midió el diámetro de 100 fibras por foto de quitosano y PCL. La prueba U de Mann-Whitney se aplicó a todos los diámetros recopilados de pcl y quitosano mediante Infostat para analizar la diferencia de medias el cual arrojó como resultado que las medias de los diámetros entre quitosano y PCL son significativamente diferentes ($p < 0.0001$).

Mediante estadística inferencial de todos los diámetros medidos de nanofibras de policaprolactona se obtuvo un diámetro promedio de 1231.6 ± 18 nm mientras que el diámetro promedio de las nanofibras del quitosano fue de 123.9 ± 1.1 nm como se resume en la Tabla 7.

Figura 14.

Histograma de distribución de los diámetros de nanofibras de quitosano y PCL: (a) fibras de quitosano/PVA (b) fibras de PCL

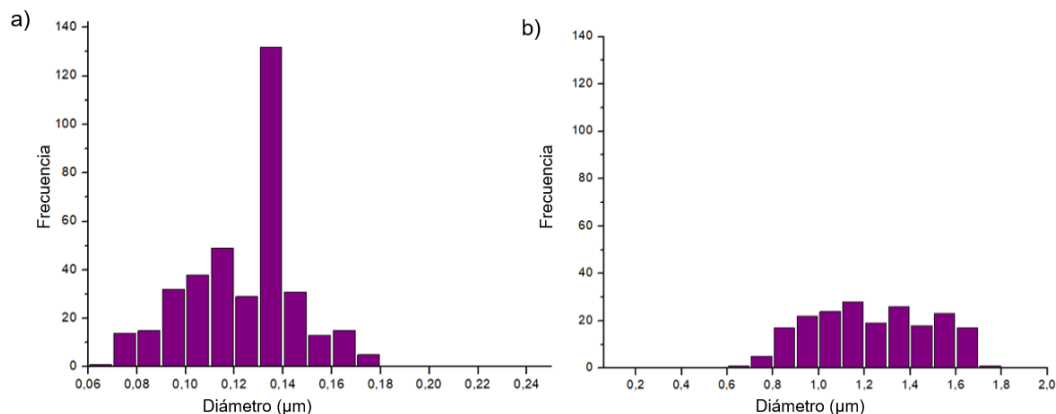


Tabla 7.

Rango de distribución de los diámetros y diámetro promedio de las nanofibras de quitosano y PCL

Material	Rango (μm)	Promedio (μm)	Promedio (nm)
Quitosano	[0,08-0,18]	0.1239 ± 0.0011	123.9 ± 1.1
PCL	[0,07-1,8]	1.2316 ± 0.018	1231.6 ± 18

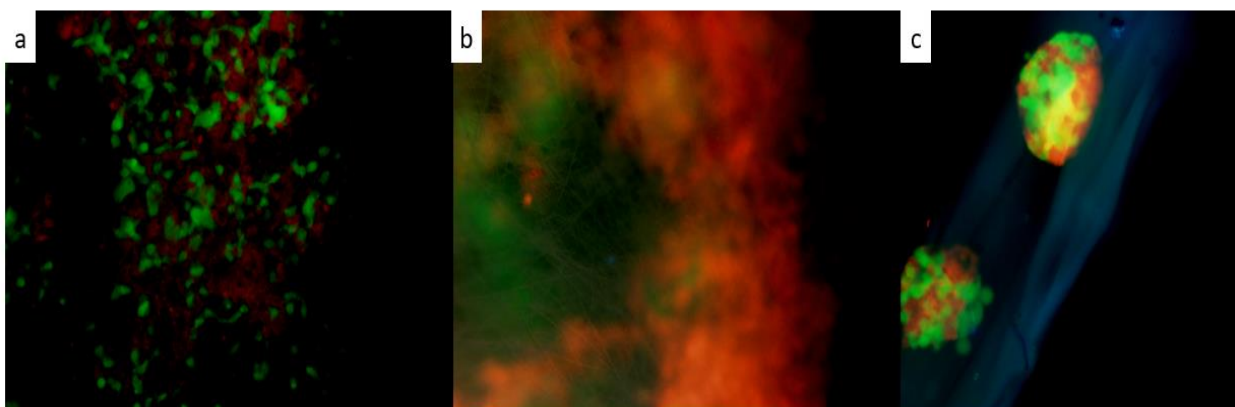
Los diámetros obtenidos de las nanofibras de PCL presentaron un rango de distribución mucho mayor yendo desde 0.07 a 1.8 μm como se ve en Figura 14b a comparación a las nanofibras de quitosano/PVA el cual presentaron nanofibras desde 0.08 a 0.18 Figura 14a, de igual forma se puede observar una mayor tendencia de las nanofibras de quitosano a diámetros entre 0.13 y 0.14 μm .

Adhesión celular

La comprobación de adherencia celular de los cultivos celulares sobre los andamios se realizó luego de 24 horas. Las fotografías de microscopía de fluorescencia permitieron evidenciar la adherencia celular de las células HEK 293T sobre los andamios de PCL y quitosano/PVA como se indica en la Figura 6.

Figura 15.

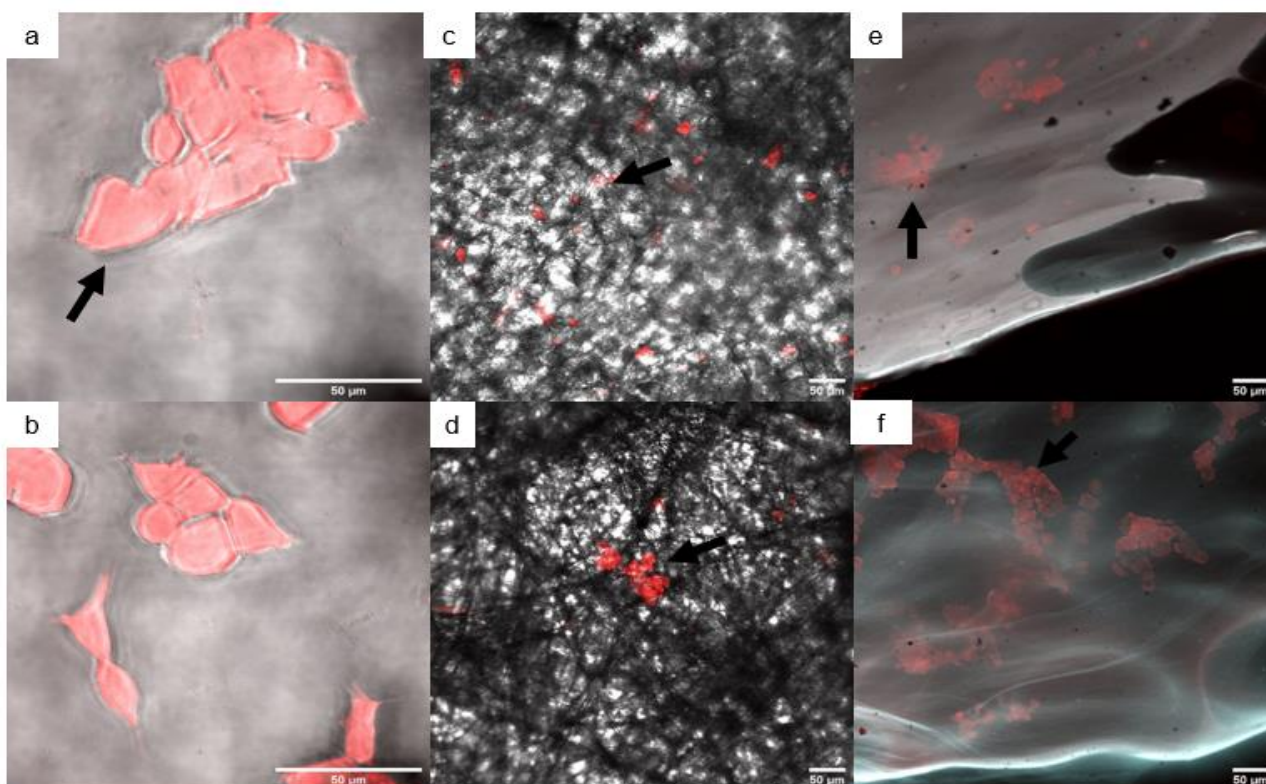
Fotos de microscopio de fluorescencia con lente 40x del cultivo de células HEK 293T sobre los andamios: (a) control, (b) PCL, (c) quitosano



Por otro lado, de las fotos obtenidas por microscopía confocal se midió el área celular de por foto de quitosano y PCL en la Figura 16. La prueba U de Mann-Whitney se aplicó a todos datos recopilados de PCL y quitosano/PVA mediante Infostat para analizar la diferencia de medias el cual arrojó como resultado que las medias del área celular entre quitosano/PVA y PCL son significativamente diferentes ($p < 0.0001$).

Figura 16.

Fotos de microscopio confocal a vista $40 \times \mu\text{m}$ del cultivo de células HEK 293T sin andamios y sobre andamios de PCL y quitosano



Nota. Las células HEK 293T cultivadas presentan una tinción roja

Se obtuvo un área celular promedio de $612,70 \mu\text{m}^2$ para el cultivo celular de células HEK 293T sobre andamios de quitosano/PVA y una menor área celular promedio de $177,13 \mu\text{m}^2$ para el cultivo celular sobre los andamios de PCL (Tabla 8). Se puede observar en la Figura 17a como en el cultivo celular sobre los andamios de quitosano/PVA las áreas celulares llegan a valores mucho mayores en comparación a

las áreas celulares de PCL observados en la Figura 17b, los rangos específicos de las áreas celulares por andamio se detallan en la Tabla 8.

Figura 17.

Histograma de distribución de las áreas celulares adheridas sobre los andamios de quitosano y PCL: (a) fibras de quitosano/PVA (b) fibras de PCL

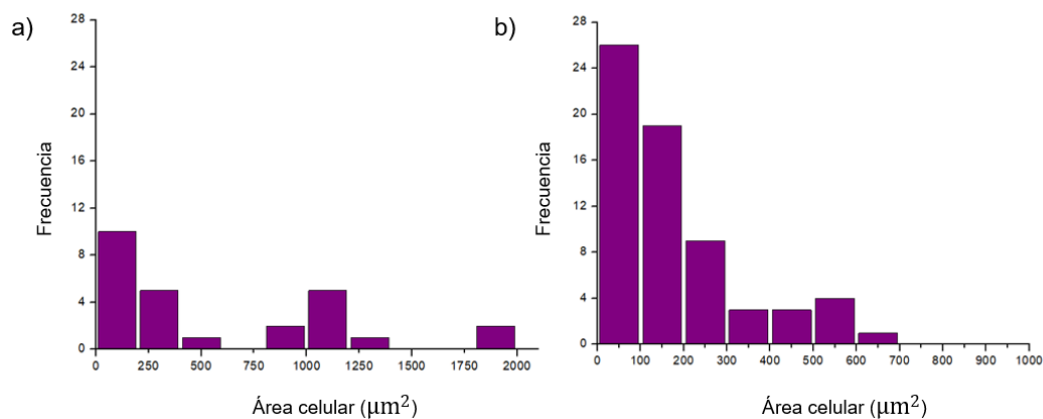


Tabla 8.

Rango de distribución de las áreas celulares y área celular promedio adherido a las nanofibras de quitosano y PCL

Material	Rango (μm ²)	Promedio (μm ²)
Quitosano	[123,96-1994,31]	612,70
PCL	[10,77-605.94]	177,13

Capítulo VI: Discusión

Los andamios han tomado un rol importante en la ingeniería de tejidos debido a su capacidad de imitar entornos similares a la matriz extracelular para la regeneración de tejidos proveyendo de potenciales sustitutos a tratamientos de diversos tejidos dañados (Agrawal & Ray, 2001). Debido a ello constituye un área de gran interés con crecimiento exponencial, con un número cada vez mayor de productos que entran en el mercado y en los ensayos clínicos, con ventas de biomateriales regenerativos de 240 millones de dólares al año (O'Brien, 2011).

De los métodos de fabricación existentes de andamios la técnica de electrohilado presenta una gran cantidad de investigaciones con un amplio espectro de polímeros naturales y sintéticos como el ácido glicólico (PGA), el ácido poliláctico, colágeno o gelatina (Boudriot et al., 2006). El amplio uso de esta técnica se debe a sus ventajas como el generar fibras uniformes alineadas, gran porosidad 80-95%, fibras de poco diámetro (100-1100 nm), amplia superficie, propiedades mecánicas superiores y un método simple de realizar (Rahmati et al., 2021).

De los polímeros naturales usados para la fabricación de andamios, el quitosano resulta de interés debido a sus propiedades biológicas atribuidas a su naturaleza catiónica (Vázquez et al., 2015) como la activación y modulación de la actividad inflamatoria de las células, propiedades hemostáticas o actividades antimicrobianas (Levengood & Zhang, 2014). Por otro lado entre los polímeros sintéticos, la policaprolactona es uno de los polímeros más explorados en diversas aplicaciones biomédicas debido a su carácter no inmunogénico, su versatilidad a diferentes métodos de modificación de la superficie, alta resistencia mecánica y lenta degradación (Siddiqui et al., 2018). Por lo anteriormente mencionado, en este estudio se fabricaron andamios fibrosos de quitosano/PVA y PCL mediante la técnica de electrohilado.

Sin embargo se debe de tomar en cuenta que los andamios fabricados únicamente de quitosano no suelen ser lo suficientemente robustos por lo que se suelen mezclar con otros compuestos como: gelatina, colágeno y fibroína, para mejorar sus propiedades mecánicas y biológicas (Lin et al., 2013). En el trabajo consiguiente se utilizó el alcohol polivinílico (PVA) como co-polímero para mejorar las propiedades mecánicas del andamio de quitosano, el cuál es un polímero sintético que ha sido usado ampliamente en conjunto con el quitosano para la generación de nanofibras (Croisier & Jérôme, 2013). También, se consideró que el PVA de alto peso molecular (146-186 kDa) genera fibras más uniformes y facilita el proceso de electrohilado (Mwiiri & Daniels, 2020), por lo cual se optó por usar un PVA de PM de 146-186 kDa en el estudio.

Para la fabricación de andamios de quitosano mediante electrohilado varios trabajos han sido descritos como el trabajo realizado por Granja & Herrera (2018), en donde se estandarizó un protocolo de electrohilado de quitosano/PVA, obteniendo los mejores resultados con una concentración de quitosano al 2 % p/v en ácido acético al 70 % v/v y PVA al 10 % p/v en agua destilada en una proporción 1:1 respectivamente. Sin embargo, no se pudo obtener fibras replicando el mismo protocolo a pesar de contar con los mismos insumos como el quitosano de mismo grado de desacetilación debido al uso de un PVA de mayor peso molecular al usado en el estudio (PM=146-186 g/mol). Es por ello que se optó por aumentar la proporción de quitosano/PVA, obteniendo los mejores resultados con una concentración de quitosano al 3% p/v con PVA al 7% en una proporción de 1:3 respectivamente. Estas proporciones son similares a los usados por Zhang et al., (2007), donde se pudo sintetizar nanofibras de mejor calidad mediante electrohilado usando proporciones mayores de PVA al de quitosano a partir de 60:40, las proporciones de igual forma se asemejan al estudio realizado por Ohkawa et al., (2004), en donde lograron obtener nanofibras uniformes y sin presencia de grumos a medida que la proporción de PVA aumentaba, en

específico obteniendo resultados bastantes favorables en proporciones mayores a 30:70 de quitosano/PVA. La razón del porque se obtiene mejores fibras a menor proporción de quitosano en relación al PVA es debido al carácter iónico del quitosano el cual afecta el proceso de electrohilado de la solución polimérica aumentando la densidad de carga, al aumentar la densidad de carga las fibras generadas disminuyen en diámetro y si se excede la proporción de quitosano respecto a la proporción de PVA la solución no logra generar fibras (Jia et al., 2007).

Con respecto a la fabricación de andamios de PCL (80 kDa), se pudo generar fibras homogéneas libre de grumos trabajando con una concentración de 10 % p/v usando como solvente acetona. Esta concentración concuerda con las usadas por Colmenares et al., (2017), donde generaron fibras con PCL de diferentes pesos moleculares (14.000, 45.000 y 80.000 g/mol) y usando de solvente acetona en donde para el PCL de peso molecular de 80.000 g/mol se pudo generar fibras homogéneas libre de grumos trabajando con concentraciones entre el 10 y 15 % p/v.

Para la caracterización de biomateriales la microscopía electrónica de barrido (SEM) es uno de los métodos más utilizados brindando aumentos de 10X a más de 300000 X (Mitić et al., 2017). El SEM convierte un haz de electrones producido por una fuente en una sonda que recorre la superficie de una muestra en donde la interacción entre la muestra y la sonda de electrones produce varios tipos de emisiones, que son captadas por diferentes detectores, esto brinda información sobre la estructura de la superficie de la muestra, la composición y la conductividad eléctrica (Suga et al., 2014). Las nanofibras de quitosano/PVA y PCL sintetizadas en este estudio fueron caracterizadas por SEM, determinando así los diámetros promedios con el software ImageJ.

El diámetro promedio de las nanofibras de quitosano/PVA fue de 123.9 nm esto tiene bastante similitud con los resultados obtenidos por Sajeev et al., (2008), el cual

obtuvo nanofibras de quitosano/PVA de promedio 120 nm trabajando a una concentración de quitosano 2 % p/v con PVA 8% p/v en proporción 2:8 respectivamente.

En cuanto a las fibras obtenidas de PCL al 10 % p/v, estas presentaron un diámetro promedio de 1231.6 nm este promedio de diámetro coincide con las fibras estudiadas por Lim et al., (2008) el cual presenta un rango de fibras de PCL (PM=80.000 g/mol) al 10% entre 200-1300 nm. Las fibras obtenidas en comparación a las de quitosano son de diámetro mucho mayor, el PCL de alto peso molecular tiene mayor tendencia a generar microfibras en comparación a otros PCL de menor peso molecular que generan nanofibras (Colmenares et al., 2017).

Es crucial para los andamios promover la adherencia celular para la formación del tejido (Boudriot et al., 2006). La adherencia celular corresponde a la función de la células a adherirse entre sí, a la matriz extracelular o superficies a través de unas proteínas de la superficie celular denominadas moléculas de adhesión celular (MAC) (Alberts et al., 2002). Para evaluar la adherencia celular a los andamios en este estudio se realizó un cultivo celular sobre los andamios de quitosano y PCL con células HEK 293T.

Un factor importante en la adherencia celular es el carácter hidrofílico o hidrofóbico que presentan los andamios, en donde los andamios hidrofílicos presentan una mayor adherencia celular en contraste a los andamios hidrofóbicos (Bacakova et al., 2011). El motivo de una mayor adherencia celular sobre superficies hidrofílicas a superficies hidrofóbicas se debe a una mayor adsorción de las proteínas de adherencia como es la fibronectina y vitronectina sobre las superficies hidrofílicas (Grinnell & Feld, 1982). Por lo tanto, los andamios de quitosano y PVA que poseen un carácter hidrofílico (Duan et al., 2007) presentan una mejor adherencia celular en

contraste a los andamios de PCL debido a que su carácter hidrofóbico (Cho et al., 2015).

De igual forma el diámetro tiene un rol importante durante la adhesión celular, los diámetros de menor tamaño presentan un área específica mayor presentando una mayor adherencia celular en parte debido a su mejor adsorción de las proteínas de adherencia y por ende mejorando la adhesión celular (Chen et al., 2009). Esto se ha comprobado con varios trabajos como Chen et al., (2007), en el cual se cultivó fibroblastos NIH 3T3 sobre andamios electrohilados de policaprolactona; o como en los estudios llevados a cabo por Noriega et al., (2012), en donde se cultivó células de condrocitos en andamios electrohilados de quitosano; en ambos casos concluyendo la relación inversa de a menor diámetro mayor adherencia celular. Esto lo podemos constatar con los resultados del cultivo celular en el cual mediante microscopía confocal se logró determinar que los andamios de quitosano/PVA (123.9 nm) presentaron mayor adherencia celular ($612,7 \mu\text{m}^2 > 177,13 \mu\text{m}^2$) en contraste a los andamios de PCL (1.2316 nm).

Capítulo VII: Conclusiones

Se logró sintetizar nanofibras de quitosano/PVA uniformes libres de grumos mediante la técnica de electrohilado estableciendo un protocolo con concentraciones de 3 % p/v de quitosano y 7 % p/v de PVA en proporción 1:3. También se obtuvo nanofibras uniformes sin la presencia de grumos de policaprolactona trabajando con una concentración del 10 % p/v.

Se determinó el diámetro promedio de los andamios de policaprolactona y quitosano mediante microscopía electrónica de barrido en donde se obtuvo un diámetro promedio de 123.9 ± 1.1 nm para los andamios de quitosano/PVA y un diámetro promedio de 1231.6 ± 18 nm para los andamios de policaprolactona.

Se encontró una mayor capacidad de adherencia celular de células HEK 293T luego de 24 horas cultivadas sobre andamios de quitosano/PVA en comparación al cultivo celular realizado sobre los andamios de policaprolactona, teniendo un área celular para el quitosano de $612,7 \mu\text{m}^2$ en contraste al área celular de la policaprolactona $177,13\mu\text{m}^2$, esto debido al carácter hidrofílico de los andamios de quitosano/PVA y su diámetro de nanofibras menor en comparación a las nanofibras de PCL.

Capítulo VIII: Recomendaciones

Con la finalidad de promover una mayor adherencia celular sobre los andamios de policaprolactona se recomienda la síntesis de fibras de menor diámetro a las expuestas en este trabajo de 1231.6 nm.

Se recomienda la implementación de lecturas de espectrofotometría para el análisis de adherencia celular el cual constituye una prueba cuantitativa.

Se puede implementar nuevas técnicas de electrohilado a los andamios expuestos como el electrohilado coaxial para generar andamios con aplicaciones para la entrega de fármacos.

Se puede llevar a cabo un estudio para funcionalizar la superficie de los andamios con compuestos bioactivos de interés para futuras aplicaciones médicas.

Referencias

- Agrawal, C. M., & Ray, R. B. (2001). Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(2), 141-150. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200105\)55:2<141::AID-JBM1000>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<141::AID-JBM1000>3.0.CO;2-J)
- Ahmed, S., Annu, null, Ali, A., & Sheikh, J. (2018). A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 849-862. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.176>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Cell-Cell Adhesion. *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26937/>
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13(19), 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
- Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T., & Svorcik, V. (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*, 29(6), 739-767. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.004>
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, 403-430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 546-554. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>

- Boudriot, U., Dersch, R., Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2006). Electrospinning Approaches Toward Scaffold Engineering—A Brief Overview. *Artificial Organs*, 30(10), 785-792. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2006.00301.x>
- Carletti, E., Motta, A., & Migliaresi, C. (2011). Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 695, 17-39. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2
- Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., Singh, S. R., & Pillai, S. R. (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17121974>
- Chen, M., Patra, P. K., Warner, S. B., & Bhowmick, S. (2007). Role of Fiber Diameter in Adhesion and Proliferation of NIH 3T3 Fibroblast on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds. *Tissue Engineering*, 13(3), 579-587. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0205>
- Chen, M., Patra, P. K., Lovett, M. L., Kaplan, D. L., & Bhowmick, S. (2009). Role of electrospun fibre diameter and corresponding specific surface area (SSA) on cell attachment. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3(4), 269-279. <https://doi.org/10.1002/term.163>
- Cheng, A., Schwartz, Z., Kahn, A., Li, X., Shao, Z., Sun, M., Ao, Y., Boyan, B. D., & Chen, H. (2019). Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 25(1), 14-29. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0119>
- Cheung, H.-Y., Lau, K.-T., Lu, T.-P., & Hui, D. (2007). A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*, 38(3), 291-300. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2006.06.014>
- Chiu, L. L. Y., Chu, Z., & Radisic, M. (2011). 2.07—Tissue Engineering. In D. L. Andrews, G. D. Scholes, & G. P. Wiederrecht (Eds.), *Comprehensive*

- Nanoscience and Technology* (pp. 175-211). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374396-1.00085-4>
- Cho, S. J., Jung, S. M., Kang, M., Shin, H. S., & Youk, J. H. (2015). Preparation of hydrophilic PCL nanofiber scaffolds via electrospinning of PCL/PVP-b-PCL block copolymers for enhanced cell biocompatibility. *Polymer*, 69, 95-102.
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.05.037>
- Colmenares-Roldán, G. J., Quintero-Martínez, Y., Agudelo-Gómez, L. M., Rodríguez-Vinasco, L. F., & Hoyos-Palacio, L. M. (2017). Influence of the molecular weight of polymer, solvents and operational condition in the electrospinning of polycaprolactone. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 84, 35-45. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.n84a05>
- Conoscenti, G., Carrubba, V. L., & Brucato, V. (2017). A Versatile Technique to Produce Porous Polymeric Scaffolds: The Thermally Induced Phase Separation (TIPS) Method. *Archives in Chemical Research*, 1(2).
<https://doi.org/10.21767/2572-4657.100012>
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>
- Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y.-Y., & Hamblin, M. R. (2011). Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9(7), 857-879. <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>
- Deb, P., Deoghare, A. B., Borah, A., Barua, E., & Das Lala, S. (2018). Scaffold Development Using Biomaterials: A Review. *Materials Today: Proceedings*, 5(5, Part 2), 12909-12919. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.02.276>
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*, 2011, e290602. <https://doi.org/10.1155/2011/290602>

- Duan, B., Wu, L., Li, X., Yuan, X., Li, X., Zhang, Y., & Yao, K. (2007). Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 18(1), 95-115. <https://doi.org/10.1163/156856207779146105>
- Dutta, R. C., Dey, M., Dutta, A. K., & Basu, B. (2017). Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 35(2), 240-250. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.01.001>
- Dwivedi, R., Kumar, S., Pandey, R., Mahajan, A., Nandana, D., Katti, D. S., & Mehrotra, D. (2020). Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 10(1), 381-388. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.10.003>
- Ebrahimi, M. (2021). Porosity parameters in biomaterial science: Definition, impact, and challenges in tissue engineering. *Frontiers of Materials Science*, 15(3), 352-373. <https://doi.org/10.1007/s11706-021-0558-4>
- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, e3429527. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>
- Granja, A., & Herrera, D. (2018). Obtención y caracterización de fibras submicrométricas de quitosano mediante la técnica de electrohilado. *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/14763>
- Grinnell, F., & Feld, M. K. (1982). Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(9), 4888-4893.
- Gupta, V., Khan, Y., Berklund, C. J., Laurencin, C. T., & Detamore, M. S. (2017). Microsphere-Based Scaffolds in Regenerative Engineering. *Annual Review of*

- Biomedical Engineering*, 19(1), 135-161. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044712>
- Huang, W., Li, X., Shi, X., & Lai, C. (2014). Microsphere based scaffolds for bone regenerative applications. *Biomaterials Science*, 2(9), 1145-1153. <https://doi.org/10.1039/C4BM00161C>
- Hutmacher, D. W., Woodfield, T. B. F., & Dalton, P. D. (2014). Chapter 10—Scaffold Design and Fabrication. In C. A. V. Blitterswijk & J. De Boer (Eds.), *Tissue Engineering (Second Edition)* (pp. 311-346). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420145-3.00010-9>
- Irvine, D. J., Stachowiak, A. N., & Hori, Y. (2008). Lymphoid tissue engineering: Invoking lymphoid tissue neogenesis in immunotherapy and models of immunity. *Seminars in Immunology*, 20(2), 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.010>
- Jayasinghe, S. N. (2017). Thoughts on Scaffolds. *Advanced Biosystems*, 1(7), 1700067. <https://doi.org/10.1002/adbi.201700067>
- Jia, Y.-T., Gong, J., Gu, X.-H., Kim, H.-Y., Dong, J., & Shen, X.-Y. (2007). Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 403-409. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.010>
- Jin, G., He, R., Sha, B., Li, W., Qing, H., Teng, R., & Xu, F. (2018). Electrospun three-dimensional aligned nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 995-1005. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.06.065>
- Kenry, & Lim, C. T. (2017). Nanofiber technology: Current status and emerging developments. *Progress in Polymer Science*, 70, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002>
- Khorshidi, S., Solouk, A., Mirzadeh, H., Mazinani, S., Lagaron, J. M., Sharifi, S., & Ramakrishna, S. (2016). A review of key challenges of electrospun scaffolds for

- tissue-engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10(9), 715-738. <https://doi.org/10.1002/term.1978>
- Kretlow, J. D., Klouda, L., & Mikos, A. G. (2007). Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(4), 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.013>
- Kumar, J., Kimble, R., Boots, R., & Pegg, S. (2004). Treatment of partial-thickness burns: A prospective, randomized trial using Transcyte (TM). *ANZ journal of surgery*, 74, 622-626. <https://doi.org/10.1111/j.1445-1433.2004.03106.x>
- Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161-3184. <https://doi.org/10.1039/C4TB00027G>
- Lin, H.-Y., Chen, H.-H., Chang, S.-H., & Ni, T.-S. (2013). Pectin-chitosan-PVA nanofibrous scaffold made by electrospinning and its potential use as a skin tissue scaffold. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24(4), 470-484. <https://doi.org/10.1080/09205063.2012.693047>
- Lim, C. T., Tan, E. P. S., & Ng, S. Y. (2008). Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers. *Applied Physics Letters*, 92(14), 141908. <https://doi.org/10.1063/1.2857478>
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 19(6), 485-502. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0437>
- Meyer, U. (2009). The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective. In U. Meyer, J. Handschel, H. P. Wiesmann, & T. Meyer (Eds.), *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (pp. 5-12). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77755-7_1
- Mitić, Ž., Stolić, A., Stojanović, S., Najman, S., Ignjatović, N., Nikolić, G., & Trajanović, M. (2017). Instrumental methods and techniques for structural and physicochemical characterization of biomaterials and bone tissue: A review.

Materials Science and Engineering: C, 79, 930-949.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.127>

Mkhabela, V. J., & Ray, S. S. (2014). Poly(epsilon-caprolactone) nanocomposite scaffolds for tissue engineering: A brief overview. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 535-545. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9055>

Mohamad Yunos, D., Bretcanu, O., & Boccaccini, A. R. (2008). Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science*, 43(13), 4433-4442. <https://doi.org/10.1007/s10853-008-2552-y>

Mwiiri, F. K., & Daniels, R. (2020). Influence of PVA Molecular Weight and Concentration on Electrospinnability of Birch Bark Extract-Loaded Nanofibrous Scaffolds Intended for Enhanced Wound Healing. *Molecules*, 25(20), 4799. <https://doi.org/10.3390/molecules25204799>

Nemati, S., Kim, S., Shin, Y. M., & Shin, H. (2019). Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. *Nano Convergence*, 6(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40580-019-0209-y>

Noriega, S. E., Hasanova, G. I., Schneider, M. J., Larsen, G. F., & Subramanian, A. (2012). Effect of Fiber Diameter on the Spreading, Proliferation and Differentiation of Chondrocytes on Electrospun Chitosan Matrices. *Cells Tissues Organs*, 195(3), 207-221. <https://doi.org/10.1159/000325144>

O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88-95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)

Onuwaje, I., & Phillips, J. B. (2020). Chapter 16—Three-dimensional culture systems in central nervous system research. En A. J. Salgado (Ed.), *Handbook of Innovations in Central Nervous System Regenerative Medicine* (pp. 571-601). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818084-6.00016-7>

Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., & Yamamoto, H. (2004). Electrospinning of Chitosan. *Macromolecular Rapid Communications*, 25(18), 1600-1605. <https://doi.org/10.1002/marc.200400253>

- Oryan, A., & Sahvieh, S. (2017). Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104(Pt A), 1003-1011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.124>
- Rahmani Del Bakhshayesh, A., Annabi, N., Khalilov, R., Akbarzadeh, A., Samiei, M., Alizadeh, E., Alizadeh-Ghodsi, M., Davaran, S., & Montaseri, A. (2018). Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(4), 691-705. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1349778>
- Rahmati, M., Mills, D. K., Urbanska, A. M., Saeb, M. R., Venugopal, J. R., Ramakrishna, S., & Mozafari, M. (2021). Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*, 117, 100721. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100721>
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Solomon, F. D. P. (2015). 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*, 230(1), 16-26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>
- Rider, P., Kačarević, Ž. P., Alkildani, S., Retnasingh, S., & Barbeck, M. (2018). Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*, 9. <https://doi.org/10.1177/2041731418802090>
- Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A., & Quiñones-Olvera, L. F. (2015). Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*, 2015, e821279. <https://doi.org/10.1155/2015/821279>
- Sajeev, U. S., Anoop Anand, K., Menon, D., & Nair, S. (2008). Control of nanostructures in PVA, PVA/chitosan blends and PCL through electrospinning. *Bulletin of Materials Science*, 31(3), 343-351. <https://doi.org/10.1007/s12034-008-0054-9>
- Sandri, G., Rossi, S., Bonferoni, M. C., Caramella, C., & Ferrari, F. (2020). Electrospinning Technologies in Wound Dressing Applications. En *Therapeutic*

- Dressings and Wound Healing Applications* (pp. 315-336). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119433316.ch14>
- Shick, T. M., Abdul Kadir, A. Z., Ngadiman, N. H. A., & Ma'aram, A. (2019). A review of biomaterials scaffold fabrication in additive manufacturing for tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 34(6), 415-435. <https://doi.org/10.1177/0883911519877426>
- Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R., & Rao, S. (2018). PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Molecular Biotechnology*, 60(7), 506-532. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0084-5>
- Skoog, S. A., Goering, P. L., & Narayan, R. J. (2014). Stereolithography in tissue engineering. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 25(3), 845-856. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5107-y>
- Steele, J. G., Johnson, G., & Underwood, P. A. (1992). Role of serum vitronectin and fibronectin in adhesion of fibroblasts following seeding onto tissue culture polystyrene. *Journal of Biomedical Materials Research*, 26(7), 861-884. <https://doi.org/10.1002/jbm.820260704>
- Suga, M., Asahina, S., Sakuda, Y., Kazumori, H., Nishiyama, H., Nokuo, T., Alfredsson, V., Kjellman, T., Stevens, S. M., Cho, H. S., Cho, M., Han, L., Che, S., Anderson, M. W., Schüth, F., Deng, H., Yaghi, O. M., Liu, Z., Jeong, H. Y., ... Terasaki, O. (2014). Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. *Progress in Solid State Chemistry*, 42(1), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2014.02.001>
- Tan, K. H., Chua, C. K., Leong, K. F., Cheah, C. M., Cheang, P., Abu Bakar, M. S., & Cha, S. W. (2003). Scaffold development using selective laser sintering of polyetheretherketone-hydroxyapatite biocomposite blends. *Biomaterials*, 24(18), 3115-3123. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00131-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00131-5)

- Vacanti, C. A. (2006). History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Engineering*, 12(5), 1137-1142. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1137>
- Venugopal, J., & Ramakrishna, S. (2005). Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 125(3), 147-157. <https://doi.org/10.1385/ABAB:125:3:147>
- Vig, K., Chaudhari, A., Tripathi, S., Dixit, S., Sahu, R., Pillai, S., Dennis, V. A., & Singh, S. R. (2017). Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040789>
- Wang Z, Zhang Z, WU DINGYU, Zhang Z, Li Y, Wang J, Zhou Q, Jin X, Xie H, Zhou G, Zhang W, Liu W, & Cao Y. (2015). *MEDICAL POLYCAPROLACTONE MEMBRANE AS WELL AS PREPARATION METHOD AND APPLICATION OF MEDICAL POLYCAPROLACTONE MEMBRANE*. https://patentscope.wipo.int/search/es/detail.jsf?docId=CN145440679&tab=NATIONALBIBLIO&_cid=P10-KN3OXX-59424-1
- Wong, Y. S., Tay, C. Y., Wen, F., Venkatraman, S., & Tan, L. P. (2012). Engineered Polymeric Biomaterials for Tissue Engineering. *Current Tissue Engineering*, 1, 41-53. <https://doi.org/10.2174/2211542011201010041>
- Yang, W., Fu, J., Wang, D., Wang, T., Wang, H., Jin, S., & He, N. (2010). Study on Chitosan/Polycaprolactone Blending Vascular Scaffolds by Electrospinning. *Journal of biomedical nanotechnology*, 6, 254-259. <https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1123>
- Ye, K., Kuang, H., You, Z., Morsi, Y., & Mo, X. (2019). Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering with Drug Loading and Release. *Pharmaceutics*, 11(4), 182. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040182>
- Yusop, A. H., Bakir, A. A., Shaharom, N. A., Abdul Kadir, M. R., & Hermawan, H. (2012). Porous Biodegradable Metals for Hard Tissue Scaffolds: A Review.

International Journal of Biomaterials, 2012, e641430.

<https://doi.org/10.1155/2012/641430>

- Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C., & Teoh, S. H. (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(4), 1169-1185. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00232-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00232-0)
- Zhang, Y., Huang, X., Duan, B., Wu, L., Li, S., & Yuan, X. (2007). Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. *Colloid and Polymer Science*, 285(8), 855-863. <https://doi.org/10.1007/s00396-006-1630-4>