



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00070

Matrícula: 2121800675

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS DE ÁCIDO POLI (LÁCTICO) Y ÁCIDO POLI (GLICÓLICO) MODIFICADOS SUPERFICIALMENTE POR PLASMA PARA SU USO COMO SUSTITUTOS DE PIEL.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 13 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS
DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ
DR. JUAN MORALES CORONA



GRACIELA RUIZ VELASCO
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (FISICA)

DE: GRACIELA RUIZ VELASCO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTA

DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

VOCAL

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

SECRETARIO

DR. JUAN MORALES CORONA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
Departamento de Física, área de Polímeros

Estudio y caracterización de andamios poliméricos de ácido poli (láctico) y ácido poli (glicólico) modificados superficialmente por plasma para su uso como sustituto de piel.

Presenta:

Fis. Graciela Ruiz Velasco

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias (Física)

Asesor:

Dr. Juan Morales Corona

Comité evaluador:

Presidente: Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

Secretario: Dr. Juan Morales Corona

Vocal: Dr. Rafael Godínez Fernández

Ciudad de México, a 13 de Diciembre de 2018



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Departamento de Física, área de Polímeros

Estudio y caracterización de andamios poliméricos de ácido poli (láctico) y ácido poli (glicólico) modificados superficialmente por plasma para su uso como sustituto de piel

Presenta:

Fís. Graciela Ruiz Velasco

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias (Física)

Asesor:

Dr. Juan Morales Corona

Comité evaluador:

Presidente: Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

Secretario: Dr. Juan Morales Corona

Vocal: Dr. Rafael Godínez Fernández

Ciudad de México, a 13 de Diciembre de 2018

Agradecimientos institucionales**Universidad Autónoma Metropolitana**

Por brindarme la oportunidad de ser parte de su comunidad y por formarme con grandes valores profesionales.

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**

Por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de maestría.

**Instituto Nacional de Rehabilitación**

Banco de Tejidos y piel del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados, por las facilidades prestadas para la elaboración de este trabajo.

A mi familia

Apolonia, Primitivo, Rosalía, Marcos, Emmanuel y Eduardo

A Elpidia, María, Francisco y Maximino

In memoriam

Agradecimientos personales

A *mi madre* por darme los tesoros más valiosos que posee, “*su amor y su tiempo*”. *Mamá*, jamás habrá forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante. Este logro es tuyo también y mi esfuerzo es inspirado en ti.

A *mi padre* por su gran ejemplo de pasión a la profesión, del esfuerzo y sacrificio para conquistar un sueño y construir un futuro mejor y por enseñarme el gran valor de la honestidad y la generosidad.

A “*Peluchito*” por ser mi guía, por su valiosa ayuda y por su mucha o poca paciencia que me tuvo cuando fue necesaria; pero sobre todo por estar ahí siempre a mi lado, ser mi hermana y mejor amiga.

A *Héctor Ramírez*, por su apoyo y gran tolerancia para responder todas mis dudas y curiosidades en la parte médica de este trabajo; pero sobre todo por su tiempo y amistad incondicional. “*Caballerito*”, cómo olvidar cuando iniciábamos y trazábamos nuestros sueños hace ya varios años atrás y hoy podemos celebrar la culminación de uno de ellos.

A mi asesor, el *Dr. Juan Morales Corona* por su apreciable amistad, apoyo y paciencia que tuvo en la elaboración de esta tesis. A los doctores *Roberto Olayo González, Humberto Vázquez y Raúl Montiel* por sus acertados comentarios y correcciones. A mis sinodales, la *Dra. Meli* y el *Dr. Rafael Godínez* por apoyarme en la mejora de esta tesis.

Al médico *Héctor Javier González Landetta*, y a la Odontóloga *Gloria Hernández Elizalde*, por compartirme sus experiencias, materiales bibliográficos y motivarme a seguir adelante.

A mis compañeros del laboratorio de polímeros: *Xinah Herón* por sacarme de la rutina en el momento justo. A *Bibis, Dianis, Nancy, Lupita, la Dra. Dorita, Omar Fabela, Omar Uribe, Gregorio, Ramón, Miguelina, Erika y Emma* por compartir sus conocimientos, experiencias y días muy agradables.

A mis grandes amigas y amigos: *Sandra, Belinda, Marisol Cerino, Natalia, Kenia, Carlos Zagoya, Jaime Burgos, y David Enrique*, por la complicidad en estos sueños, por su ejemplo de perseverancia y aliento para seguir creciendo. Y uno en especial para *Elizabeth Aquino*, por ser la primera persona en enseñarme a creer en mí.

A los profesores: *José Luis Jiménez, José Luis Del Rio, Annik Vivier Jegoux, Rosa Ma. Velasco, Leonardo Dagdug, Norberto Aquino, Laura Hidalgo, Abel Camacho, Eloy Ramos, Eckehard W. Mielke, Irina Druzhinina de Tkatchenko, Lidia Jiménez, Ma. Elena Luna, Olga L. Hdez. Chávez y Ricardo López Lemus*, por sus fascinantes clases y grandes motivaciones.

A mis compañeros de maestría *Nahúm, Evelyn, Martín, Yoshua, Marisol Gómez y Daniel Huerta* porque la unión hace la fuerza y sin ellos sobrevivir habría sido más difícil.

A todos ¡muchas gracias!

Índice

Resumen	1
1. Introducción	3
2. Generalidades.....	6
2.1. Anatomía de la piel	6
2.2. Lesiones de la piel.....	10
2.3 Sustitutos cutáneos	12
2.4. Biomateriales.....	15
2.5. Polímeros.....	17
2.5.1 Polímeros sintéticos	18
2.5.2. Ácido poliglicólico.....	19
2.5.3. Ácido poliláctico	20
2.6. Electrohilado	22
2.7. Polimerización por plasma	23
2.7.1. Plasma.....	23
2.7.2. Clasificación del plasma.....	25
2.7.3. Plasmas naturales.....	25
2.7.4. Plasmas artificiales	26
2.7.5. Descarga de radio frecuencia.....	26
2.7.6. Parámetros que caracterizan un plasma de radio frecuencia....	27
2.8. Tipos de polimerización.....	28
2.9. Polímeros Conductores y semiconductores.....	29
2.10. Pirrol	30
2.10.1. Películas de pirrol sintetizado por plasma.....	31
2.11. Yodo	31
2.12 Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada	32
2.12.1 Radiación Infrarroja	32
2.12.2. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.....	34

2.12.3. Reflectancia Total Atenuada	34
3. Motivación	36
4. Objetivos	37
4.1. Objetivo general	37
4.2. Objetivos específicos	37
4.3. Objetivos particulares	37
5. Desarrollo experimental	38
5.1. Preparación de los andamios	38
5.2. Polimerización por plasma	38
5.3. Caracterización fisicoquímica y morfológica	40
5.3.1. Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier - Reflectancia Total Atenuada	40
5.3.2. Dispersión de Rayos X a ángulo pequeño	40
5.3.3. Dispersión de Rayos X a ángulo grande	41
5.3.4. Microscopia Electrónica de Barrido	42
5.4. Caracterización biológica	42
5.4.1. Esterilización y sembrado de células	43
5.4.2. Microscopía Óptica	43
5.4.3. Microscopia Confocal	44
6. Resultados y discusión	45
6.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada	45
6.2. Dispersión de Rayos X	49
6.2.1. Dispersión de Rayos X a ángulo pequeño	49
6.2.2. Dispersión de Rayos X a ángulo grande	50
6.3. Microscopía Electrónica de Barrido	54
6.4. Pruebas biológicas	59
6.4.1. Prueba de acidez	59
6.4.3. Microscopio Óptico	60
6.4.3. Microscopía Confocal	64
7. Conclusiones y perspectivas	70

7.1. Conclusiones	70
7.2. Perspectivas.....	70
Bibliografía.....	72
Anexos	78
Productividad del trabajo	78
Artículos publicados	78
Trabajos en congresos.....	78
Seminarios.....	79

Resumen

Dada la problemática que se presenta en los casos clínicos de pacientes con quemaduras extensas, el disponer de la cantidad suficiente de piel sana para cubrir las heridas a veces no es posible por lo que los riesgos de infección u otras complicaciones se incrementan.

La aplicación científica de la disciplina de ingeniería de tejidos, apoyándose en el campo de los materiales, en particular en el de los biomateriales ha permitido el desarrollo de andamios poliméricos que sirven como base para el crecimiento de células.

Por lo anterior, el presente trabajo se desarrolló con la finalidad de generar un material que permita la creación de piel humana de forma artificial. Para ello se trabajó en la modificación superficial de un andamio de ácido poli-l-láctico (PLLA) y ácido poliglicólico (PGA) mediante la técnica de plasma, depositándoles una película delgada de polipirrol dopado con yodo (PPy-I). Una vez que los andamios se modificaron superficialmente se les realizó análisis de morfología y propiedades superficiales mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopia de infrarrojo de reflectancia total atenuada. Los espectros de infrarrojo mostraron los puntos característicos del PLLA y del PGA reportados en la literatura e identificando la presencia de los materiales base de los andamios, así como también de los grupos funcionales típicos de PPy-I sintetizado por plasma. Las imágenes de microscopía electrónica mostraron para el andamio de PLLA una estructura firme con dimensiones alrededor de 50µm en su sección transversal cuyo tamaño es idóneo para la fijación de células. Para el andamio de ácido PGA las imágenes de microscopía electrónica mostraron la fragilidad del andamio exponiendo fibras carentes de firmeza y en estado de degradación. Los andamios modificados se sometieron a pruebas biológicas a través de cultivos de células humanas primarias de la piel como fibroblastos y queratinocitos, así como también con tenocitos primarios y la línea celular HEK-293. Previo a los cultivos de células se realizó una prueba de acidez para los andamios en presencia de medio de cultivo, midiendo el pH a las 24, 48 y 72 horas y a los 7 días. El andamio de PGA sufrió un cambio muy significativo de pH (de 7.23 se fue a 3.15) causado por la degradación del material, tornando demasiado ácido el medio de cultivo e impidiendo algún tipo de crecimiento celular. Para el andamio de PLLA se tuvo un pH de alrededor de 7.38 el cual se mantuvo constante sin afectación del medio para cultivo celular. Se obtuvieron imágenes con un microscopio óptico para apreciar los núcleos celulares en un medio control, y sobre las fibras de los andamios en medio de cultivo. Las imágenes tomadas para el andamio de PGA recubierto con PPy-I (PPy-I/PGA) mostraron que ninguno de los cuatro tipos de células se

ancló a las fibras y murieron. Las imágenes obtenidas para el andamio de PLLA recubierto con PPy-I (PPy-I/PLLA) mostraron células de los cuatro tipos celulares estudiados claramente adheridas a las fibras del andamio. El complejo células/andamio para PPy-I/PLLA se mantuvieron en cultivo por 9 días, posterior a esto se realizó un lavado y se hizo un remplazo del medio de cultivo por uno infectado con el adenovirus no replicable Ad-CMV-GFP, y se analizaron con microscopia confocal. Las fotomicrografías mostraron poblaciones celulares sobre las fibras del andamio. Como resultado de este trabajo se concluye que el andamio PPy-I/PLLA es un excelente candidato para el crecimiento de células humanas, en particular las de la piel; dejando abierta la posibilidad de obtener un andamio ideal para su uso en la regeneración de piel lesionada.

1. Introducción

Existen dos tipos de heridas en la piel que han motivado el desarrollo de sustitutos para este importante órgano; por un lado se tienen las heridas causadas por quemaduras las cuales pueden llegar a ser muy extensas, y las heridas crónicas causadas por úlceras varicosas, lesiones diabéticas, y problemas de cicatrizaciones que tienden a involucrar un área relativamente pequeña de piel pero que representan una alta exigencia de atención médica. La necesidad de sanar heridas en el entorno clínico, ha llevado al desarrollo de sustitutos de piel. Si bien es cierto que ninguno de los sustitutos actualmente disponibles puede remplazar todas las estructuras y funciones de la piel natural, estos pueden ser usados para proporcionar cobertura a las heridas y facilitar la curación de lesiones crónicas y agudas. Para que un sustituto de piel tenga una aplicación clínica útil, la primera meta que debe cumplir es regenerar la barrera superficial de la piel cuya función está asignada a la epidermis, encargada de sintetizar ciertas proteínas, regular la pérdida de fluidos y prevenir infecciones. Idealmente, los remplazos de piel deberían promover una cobertura permanente sin la necesidad de requerir posibles cirugías o injertos posteriores permitiendo una rápida curación al obtener un remplazo adecuado de la capa dérmica y epidérmica. Más aún, los sustitutos regeneradores de piel deben ser fáciles de usar en el momento que se requiera, lograr una funcionalidad aceptable, dar el mejor resultado cosmético posible y estar libres de riesgos de transmisión de enfermedades y reacciones inmunológicas. El uso de sustitutos de piel puede ser conveniente como una terapia adjunta en casos con escasas alternativas como sucede con los pacientes con quemaduras de grandes extensiones de piel o con heridas crónicas que no responden a los tratamientos convencionales. La necesidad de obtener una piel de manera artificial y que pueda ser una alternativa cuando se sufren pérdidas parciales de la misma es grande. A veces el problema se puede solucionar de manera parcial o total al realizarse autoinjertos (piel del propio paciente), aloinjertos (recubrimientos con piel donada), xenoinjertos (coberturas hechas a base de piel de animales, como el cerdo) o sustitutos dérmicos que ya existen en el mercado. El uso de las técnicas mencionadas no siempre es la mejor solución para el tratamiento de las lesiones de la piel debido a que los pacientes puede presentar poca cantidad de piel para la aplicación de un autoinjerto (como en el caso de las quemaduras que involucran el 60% o más de la piel), un rechazo inmunológico en el caso del aloinjerto y xenoinjerto, una mala aplicación quirúrgica y en el caso de los sustitutos cutáneos comerciales los altos costos, problemas de manipulación y preservación.

La ingeniería de tejidos es la disciplina científica encargada de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos y

órganos funcionales sustentándose en la medicina, la ciencia de materiales y la biología. Los andamios son estructuras hechas a base de polímeros sintéticos o naturales cuya función es ofrecer un soporte tridimensional que brinde sostén mecánico a la carga fisiológica, permita la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Un andamio ideal debe contribuir a la producción de la matriz extracelular natural del tejido u órgano dañado y así conseguir la regeneración. El área de materiales es la encargada de desarrollar y estudiar polímeros que sean biocompatibles para que funcionen como andamios para las células asignadas a la regeneración de tejidos y órganos. Polímeros como el ácido poliláctico y sus dímeros D y L así como el ácido poliglicólico han sido ampliamente estudiados y aplicados en la ingeniería de tejidos por ser bioestables y biodegradables. Los andamios compuestos de fibras hechas a base de ácido poliáctico y ácido poliglicólico son intrínsecamente hidrófobos por lo cual las células llegan a tener un anclaje pobre sobre ellos. El modificar por algún medio físico o químico las superficies de los andamios permite ofrecer un ambiente más rico en grupos funcionales sobre su superficie que permitan un mejor desarrollo celular. Un método físico para modificar superficies de andamios es el tratamiento por plasma. Esta técnica ha mostrado que los andamios así modificados presentan una mejor adhesión y proliferación celular, además se ha documentado que a través de la técnica de plasma, el depósito de películas delgadas de polipirrol y polipirrol dopado con yodo generan una superficie rica en grupos amina con cargas positivas sobre las fibras de los andamios provocando un mejor anclaje, crecimiento y proliferación celular.

En este trabajo se presenta una técnica de modificación de la superficie de dos andamios poliméricos, uno de ácido poli L-láctico y otro de ácido poliglicólico de la marca Biofelt® a los cuales se les realizó un recubrimiento por plasma de polipirrol dopado con yodo. Los andamios modificados se caracterizaron fisicoquímicamente por las técnicas estándar para polímeros y morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido. Se les realizaron pruebas biológicas utilizando cultivos celulares de queratinocitos y fibroblastos primarios derivados de piel humana, tenocitos primarios y la línea celular HEK-293. Todo lo anterior se realizó con el objetivo de proponer un material biocompatible y bioestable que permita el desarrollo de una piel humana de manera artificial que no tenga los inconvenientes de otros substitutos de piel.

El contenido de la presente obra se desarrolla de la manera siguiente: en el capítulo 2, se expone una descripción general de la anatomía de la piel, las lesiones que requieren un tratamiento, la descripción de un biomaterial y

de un biomaterial polimérico, y las características que debe cubrir un andamio polimérico, su función como base para el cultivo de células, en partículas las de piel. En el capítulo tres se plantea la motivación para la realización de este trabajo, en el capítulo cuatro los objetivos, en el capítulo cinco se explica el desarrollo experimental iniciando con la selección de materiales, continuando con el proceso de modificación de superficies y culminando con las técnicas de caracterización, en el capítulo seis se exponen los resultados obtenidos, en el capítulo siete las conclusiones y perspectivas que arrojado este trabajo, el capítulo ocho se encuentra la bibliografía y finalmente esta un anexo donde se enlistan los trabajos publicados y presentados a raíz de este proyecto.

2. Generalidades

2.1. Anatomía de la piel

El sistema tegumentario se encuentra formado por la piel y sus estructuras anexas como pelo, uñas, glándulas, músculos y nervios. Este sistema está encargado de proteger la integridad física y biológica del cuerpo manteniendo constante la temperatura corporal y proporcionando información sensorial acerca del entorno.

La piel es el órgano que recubre toda la superficie exterior de nuestro cuerpo de tal forma que en una persona adulta sus dimensiones llegan a ser hasta de dos metros cuadrados con un peso aproximado de cuatro a cinco kilogramos, es decir, que la piel constituye el 16% del peso corporal. Su grosor varía de 0.5 mm en párpados, hasta 4mm en talones, en la mayor parte del cuerpo va de 1 a 2 mm [1].



Figura 2.1.1. La piel (Tomado de (2)).

De manera general se puede decir que su estructura está conformada por tres capas: *epidermis*, *dermis* e *hipodermis*. Las dos primeras capas son

donde se llevan a cabo las funciones fisiológicas de este órgano (Figura 2.1.2) [1, 3-8].

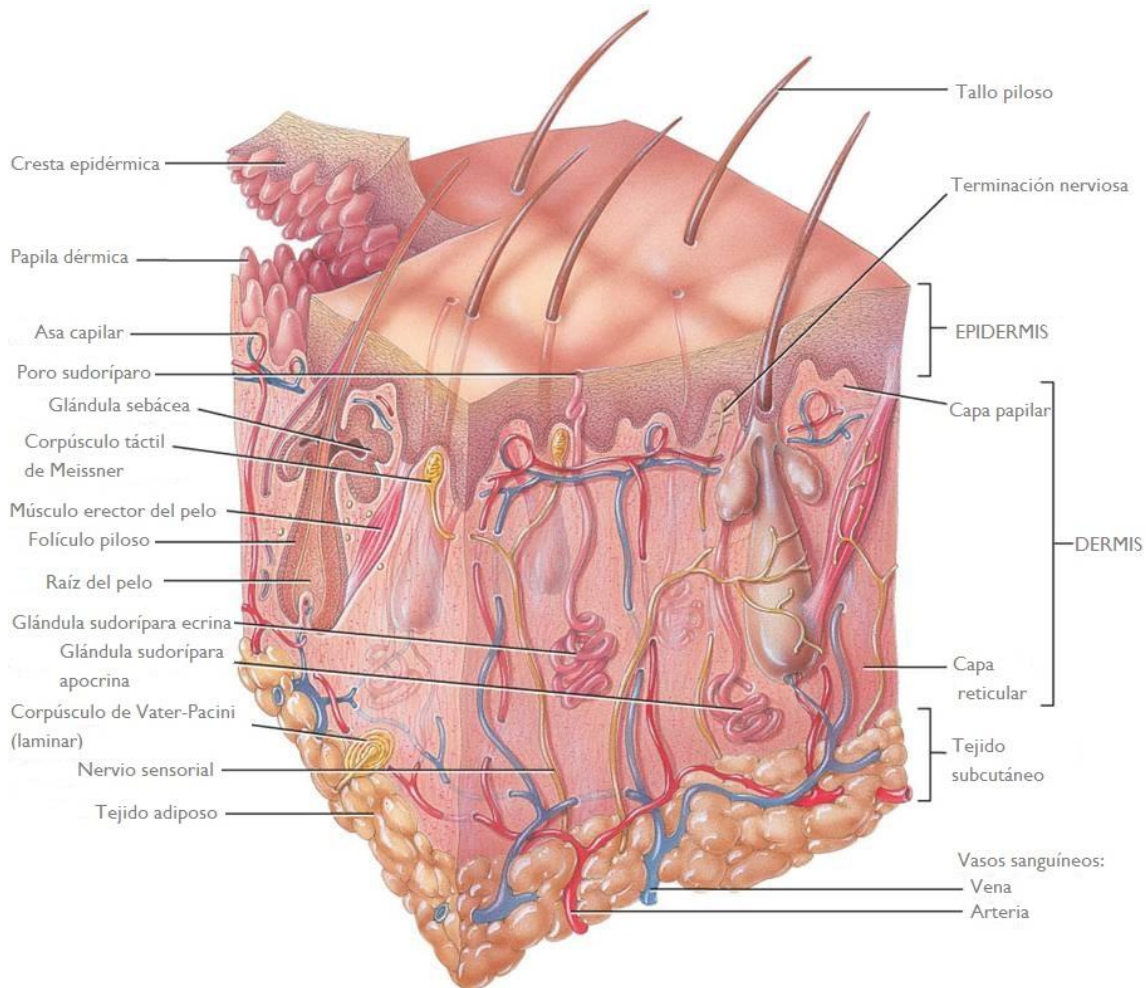


Figura 2.1.2. Vista seccional de la piel. Elementos que componen parte del sistema tegumentario de acuerdo a la capa en la que se integran (Tomado de (1)).

La epidermis es la cubierta más delgada de la piel, conformada por tejido epitelial y localizada con el exterior del cuerpo. Al ser el recubrimiento superficial y el más delgado de la piel su composición celular está dada por el 90% de queratinocitos, 8% de melanocitos y el resto por células de Langerhans y Merkel; las cuales están distribuidas en cuatro y cinco tipos de capas que varían de acuerdo al área corporal donde se encuentren.

En la mayor parte de la composición de la epidermis (Figura 2.1.3) se tienen cuatro estratos: *basal*, *espinoso*, *granuloso* y *córneo* (este último es el más delgado y es el que está en contacto con el exterior) y en las regiones de más fricción como las palmas de las manos, yemas de los dedos y plantas de los pies se tienen cinco estratos: *basal*, *espinoso*,

granuloso, lúcido y córneo. El estrato basal se encuentra en la parte más profunda de la epidermis y está formado por una sola hilera de queratinocitos cúbicos o cilíndricos, donde algunos de los cuales son células madre encargadas de producir continuamente nuevos queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans y Merkel, que se encuentran dispersos entre los queratinocitos de este estrato. Es importante mencionar que la piel no se puede regenerar si una lesión destruye el estrato basal y sus células madre; por lo que este tipo de lesiones cutáneas requerirán de injertos para su curación [1-8,11].

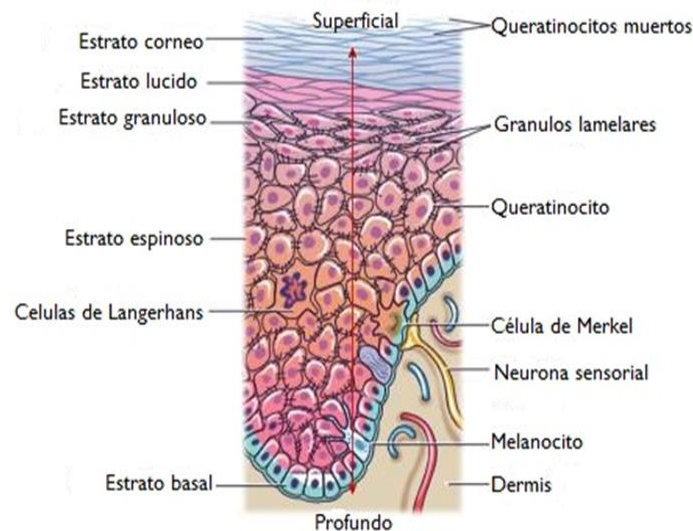


Figura 2.1.3 Composición de la epidermis donde se muestran los estratos que la conforman (Tomado de (9)).

Sobre el *estrato basal* se encuentra el *estrato espinoso* el cual consiste de ocho a diez capas de queratinocitos poliédricos unidos estrechamente y con la misma composición que los del estrato basal aunque algunos en este estrato todavía conservan su capacidad de división celular, y donde también se observan prolongaciones de células de Langerhans y melanocitos. En la parte central de la epidermis se encuentra el *estrato granuloso* formado de tres a cinco capas de queratinocitos aplanados en los que ocurre la apoptosis (muerte celular programada), por lo que el estrato granuloso marca la transición entre los estratos profundos metabólicamente activos y las células muertas de los estratos superficiales. El *estrato lúcido* solo se encuentra en la piel de las yemas de los dedos, palmas de las manos y plantas de los pies y está formado de tres a cinco capas de queratinocitos transparentes planos y muertos con filamentos intermedios muy apiñados y una membrana plasmática gruesa, mientras que el *estrato córneo* consta de 25 a 30 capas de queratinocitos muertos y aplanados. Entre las células hay lípidos de los gránulos laminares que permiten hacer impermeable este estrato, en el que las

células se descaman constantemente y son sustituidas por otras que emergen de estratos más profundos [1,3-8,11].

La dermis es la capa profunda y gruesa de la piel, compuesta de tejido conectivo laxo areolar que contiene colágeno y fibras elásticas (figura 2.1.4). La poca población celular que aquí se encuentra está conformada por algunos fibroblastos, macrófagos, y adipocitos, además de vasos sanguíneos, nervios, glándulas y folículos pilosos. Se divide en dos capas: *papilar superficial* y *reticular profunda*. En la capa papilar superior se encuentran las papilas dérmicas las cuales son pequeñas protuberancias digitiformes (tienen forma de dedos) que conforman terminales nerviosas que emergen y penetran a la epidermis conteniendo asas capilares encargadas del abastecimiento nutritivo de la epidermis debido a que esta no posee vasos sanguíneos. Algunas de estas papilas incluyen receptores táctiles llamados *corpúsculos de Meissner* que son terminaciones nerviosas sensibles al tacto. En las papilas dérmicas también existen terminaciones nerviosas libres, cuya finalidad es enviar impulsos que se traducirán como sensaciones de calor, frío, dolor, cosquilleo y comezón. Por su parte la capa reticular profunda está compuesta de tejido conectivo denso e irregular, de colágena y fibras elásticas gruesas entrelazadas en forma de red, entre cuyos espacios hay adipocitos, folículos pilosos, nervios, glándulas sebáceas y sudoríparas. Dicha combinación de fibras de colágena y elásticas en esta capa le proporciona a la piel su resistencia, extensibilidad y elasticidad [1,3-8,11].

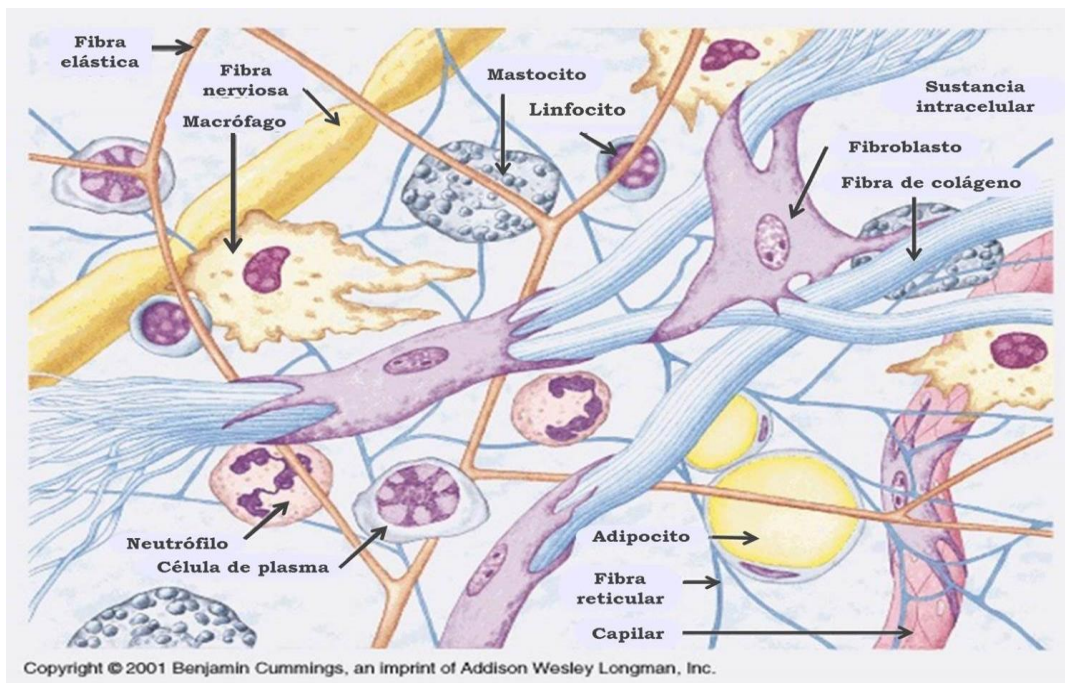


Figura 2.1.4. Composición del tejido laxo areolar presente en la dermis (Tomado de (10))

La hipodermis conocida también como *capa subcutánea* (Figura 2.1.5), es la encargada de unir a la piel con las estructuras subyacentes como el hueso o el músculo. Esta capa se encuentra constituida por tejido areolar adiposo subcutáneo, formada por células llamadas adipocitos, fibroblastos y macrófagos. Su composición consta de dos capas, la *areolar* que es la más externa, está en contacto con la dermis y contiene principalmente adipocitos; y la *lamelar* que es la profunda y que es la que se incrementa cuando una persona aumenta de peso. Las funciones más destacadas de esta capa son conservar la temperatura, almacenar sustancias que son la fuente de energía química más importante para el organismo y ser una almohadilla amortiguadora. Aunque pareciera que este tipo de tejido no sirve de mucho este suele tener funciones importantes en el organismo ya que los adipocitos tienen receptores para las hormonas del crecimiento, tiroideo y la insulina, y además en ellos se almacenan los lípidos que son principalmente grasas neutras y triglicéridos [1,3-8,11].

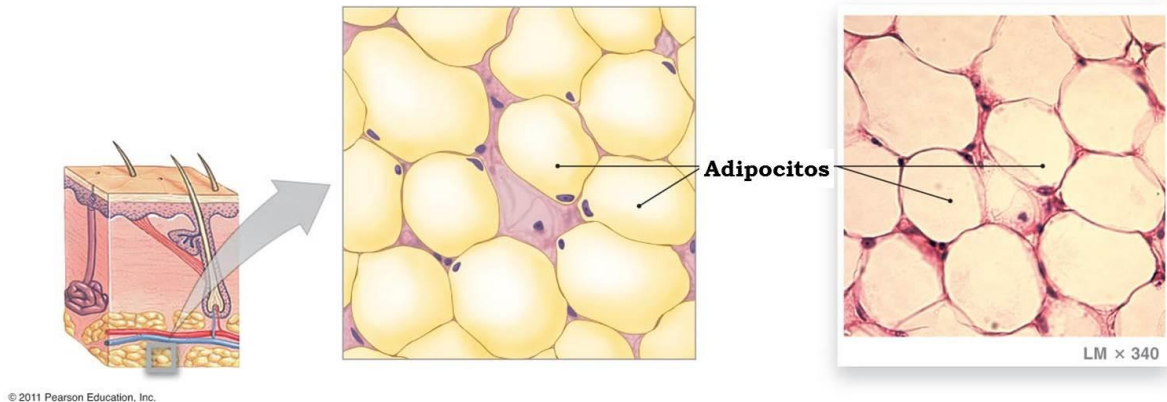


Figura. 2.1.5. Estructura y localización del tejido adiposo profundo de la piel (Tomado de (12)).

2.2. Lesiones de la piel

La piel conforma la capa límite exterior entre el ser humano y el medio ambiente, y en este lugar tan expuesto actúa por una parte como barrera, y por otra como enlace entre el mundo exterior y los órganos internos. Pero su misión es mucho más amplia e importante que la de servir como límite entre nuestro organismo y el medio. Dentro de las funciones específicas y vitales esta su efecto protector a los agentes físicos, químicos y biológicos presentes en el medio ambiente y que son potencialmente agresivos como los traumatismos, las radiaciones solares, el frío o calor intenso, productos cáusticos y microorganismos por mencionar algunos. Su intervención en la prevención de la invasión de microorganismos es mediante el proceso de descamación de la capa queratínica. La secreción sebácea posee propiedades antimicrobianas debido a su elevado nivel de ácidos grasos de cadena larga. Favorece el intercambio de temperatura con el medio

ambiente mediante y la modificación del calibre de sus vasos sanguíneos actúa como sistema de termorregulación, de tal manera que una vasodilatación hace perder calor y una vasoconstricción lo evita y algunos de sus anexos como pelos y glándulas sudoríparas, también intervienen en el mantenimiento de la temperatura interna, tiene participación en la síntesis de la vitamina D, en el metabolismo lipídico y sobre todo, hidroelectrolítico. La piel está considerada como un órgano sensorial de primer orden debido a que contiene un gran número de receptores sensitivos para el tacto, temperatura y dolor y por consiguiente es un órgano de comunicación social, el cambio en la inervación de sus vasos como respuesta a emociones producen rubor o palidez, a través del tacto personas invidentes pueden comunicarse o realizar la lectura. Los cambios en su coloración normal como la palidez, cianosis, ictericia, vesículas, escaras, manchas por mencionar algunas llegan a constituir signos clínicos presentes en muchas patologías y manifestaciones cutáneas generales o como afecciones propias de la piel. En ella también se realizan pruebas diagnósticas como puede ser la inyección intradérmica de tuberculina, o incluso para la administración de fármacos tópicos o inyectables como la insulina [6].



Figura 2.2.1. Lesiones de la piel. a) Epidermis ampollosa, b) nevos, c) vitiligo, d) pénfigo vulgar, e) cáncer, f) úlceras, g) cicatrices y h) grades heridas.

Por lo tanto, la importancia de mantener una piel intacta y libre de traumatismos es vital para un desarrollo físico, social y psicológico en el ser humano. Pero, la piel puede sufrir algún tipo de daño ya sea por una enfermedad o accidente. Lesiones ocasionadas por quemaduras, cáncer de piel, diabetes, deficiencia venosa, enfermedades congénitas y malas cicatrizaciones pueden dañar la piel (Figura 2.2.1).

Dentro las lesiones más severas que pueden afectar a la piel se encuentran las quemaduras. Una quemadura es una lesión tisular producida por la acción de temperaturas elevadas. La extensión, y magnitud de este tipo de lesión térmica depende del grado de temperatura

y del tiempo de su actuación (Figura 2.2.2). Las consecuencias de las quemaduras se clasifican en una escala de cuatro grados. En la quemadura de *primer grado* se produce un enrojecimiento y ligero hinchamiento de la piel en la región afectada asociándose con dolor, enrojecimiento y sensación de tirantez. En la quemadura de *Segundo grado* figura la formación de ampollas debido a que, por efecto de calor las células se lesionan o destruyen y por tanto liberan sustancias flogógenas (las que producen inflamación), estas sustancias aumentan la permeabilidad vascular y favorecen el paso de plasma a tejidos. Al aumentar en determinada medida la presión de dicho plasma extravasado, se rompen los puentes protoplasmáticos que existen entre las células de la epidermis y por tanto, se forma una vejiga o “ampolla”. En las quemaduras de primero y segundo grado el estrato germinativo permanece intacto, se mantiene la capacidad de regeneración de la piel y puede garantizarse la curación sin dejar cicatriz. En la quemadura de *tercer grado* se da lugar a una lesión duradera del epitelio y de todos los anexos cutáneos. La desnaturalización de proteínas y la necrosis es provocada por el alto grado de temperatura. Y finalmente, la quemadura de *cuarto grado* es la que deja como consecuencia la carbonización de la zona afectada. En esta lesión los tejidos no solo resultan coagulados sino también ennegrecidos y carbonizados por el excesivo efecto del calor [67].

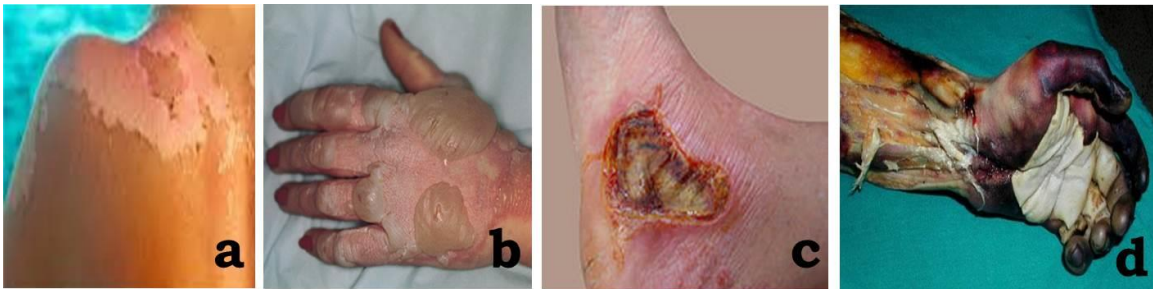


Figura 2.2.2. Tipos de quemaduras. a) Primer grado, solo afecta a la epidermis, b) segundo grado, involucra a la dermis y la epidermis, c) tercer grado, su profundidad afecta a la hipodermis, d) cuarto grado, involucra músculo y hueso.

2.3 Sustitutos cutáneos

Actualmente los sustitutos de piel disponibles varían en complejidad y van desde apósitos temporales sintéticos hasta remplazamientos permanentes, con o sin la incorporación de cultivo de células de piel. Dentro de la variedad de los sustitutos cutáneos actualmente comerciales se encuentran los siguientes:

Sustitutos acelulares

Contienen componentes que se incorporan en el lecho de la herida y posteriormente pueden poblarse de células dérmicas del propio paciente, los más destacados son:

Biobrane: es un apósito biocompuesto que ayuda a la disminución del dolor, reduce el cambio de apósitos y disminuye el tiempo de hospitalización. Está compuesto de una malla de nylon recubierta de colágeno péptido y unido a una membrana delgada de silicón [13-15, 17, 18].

Integra: es un remplazamiento sintético de piel, el cual combina los dos tipos de apósitos: temporal y permanente. Sus funciones como piel artificial es proporcionar una cobertura fisiológica impidiendo el paso de bacterias y evitando la pérdida de líquidos por lo que se utiliza en heridas o defectos parcialmente profundos y úlceras crónicas. Está formado por dos capas: la externa que es una membrana de silicona y la profunda que está compuesta por una matriz reticulada de colágeno bovino de tipo I recubierto de glicosaminoglicanos de tiburón. Las desventajas que posee son su alto costo, el largo periodo de vascularización que requiere (10 a 14 días), los extremos cuidados pos operatorios ya que requiere de dos etapas quirúrgicas; y el hecho de que los cultivos epidérmicos autólogos no se integran muy bien en la neodermis producida (tejido recién formado alrededor de un andamio). Sus ventajas radican en el fácil manejo, su baja inmunogenicidad y el bajo riesgo de transmisión de enfermedades. Además como regenerador dérmico crea una neodermis similar a la original que ayuda a mejorar la calidad estética y funcional de la cicatriz [13,16-18].

TransCyte: es un sustituto de piel temporal formado por dos capas, la externa compuesta de una lámina de silicona y la profunda que es una malla de nylon cubierta de colágeno dérmico porcino donde se introducen fibroblastos alogénicos neonatales. Es usado en heridas de espesor parcial durante la reepitelización o para cobertura de heridas de espesor total antes de la colocación del autoinjerto. Una ventaja de este sustituto es ser transparente lo cual permite el monitoreo visual del lecho de la herida. Los fibroblastos proliferan en la malla de nylon secretando colágena dérmica humana, proteínas de la matriz extracelular y factores de crecimiento, por lo que la piel sustituta brinda una adecuada barrera protectora temporal. Entre sus desventajas está el tener que ser retirado después de 7 a 14 días debido a que está fabricado con material sintético no biodegradable [13-15,18].

AlloDerm: es un sustituto permanente dérmico constituido por una dermis alógena derivada de piel humana donada, para lo cual la piel es procesada a fin de preservar gran parte de la matriz extracelular dérmica y evitar el rechazo del tejido. Su diseño sirve como matriz biológica y contiene la estructura e información bioquímica para dirigir la revascularización

normal, y la repoblación celular. Es muy utilizado para replazamientos de tejido suave como es el caso de la reconstrucción de la pared abdominal. En el caso de heridas por quemaduras es usado en conjunto con autoinjertos de espesor parcial para producir resultados similares a los injertos de espesor parcial o total [13-15,18].

Sustitutos alogénicos

Contienen células alogénicas (obtenidas de un donante) por lo que tienen mayor similitud a la piel natural, pero estos solo son considerados sustitutos temporales de piel debido a que las células alogénicas son eventualmente remplazadas por las células derivadas del propio paciente. La ventaja de estos sustitutos es que pueden secretar una matriz extracelular y factores de crecimiento mejorando la regeneración del tejido y proporcionando una cobertura a la herida hasta que un autoinjerto esté disponible, mientras que en el caso de las pequeñas heridas estos sustitutos pueden regenerar el lecho de la herida y sus alrededores sin necesidad de requerir un injerto. En el caso de heridas grandes con injertos autólogos (tejido obtenido del propio individuo) de piel por ingeniería de piel (como las de los quemados), con grandes extensiones de piel afectada, el tener células autólogas es un requisito indispensable, donde la desventaja radica en que los sustitutos de piel obtenidos por bioingeniería con células autólogas, es el tiempo requerido para el cultivo de células y la preparación del injerto. Dentro de los sustitutos alogénicos acelulares se encuentran:

Dermagraft: es un apósito compuesto por un andamio de polímero en malla hecho a base de ácido poliláctico/ácido poliglicólico sembrado de fibroblastos alogénicos humanos obtenidos de prepucio de neonatos. Es bioabsorbible ya que se degrada por hidrólisis en un periodo de 20 a 30 días; tiempo en el que los fibroblastos producen factores de crecimiento y elementos de la matriz extracelular que ayudan a regenerar la dermis perdida. Este sustituto se utiliza principalmente para tratamientos en pacientes con pie diabético y úlceras venosas. Una de sus desventajas es el incremento en el costo debido a que se requieren múltiples aplicaciones [14, 15,18].

Alpigraf y Orcel: estos sustitutos ya han sido aceptados por la FDA, y están constituidos de células y proteínas estructurales. Se elaboran en una bicapa con una matriz de colágeno bovino tipo I en gel o esponja de colágeno. La capa dérmica contiene fibroblastos y la capa epidérmica está formada por queratinocitos, ambos derivados de prepucio neonatal. Este sustituto también suele ser aplicado en pacientes con úlceras venosas y pie diabético. Entre sus principales desventajas se encuentran su corta viabilidad después de la aplicación (cinco días), su aplicación es delicada, y presentan riesgo de transferir enfermedades a consecuencia de sus constituyentes alogénicos [13-16,18].

Sustitutos autólogos celulares

En teoría son sustitutos permanentes de piel, compuestos de queratinocitos y fibroblastos obtenidos de biopsias de las lesiones de los pacientes; entre los que destacan se encuentran los sustitutos autólogos acelulares siguientes:

Epicel: consiste de una lámina de queratinocitos autólogos sembrados en cultivo que son aislados de una biopsia y están generalmente listos en 3 semanas para usarse como injertos. Un problema que presenta este sustituto es la formación de ampollas epidérmicas, que cuando son pequeñas el problema se resuelve espontáneamente, pero cuando son grandes el tratamiento termina siendo un fracaso. Este fenómeno se atribuye a la ausencia de unión de la dermis con la epidermis en la composición de injerto [15,18].

EpiDex: en este sustituto los queratinocitos no son obtenidos de biopsias de piel, sino a partir de los folículos pilosos del cuero cabelludo. La técnica de obtención consiste en arrancar el pelo del paciente y obtener las células de la vaina externa de la raíz que posteriormente se colocan en cultivo de explantes (tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento) sobre una membrana de silicona. En aproximadamente 5 semanas de expansión celular se realiza un segundo cultivo para la preparación de las láminas de injerto epitelial. Aunque los resultados clínicos han sido favorables, con este tipo de sustitutos las zonas tratadas han sido heridas relativamente pequeñas [15,18].

Las limitaciones de estos remplazamientos de piel autólogos incluyen el hecho de que solo contienen queratinocitos y por lo tanto solamente suplen la capa epidérmica lo que provoca una alta fragilidad mecánica debida a la ausencia de un componente dérmico. En el caso de grandes heridas de espesor total como lo son las quemaduras, el remplazamiento de ambas capas (la dérmica y la epidérmica) es benéfica para reducir cicatrices, mejorar la funcionalidad, y obtener mejores resultados cosméticos. Para que esto pueda realizarse se requiere la combinación de sustitutos dérmicos y remplazamientos epidérmicos, pero estos generalmente requieren múltiples procedimientos quirúrgicos [18].

2.4. Biomateriales

El desarrollo y aplicación de biomateriales goza hoy en día de un gran interés, aunque su existencia es tan antigua como la medicina misma [20]. Hay materiales como metales, cerámicas, plásticos, etc., que pueden estar en contacto con fluidos fisiológicos, células o tejidos de un órgano con la finalidad de sustituir una parte o una función del cuerpo humano de un modo seguro, eficaz y fisiológicamente aceptable por el organismo. Pero no todos los metales, ni todas las cerámicas o plásticos están preparados para interactuar con sistemas biológicos [20, 21]. Un biomaterial se puede

definir como un material ideado para fabricar un dispositivo biomédico que interaccionara con sistemas biológicos remplazando, evaluando, tratando o sustituyendo alguna parte o función del cuerpo de una forma segura, confiable y fisiológicamente compatible [20,22].

Hasta hoy en día se puede hablar de tres generaciones de biomateriales, las cuales han ido evolucionando de acuerdo a las necesidades que se han ido desarrollando para la convivencia en medios biológicos [23].

Primera generación: eran utilizados en la industria y no diseñados para interactuar con el medio biológico. Se calificaron como sustancias sintéticas y farmacológicamente inertes diseñadas para la implantación dentro de un sistema viviente o para incorporarse a él. El objetivo de estos era tener propiedades físicas similares a las del tejido anfitrión con una toxicidad y respuesta inmune de cuerpo extraño reducidas a su mínima expresión; como ejemplos de estos se encuentran los remplazos de articulaciones y prótesis vasculares.

Segunda generación: definidos como materiales no vivientes y utilizados en un dispositivo medico destinado a interactuar con los sistemas biológicos. El objetivo era que fuesen bioactivos y bioabsorbibles o biodegradables.

Tercera generación: biomateriales actualmente más y mejor utilizados. Diseñados para albergar células, permitir su diferenciación, promover el desarrollo y reproducción para generar tejido nuevo. Estos materiales hoy se denominan andamios celulares.

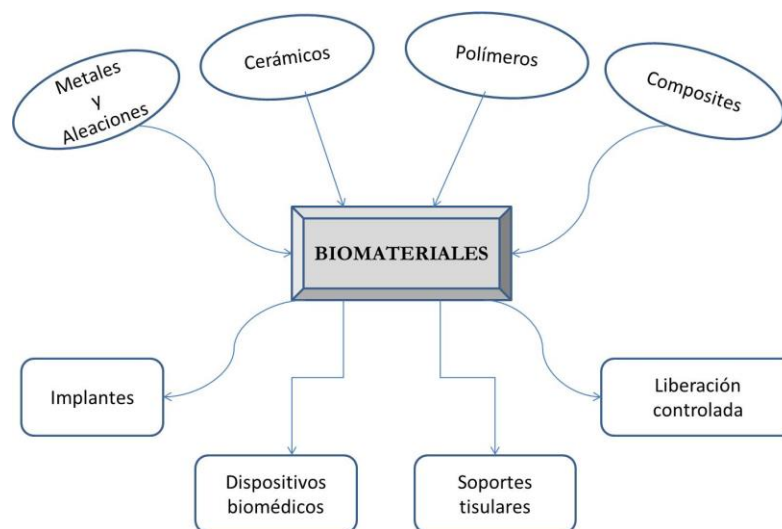


Figura 2.4.1. Componentes de los biomateriales y sus aplicaciones.

La ciencia de los biomateriales ha experimentado un espectacular desarrollo gracias a la disponibilidad de materiales simples y compuestos (composites) que permiten la preparación de elementos con aplicaciones avanzadas en la generación de implantes tanto para tejidos duros,

blandos, bioestables o biodegradables. En la Figura 2.4.1 se muestra la variedad de ingredientes que comprenden el campo de los biomateriales y sus posibles aplicaciones clínicas.

Dentro de toda la serie de compuestos que hoy se utilizan en el diseño de biomateriales, los que actualmente se emplean en el campo de la medicina se exponen en la tabla 2.4.1.

Tabla 2.4.1. Materiales que se emplean en medicina para evaluación, soporte y sustitución de tejidos y órganos.

Metales	Cerámicos	Polímeros	Biológicos
Acero inoxidable	Grafito	Silicona	Pericardio bovino
Oxido de talio	Fibra de carbono	Politetrafluoroetileno (teflón)	Disoluciones de colágeno
Iridio	Fosfato tricálcico	Poliiolefinas	Colágeno modificado químicamente
Oro	Vidrio activado	Polimetil-metacrilato	Gelatina
Plata	Hidroxilapatita	Polímeros de hexametilamina y ácido adíptico (nylon)	Tejidos biológicos naturales o modificados
Platino	Alúmina	Polipropileno	
Titanio		Poliuretano	
Aleaciones diversas a base de:		Fibra de poliéster (dacrón)	
Cromo		Epóxidos	
Cobalto		Poliglicolato	
Niquel		Resinas acrílicas	
Molibdeno		Cloruro de polivinilo	
Aluminio		Polilactato	
Titanio		Polihidroxietil-metacrilato	
		Policarbonato	
		Celofán	
		Acetato de celulosa	
		Poliétileno	
		Alcohol polivinílico	
		Caucho	

2.5. Polímeros

Dentro del grupo de biomateriales usados en medicina se encuentran algunos polímeros. Estos polímeros poseen una amplia variedad de aplicaciones debido a que presentan propiedades físicas, químicas y

mecánicas muy similares a las de los tejidos vivos (los cuales en su mayoría están compuestos por polímeros naturales como las proteínas y los polisacáridos). Una característica relevante que poseen los polímeros sobre otros materiales aplicados en el área biomédica es que son biodegradables y por esta razón son utilizados al ser muy funcionales en aplicaciones temporales. Kulkarni et al. Introdujeron en los años 60 el concepto de material bioabsorbible. Este tipo de polímeros se clasifican como polímeros naturales y polímeros sintéticos, donde sus propiedades más importantes dependerán de su composición [24].

Los polímeros naturales son el grupo donde se encuentran los polipéptidos y los polisacáridos. La ventaja de usar polímeros naturales radica en el hecho de que contienen moléculas biofuncionales que contribuyen a la fijación, proliferación y diferenciación celular, aunque también ofrecen desventajas, ya que dependiendo de la aplicación su velocidad de degradación no puede ser controlada provocando la inhibición de ciertas funciones, lo cual se resume en la dificultad para determinar el tiempo de vida de estos polímeros *in vivo*. En la tabla 2.5.1 se exponen los polímeros naturales con aplicaciones biomédicas.

Tabla 2.5.1. Polímeros naturales utilizados en aplicaciones biomédicas.

Polímero natural	Método de degradación primaria	Producto de degradación primaria
Agarosa	Agarosas enzimáticas	Oligosacáridos
Algín	Liasas de alginato	Ácido manurónico y ácido gulurónico
Ácido Hialurónico	Enzimática	β (1-4) ácido glucurónico y glucosamina
Quitosano	Colágeno enzimático	Glucosamina
Colágeno	Colágeno enzimático o lizosima	Varios péptidos dependiendo de la secuencia
Gelatina	Colágenos enzimáticos	Varios péptidos dependiendo de la secuencia
Seda	Peptidazas proteolíticas	Varios péptidos dependiendo de la secuencia

2.5.1 Polímeros sintéticos

Los polímeros sintéticos son polímeros elaborados químicamente y tienen ciertas ventajas notables sobre los de origen natural; ya que pueden ser manipulados para adaptarse a funciones específicas y presentar propiedades controlables, además de que su velocidad de degradación no muestra variación en los pacientes; los más utilizados en aplicaciones biomédicas se muestran en la tabla 2.5.1.1. Para este tipo de polímeros los más comunes son los poliésteres, aunque también se pueden incluir los polianhidridos, policarbonatos y polifosfatos. Una desventaja que ofrecen

estos polímeros es que por ser materiales sintéticos estos se pueden degradar en productos desfavorables en altas concentraciones, desencadenando acidez local y provocando respuestas adversas como inflamación o una encapsulación fibrosa.

Tabla 2.5.1.1. Polímeros sintéticos usados en aplicaciones biomédicas.

Polímero sintético	Método de degradación primaria	Productos de degradación primario
Ácido poli glicólico	Hidrolisis del éster	Ácido glicólico
Ácido poli L láctico	Hidrolisis del éster	Ácido láctico
Ácido glicólico D, L láctico	Hidrolisis del éster	Ácido láctico y ácido glicólico
Poli Caprolactona	Hidrolisis del éster	Ácido caproico
Polipropileno fumarato	Hidrolisis del éster	Ácido fumarico y propilenglicol
Poli ortoéster	Hidrolisis del éster	Varios ácidos dependiendo del grupo R
Poli anidrido	Hidrolisis del anidrido	Varios ácidos dependiendo del grupo R
Poli fosfatasa	Hidrolisis	Fosfatasa y amoniaco
Poli carbonato	Eéster e hidrolisis del carbonato	Alcohol de alquino y desaminoyosoyl-tirosina
Poli etinel glicol/ poli etinel oxido	No degradable	No aplicable
Poli uretano	Ester, uretano, hidrolisis de la urea	Disocianato y dioles

La importancia de tomar en cuenta la biodegradabilidad de los materiales de interacción con el organismo humano fue notada por algunos de los primeros cirujanos como Joseph Lister quien observó que los lechos de las suturas de aquel entonces que no eran de materiales absorbibles causaban infección en las heridas tratadas. Entonces, desde la aparición de los polímeros sintéticos, los profesionales de la medicina se percataron de que estos materiales podían ser de gran interés en aplicaciones terapéuticas. Los polímeros degradables más comúnmente utilizados son los elaborados a partir de ácido poliglicólico (PGA) y de ácido poliáctico (PLA), los cuales han encontrado una multitud de usos en la industria médica, comenzando por las suturas biodegradables.

2.5.2. Ácido poliglicólico

El *ácido poliglicólico* “PGA” (Poli Glicolic Acid, por sus siglas en inglés) es un poliéster lineal alifático (Figura 2.5.2.1). Fue utilizado para desarrollar la primera sutura sintética totalmente absorbible que se comercializó como

DEXON® en los años 60 por Davis & Geck, Inc. Mediante un proceso de dimerización del ácido glicólico se sintetiza el monómero cíclico, el cual por polimerización de apertura de anillo de los di-ésteres del ácido glicólico, Los polímeros que se obtienen mediante este proceso tienen peso molecular entre 20000 y 140000 con los cuales se pueden obtener fibras. Es altamente cristalino (45 a 55 %), tiene un punto de fusión de 185 a 225 °C y una temperatura de transición vítrea de 35 a 40°C, baja solubilidad en solventes orgánicos, es hidrofóbico y de alta degradación lo que lo orilla a tener baja resistencia mecánica. Se descompone hidrolíticamente en ácido glicólico (ver tabla 2.5.2), pero tiene la desventaja de que a altas concentraciones su acidez aumenta considerablemente provocando inflamación y posible daño al tejido en el área circundante al implante [18, 24].

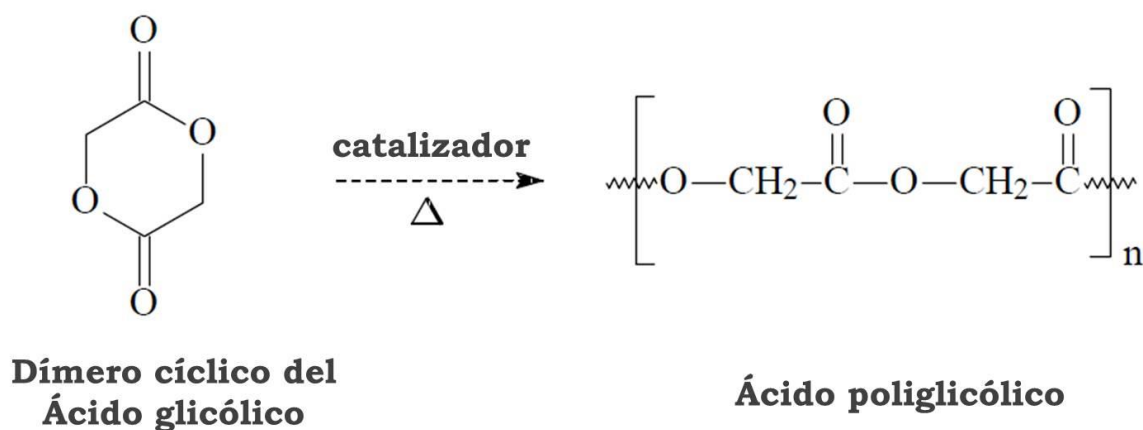
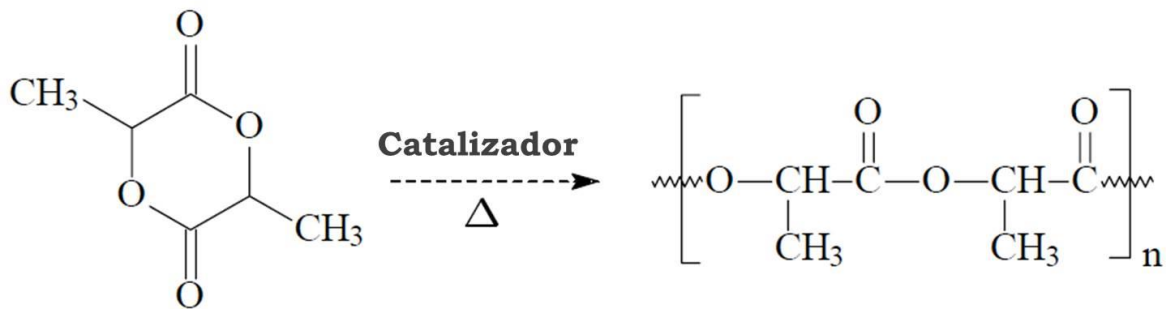


Figura 2.5.2.1. Síntesis del ácido poliglicólico mediante apertura de anillo del dímero cíclico del ácido glicólico.

2.5.3. Ácido poliláctico

El *ácido poliláctico* PLA (*Poli Lactic Acid*, por sus siglas en inglés) es un polímero sintético, termoplástico, amorfo o semicristalino. Ha sido estudiado en el área biomédica por su variedad de aplicaciones en la liberación controlada de fármacos, suturas biodegradables, implantes para fijación de fracturas, elaboración de dispositivos vasculares por mencionar algunos. El PLA es una molécula quiral, existe en dos formas estereoisómeras que dan lugar a cuatro polímeros morfológicamente diferentes, dos polímeros estereorregulares el PDLA (Poli D-Lactic Acid) y el PLLA (Poli L-Lactic Acid), la forma racémica DLPLA y el meso-PLA. El isomerismo óptico del ácido láctico tiene una gran influencia sobre la desintegración del monómero y las propiedades del polímero resultante. Debido a la isomería del PLA, tanto el PDLA y el PLLA son física y químicamente idénticos excepto que cada uno rota en dirección opuesta, el D es dextrógiro (rota a la derecha) y el L es levógiro (rota a la izquierda). Los polímeros D y L del ácido poliláctico son materiales semicristalinos y

las propiedades de cristalinidad tienen importantes implicaciones tanto en las propiedades mecánicas como en el tiempo de degradación. Las zonas amorfas del PDLA, PLLA y PDLA tienen una T_g (temperatura de transición vítrea) por debajo de la cual el polímero se comporta más como un sólido vítreo y por encima de la cual el polímero tiene un comportamiento de tipo gomoso. Un polímero cerca de la temperatura corporal (36°C) será más dúctil al ser implantado, comparado con la temperatura ambiente. El peso molecular también tiene una fuerte influencia ya que también puede afectar las propiedades mecánicas como el tiempo de degradación del material [18, 24].



**Dímero cíclico del
Ácido láctico**

Ácido poliláctico

Figura 2.5.3.1. Estructura química del ácido poli láctico.

La degradación del PLLA es hidrolítica y se descompone en ácido láctico, (tabla 2.5.1.1). Una hipótesis que se tiene a cerca de como el cuerpo lo va a excretar es en forma de agua y dióxido de carbono vía el sistema respiratorio (Figura 2.5.3).

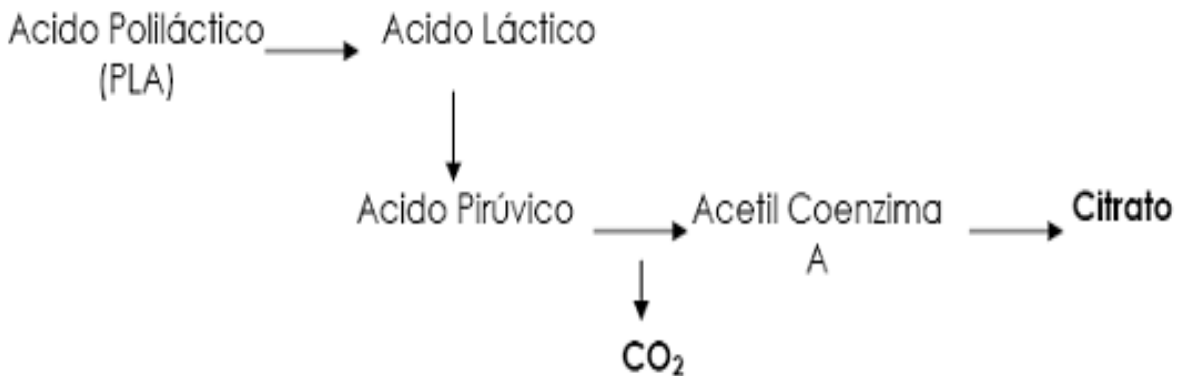


Figura 2.5.3.2. Esquema de degradación del PLA en el organismo.

2.6. Electrohilado

Las fibras desarrolladas por electrohilado han tenido un alto impacto en el área Biomédica ya que al producir fibras muy delgadas del orden nanómetros, con amplias áreas superficiales, ha permitido desarrollar soportes celulares o andamios, cuyas estructuras y dimensiones son similares a las de una matriz extracelular de un tejido que se desea reparar. Sin embargo no solo en esta área ha tenido aplicación ya que también es utilizado en filtración, material de protección, aplicaciones eléctricas y ópticas, así como en sensores o compuestos reforzados con nano fibras [25].

Históricamente el desarrollo de la técnica tiene sus orígenes desde finales del siglo XVI cuando William Gilbert describió los fenómenos magnéticos y electrostáticos analizando gotas de agua colocadas cerca de piezas de ámbar perfectamente cargadas, dando como resultado una deformación cónica de las gotas las cuales posteriormente fueron expulsadas del cono, proceso al que se le denominó electrospraying [26]. Posteriormente, en 1897 Rayleigh midió el efecto de inducir cargas eléctricas en chorros de agua y en 1914 Zeleny analizó el comportamiento de gotas de solución en el extremo de un capilar e hizo un modelado matemático del comportamiento de los fluidos sometidos a fuerzas electrostáticas. El dispositivo fue patentado en 1900 por Coorley, en 1902 por Morton y finalmente en 1934 por Formhals, quien describió explícitamente el funcionamiento en su respectiva patente [27,29].

El electrohilado consiste en aplicar una fuerza electrostática a soluciones poliméricas para producir nano fibras de dimensiones controlables. El dispositivo posee una tecnología simple que permite una rápida manufacturación de grandes cantidades de fibras.

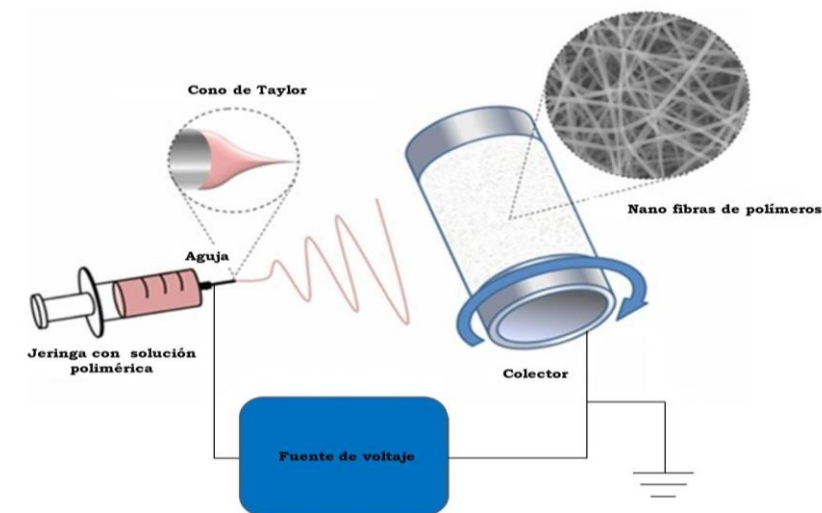


Figura 2.6.1. Dispositivo de electrohilado.

La Figura 2.6.1. esquematiza el proceso de electrohilado, el cual consiste en aplicar un alto voltaje en un circuito eléctrico, que en un extremo tendrá conectada la punta de la aguja de una jeringa conteniendo el polímero a hilar, a la cual se le aplicará una cierta velocidad de flujo, y por consiguiente saldrán gotas que posteriormente se transformarán en fibras. En el otro extremo del circuito se conecta el colector debidamente aterrizado, donde se capturarán las fibras. Debido al intenso campo eléctrico al que están sometidas las gotas, estas saldrán de la punta de la aguja como un chorro de solución. Un chorro de solución venciendo así la tensión superficial y la viscoelasticidad de la solución lo que provoca una deformación en la gota emergente y genera lo que se conoce como el *cono de Taylor*. Debido a las cargas presentes en el chorro de la solución polimérica esta se estira y adelgaza a medida que viaja hacia el colector, y al momento del impacto en el colector, la carga de las fibras se disipa y el circuito eléctrico es completado [28].

Uno de los principales puntos a cubrir en la ingeniería de tejidos es poder mimetizar lo mejor posible el tejido que se está reparando. Fabricar andamios con estructuras y dimensiones similares a la matriz extracelular del tejido en cuestión es una de las tareas primordiales para proporcionar a las células un ambiente muy similar a su hábitat natural para asegurar que el implante tenga una analogía en propiedades físicas y estructurales al del tejido original. Es por eso que en el proceso de la fabricación de andamios por electrohilado, se deben de tener en consideración ciertos parámetros que deben cumplir las soluciones a hilar ya que de esto dependerá la morfología de las fibras, entre los parámetros a considerar se encuentran tres grupos principales, lo cuales se muestran en forma resumida en la tabla 2.6.1.

2.7. Polimerización por plasma

La ionización que sufren las partículas que componen un plasma es debida a que el gas que las contiene está sometido a radiaciones altamente energéticas, campos eléctricos o energía calorífica alta.

2.7.1. Plasma

El físico y químico Sir William Crooks estudió la conducción eléctrica en gases y en 1879 propuso el concepto de “cuarto estado de la materia” para describir a la “materia” que se encontraba eléctricamente cargada, pero fue hasta 1928 que Irving Langmuir implementa el término *plasma* para denotar el estado en que se encuentran los gases contenidos en tubos de descarga. Hoy en día, al cuarto estado de la materia como el que se muestra en la Figura 2.7.1 se le denomina, el cual describe a la materia que se encuentra como un gas a alta temperatura y parcialmente ionizado, donde sus componentes son iones positivos y negativos, electrones,

moléculas excitadas y metaestables, fotones y especies neutras, entre otras [30-32].

Tabla 2.6.1 Parámetros y variables que deben cumplir las soluciones poliméricas y el dispositivo de electrohilado.

	Parámetro	Mayor	Menor	Resultado
SOLUCIÓN POLIMÉRICA	Viscosidad (Depende de la concentración y el peso molecular del polímero)	*	*	Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector. La concentración dificulta el paso de la solución a través de la aguja.
	Conductividad eléctrica	*	*	A mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución y fibras más delgadas.
	Tensión superficial		*	A menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución y fibras más gruesas.
			*	Aparición de defectos en las fibras (como perlas o gotas solidas)
DISPOSITIVO DE ELECTROHILADO	Voltaje		*	Obtención de fibras lisas.
		**	*	Muy alto produce fibras gruesas, distorsión del chorro, aparición de perlas.
	Velocidad de flujo de la solución		*	Poco impulso para que la solución llegue al colector.
			*	Fibras más gruesas, perlas de mayor tamaño.
			*	Mayor tiempo para la evaporación del solvente, fibras sin defectos.
Distancia entre la punta de la aguja y el colector	*	*	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución con obtención de fibras delgadas.	
	**	**	Aparición de defectos (perlas) en las fibras al trabajar a muy altas o bajas distancias.	
C.A.	Humedad	*		Incremento en el tamaño y número de poros entre las fibras.
	Temperatura de la solución	*		Velocidad más rápida de deposición de fibras y con menor diámetro.

2.7.2. Clasificación del plasma

Existe una gran variedad de plasmas que se encuentran en la naturaleza o que se pueden producir en el laboratorio, y cuya clasificación se puede dar de distintas formas. Una forma posible puede ser mediante la medición de la temperatura o energía media de las partículas que lo conforman. En la Figura 2.7.2.1 se muestra una gráfica con la clasificación de los plasmas de acuerdo a su temperatura y número de electrones.

2.7.3. Plasmas naturales

Dentro de los plasmas naturales como los ejemplos citados en la Figura 2.7.3.1 se encuentra la materia que compone alrededor del 99% del Universo. En nuestro planeta el plasma natural es la ionosfera la cual funciona como escudo de protección para los seres vivos contra los rayos UV provenientes del Sol. Las auroras boreales son otro ejemplo de plasma natural, estas se forman cuando partículas altamente energéticas y cargadas eléctricamente son emitidas por el Sol y chocan con las partículas de gas que conforman la atmosfera. Otro tipo de plasma natural se encuentra en las tormentas eléctricas, cuando un rayo cae ocurre una poderosa descarga natural de electricidad estática, la descarga eléctrica que se produce en el rayo es acompañada por la emisión de luz que es causada por el paso de corriente eléctrica que ioniza a las moléculas del aire, donde dicha reacción en la atmosfera calienta y expande rápidamente el aire, dando origen a un plasma [34,35].

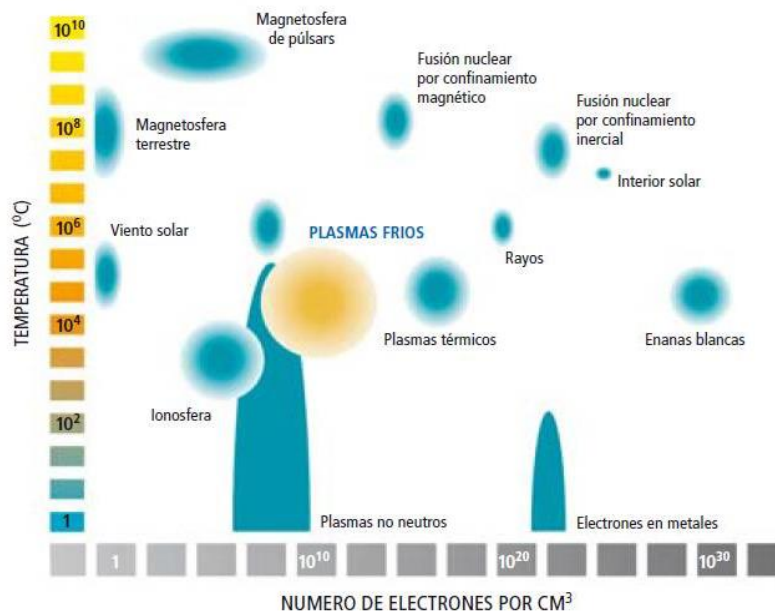


Figura 2.7.2.1. Distintos tipos de plasmas. La clasificación se hace mediante el número de electrones por cm³ y su energía electrónica media (Tomado de [30]).



Figura 2.7.3.1. Ejemplos de plasmas naturales. a) descarga natural de electricidad estática o rayo (Tomado de [36]). b) Aurora boreal, c) Nebulosa de la Laguna, una gran nube de baja densidad de gas parcialmente ionizado (Tomado de [37]).

2.7.4. Plasmas artificiales

Los plasmas artificiales son los que se pueden producir en el laboratorio cuando se hace un incremento en la energía a los materiales, sin importar la naturaleza de dicha energía [30, 33, 38]. Estos plasmas pueden ser generados de manera mecánica, térmica, química, por radiación electromagnética, reacciones nucleares o energía eléctrica las cuales proporcionan descargas de arco, tipo corona, corriente directa (CD) y radio frecuencia (RF, o descarga de resplandor) [30, 33, 38]. Especialmente este trabajo estará enfocado en la producción de un plasma por medio de energía eléctrica, la cual se obtiene por descarga de RF.

2.7.5. Descarga de radio frecuencia

Los plasmas producidos por radio frecuencia (RF) se conocen como plasmas fríos. Estos plasmas tienen la característica de que la temperatura de sus partículas neutras así como la de los iones, es muy cercana a la temperatura ambiente, que oscila entre los 25 y 100 °C. Pero la temperatura de los electrones (temperatura electrónica) encontrándose en un intervalo de los 500 y 10⁵ °C. Otra característica que presentan los plasmas fríos es que estos se generan a bajas presiones que suelen ser menores a los 133 mbar (99.75 Torr) [33]. Dichas descargas se originan cuando se hace pasar una corriente eléctrica entre dos electrodos los cuales están inmersos en un gas a baja presión. Las reacciones químicas que ocurren dependen del tipo de gas, de la presión a la que están sometidas, la geometría del reactor, la potencia aplicada, la densidad de partículas y la corriente eléctrica [33]. Las descargas de radio frecuencia se producen en el intervalo de 1kHz a 1GHz de frecuencia. Y como son de bajo grado de ionización, al no ser un plasma en equilibrio suele llamársele también, descarga de resplandor [30] La Figura 2.7.3.1 muestra un ejemplo de una reacción que se lleva a cabo en un plasma de Acetileno con Argón.

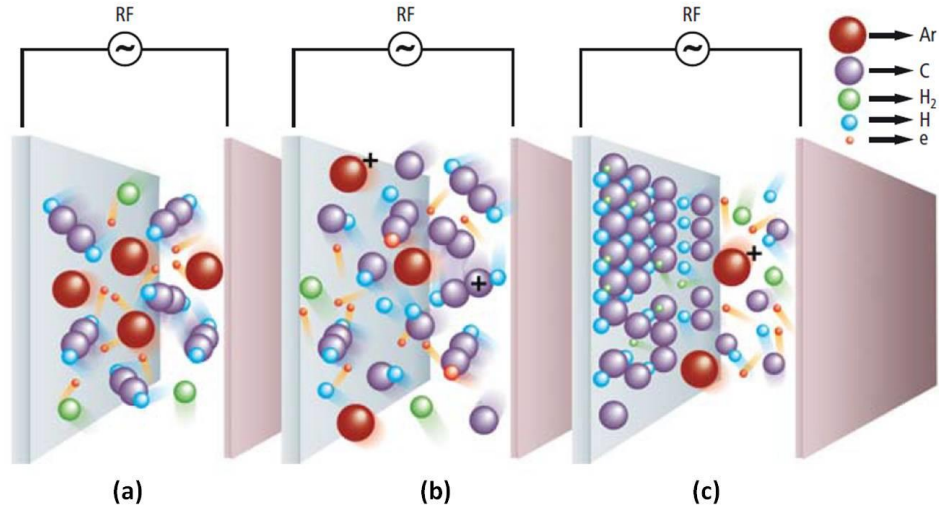


Figura 2.7.3.1. Ejemplo de una reacción de plasma de acetileno (C_2H_2) con argón (Ar) e hidrogeno molecular (H_2). La secuencia de imágenes muestra el proceso de activación del plasma. En (a) y (b) los electrones comienzan a ionizar y disociar a los átomos y moléculas del plasma, mientras que (c) muestra el depósito de átomos de carbono sobre un sustrato (Tomado de [33]).

2.7.6. Parámetros que caracterizan un plasma de radio frecuencia

Los parámetros que caracterizan a un plasma de RF son los siguientes:

Potencia media

Es la potencia ganada por los electrones. Dado que en la reacción se llevan a cabo infinidad de colisiones entre iones, electrones y moléculas, la potencia absorbida por un electrón está dada por:

$$\bar{p} = \frac{e^2 E_0^2}{2m_e} \frac{v_e}{v_e^2 + \omega^2}$$

Donde v_e representa la frecuencia de colisión de un electrón con un átomo, ω es la frecuencia del campo (RF) y E_0 la amplitud del campo eléctrico. La Figura 2.7.5 muestra los procesos de reacción en un reactor de plasma de RF [30].

$$\bar{\lambda} = \frac{1}{\pi(r_1 + r_2)^2 N}$$

Donde r_1 y r_2 son los radios de colisión de las partículas y N es el número de densidad de partículas (partículas por unidad de volumen) [30].

Longitud de Debye

Es un parámetro característico que describe el apantallamiento eléctrico, donde el potencial de cada partícula es apantallado por cargas de partículas circundantes, de manera aproximada matemáticamente, la longitud de Debye se escribe como:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 k T_e}{n_e e^2}}$$

Tomando a ϵ_0 como la permitividad del espacio, e es la carga del electrón, k es la constante de Boltzmann, T_e es la temperatura de los electrones y n_e es la densidad electrónica [30].

Camino libre medio

Es la distancia poligonal entre dos colisiones sucesivas debida a la naturaleza probabilística de dichas colisiones.

Temperatura del plasma

Está determinada por la energía cinética promedio de los electrones (temperatura electrónica, T_e) de los iones (temperatura iónica, T_i); así como de las partículas neutras (temperatura de moléculas neutras, T_m). En el caso de descargas a baja presión, T_e es del orden de 10^4 K, $T_i \sim 300-1000$ K y $T_m \sim 300$ K. En las colisiones elásticas que llegan a ocurrir en las reacciones del plasma los iones pierden mucha energía y entonces la temperatura T_i no puede ser tan alta como se le puede asumir que $T_i \cong T_m$ [39].

2.8. Tipos de polimerización

Se le llama polímero a una cadena de macromoléculas formada por una cierta repetición de moléculas pequeñas llamadas monómeros, (Figura 2.8.1). Los polímeros se clasifican en homopolímeros y copolímeros, esto es de acuerdo al tipo de repetición del monómero así como de la combinación de estos, es decir, depende de cuantas moléculas distintas de monómeros se usen para formar el polímero [42-44,46]. El *homopolímero* está formado por una sola especie de monómero. El *Copolímero* es formado por la combinación de dos o más especies de monómeros.

Dentro de los tratamientos para fabricar polímeros existen muchos tipos y categorías donde las más destacadas son:

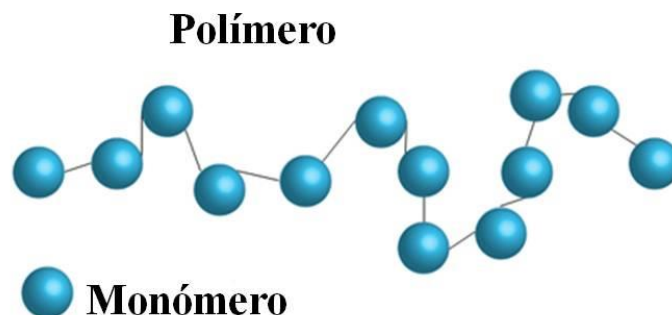


Figura 2.8.1. Representación gráfica de cómo se forma un polímero, a partir de la repetición de un monómero (Tomado de [46]).

Polimerización por adición

Ocurre cuando el monómero se adhiere a otro para formar el polímero pero no tiene pérdida de átomos, lo que implica que la cadena que resulta es igual a la suma de las composiciones químicas de los monómeros que contiene [43-45].

Polimerización por condensación

En la reacción de esta existe pérdida de átomos de moléculas no muy grandes, como por ejemplo la de agua, este tipo de polimerización genera productos, a diferencia de la de adición [43-45].

Ejemplos de estos tipos de polimerización se encuentran la formación del polietileno que se lleva a cabo en una reacción de adición. Y la producción del nylon 6,6 se realiza por condensación.

2.9. Polímeros Conductores y semiconductores

En la diversidad de los polímeros conductores, existen los polímeros conductores sintéticos mejor conocidos como metales sintéticos y los polímeros conductores naturales, estos últimos suelen llamarse biopolímeros conductores. La función primordial de los biopolímeros conductores es proporcionar un acoplamiento de un polímero conductor y un sistema biológico. Los biopolímeros más utilizados en aplicaciones biomédicas son el poliacetileno, polipirrol, politiofeno, polianilina y el PEDOT (poli [3,4-ethylene dioxitiofeo]) cuyas macromoléculas se ejemplifican en la Figura 2.9.2.

Los polímeros pueden ser dopados mediante la adición de un reactivo químico que oxida o reduce el sistema, lo que hace transitar los electrones de la banda de valencia a la banda de conducción, haciendo que el sistema sea más conductor, la Figura 2.9.1 ilustra de manera peculiar como es el dopaje de polímeros.

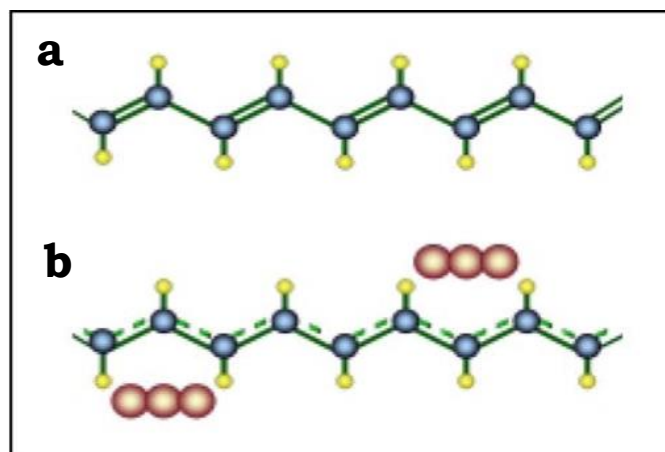


Figura 2.9.1. Modelo de una cadena carbonada de un polímero conductor. Poliacetileno sin dopar (a) y poliacetileno dopado (b). Los enlaces dobles bien definidos de la molécula sin dopar la hacen ser mal conductora, mientras que los enlaces difusos (líneas discontinuas) representan las bandas semillenas de la molécula conductora (Tomado de [48]).

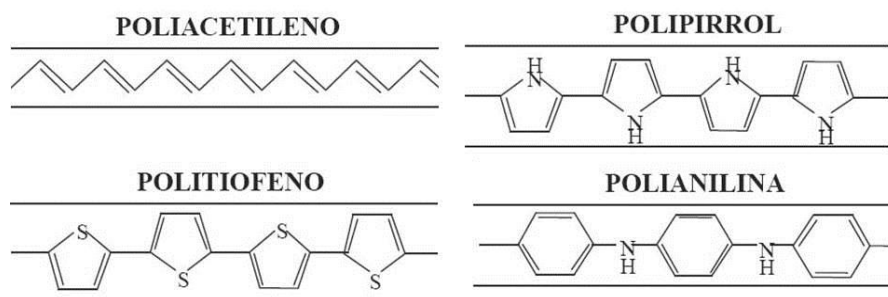


Figura 2.9.2. Ilustración de algunas de las cadenas carbonadas que conforman a los biopolímeros conductores.

2.10. Pirrol

Un antecedente biológico del pirrol fue encontrado por Thomas Anderson en una muestra pura por destilación de aceite de hueso [49]. Aunque el pirrol (o pirroles) se encuentran en un ambiente biológico más extenso, siendo parte de cofactores y productos naturales [50], como la vitamina B12, pigmentos biliares como la bilirrubina, biliverdina, las porfirinas del grupo hemo y la clorofila por mencionar algunas [51].

El pirrol ha mostrado el potencial como biomaterial que favorece el crecimiento y el control celular ya que estudios realizados en simulaciones eléctricas muestran que por medio de sustratos de pirrol se fomenta el crecimiento de neuritas [52]. En consecuencia, estudios como el mencionado y el trabajo expuesto en esta tesis abren las puertas para el uso del pirrol como biomaterial para el desarrollo de andamios poliméricos con aplicaciones a la ingeniería de tejidos.

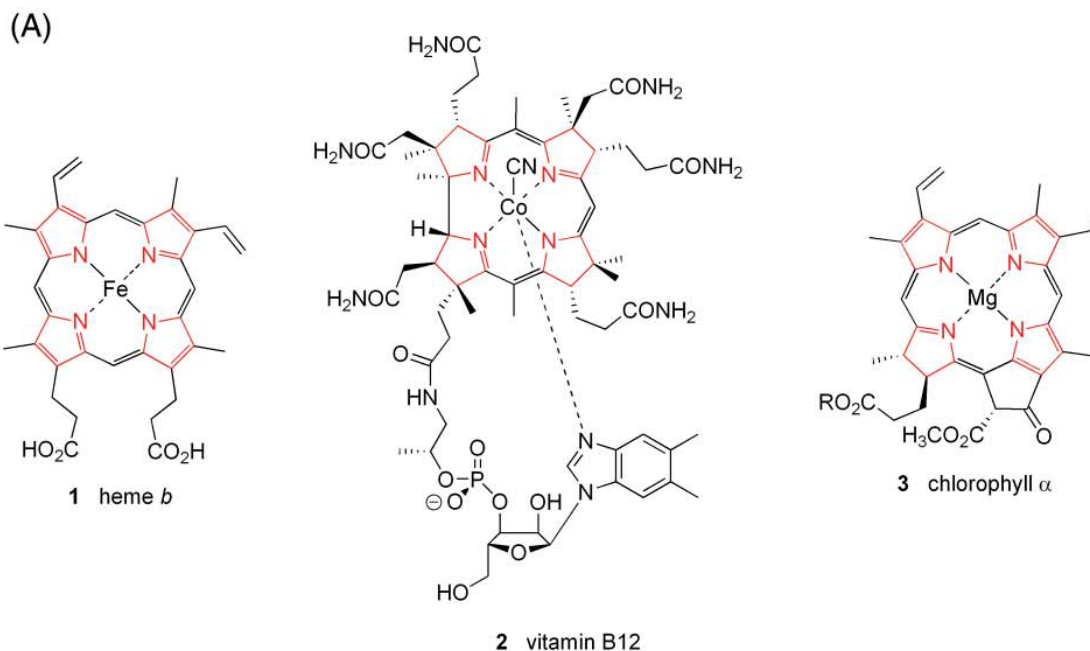


Figura 2.10.1. Productos naturales que contienen anillos de pirrol sus moléculas (Tomado de [51]).

2.10.1. Películas de pirrol sintetizado por plasma

Tomando en cuenta que el pirrol es una molécula que se encuentra dentro de algunos compuestos biológicos [51], se ha estudiado su comportamiento al ser modificada su estructura mediante la técnica de polimerización por plasma. Esta técnica permite fragmentar las moléculas de pirrol dando pie a la formación de grupos amina con una buena adhesión celular [56]. Por lo que el tratamiento del pirrol mediante plasma, estimula el crecimiento de células como las nerviosas [53,54]. Resultados obtenidos en el grupo de Ingeniería de Tejidos de la UAM Iztapalapa han mostrado que el modificar superficies de andamios poliméricos sintetizados por plasma de pirrol y pirrol con yodo crea un ambiente idóneo para el sembrado, crecimiento y proliferación de células como osteocitos, células musculares, hepatocitos y células beta pancreáticas [57- 59].

2.11. Yodo

El yodo es un elemento químico esencial para el ser humano. La glándula tiroides fabrica las hormonas tiroxina y triyodotironina que contienen yodo y el déficit en yodo produce bocio y mixedema. El uso de yodo detiene el crecimiento de tumores cancerosos como el de mama y próstata. Sus compuestos (solución de yodo al 5%, tintura de yodo, yodopovidona), desde su descubrimiento como elemento natural en 1811, por el químico Bernard Courtois, han sido usados ampliamente para la prevención de las infecciones y el tratamiento de heridas. El primer reporte del uso del yodo

en el tratamiento de heridas fue dado por Davies en 1839, y posteriormente fue usado en la guerra civil americana, aún hoy se usa la tintura de yodo como antiséptico en cirugía, sin embargo el yodo molecular suele ser muy tóxico para los tejidos, causando dolor, irritación y decoloración de la piel, por lo que se han desarrollado los yodóforos desde 1949, más seguros y menos dolorosos. El yodo actúa disminuyendo los requerimientos de oxígeno de los microorganismos aerobios, interfiriendo la cadena respiratoria por bloqueo del transporte de electrones a través de reacciones electrolíticas con enzimas, tiene una poderosa actividad germicida, ataca bacterias, micobacterias, esporas, hongos, virus, quistes y protozos [66].

2.12 Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada

La espectroscopia es una técnica de caracterización que estudia la interacción de la radiación (OEM, ondas electromagnéticas) con la materia; se utiliza para estudiar materiales *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

2.12.1 Radiación Infrarroja

La radiación infra roja (IR) fue descubierta por el astrónomo germano-británico Sir William Herschel en 1800. Este tipo de radiación es la que se encuentra por debajo de la región del rojo en el espectro electromagnético (Figura 2.12.1.1), antes de iniciar la región visible (Figura 2.12.1). Este tipo de luz no es visible para el ojo humano, ya que nuestro sentido de la vista responde a longitudes de onda entre los 390 y 750 nm [60].

La espectroscopia IR analiza la composición de la materia en un amplio rango de muestras ya sea en bulto o en cantidades microscópicas, a diversas temperaturas y estados físicos. Esta técnica ofrece la ventaja de ser no destructiva para las muestras de estudio y brinda información concerniente a su estructura molecular mediante un espectro de absorción, el cual se obtiene al medir el paso de las OEM infrarrojas a través de la muestra y determinar la fracción de la radiación incidente que es absorbida. La porción de energía a la que aparece en cualquier pico mostrado en el espectro de absorción corresponde a la frecuencia de vibración de una parte de la molécula de la muestra.

Fenomenológicamente lo que ocurre es que las ondas electromagnéticas del IR que viajan a través del medio, en este caso la materia, interactúan con la polaridad (momento dipolar) de los enlaces químicos de las moléculas. Si no hay polaridad en la molécula, la interacción con la radiación IR esta inactiva y la molécula no produce un espectro IR.

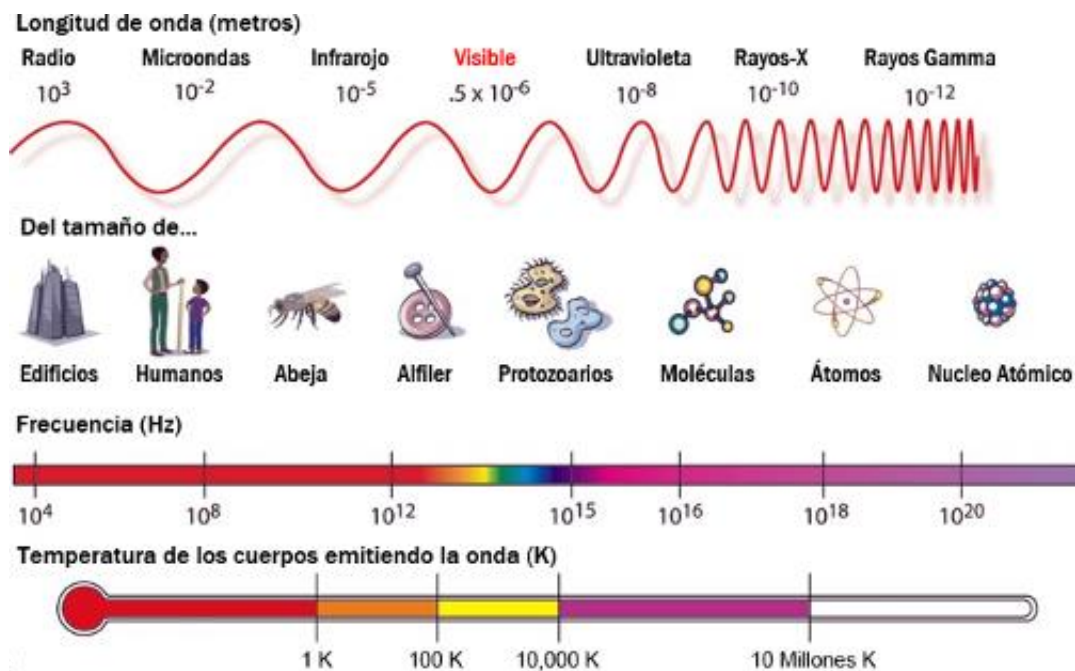


Figura 2.12.1.1. Distribución de energía en el EM (espectro electromagnético) de las ondas electromagnéticas que indica la cantidad de radiación que emite o absorbe una sustancia.

La región IR del espectro va de los 800 nm a los 1000 μ m y está dividido en tres regiones, Infra Rojo Cercano (NIRS), Infra Rojo medio (MIRS) e Infra Rojo lejano (FIRS), como se muestra en la tabla 2.12.1.1 que exhibe los intervalos para los tres rangos del infrarrojo.

Tabla 2.12.1.1 Regiones en el espectro electromagnético para la espectroscopia infrarroja (IR) en función de su la longitud de onda.

Región IR (tipo)	Longitud de onda (λ) [nm]	Número de onda (λ^{-1}) [cm^{-1}]
1 (cercano)	700 a 2,500	14,000 a 4,000
2 (medio)	2,500 a 25,000	4,000 - 400
3 (lejano)	25,000 a 300,000	400 - 10

La primera región permite el estudio de sobretonos y armónicos o vibraciones combinadas, mientras que la región media es para estudiar las vibraciones fundamentales y la vibración-rotación de la estructura de moléculas pequeñas, y en la región lejana se encuentran las vibraciones bajas de átomos pesados, metales ligeros o las vibraciones de la red.

2.12.2. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

En el desarrollo de las técnicas de espectroscopia infrarroja se logró un gran avance, el cual ha permitido tener dos tipos de espectrómetros IR: el clásico y el de la transformada de Fourier (FT). Ambos espectrómetros arrojan la misma información pero, la diferencia radica en que el segundo usa un interferómetro de Michelson (Figura 2.12.2.1), que permite que todas las frecuencias lleguen al detector a la vez y no solo una como en el clásico, además de que en general, las técnicas espectroscópicas que incluyen FT determinan el espectro de absorción con mayor precisión [60].

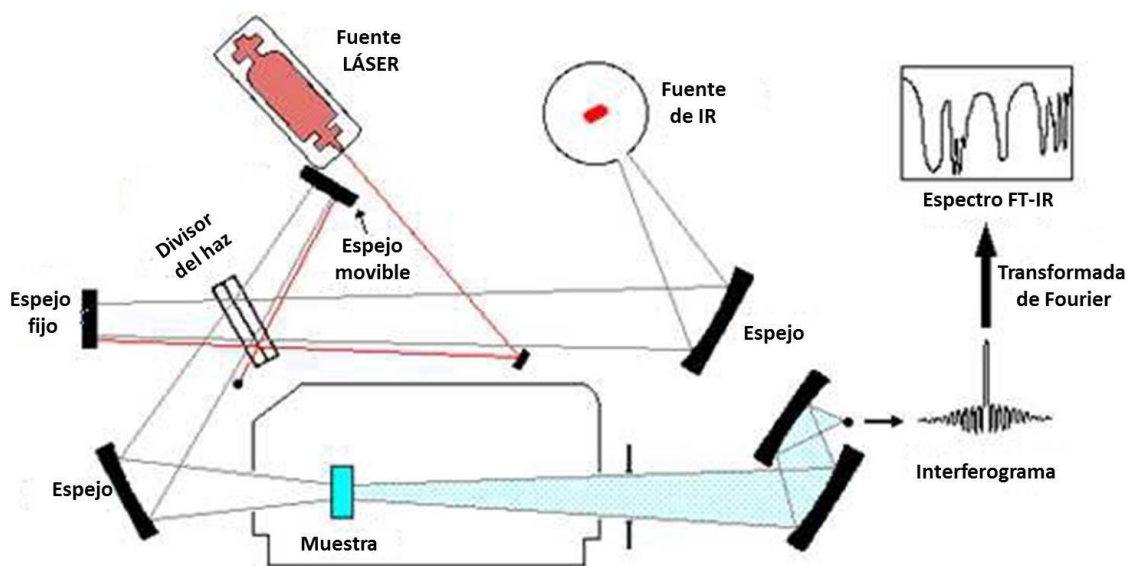


Figura 2.12.2.1. Representación esquemática del funcionamiento de un espectrómetro FTIR.

2.12.3. Reflectancia Total Atenuada

En la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés), existe la posibilidad de anexar un accesorio de reflexión total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés). Su funcionalidad permite obtener espectros de películas delgadas, materiales opacos, fuertemente absorbentes o gruesos que a menudo producen picos intensos cuando se miden por el método de transmisión convencional en la región del IR cercano. La técnica ATR es idónea para este tipo de muestras debido a que la intensidad de las ondas evanescentes decae de forma exponencial, (lo que le confiere la denominación de atenuada) conforme al incremento de la distancia de la superficie del cristal ATR a la muestra ya que a menor índice de refracción y menor ángulo de incidencia, mayor penetración se consigue. La profundidad de penetración también se incrementa con la

longitud de onda; haciendo que la técnica sea por lo general insensible al espesor de la muestra.

Los equipos de espectroscopia IR TF RTA (Infrarrojo por Transformada de Fourier de Reflexión Total Atenuada, "FT-IR-ATR" por sus siglas en inglés) se basan en los principios de reflexión total interna, fenómeno que se produce cuando la luz (radiación electromagnética IR) atraviesa dos materiales con distintos índices de refracción, uno de menor valor que es la muestra y otro mayor que es el elemento de reflexión total interna (cristal ATR) a cierto ángulo conocido como ángulo crítico. En esas condiciones la luz se refracta de tal modo que no es capaz de atravesar la superficie entre ambos medios y termina reflejándose completamente.

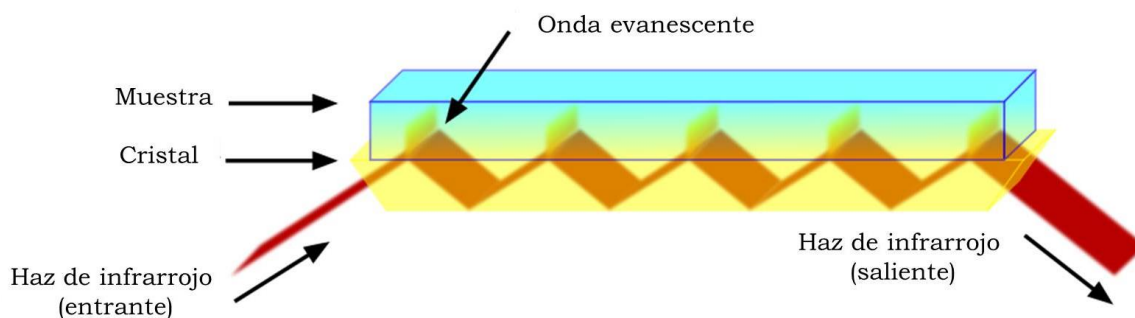


Figura 2.12.3.1. Reflexión total atenuada (múltiple) y formación de onda evanescente.

En el dispositivo del instrumento FT IR ATR, el haz de radiación IR incide sobre el cristal y sufre reflexión total interna en la interface cristal-muestra creando una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal, en la muestra manteniéndose en contacto con el cristal (Figura 2.12.3.1). En las regiones del espectro IR en que la muestra absorbe la energía, se atenúa la onda evanescente, entonces el haz atenuado regresa al cristal y posteriormente sale por el extremo opuesto de este dirigiéndose al detector del espectrómetro IR [61]. En este trabajo se analizan muestras de un espesor de alrededor de 5mm por lo cual se consideró usar la FT IR ATR.

3. Motivación

La piel es el órgano más grande de nuestro cuerpo y está expuesto a sufrir daños ocasionados por accidentes o enfermedades. Lesiones como úlceras, grandes heridas o quemaduras que involucran una pérdida considerable de piel incitan a buscar alternativas que ayuden a mejorar el aspecto y la salud de las personas que las padecen. Actualmente hay tratamientos convencionales que permiten si bien no una reparación total de la herida, si una protección temporal que ayude a disminuir factores de riesgo como las infecciones y pérdida de líquidos.

Tratamientos como los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos permiten una sanación total, parcial o temporal para las heridas de la piel. Pero, este tipo de tratamientos no siempre suelen ser efectivos. En el caso de los aloinjertos hay poca disponibilidad de piel ocasionada por la falta de donantes debido a una cultura pobre en nuestro país acerca de la donación de órganos después de la muerte. En heridas de grandes extensiones como en los grandes quemados la poca disponibilidad de piel sana para realizar autoinjertos limita a este tipo de tratamiento. Hoy en día existen una gran gama de sustitutos dérmicos disponibles en el mercado algunos temporales y otros permanentes pero son de alto costo [68], difícil manipulación, requieren de una vigilancia médica estricta y tratamientos constantes.

Dentro de la ingeniería de tejidos se trabaja arduamente en la creación de nuevos materiales biocompatibles que funcionen como andamios que permitan el desarrollo de órganos y tejidos en forma artificial. Como se mencionó en la introducción entre los materiales utilizados en el área biomédica se encuentran los polímeros sintéticos como el ácido poliláctico y el ácido poliglicólico, estos materiales permiten crear soportes para cargas biológicas. Modificar las superficies de los andamios por algún tipo de medio físico o químico ocasiona que estos ofrezcan un ambiente más apropiado para la adhesión y proliferación celular. El método de plasma para la modificación de superficies de andamios permite crear un ambiente rico en grupos funcionales para un mejor anclaje celular [69].

Dicho todo lo anterior, el presente trabajo propone el uso de polímeros sintéticos con modificación de su superficie mediante la técnica de plasma para obtener andamios bioestables, biocompatibles y biodegradables que funcionen como un soporte para células, en partículas las de piel.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Diseñar y caracterizar andamios poliméricos de PGA y PLLA modificados en su superficie con PPy-I mediante la técnica de plasma.

4.2. Objetivos específicos

- Modificar la superficie de andamios poliméricos de PGA y PLLA para la creación de un soporte de células de piel humana.
- Caracterizar fisicoquímicamente soportes de PGA y PLLA de la marca Biofelt® modificados en su superficie por plasma de PPy-I.
- Evaluar mediante cultivos celulares los andamios PPy-I/PGA y PPy-I/PLLA para su posible aplicación en ingeniería de tejidos de piel.

4.3 Objetivos particulares

- Desarrollar fibras poliméricas de PLLA por electrohilado, que funcionen como un andamio para crear sustitutos de tejidos y órganos artificiales.
- Aplicar la técnica de polimerización por plasma para modificar superficies de materiales con aplicación en ingeniería de tejidos.
- Desarrollar y evaluar cultivos celulares con andamios de PGA y PLLA modificados en su superficie con plasma de PPy-I para queratinocitos, tenocitos y fibroblastos primarios derivados de piel humana y la línea celular HEK-293.

5. Desarrollo experimental

En este capítulo se describe la modificación por plasma de andamios poliméricos comerciales de ácido poliglicólico (PGA-Biofelt®) y ácido l-poliláctico (PLLA-Biofelt®), lo cuales fueron adquiridos en CONCORDIA MEDICAL. Se describen los parámetros usados para la modificación de la superficie del andamio.

5.1. Preparación de los andamios

Los andamios se crearon cortando muestras de 10x10mm, se introdujeron en el reactor de plasma para efectuarles un recubiertos con una película delgada de polipirrol dopada con yodo (PPy-I), la Figura 5.1.1 muestran los andamios sin modificar.

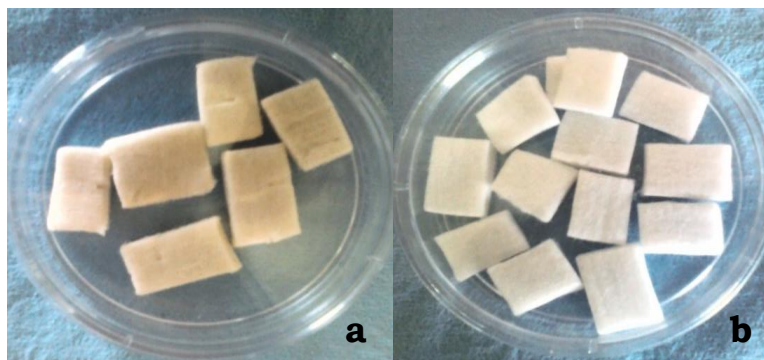


Figura 5.1.1. Andamios de fibras no tejidas de (a) ácido poliglicólico (b) ácido poliláctico, antes de ser sometidos al proceso de plasma para la modificación de su superficie.

5.2. Polimerización por plasma

Mediante la técnica de polimerización por plasma se hace un depósito de una película delgada de PPy-I sobre los andamios de PGA, PLLA y al mismo tiempo se recubren cubreobjetos de vidrio (knittel Glass de 2.5cm x 2.5cm) para su posterior análisis.

Un diagrama esquemático del reactor para la polimerización por plasma (Figura 5.2.1) que está construido con un tubo de vidrio Pyrex con dimensiones de 9cm de diámetro exterior, 0.35cm de espesor y 25cm de longitud. En cada extremo del tubo se coloca una tapa de acero inoxidable, donde cada tapa tiene dos puertos de acceso, además cada tapa tiene un orificio en el centro donde se inserta un electrodo de acero inoxidable para cada una. Los electrodos están compuestos de una barra cilíndrica y una placa circular plana de 7cm de diámetro. Los electrodos son conectados a un generador de radio frecuencia DRESSLER Modelo CESAR-1500, colocando un electrodo en la terminal positiva y otro en la negativa para

formar un campo eléctrico entre las placas. Dado que cada tapa tiene dos puertos, en uno de ellos se conecta el sistema de vacío que consiste de una trampa fría para partículas y de una bomba de vacío mecánica marca Edwards, mientras que en el otro puerto se conecta un medidor de presión tipo pirani (Edwards), y en la otra tapa se colocan el monómero de pirrol y yodo cada uno en su respectivo contenedor.

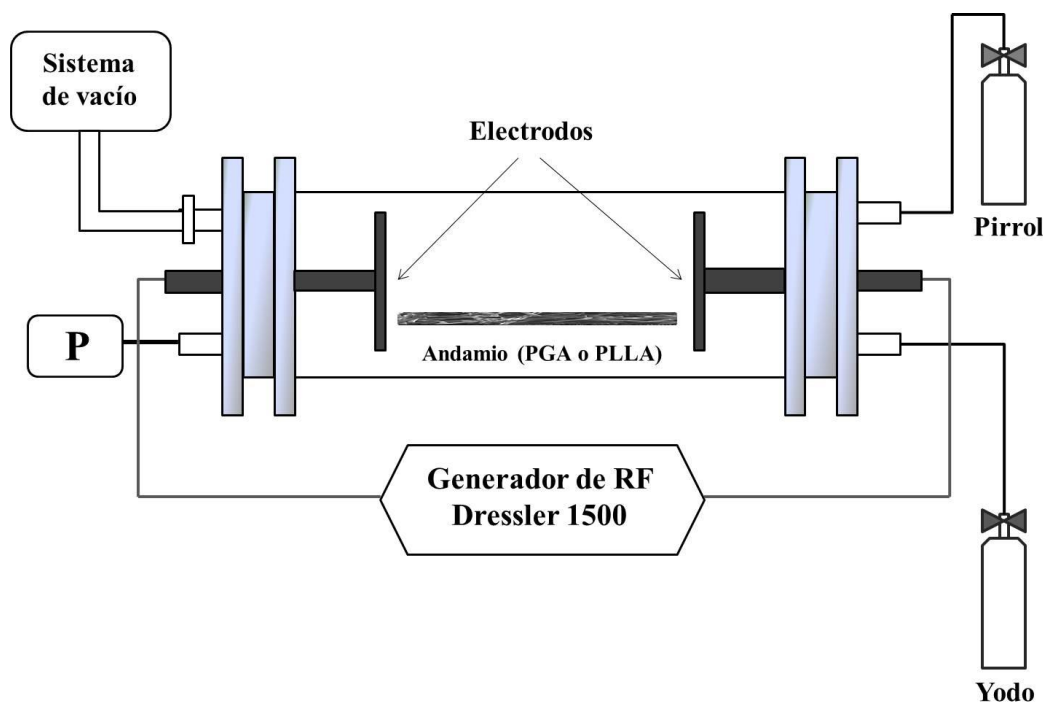


Figura 5.2.1. Arreglo y montaje del dispositivo experimental para polimerización por plasma.

Para iniciar el proceso de polimerización los electrodos se colocan a una distancia aproximada de 5cm entre ellos. Los andamios de PGA y PLLA se colocan en el centro del reactor, pegados en el interior del tubo de vidrio y entre los electrodos. Antes de iniciar la polimerización, se hace un proceso de purgado al reactor de alrededor de 10 minutos para eliminar impurezas. Posteriormente, se genera un vacío alrededor de 3×10^{-1} Torr a 4×10^{-1} Torr, se enciende la fuente de radio frecuencia, se ajusta a una potencia de 20W y se abre la válvula del monómero de pirrol durante una hora. El yodo se inyecta de manera intermitente. La válvula de yodo se abre a los seis minutos de iniciada la reacción y se cierra a los 10 minutos, posteriormente se vuelve a abrir a los 16 minutos y se cierra a los 20 minutos y así sucesivamente hasta llegar a los 60 minutos de tiempo total de síntesis. Esto se hace con la finalidad de que los andamios no queden completamente cubiertos de yodo.

Al hacerles el depósito de una película delgada por plasma de PPy-I, se busca modificar esta propiedad para obtener una mejor adhesión,

proliferación y diferenciación celular. Debido a que el PPy-I ha mostrado servir para el cultivo de diferentes líneas celulares [63,64]. La polimerización por plasma proporciona una superficie rica en especies reactivas, lo que permite una mayor interacción con las células ya que el andamio compuesto adquiere una superficie rica en grupos amina dotada de cargas positivas que proporciona a los andamios una alta biocompatibilidad para el cultivo de células [65].

5.3. Caracterización fisicoquímica y morfológica

En esta sección se describen las técnicas usadas para la caracterización de los andamios compuestos de PPy-I/PGA y PPy-I/PLLA.

5.3.1. Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier - Reflectancia Total Atenuada

En la Figura 5.3.1.1 (a) se muestra el espectrómetro de infrarrojo Perkin-Elmer 2000 GX System. Como los andamios son muy gruesos no se pueden analizar por transmisión con este espectrómetro por lo cual se utiliza un aditamento para reflectancia total atenuada, ATR. Por lo que en la Figura 5.3.1.1 (b) se muestra el aditamento de ATR Smith de diamante Durasable II. A los andamios recubiertos con PPy-I se les realizó un espectro de infrarrojo en modo ATR, haciendo 32 barridos con un intervalo de muestreo de 700 a 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} .



Figura 5.3.1.1. a) Equipo de FT-IR, b) aditamento ATR de Perkin-Elmer GX System.

5.3.2. Dispersión de Rayos X a ángulo pequeño

La caracterización por dispersión de rayos X a ángulo pequeño (Small-Angle X-Ray Scattering, SAXS) se efectuó utilizando un equipo Xeuss, Xenocs (Figura 5.3.2.1), equipado con una fuente de rayos X con ánodo de cobre, $\text{CuK}\alpha$ (Genix 3D Cu ULD, Xenocs) y un detector de pixeles híbrido (Palatus 300K, Dectris). La distancia de la muestra al detector fue 1.28m,

la longitud de onda del haz tuvo un valor de 0.15418 nm. Los andamios fueron sometidos a esta técnica de caracterización sin preparación previa.



Figura 5.3.2.1. Equipo de difracción de rayos X a ángulo bajo.

5.3.3. Dispersión de Rayos X a ángulo grande

La caracterización por dispersión de rayos X a ángulo grande (Wide-Angle X-Ray Scattering, WAXS) se efectuó utilizando un equipo Bruker D8 Advance, para lo cual se instalaron las muestras en un portamuestras para sólidos y se colocaron en el soporte del equipo. Se realizó un barrido de 5 a 50 grados en modo fijo en 11 minutos. La Figura 5.3.3.1 muestra el equipo utilizado que se encuentra en el Laboratorio de Análisis cualitativo por difracción de rayos X de la UAM Iztapalapa.



Figura 5.3.3.1. a) Portamuestras, b) preparación de muestras c) portamuestra colocado en el difractómetro y d) equipo para difracción de rayos X a ángulo grande.

5.3.4. Microscopia Electrónica de Barrido

La caracterización morfológica de los andamios se realizó para observar la calidad de las fibras, su diámetro, la porosidad generada por la distribución de las fibras y su degradación, para lo cual se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo JEOL JSM 7600F. La Figura 5.3.4.1 muestra una imagen del equipo proporcionado por el laboratorio de microscopia de la UAM Iztapalapa.

Previamente a la introducción de los materiales al equipo de medición se les extrajo los restos de agua y solvente que pudieran contener mediante una boba de vacío. Posteriormente se colocan pequeñas muestras (5×5 mm) de PGA, PLLA, PPy-I/PGA, PPy-I/PLLA sobre un porta muestras como se exhibe en la Figura 6.2.4(c) adhiriéndolos con cinta de grafito.



Figura 5.3.4.1. a) Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM 7600F, b) captura de datos y obtención de imágenes, c) portamuestras con los andamios a analizar.

5.4. Caracterización biológica

Muestras de andamios modificados por plasma (Figura 5.4.1) y sin modificar se sometieron a cultivo celular de 4 especies de células: embrionarias de riñón línea HEK-293, fibroblastos, queratinocitos primarios y tenocitos, estos tres últimos derivados de piel humana. Los crecimientos celulares se llevaron a cabo en el laboratorio de cultivo celular del Banco de Piel y Tejidos en el Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) bajo la dirección del Dr. Francisco Martínez Flores.

Para las pruebas biológicas se utilizó como medio de cultivo, suero fetal bobino (SBF) y se realizaron pruebas de esterilidad, acidez y población celular.

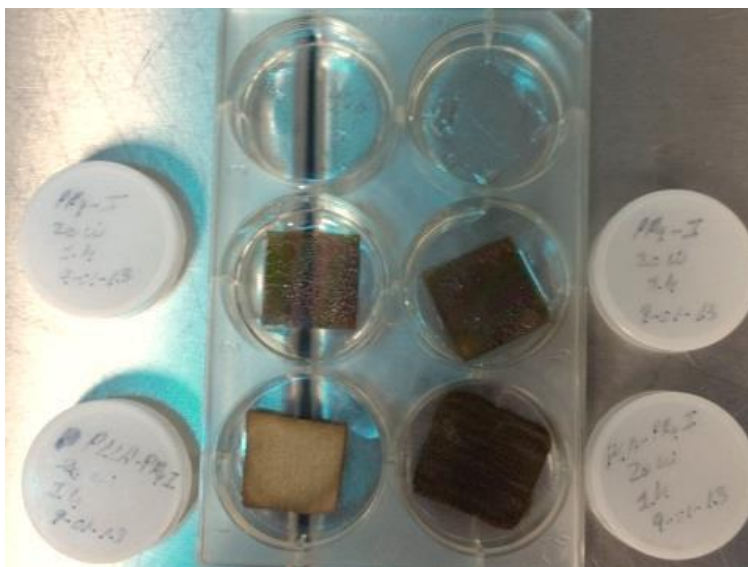


Figura 5.4.1. Andamios colocados en caja de 6 pozos para análisis de pH y cultivo celular.

5.4.1 Esterilización y sembrado de células

La esterilización de los andamios se realizaron sumergiéndolos en una solución de isopropanol durante 20 minutos, posteriormente se colocaron en un gabinete estéril Herasafe Cabinet Class II (Thermo-Kendro, Germany) para un proceso de secado por 10 minutos. Una vez realizado esto, los andamios son rehidratados con SBF por una hora. Posteriormente, se hizo un sembrado de células en una caja de cultivo celular de seis pozos con medio de cultivo fresco y completo, adicionando antibióticos y se procedió a la incubación. Se midió la condición de acidez para cada sistema medio-andamio realizándose por triplicado y midiendo el pH a los 1, 2, 3 y 7 días.

Se realizó el sembrado de 2×10^6 células a alta confluencia en el medio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F12) suplementado con antibióticos y SFB inactivado por calor. Las muestras se colocaron en la incubadora a condiciones de 5% de CO_2 , 21% de O_2 y 100% de humedad.

5.4.2 Microscopía Óptica

Se observó la población celular con un microscópico óptico para las muestras control, PPy-I/PGA y PPy-I/PLLA. Para las células embrionarias de riñón y los fibroblastos, se tomaron imágenes y para los queratinocitos y tenocitos.

5.4.3 Microscopia Confocal

Los complejos células/andamio se mantuvieron en cultivo por 9 días, después de este tiempo se reemplazó el medio de cultivo por un medio infectado con un adenovirus no replicante Ad-CMV-GFP con multiplicidad de infección (MOI, multiplicity of infection) de 100, durante una hora en una caja de 6 pozos (Greiner Bio-one, Germany). Después, las células fueron lavadas y el medio se reemplazó por uno fresco y 24 horas más tarde, los conjuntos células/andamio fueron analizados con un Microscopio Confocal LSM Meta 100 (Carl Zeiss, Germany) de Argón con 488nm de excitación y con un filtro de 520nm de emisión

6. Resultados y discusión

6.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada

En la Figura 6.1.1 se muestra un espectro de infrarrojo del PGA, donde se puede apreciar en 3500cm^{-1} se encuentra el característico de la vibración del enlace O-H. En 2961cm^{-1} se localiza la vibración de los carbonos alifáticos (CH_2), la señal más intensa corresponde al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) que vibra en la posición de 1738cm^{-1} . La vibración de los enlaces CH_3 está localizada a 1412cm^{-1} , mientras que la señal del grupo funcional C-C se encuentra en la posición de 1177cm^{-1} y el pico de 1084cm^{-1} corresponde a la vibración del grupo C-O.

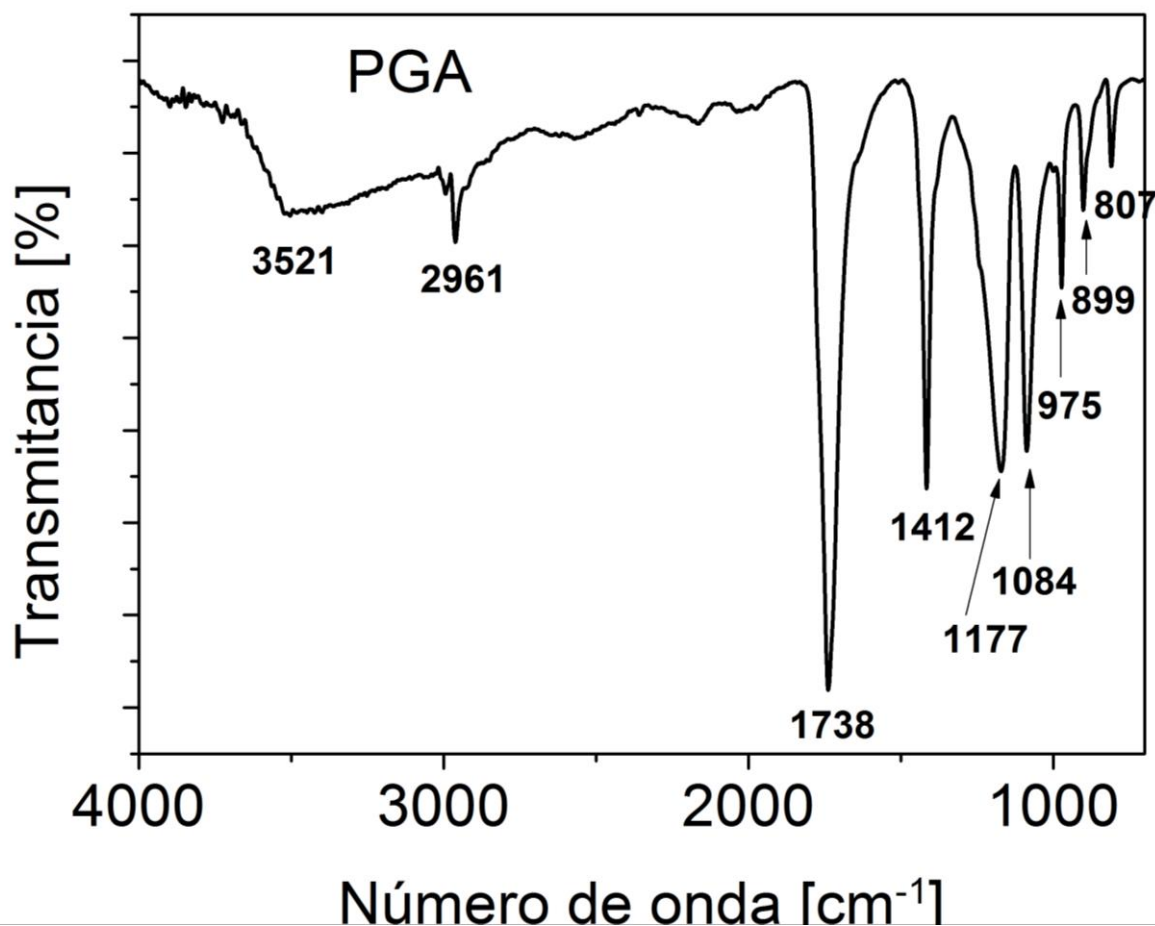


Figura 6.1.1. Espectro FT-IR-ATR del andamio de PGA.

El espectro del andamio de PGA recubierto con PPy-I (Figura 6.1.2), muestra bandas amplias y complejas características de polímeros sintetizados por plasma. En la posición de 3311cm^{-1} se encuentra la vibración de los grupos de aminas primarias y secundarias que son característicos del pirrol; esta banda amplia y compleja está cubriendo la vibración del grupo O-H de PGA. El pico que aparece en 2958cm^{-1} es debido a los carbonos alifáticos. Como en el caso del material sin recubrimiento, la señal más intensa corresponde al grupo carbonilo (C=O) y vibra en la posición de 1738cm^{-1} , junto a esta señal se aprecia un hombro que corresponde a la señal de C=N proveniente del pirrol. La vibración de los enlaces CH_3 están localizadas a 1412cm^{-1} y es característica del PGA y el resto de las señales corresponden al PGA.

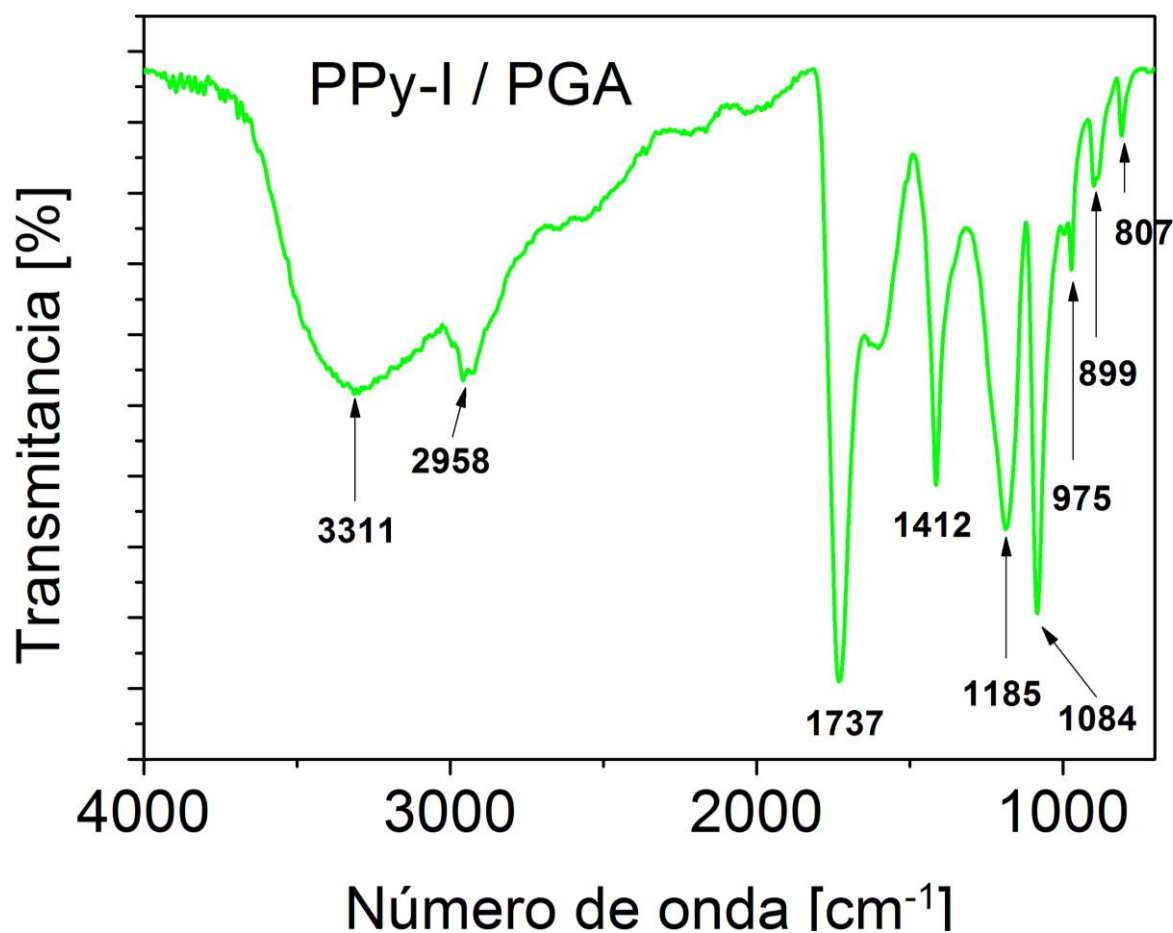


Figura 6.1.2. Espectro FT IR ATR del andamio de PGA cubierto con una película delgada de PPy-I.

En la Figura 6.1.3 se muestra el espectro infrarrojo del andamio de PLLA. Se observan los picos característicos de los grupos funcionales del PLLA: en 1784 cm^{-1} se localiza la vibración característica del grupo carbonilo C=O que es la señal más intensa; el grupo funcional CH_3 muestra sus vibraciones asimétricas entre 1454 cm^{-1} y 1387 cm^{-1} , mientras que en 1177 cm^{-1} se encuentra la vibración del grupo C-C y la vibración de tensión del grupo éster C-O, se observa en 1084 cm^{-1} .

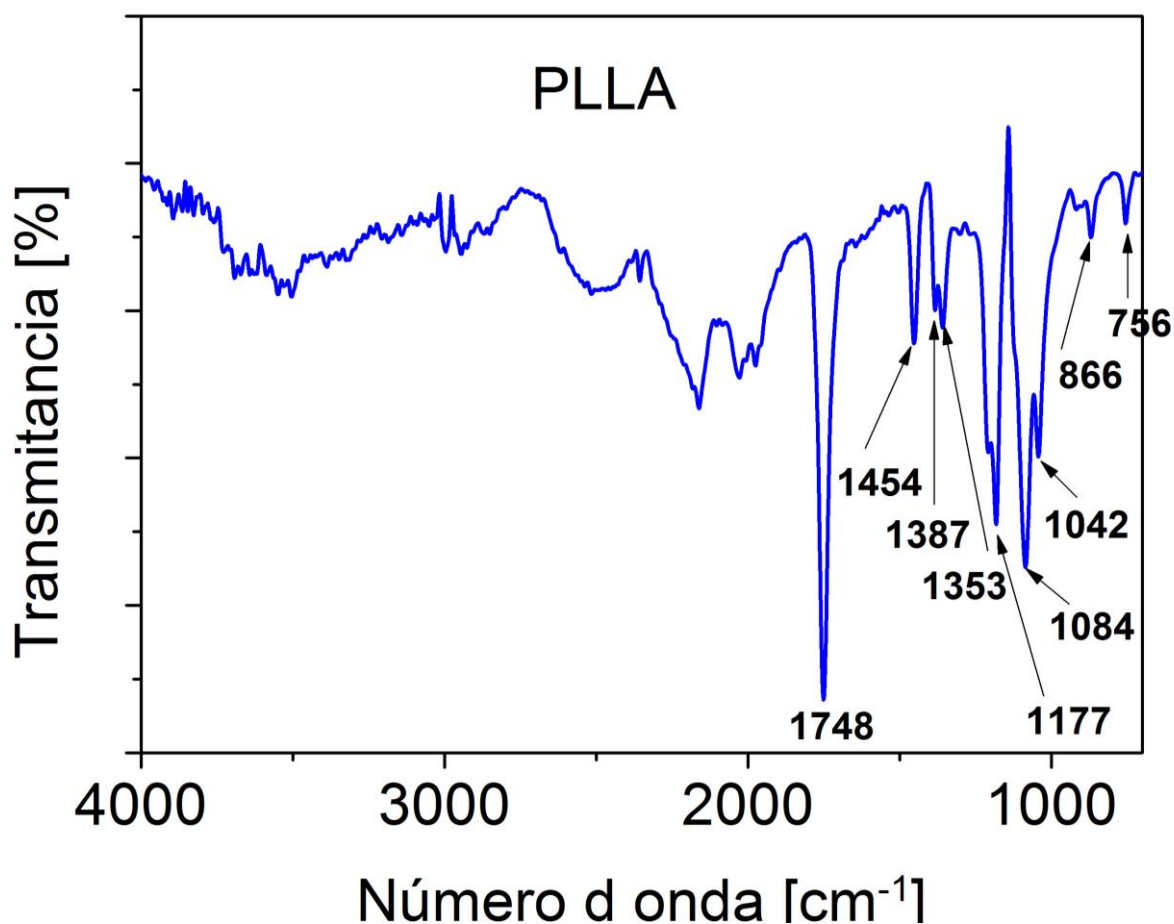


Figura 6.1.3 Espectro FT-IR-ATR del andamio de PLLA.

En la Figura 6.1.4 se muestra el espectro infrarrojo del andamio de PLLA recubierto con PPy-I polimerizado por plasma, en donde se puede apreciar alrededor de 3300 cm^{-1} la señal de las aminas primarias de polipirrol, alrededor de los 2900 cm^{-1} la vibración características de los carbonos alifáticos, en los 1784 cm^{-1} la vibración característica del grupo carbonilo C=O y junto de ella, al igual que en el caso anterior, en forma de un hombro la vibración del grupo C=N proveniente del polipirrol. Con una intensidad menor se muestra el grupo funcional CH_3 cuyas vibraciones asimétricas entre los 1446 cm^{-1} y 1361 cm^{-1} . La interacción con el PPy-I ocasiona que estas bandas estén recorridas hacia valores menores. En 1185 cm^{-1} se encuentra la vibración del grupo C-C mientras la vibración de tensión del grupo éster C-O, se observa en los 1076 cm^{-1} .

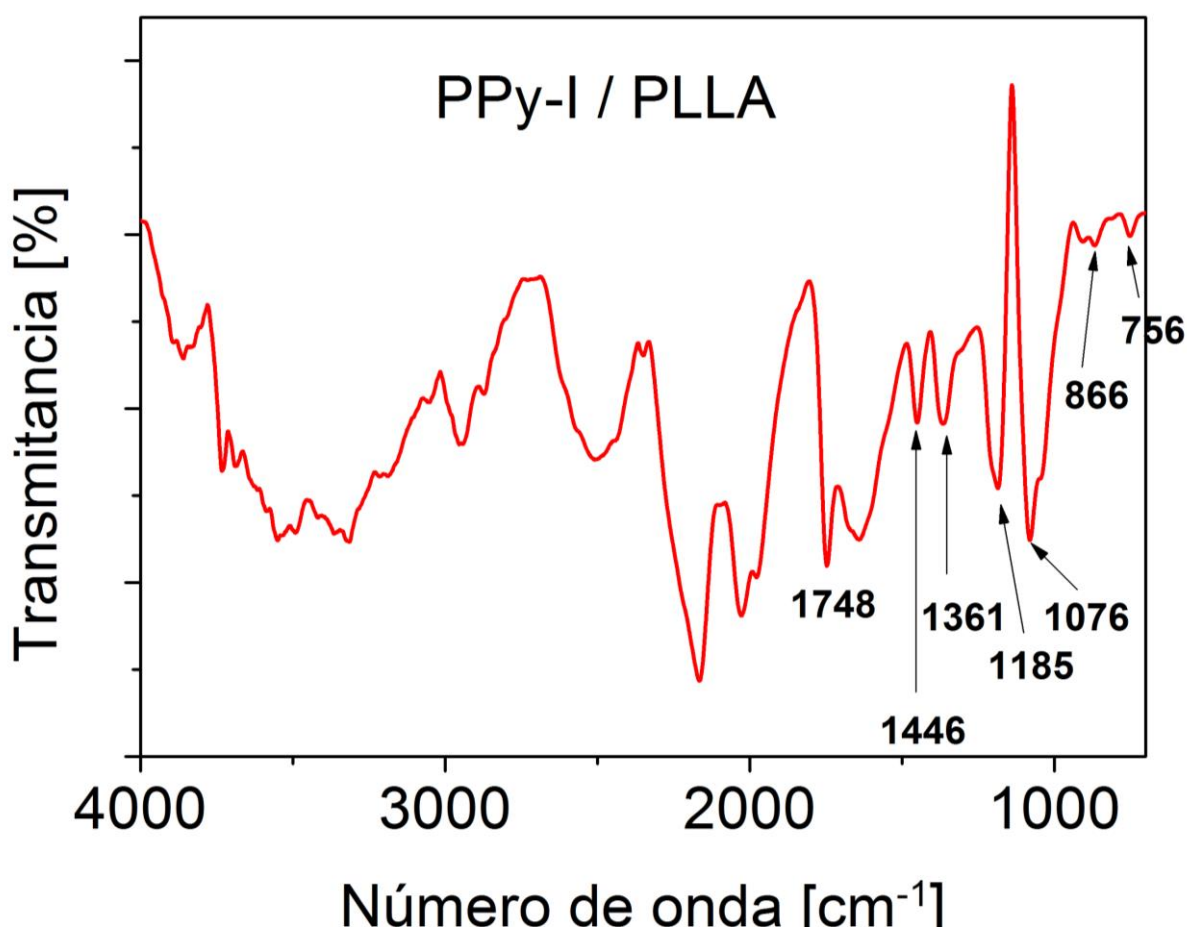


Figura 6.1.4. Espectro FT IR ATR del andamio de PLLA recubierto con PPy-I.

6.2 Dispersión de Rayos X

6.2.1 Dispersión de Rayos X a ángulo pequeño

En la Figura 6.2.1 se muestra el difractograma de rayos X a ángulo pequeño de los andamios de PGA y PLLA sin modificar y los recubiertos con una película delgada de PPy-I sintetizada por plasma. Todos los difractogramas son difusos, sin pico de difracción máximo. Los espectros de PLLA y PPy-I/PLLA no muestran ninguna señal de difracción mientras que PGA y PPy-I/PGA presenta un pequeño hombro alrededor de $q=0.85 \text{ nm}^{-1}$. Este material tiene una estructura lamelar encerrada entre capas amorfas del polímero, el hombro en esta posición indican que el tamaño de las lamelas es de 7 a 8 nm. Como se puede apreciar la capa de polímero sintetizada sobre el PGA no altera la estructura del material.

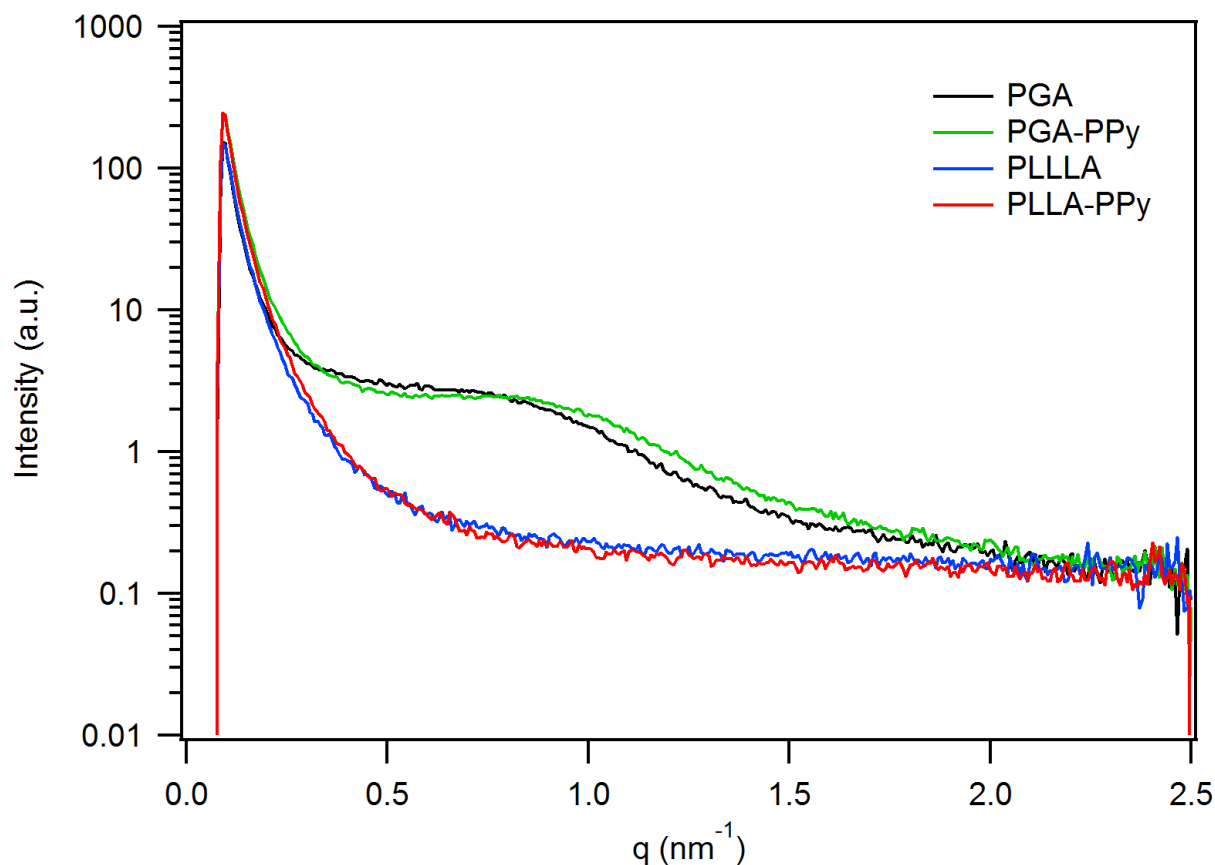


Figura 6.2.1. Espectro de dispersión de rayos X para ángulo pequeño.

6.2.2 Dispersión de Rayos X a ángulo grande

La Figura 6.2.2.1 se muestra el difractograma del andamio de PGA sin modificar, el cual indica que se tienen una fase amorfa y sobre ella destacan dos picos cristalinos. El grado de cristalinidad, el tamaño de los cristales y los parámetros de red se pueden obtener de este difractograma. Si la longitud de onda del haz de rayos X es de $\lambda = 0.1542$ nm y con un diámetro del haz de 0.4 mm en la posición de la muestra.

El grado de cristalinidad se puede obtener deconvolucionando el difractograma y tomando el área de la región cristalina entre el área total, o aplicando la ecuación:

$$X_c = \frac{I_c}{I_c + I_A} * 100$$

Donde I_c es la intensidad de difracción del pico cristalino y I_A es la intensidad de difracción del pico amorfo.

El tamaño del cristal se puede estimar con la ecuación de Scherrer:

$$D = \frac{k \lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

Donde $k= 0.9$, β es la altura a la mitad del pico de difracción y θ es el ángulo de difracción de Bragg.

El difractograma muestra 2 picos intensos en 22.5° y 29° que son asignados a los planos de difracción (110) y (020) respectivamente. La celda unitaria para el cristal de PGA es ortorrómbica y tiene parámetros de red de: $a=5.25$ Å, $b=6.19$ Å y $c=7.02$ Å con una cristalinidad del 50%.

En la Figura 6.2.2.2 se muestra el espectro del andamio compuesto de PPy-I/PGA, en el cual se pueden apreciar dos fases, una cristalina debido y otra debida a la amorfa ambas debidas al PGA, además de la parte amorfa de polipirrol derivado de plasma. La parte cristalina presenta una mayor intensidad ya que tiene dos contribuciones a esta fase, una por el polipirro y otra por el PGA. El difractograma muestra los picos característicos del PGA centrados en $2\theta=22.5^\circ$ y 29° , los cuales traslapan completamente el pico del PPy-I centrado en 25° . El espectro indica que los dos materiales están presentes en la muestra y su forma es sólo la superposición de los dos espectros discutidos anteriormente.

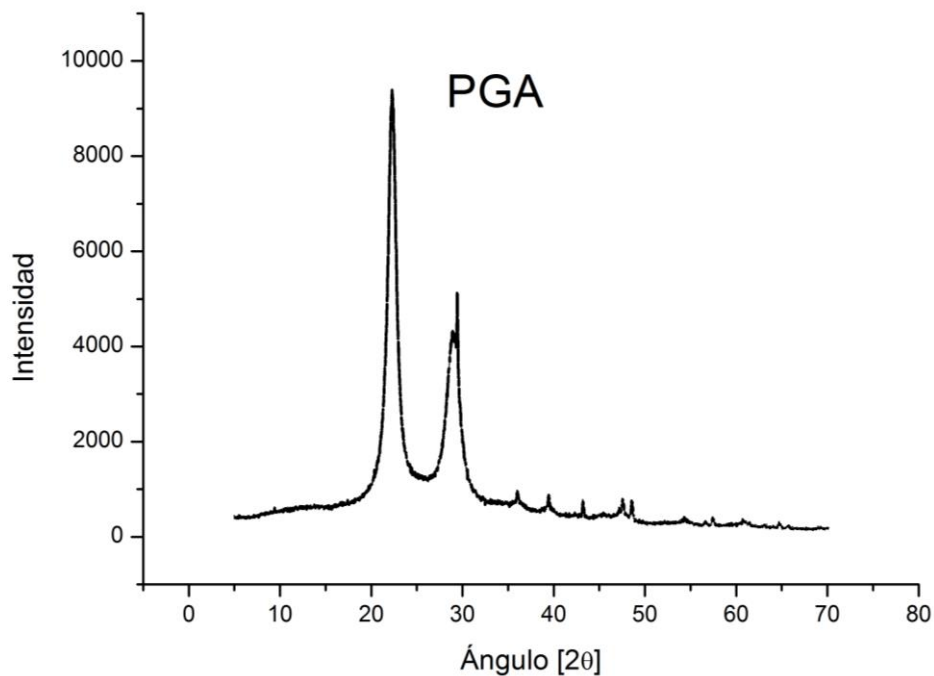


Figura 6.2.2.1 Difractograma de la andamio de PGA.

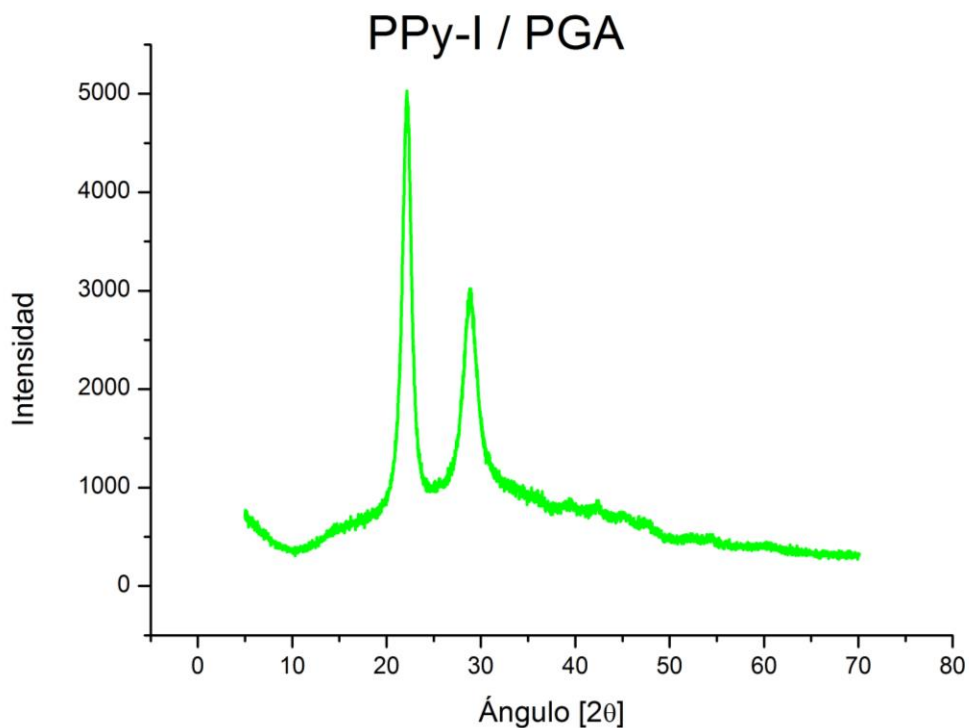


Figura 6.2.2.2. Difractograma del andamio de PGA recubierto de una película delgada de polipirrol dopado con yodo.

En la Figura 6.2.2.3 se muestra el espectro de difracción de rayos X de ángulo grande del andamio de PLLA sin modificar. Apreciándose que el PLLA tiene dos fases, una cristalina y otra amorfa. Sobre la región amorfa destaca un pico centrado en $2\theta=16.5^\circ$ que corresponden al plano de difracción de (200/110), esta señal indican la presencia de cristales α . Los parámetros de red asociados a este tipo de estructura ortorrómbica son $a=10.6 \text{ \AA}$ $b= 10.6 \text{ \AA}$ y $c= 28.8 \text{ \AA}$.

En la Figura 6.2.2.4 se muestra el difractograma del andamio de PLLA recubierto con polipirrol-yodo, y como en el caso del PPy-I/PGA, el espectro muestra la superposición de 2 señales, una del PLLA y otra del polipirrol-yodo, pero sin apreciarse cambios significativos.

En la Figura 6.2.2.5 se muestra el difractograma del polipirrol-yodo sintetizado por plasma utilizado para recubrir las fibras de PGA y PLLA. El polipirrol-yodo está depositado sobre un cubre objeto de vidrio para su análisis, observándose que el polímero es de naturaleza amorfa como lo indica el ancho pico característico de material amorfo centrado en $2\theta=25^\circ$, ya que este pico se debe a la dispersión de las cadenas poliméricas en el espacio interplanar. La separación promedio de las cadenas poliméricas se puede calcular del pico principal usando la relación siguiente:

$$S = \frac{5 \lambda}{8 \text{sen}(\theta)}$$

Donde S es la distancia de separación de las cadenas del polímero, λ es la longitud de onda de rayos X y θ es el ángulo de difracción a la máxima intensidad del pico. La separación promedio entre cadenas poliméricas se calculó dando un valor de $S=4.45 \text{ \AA}$ para el polipirrol-yodo sintetizado por plasma.

El tamaño promedio del cristal del pico a 25° se puede estimar usando la fórmula de Scherrer indicada anteriormente, resultando $D=56 \text{ nm}$.

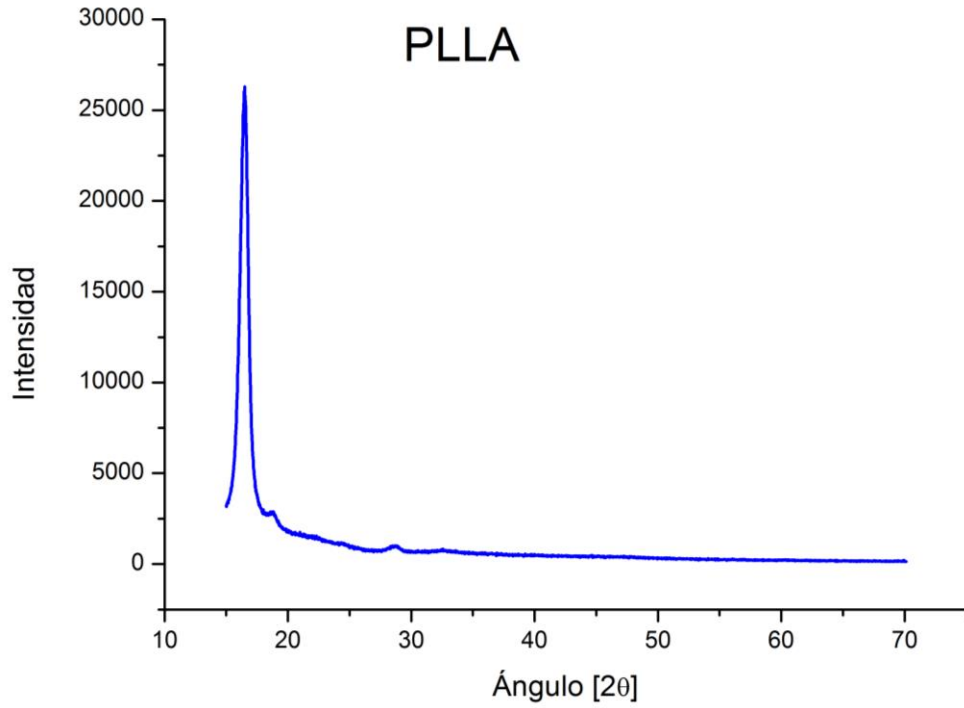


Figura 6.2.2.3. Difractograma del andamio de PLLA sin modificar.

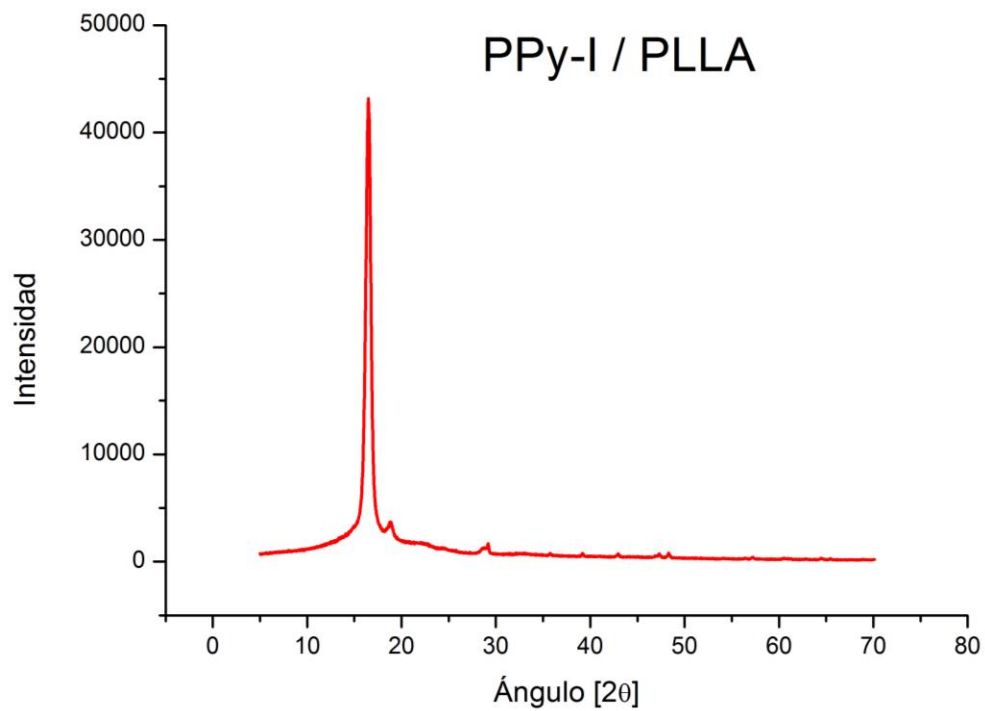


Figura 6.2.2.4. Difractograma del andamio de PLLA recubierto con polipirrol-yodo.

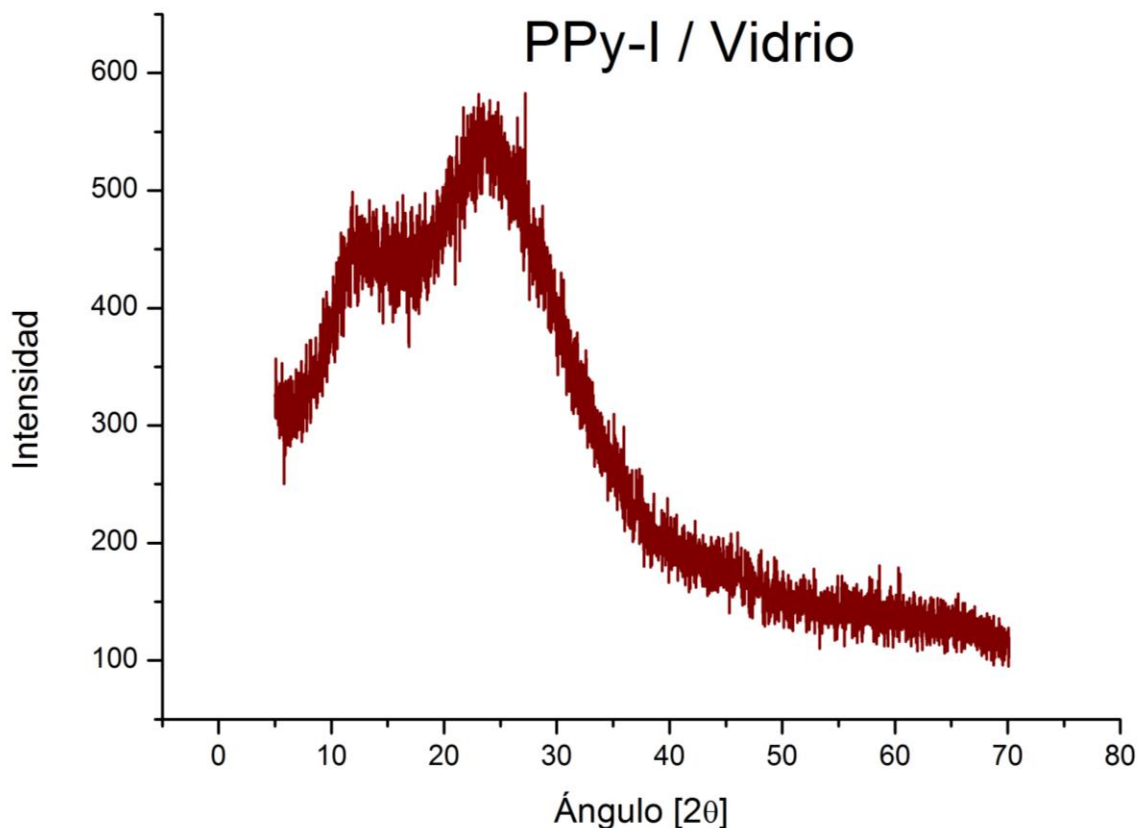


Figura 2.2.2.5 Difractograma de la película de polipirrol-yodo depositada sobre vidrio via plasma.

6.3. Microscopía Electrónica de Barrido

En la Figura 6.3.1 se muestran fotomicrografías del andamio de PGA a diferentes ampliaciones en las que se observan fibras distribuidas de manera aleatoria por toda la zona como si fuera paja arrojada al azar. Estas fibras tienen una apariencia rígida y su superficie es muy lisa, estas propiedades no permiten que las células se anclen y proliferen en su superficie. Se puede apreciar en las imágenes que al estar distribuidas de manera aleatoria generan poros de diferentes tamaños, mayores a $20\ \mu\text{m}$. Este tamaño de poro los hace ideales para crecer sobre ellos diferentes células como los queratinocitos que tienen un diámetro aproximado de 6 a $10\ \mu\text{m}$ [70], los fibroblastos de 10 a $15\ \mu\text{m}$ [71]. El tamaño de los poros generados permite que las células se introduzcan dentro del andamio y generen un crecimiento tridimensional. El tamaño promedio de las fibras de PGA sin modificar es de $13.28\ \mu\text{m}$ con una desviación estándar de $1.61\ \mu\text{m}$.

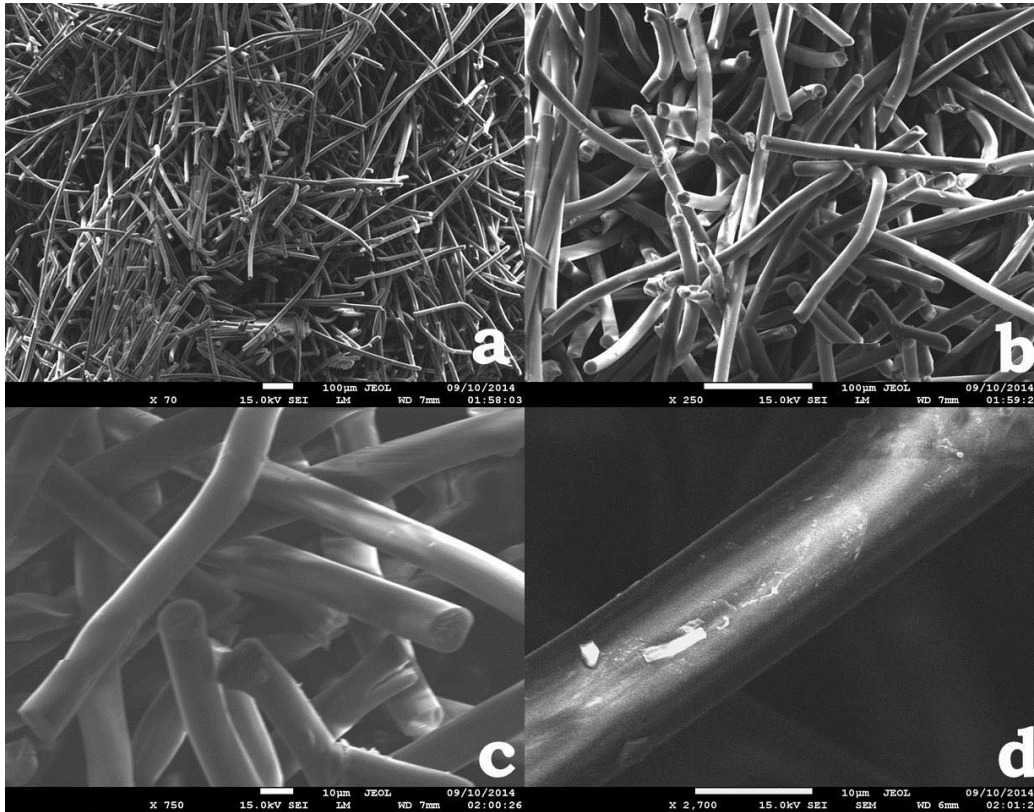


Figura 6.3.1 Imágenes de SEM del andamio de PGA. a) Vista panorámica donde se aprecia una distribución aleatoria de las fibras, barra de 100 μm . b) Acercamiento para la apreciación de la superficie de las fibras, barra de 100 μm . c) Fibras bien estructuradas pero fracturadas, barra de 10 μm . d) Acercamiento a una fibra mostrando una superficie demasiado lisa, barra de 10 μm .

En la Figura 6.3.2 se muestra el andamio de PGA recubierto con una película delgada de PPy-I. Como se puede apreciar en las imágenes (a) y (b), las fibras se fragmentaron debido posiblemente a la adsorción de humedad ambiental que les provocó degradación, y algunas fibras se ven largas y algunas tienen la apariencia de estar recubiertas con una pequeña película de PPy-I, esta película no las protegió de la degradación de los factores ambientales. En la imagen (c) se aprecia con mayor detalle la película de PPy-I, en la parte inferior de la imagen se ve que la película se fracturó y muestra en el fondo a la fibra. En el centro de la imagen (d) se aprecia como las fibras se están fragmentando en pedazos pequeños. Esta degradación tiene efectos importantes sobre los cultivos celulares como se discutirá más adelante en este capítulo.

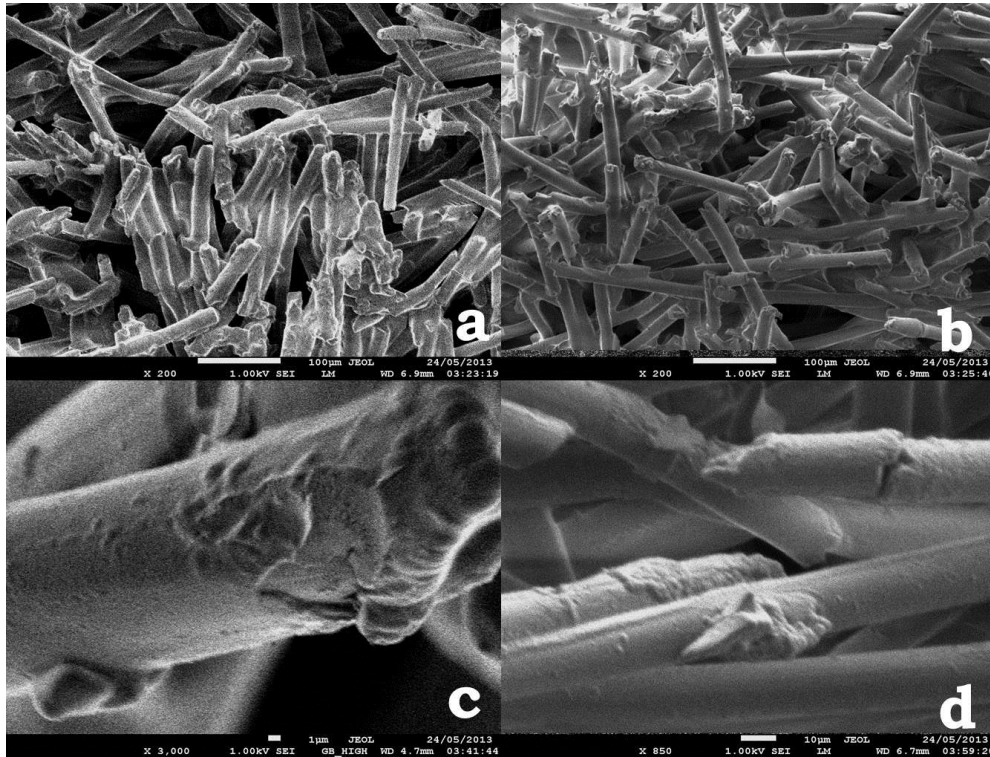


Figura 6.3.2 Imagen SEM del andamio de PPy-I/ PGA. a) Fibras fragmentadas después de la modificación superficial, barra de 100 μm . b) Apreciación más nítida del conglomerado de fibras, se aprecia una superficie rugosa a causa de la exposición al plasma, barra de 100 μm . c) Acercamiento en el extremo de una fibra, se aprecia claramente una superficie rugosa provocada por la exposición al plasma, barra de 1 μm . d) Acercamiento a un pequeño grupo de fibras, se observa un perfecto recubrimiento, con un diámetro aproximado de 20 μm , barra de 10 μm .

En la Figura 6.3.3 se muestran fotomicrografías del andamio de PLLA recubierto con una película delgada de PPy-I. En la Figura (a) se puede apreciar que las fibras son largas y están distribuidas de manera aleatoria sobre toda la superficie y su distribución genera poros grandes mayores a 100 μm . En (b) se puede apreciar una especie de manojos de fibras que están alineadas unas respecto de otras, son fibras largas mayores a 600 μm . A diferencia de las fibras de PGA que son redondas, las fibras de PLLA son un poco aplanadas en las puntas, y homogéneas en la distribución de tamaño de su sección transversal, por lo que su diámetro promedio es de 24.35 μm , con una desviación estándar de 3.42 μm . La Figura 6.3.3 (c) muestra con mayor detalle que las fibras de PLLA están aplanadas en la punta y presentan algunas protuberancias sobre su superficie, en el centro de la imagen se aprecia la punta de una fibra aplanada con una sección transversal de aproximadamente 50 μm la cual permitiría que una célula se ancle sobre su superficie y aún tenga un poco de espacio para

moverse. En 6.3.3 (d) se aprecia la punta de una fibra y parecería que la fibra tiene una estructura interna sólida y que esta forrada por una película delgada, también se aprecia una marca de 10 μm de largo y junto a ella algunas protuberancias. Las marcas y protuberancias indican que las fibras no son completamente lisas.

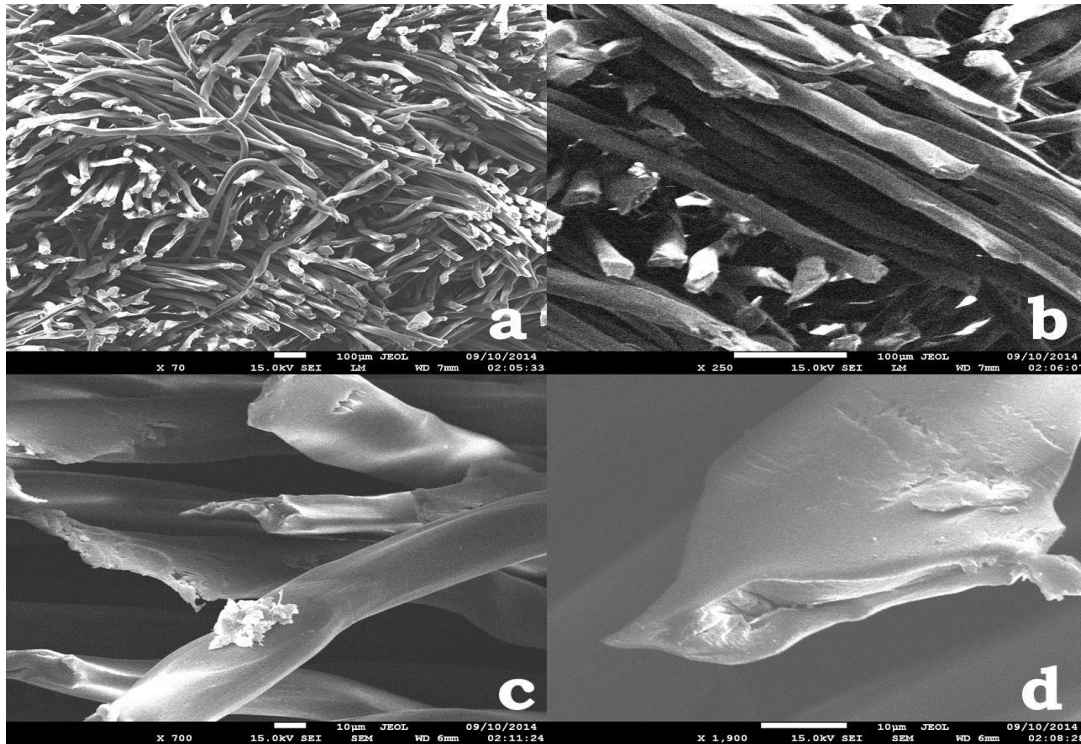


Figura **6.3.3**. Imagen de SEM del andamio de PLLA. a) Vista panorámica de la estructura del andamio, se observan fibras largas no fracturas con buena consistencia, barra de 10 μm . b) Acercamiento que muestra la forma en la que están agrupadas las fibras, se observan alineadas, con longitudes mayores a los 600 μm , barra de 100 μm . c) Acercamiento a los extremos de unas fibras, se observan superficies bastante lisas sin rasgos de fractura, barra de 10 μm . d) Acercamiento al extremo de una fibra, se puede apreciar algo de rugosidad lo que permite la adherencia de algunas células y estructura interna sólida, barra de 10 μm .

La Figura 6.3.4 muestra el andamio de PPy-I/PLLA a diferentes ampliaciones. En la Figura (a) se ve una distribución aleatoria de las fibras sobre todo el campo visual se aprecian fibras largas que no han sufrido un proceso de degradación como el mostrado por las fibras de PGA. Parece que la película de PPy-I en este caso si protege a la fibra, lo que va a ocasionar que este andamio sea más resistente a los factores ambientales y dure más tiempo sin sufrir degradación dentro del sistema biológico. En la parte inferior izquierda de la imagen se aprecia una fibra que no es redonda y está formando una especie de “listón”. En (b) se

aprecian fibras rígidas algunas de ellas con pequeñas fracturas superficiales lo que indica que la película de PPy-I se fracturó posiblemente d a la manipulación de la muestra. En la parte superior derecha se aprecia en segundo plano una rasgadura a la cubierta de la fibra, indicando que la película está adherida sobre las fibras. La imagen (c) muestra un acercamiento, donde se observa que la película de PPy-I se depositó cubriendo casi en su totalidad el perímetro de la fibra, en color negro se aprecia la fibra y en un tono más claro la película. En (d) se muestra con mayor detalle el recubrimiento de película. Las fibras que están en el fondo de las imágenes (c) y (d) también están recubiertas del polímero, lo que indica que la película sintetizada por polimerización por plasma recubre a las fibras internas del andamio lo que puede provocar que las células se introduzcan al andamio dando la posibilidad de generar un crecimiento celular tridimensional.

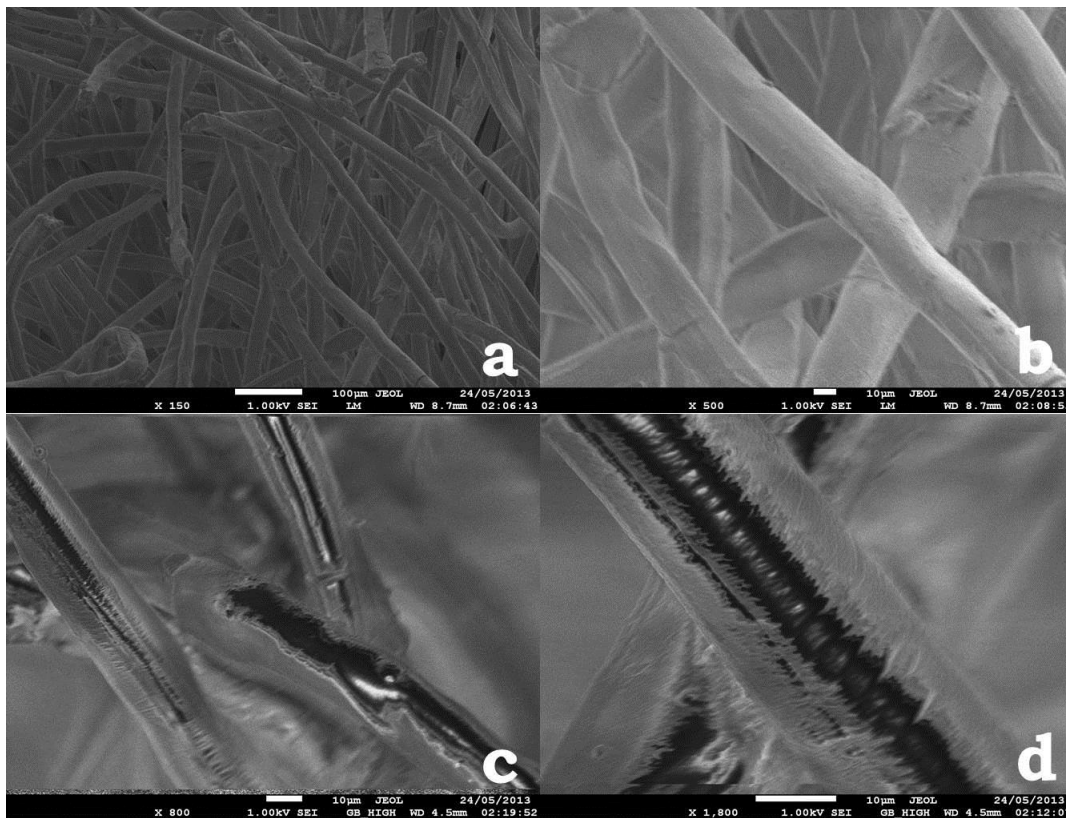


Figura 6.3.4. Imagen SEM del andamio de PPy-I/PLLA. a) Se Observa la estructura y firmeza de las fibras que componen este andamio, el recubrimiento se ve bastante bien adherido a la superficie de las fibras, barra de 100 μm . b) Acercamiento a más detallado, se aprecia claramente el depósito de la película de polipirrol-yodo. La fibras tienen un diámetro aproximado de 25 μm , barra de 10 μm . c) Se aprecian tres fibras de longitudes suficientemente largas y perfectamente firmes. La región en negro es parte de la fibra que se cubrió de la película de PPy-I, la parte

blanca es la película de PPy-I que deposita sobre la fibra, el diámetro de una de las fibras es de 20 μ m, barra de 10 μ m. c) Se aprecia perfectamente un segmento de una fibra, se ve claramente la algunas capas de la película depositada, barra de 10 μ m.

6.4. Pruebas biológicas

6.4.1 Prueba de acidez

En la tabla 6.4.1 se muestran los resultados de la inmersión de los andamios compuestos en el medio de cultivo celular, se midió el pH a las 24, 48, 72 horas y así como a los 7 días. Como medio control se usó el suero fetal bovino (SFB) y como se puede apreciar en la tabla, este no sufre cambios importantes en el pH tomado a los tiempos indicados. Para el PPy-I/PGA desde las primeras 24 horas sufre un cambio muy importante, ya que el pH inicial fue el mismo que el del control (7.23) pero cambió a 3.15 debido a que el material se está degradando, como lo muestra la imagen obtenida por SEM, y en consecuencia el medio se acidifica, observándose el mismo comportamiento hasta el día 7. Este material tiene un efecto significativo sobre el medio de cultivo celular y sobre los cultivos celulares como se mostrara más adelante. En contraste, el andamio de PPy-I/PLLA no presenta cambios significativos en el pH del SFB-polímero con respecto al medio control durante el tiempo que duro el experimento. Este andamio es muy estable en el medio celular permitiendo una mejor respuesta al crecimiento celular como se describirá más adelante.

Tabla 6.4.1. Medición del pH en función del tiempo de inmersión de los andamios en el medio de cultivo celular.

Tiempo	Control	PPy-I/PGA	PPy-I/PLLA
24 horas	7.23	3.15	7.32
48 horas	7.50	3.66	7.64
72 horas	7.19	3.44	7.34
7 días	7.15	3.62	7.23

6.4.2. Cultivo Celular sobre los andamios modificados

Sobre los andamios modificados se sembró la línea celular HEK-293, fibroblastos humanos primarios derivados de piel, queratinocitos humanos primarios derivados de piel y tenocitos humanos primarios.

6.4.3. Microscopio Óptico

A continuación se muestran las imágenes obtenidas después de 7 días de cultivo de los cuatro tipos celulares, para medio control, PPy-I/PGA y PPy-I/PLLA.

Línea celular HEK-293

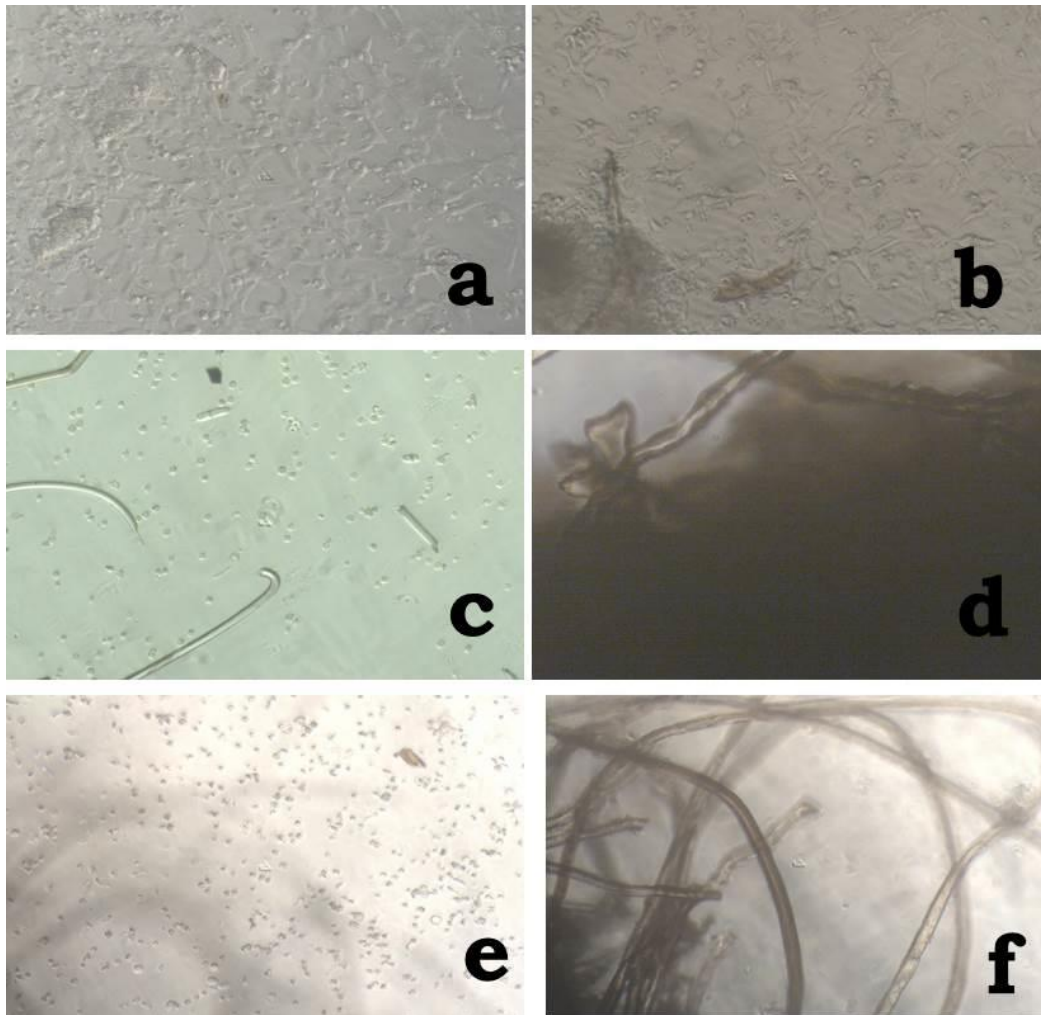


Figura 6.4.2.1. Imágenes del cultivo celular de la línea HEK 293 obtenidas con microscopio óptico en medio control. a) y b) medio control. c) y d) sobre el andamio de PPy-I/PGA. e) y f) sobre el andamio de PPy-I/PLLA.

En la Figura 6.4.2.1 se muestra las imágenes obtenidas con microscopio óptico del cultivo celular de las células HEK-293 en el medio control y sobre los andamios de PPy-I/PGA y PPy-I/PLLA. En 6.2.4.1 (a) se aprecian los núcleos celulares de forma redondeada y el cuerpo celular de forma un poco alargada, las células se están uniendo tratando de formar una monocapa celular. En esta misma imagen se aprecian células muertas de forma redonda lo que indica que no se anclaron al sustrato y murieron. En

6.2.4.1 (b) se aprecia cúmulos de células que están ancladas al substrato, en la parte inferior izquierda se aprecia con mayor detalle los núcleos de las células y como que se unen entre sí para formar un entramado. También se aprecian algunas células muertas. En la Figura 6.2.4.1 (c) se ven algunas fibras del andamio fragmentos en el fondo del pozo de cultivo. Se ve que todas las células en la zona están muertas y se aprecian en forma de ovillos. En 6.2.4.1 (d) solo se aprecian fibras en el extremo superior izquierdo pero no se aprecia ninguna célula anclada en este andamio. Como lo marca el análisis de acides esta es provocada por la degradación de las fibras ocasiona que todas las células se mueran. En la Figura 6.2.4.1 (e). Se puede apreciar una gran cantidad de células en el fondo del pozo de cultivo, se aprecia un pequeño segmento de fibra que se desprendió del andamio. Se aprecian pocos núcleos celulares en forma de ovillos. En el área no se aprecia ninguna fibra del andamio compuesto. En 6.2.4.1 (f) se enfoca a un extremo del andamio, se observan algunas fibras largas y sin fragmentaciones, sobre ellas se aprecia adherencia de células y formación de cúmulos.

Fibroblastos

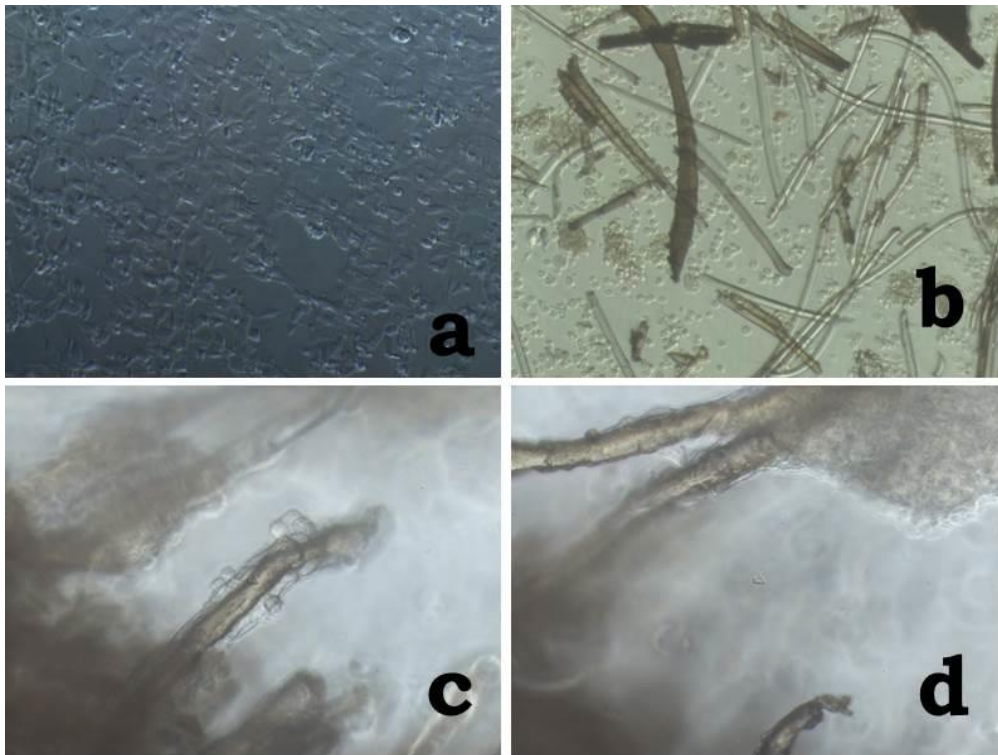


Figura 6.4.2.2. Imágenes del cultivo celular fibroblastos primarios derivados de piel humana, obtenidas con microscopio óptico. A) Medio control. b) Sobre el andamio de PPy-I/PGA y d) sobre el andamio de PPy-I/PLLA.

La Figura 6.4.2.2 muestra las imágenes obtenidas con microscopio óptico del cultivo de fibroblastos primarios derivados de piel humana. 6.4.2.2 (a) Es para el medio control donde se aprecian fibroblastos desarrollados en su forma poligonal tradicional anclados a la superficie, algunos núcleos celulares tratan de llegar a la confluencia formando una monocapa. En 6.4.2.2 (b) se muestra el cultivo sobre el andamio de PPy-I/PGA, en el fondo de la imagen se aprecia trozos de fibras del andamio y una gran cantidad de células muertas, por lo que este andamio mostró no ser apto para este cultivo de células. 6.4.2.2 (c) y (d) muestran las imágenes del cultivo sobre el andamio de PPy-I/PLLA. Ambas imágenes fueron enfocadas al extremo del andamio para tener una mejor apreciación de lo que está sobre las fibras, en estas imágenes se aprecian células que están rodeando a las fibras, todas las fibras que se muestran tienen células ancladas y vivas en su superficie, lo cual indica que este andamio es agradable para este tipo de células.

Queratinocitos

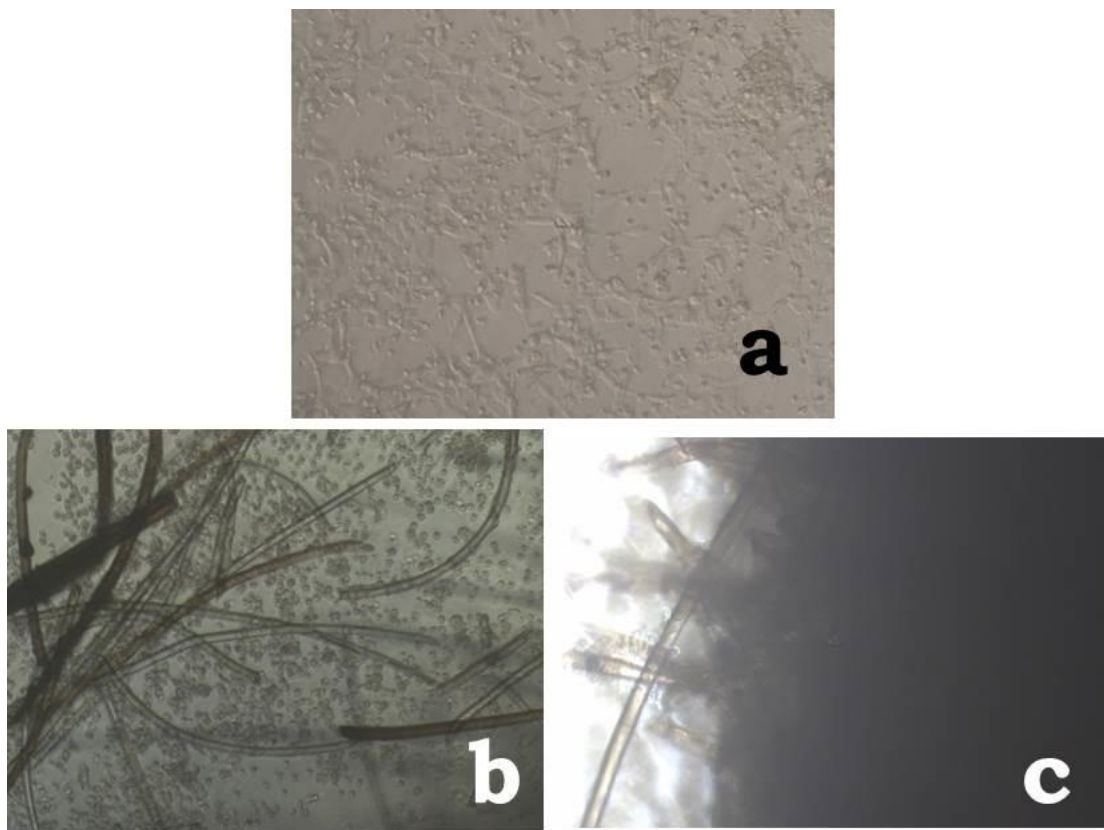


Figura. 6.4.2.3. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos primarios derivados de piel humana obtenidas con microscopio óptico. A) Medio control. b) Sobre el andamio de PPy-I/PGA y d) sobre el andamio de PPy-I/PLLA.

En la Figura 6.4.2.3 se muestra el cultivo celular de queratinocitos primarios derivados de piel humana. La Figura 6.4.2.3 (a) corresponde al cultivo en el medio control, se puede apreciar que hay una gran cantidad de queratinocitos diseminados por toda la superficie y aunque hay cúmulos de células que se están desarrollando en esta superficie también hay células muertas. La imagen en 6.2.4.3 (b) presenta el andamio de PPy-I/PGA, y se puede apreciar que en el fondo del pozo la mayoría de las células no se ancló y murieron, sobre las fibras se aprecian algunas células que ancladas sobre ellas pero muertas. La imagen 6.4.2.3 (c) corresponde al andamio de PPy-I/PLLA, la parte iluminada de la fotografía muestra una gran cantidad de queratinocitos adheridos a la superficie de las fibras, las cuales se aprecian firmes sin rasgos de degradación.

Tenocitos

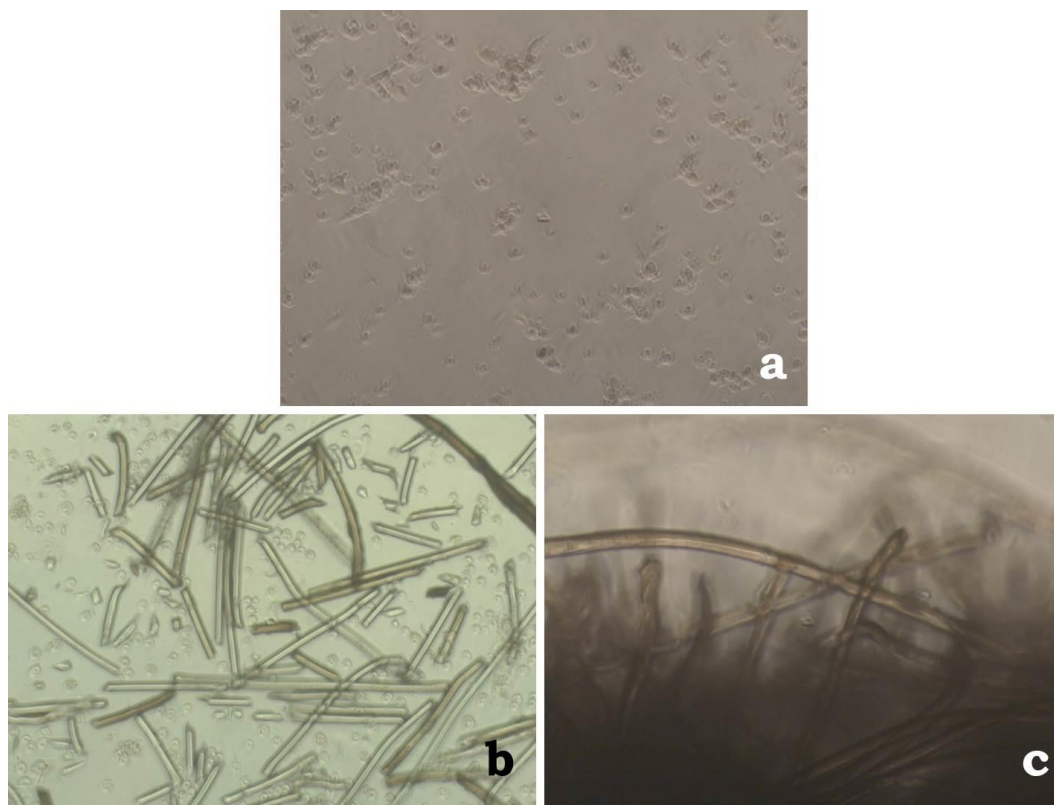


Figura. 6.4.2.4. Imágenes del cultivo celular de tenocitos primarios humanos obtenidas con microscopio óptico. a) Medio control. b) Sobre el andamio de PPy-I/PGA y d) sobre el andamio de PPy-I/PLLA.

En la Figura 6.4.2.4 se exponen las imágenes del cultivo de tenocitos, este tipo de cultivo es complicado debido a que estas células crecen sobre matrices de colágeno y su desarrollo en otros sustratos requiere de tratamientos especiales. En la Figura 7.5.4 (a) se tiene al medio control, donde se observa que los tenocitos no se desarrollaron en este sustrato

como los otros tipos celulares. Se pueden notar algunas pocas células en la superficie y algunas están muertas porque están formando ovillos, lo cual es indicativo de que no se anclaron ni proliferaron. En 6.4.2.4 (b) se aprecian fibras rotas y degradadas y como se observó, en los casos de otros tipos celulares todas están depositadas en el fondo del pozo de cultivo sin lograr anclarse a este sustrato. En la Figura 6.4.2.4 (c) se exponen las imágenes del cultivo sobre el andamio de PPy-I/PLLA, con un acercamiento a un extremo del andamio para una mejor apreciación de las fibras sólo se logra apreciar a algunas cuantas células que están ancladas sobre ellas.

6.4.3. Microscopía Confocal

Dados los resultados obtenidos en las observaciones con el microscopio óptico, el andamio de PPy-I/PGA mostro alta degradación y muerte celular para los cuatro tipos de células, las muestras de este andamio se descartaron para el estudio con microscopia confocal.

Para las observaciones en este instrumento, los complejos andamio-células para PPy-I/PLLA se mantuvieron en cultivo por nueve días. Después de este tiempo el medio de cultivo fue reemplazado por uno infectado con el adenovirus no replicante Ad-CMV-GFP durante 1 hora. Pasado este tiempo los complejos andamio-células se lavaron y el medio de cultivo se reemplazó por uno fresco, y 24 horas después los complejos fueron observados aplicando luz de 488 nm de excitación y 520 nm de emisión. Las células sanas y funcionales se infectaron con el adenovirus, el cual es fluorescente, así que todas las células infectadas se volvieron fluorescentes cuando se les excitó con luz láser.

Línea celular HEK-293

En la Figura 6.4.3.1.1 se muestran las imágenes obtenidas para el cultivo de la línea celular HEK-293. La imagen en (a) es una vista panorámica de cómo están distribuidas las células en las fibras, se aprecia una gran población de células funcionales y ancladas a las fibras. En (b) se aprecia mejor como las células están sobre las fibras del andamio y aunque se identifica un menor número de células. La imagen (c) muestra la formación de cúmulos celulares, y en (d) se enfoca de manera preferencia sólo una fibra y se ve toda iluminada indicando que las células de riñón están cubriendo totalmente a la fibra.

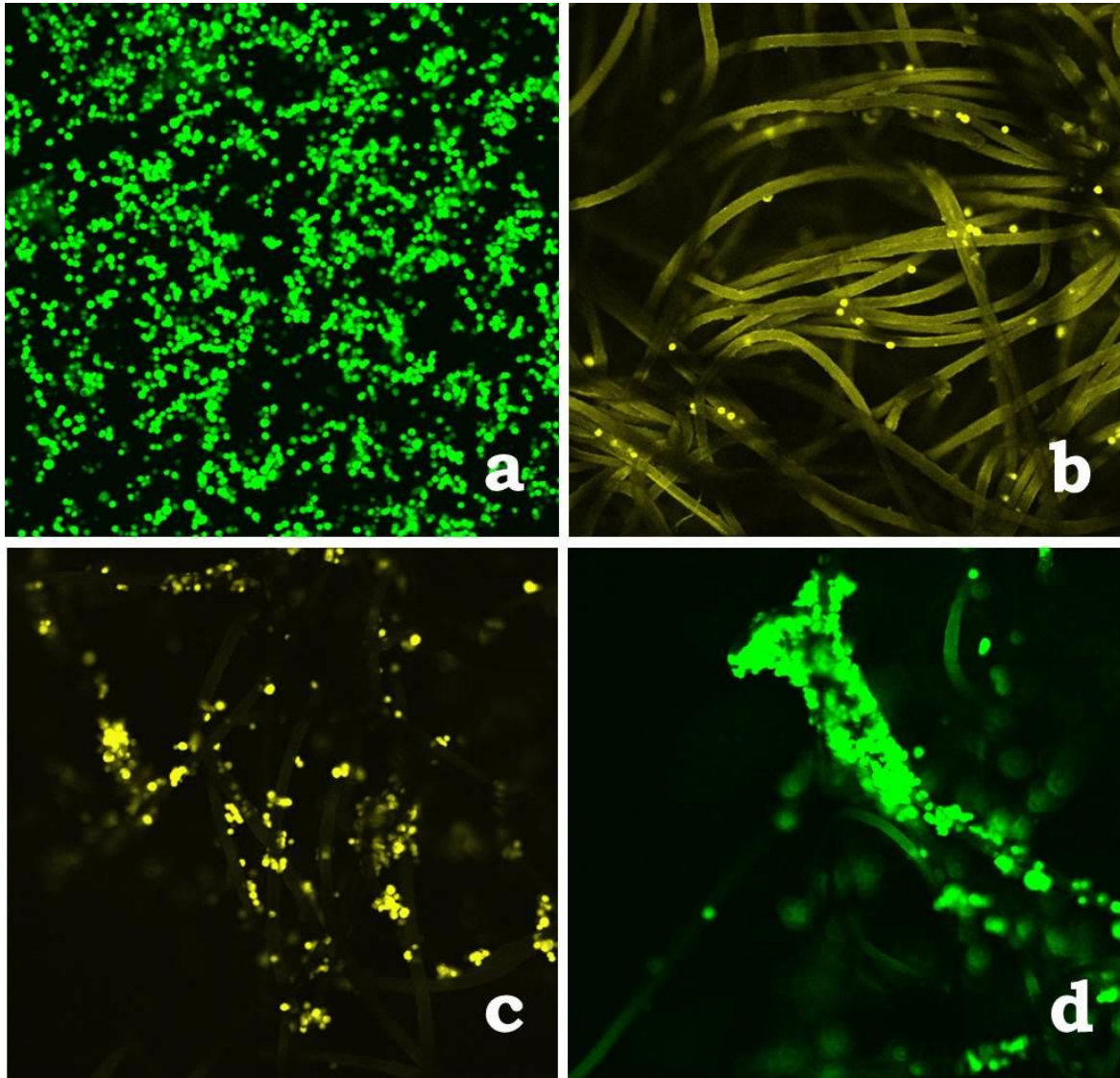


Figura 6.4.3.1. Fotomicrografía del cultivo de las células línea HEK 293 sobre el andamio de PPy-I/PLLA en filtro verde y amarillo. a) Imagen panorámica del cultivo células b) Acercamiento a las fibras del andamio mostrado el anclaje de las células sobre ella. c) Identificación de cúmulos de células muy bien ancladas sobre las fibras. d) Acercamiento a una fibra del andamio mostrado un excelente anclaje de las células sobre ella.

Fibroblastos

La Figura 6.4.3.2 muestra las imágenes obtenidas del cultivo celular de fibroblastos primarios derivados de piel humana cultivados sobre el andamio de PPy-I/PLLA. Se aprecia que los fibroblastos crecen sobre las fibras de los andamios e incluso llegan a formar colonias como se observa en las imágenes (c) y (d).

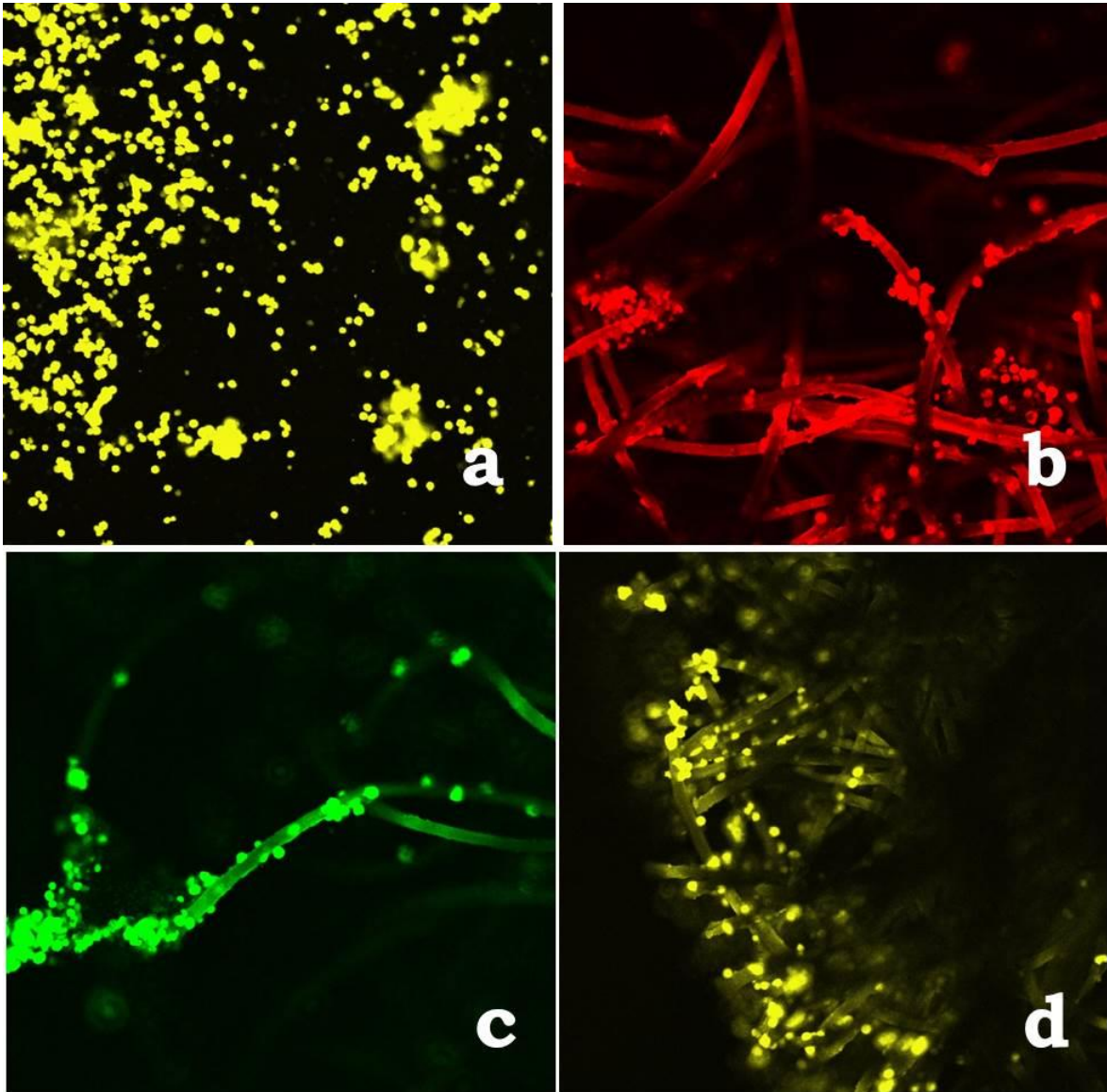


Figura 6.4.3.2 Fotomicrografía del cultivo de fibroblastos primarios humanos derivados de piel para el andamio de PPy-I/PLLA en filtros amarillo, rojo y verde. a) Vista panorámica del cultivo control. b) Fibras del andamio con células adheridas en su superficie. d) Acercamiento a un manojo de fibras con fibroblastos perfectamente anclados sobre ellas.

Queratinocitos

En la Figura 6.3.3.3 se muestran imágenes del cultivo celular de queratinocitos crecidos sobre el andamio de PPy-I/PLLA. En 6.4.3.3 (a) se aprecia una alta población de queratinocitos sobre el andamio. 6.4.3.3 (b) y (c) permiten mostrar regiones de fibras densamente pobladas de células. En 6.4.3.3 (d) se exhibe una fibra perfectamente poblada de queratinocitos. Como lo muestran estas cuatro imágenes, los

queratinocitos cubrieron por completo las fibras del andamio. Esto es un indicativo de que este sustrato es adecuado para el cultivo de queratinocitos derivados de piel humana. Hay que recordar que la piel humana está formada en un 90% de estas células por lo que si estos cultivos pudieran llevarse a escala macroscópica situaría a este trabajo en la posibilidad de cultivar una piel artificial que ayude a sanar a personas que han sufrido quemaduras graves o pérdidas de piel por accidentes o enfermedades.

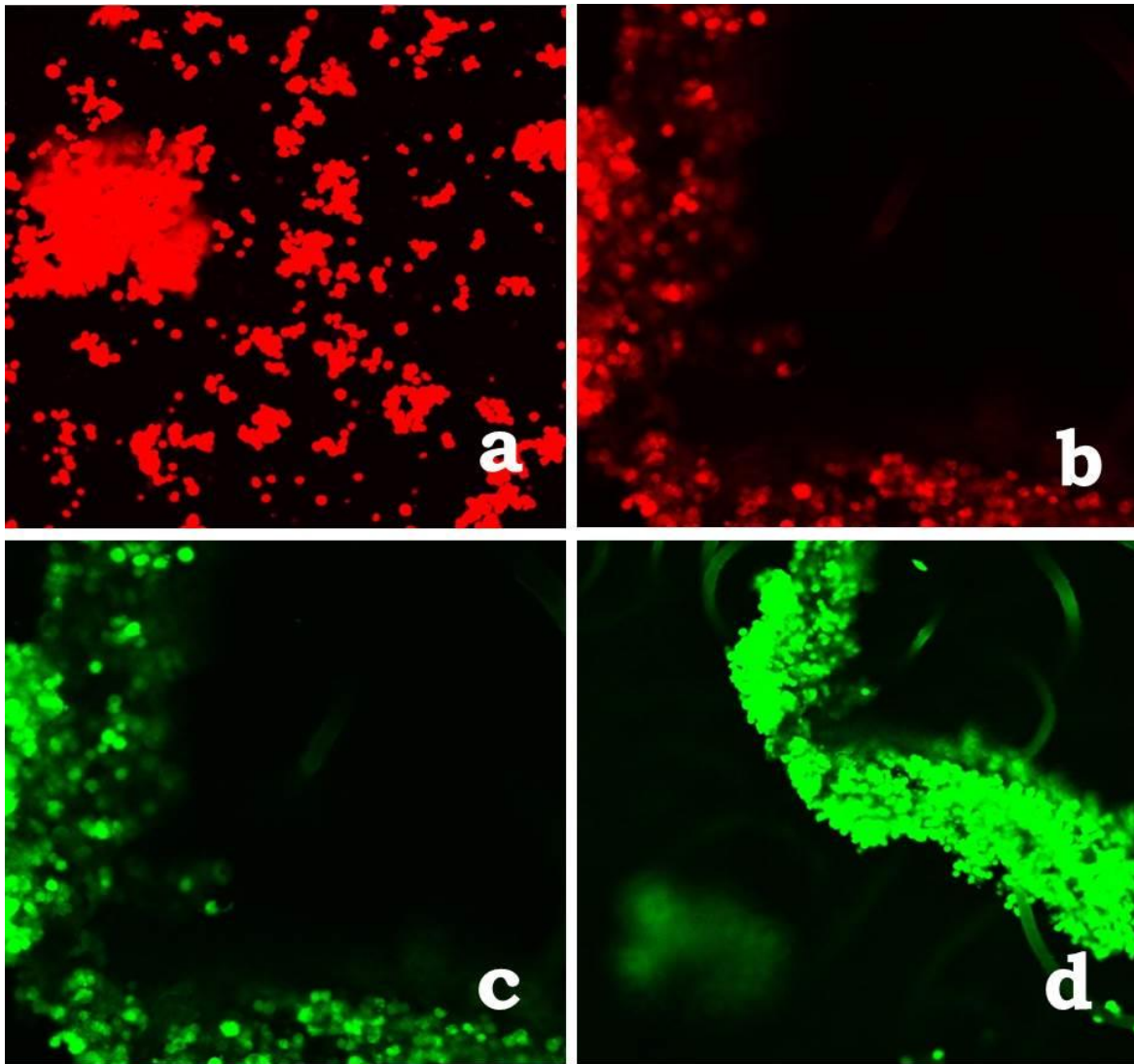


Figura 6.4.3.3. Fotomicrografía del cultivo de queratinocitos primarios derivado de piel humana en el andamio de PPy-I/PLLA en filtros rojo y verde. a) Imagen panorámica del cultivo b) y c) acercamiento a una región del andamio con alta confluencia de células. d) Enfoque preciso sobre una fibra altamente poblada por los queratinocitos.

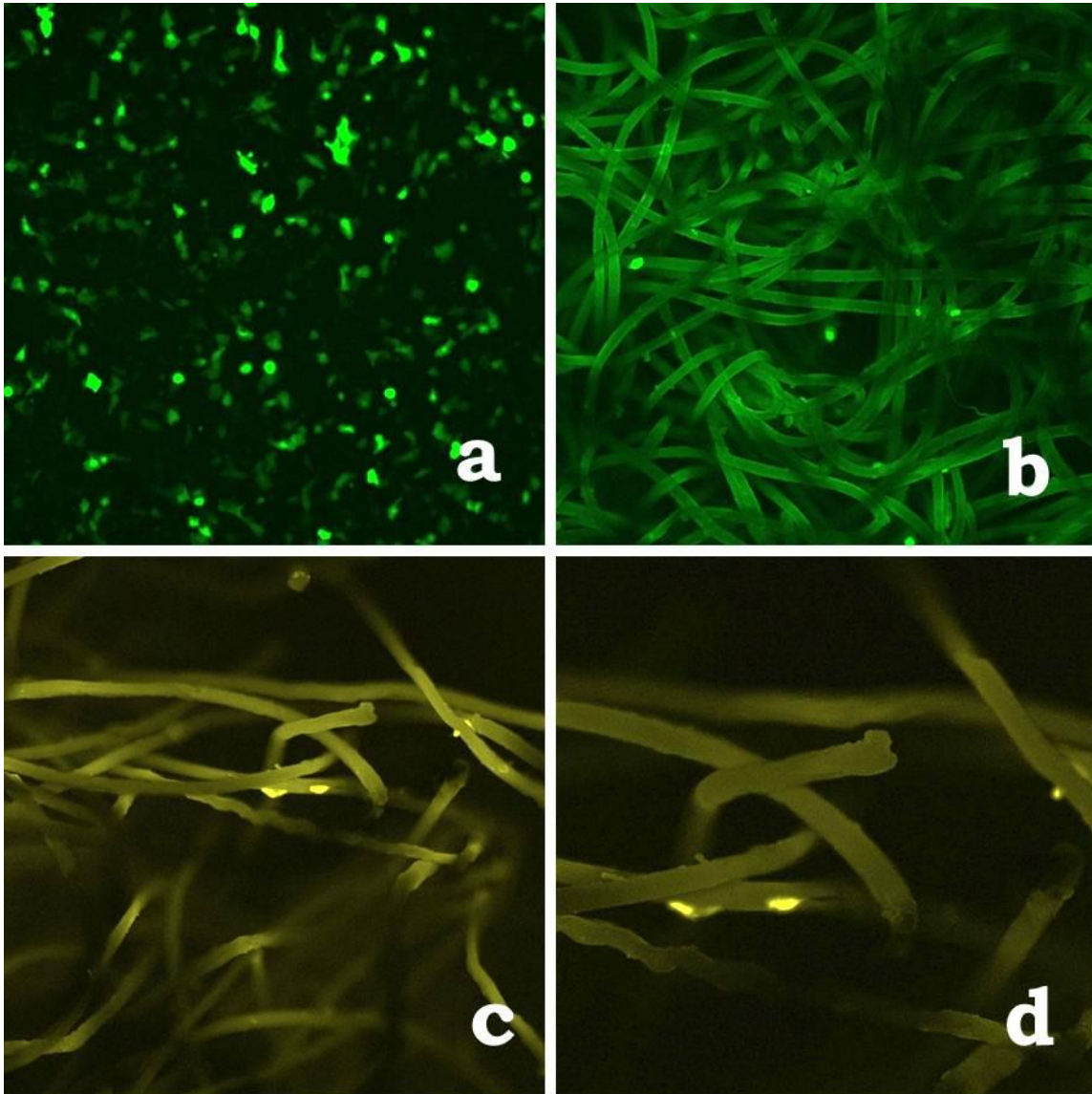
Tenocitos

Figura 6.4.3.4. Fotomicrografía del cultivo de tenocitos en el andamio de PPy-I/PLLA en filtro verde y amarillo. a) Vista panorámica del crecimiento celular sobre el andamio. b) Acercamiento a una zona de fibras en busca de células adheridas sobre ellas c) Enfoque en otro plano del andamio, se aprecia un diminuto cumulo de células de tendón. d) Acercamiento a una fibra, hay células adheridas sobre ella.

En la Figura 6.4.3.4 se muestra imágenes del cultivo celular de los tenocitos. Como se puede apreciar en las imágenes sólo hay algunas cuantas células diseminadas sobre las fibras del andamio de PPy-I/PLLA. El que los tenocitos se hayan adherido sobre este tipo de andamio es un buen indicativo de que la modificación de superficies vía plasma genera

ambientes idóneos para las células, ya que el tenocito es un tipo de célula muy difícil de cultivar en condiciones *in vitro*. Sin embargo, aunque en pocas cantidades este tipo celular crece en el andamio de PPy-I/PLLA.

7. Conclusiones y perspectivas

7.1. Conclusiones

Se utilizaron andamios de PLLA y PGA de la marca BIOFELT® y se modificó su superficie con una película delgada de PPy-I sintetizado por plasma. Dando como resultado que el andamio de PPy-I/PLLA es un excelente soporte para el crecimiento de células en particular para queratinocitos y fibroblastos derivados de piel humana.

La caracterización morfológica del andamio de PPy-I/PLLA mediante imágenes de SEM mostró que el andamio posee una porosidad adecuada para el crecimiento celular como las que tienen mayor presencia en la piel humana.

Los espectros de FT IR ATR del andamio PPy-I/PLLA mostraron la presencia de los enlaces químicos de los grupos funcionales del polipirrol sintetizado por plasma como los son las aminas de pirrol dando muestra de que estas proporcionan un ambiente apropiado para las células de la piel y de tendón.

El andamio de PGA mostró una alta velocidad de degradación, lo que provocó un aumento en la acidez del medio para el cultivo celular ocasionando muerte celular. Por lo que este andamio no resultó idóneo para los fines propuestos.

7.2. Perspectivas

Los resultados arrojados de la elaboración de este trabajo aplicando la técnica de polimerización por plasma para la modificación de superficies de andamios, contribuyen a la investigación y desarrollo de nuevos materiales biocompatibles para su aplicación en de la ingeniería de tejidos.

Un fruto que se desprende del desarrollo de este trabajo ha sido:

Obtener un andamio de PLLA cubierto de PPy-I por plasma mostrando alentadoras posibilidades para su aplicación en la generación de una piel artificial.

Queda para trabajo a futuro:

Elaborar andamios de PLA con la técnica de electrohilado y recubrirlos con una película delgada de PPy-I sintetizada por plasma, realizar la caracterización fisicoquímica mediante las técnicas de espectroscopia infrarroja FT-IR ATR, microscopia SEM, difracción de rayos X, ángulo de contacto, porosidad y pruebas mecánicas de elasticidad y compresibilidad, así como de la velocidad de degradación.

Hacer un análisis de la caracterización biológica de los andamios recubierto solo con PPy y andamios recubiertos con PPy-I (polipirrol dopado *in situ* con yodo) y ver las respuestas en medios biológicos.

Bibliografía

1. Tortora G. J., Grabowski S. R., Principios de Anatomía y Fisiología, Oxford University Press, 11va. Edición, 2002, México, p.p. 143-159.
2. Gunther von Hagens/ Body Worlds, la exhibición original, guía de estudio, diciembre 2014.
3. Wolff K., Goldsmith L.A., Katz S.I., Gilchrest B.A., Paller A.S., Leffell D.J., *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 7th edition, McGrawHill Medical, 2008, E.E.U.U., p.p. 57-73.
4. Dienhart Ch. M., Anatomía y Fisiología Humanas, Nueva Editorial Interamericana, 1981, México.
5. Arenas R., Atlas Dermatología Diagnóstico y tratamiento, 3ra Ed. McGraw Hill, 2005, México., p.p.1-8.
6. Cordón Llera F., Atención al paciente quemado, Graficas la paz de Torre Don Jimeno S. L., 2007, México., p.p. 25-27.
7. Cordero A. A., Biología de la piel, estructuras y funciones, Editorial médica panamericana, 1996, Argentina, p.p. 5-56.
8. Manzur J., Díaz Almeida J., Cortés M., Dermatología, Editorial Ciencias Médicas, 2002, Cuba, p.p. 1-7.
9. www.keywordsuggest.org/gallery/406679.html
10. www.notodoloquerelucees.blogspot.mx/2015/09/la-piel-dermis.html
11. Lorente J.A., Esteban A., Cuidados intensivos del paciente quemado, 1ra Edición, Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 1998, p.p. 36-45.
12. www.highlands.edu/academics/divisions/scipe/biology/faculty/harnden/2121/notes/tissues.html
13. Ramos López C., Gan Acosta A., Díaz R. Jorge L., Piel Artificial, Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada, Vol. 2, No. 8, 2006, 41-47.
14. Álvarez Longoria J. A., Flores Ochoa M., Hernández García R. I., Martínez Menchaca H. R., Escamillas Ocañas C., Rivera Silva E., Una segunda piel, tratamientos con sustitutos cutáneos, Revista Médica MD, No. 1, 2012, 37-41.

15. Arenas Gómez, C. M., Merizalde Soto G. J., Restrepo Múnera L. Ma., Sustitutos cutáneos desarrollados por ingeniería de tejidos, *Iatreia*, 25 (1), 2012, 42-53.
16. Velásquez Puerta D.A., Pineda Molina C., Cardona Cano Ma. E., Gómez Suarez N. E., Gartz Moises G.J. Úsuga Gómez I. C. Trocha Wilchez D. F., Londoño Peláez C., Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño, *Revista Ingeniera Biomédica*, 2, 2008, 77-83.
17. 17. Cordón Llera F., Atención al paciente quemado, *Graficas la paz de Torre Don Jimeno S. L.* 2007, México., p.p. 163-185.
18. 18. Fisher John P., Mikos Antonios G., Bronzino Joseph D., *Tissue Engineering*, CRC Press Taylor&Francis Group, 2007, U.S.A. 18.1 – 18.17.
19. 19. Brahatheeswaran Dhandayuthapani, Yasuhiko Yoshida, Toru Maekawa y D. Sakthi Kumar., *Polymeric Scaffolds in tissue Engineering Application: A Review*, *International Journal of Polymer Science*, Vol. 2011, Article 290602, doi:10.1155/2011/290602.
20. 20. Sastré R., De Aza S., San Román J., *Biomateriales*, Fenza Editrice Ibérica, España 2014.
21. 21. Rodríguez-García R., Gavilanes Franco J.G., Gavilanes Franco Rodríguez R., *Nuevas tecnologías en biomédica*, Ed. Síntesis, España 1998.
22. [22]. Vallet-Regí Ma., *Bioceramics: evolución y aplicaciones*, *Revista Anales de Química*, 2011, 107(1), 28-35.
23. Argibay P., *Medicina Regenerativa y stem cells: de la terapia celular a la ingeniería de tejidos*, Universidad Nacional de Quilmes Editorial, Buenos Aires, 2005, p.p. 141-174.
24. Middleton John C., Tipton Artur J., *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*, *Biomaterials* 21(2000), 2335-2346.
25. Semena Agarwal, Joachim H. Wendorff, Andreas Greiner, *Use of electrospinning techniques for biomedical applications*, *Polymers* 49(2008), 5603-5621.
26. www.es.wikipedia.org/wiki/Electrospinning

27. Duque Sánchez Lina Marcela, Rodríguez Leonardo, López Marcos, Electrospinning: la era de las nanofibras, Revista Iberoamericana de Polímeros, 14(1), 2014, 10-17.
28. Lucy Di Silvo, Cellular Response to Biomaterials, Woodhead Publishing; Boca Raton: CRC Press, Cambridge, England, 2009, p.p. 1-27.
29. Wojasiński M., Faliszewski K., Ciach T., Electrospinning Production of PLLA fibrous Scaffolds for tissue Engineering, Challenges of Modern Technology, 2004, Vol. 4, no.1, (2013), 9-15.
30. Ferencz S. Denes, Sorin Manolache, "Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science", Prog. Polym. Sci., 29(8):815-885.
31. Sainz Garcia Alicia, "Estudio de procesos de plasma-polimerización de recubrimientos antifricción sobre materiales plásticos", Universidad de la Rioja, España 2012.
32. Vásquez Ortega Miguelina, "Síntesis por plasma y caracterización de compuestos derivados del poliacetileno", ESQUIE-IPN, México 2004.
33. Gordillo Vázquez Francisco José, "Plasmas fríos", Investigación y Ciencia, número de junio, (70)2008.
34. Bravo Silvia, "Plasma en todas partes", La ciencia para todos FCE, núm. 126, México 1994.
35. www.es.wikipedia.org/wiki/Rayo
36. www.weather.com/es-ES/espana/ciencia/news/2018-08-24-rayo_durmiente_incendio_llutxent
37. www.en.wikipedia.org/wiki/Astrophysical_plasma
38. Pachecho Sotelo Joel O., "El plasma", Contacto Nuclear, 2002, (28):3-6.
39. Yasuda H., "Plasma Polymerization", Academic Press, Orlando (1985).
40. Vicuña Hernández Verónica, "Análisis espectroscópico y caracterización de un plasma de resplandor", F.C. UNAM, México 2008.
41. Morales Corona Juan, "Polimerización por plasma: Tratamiento Superficial y Simulación del Plasma", UAM-Iztapalapa, México, 2001.
42. Chang R., College W. Química General, McGraw-Hill, 7a. Ed., Colombia 2002.

43. Brown T.L., LeMay H. E., Bursten B.E., Burdge J. H., "Química la ciencia central" Pearson Educación, 9ª, Ed., México, 2004.
44. www.es.wikipedia.org/wiki/Polimerización
45. tecnologiadelosplasticos.blogspot.mx/2012/07/polietileno-pe.html
46. Losadesivos.com
47. Fridmann A. "Plasma Chemistry", Cambridge University Press, U.S.A. 2008.
48. www.eis.uva.es/~macromol/curso04-05/polimeros_cond/
49. Alvarez Builla J., Modern Heterocyclic Chemistry, Wiley-VCH Verlag, Weinheim. Germany, 2011, p.p. 274, 336.
50. www.wikipedia.org/wiki/Pyrrole
51. Walsh Christopher T., Garneau-Tsodikova S., Howard-Jones A., Biological Formation of Pyrroles: Nature's Logic and Enzymatic Machinery, The Royal Society of Chemistry, 23, 2006: 517-531.
52. Schimdt Christine E., Venkatram R. Shastri, Vacant P. Joseph, Langer Robert, Stimulation of Neurite Outgrowth Using an Electrically Conducting Polymer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, (94): 8948-8953.
53. Olayo R., Ríos C. Salgado-Ceballos H., Cruz J.G., Morales J., Olayo M.G., Alcaraz-Zubeldia M., Alvarez A.L., Mondragon R., Morales A., Diaz-Ruiz A., Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma, J. Mater Sci: Mater Med. (2008) 19:817-826.
54. Colin E., Olayo M.G., Cruz J.G., Carapia L., Morales J., Olayo R., Affinity of amine-functionalized plasma polymers with ionic solutions similar to those in the human body, Progress in Organic Coatings 64(2009) 322-326.
55. Cruz J.G., Mondragon-Lozano R., Diaz-Ruiz A., Manjarrez J., Olayo R., Salgado-Ceballos H., Olayo Ma. G., Morales J., Alvarez-Mejia L., Morales A., Mendea-Armenra M., Plasencia N., Fernandez Ma. Del C., Ríos C., Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection, J. Mater Sci: Mater Med (2012) 23:2583-2592.
56. Colin Orozco Elena, Síntesis de Polímeros Biocompatibles por Plasma,

- Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco, México 2007.
57. Zuñiga Aguilar Esmeralda, Desarrollo y caracterización de un modelo de unión neuromuscular, empleando técnicas de co cultivos celulares, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México 2009.
 58. Flores Sánchez Ma. Guadalupe, Fabricación y caracterización biológica de matrices compuestas de ácido polilactico-hidroxiapatita cubierta con polipirrol para su uso como andamios en tejido óseo, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México 2012.
 59. Uribe Juárez Omar Eduardo, Interacción de nanopartículas polipirrol sintetizadas por plasma con líneas celulares para aplicaciones biomédicas, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, 2016.
 60. Theophanides Theophile, Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology, INTECH, 2012: 1-10.
 61. Theophanides Theophile, "Infrared Spectroscopy Materials-Science, Engineering and Technology", INTECH 2012: 233-244.
 62. Morales J., Olayo M.G., Cruz J.G., Olayo R., Plasma polymerization of random polyaniline-polypyrrole-iodine copolymers, Journal of Applied Polymers Science, Vol.85, 2002:263-270.
 63. Zuñiga-Aguilar E., Godínez R., Ramírez-Fernández O., Morales J., Olayo R., Development of a neuromuscular junction on model on surfaces modified by plasma polymerization, Revista mexicana de ingeniería biomédica, Vol.4(3), 2013: 217-226.
 64. Zuñiga-Aguilar E., Olayo R., Ramírez-Fernández O., Morales J. & Godínez R., nerve Cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization, Journal of Biomedical Science, Polymer Edition, 2014: 1-19.
 65. Ruiz-Velasco G., Martínez-Flores F., Morales-Corona J., Olayo-González R., Polymeric Scaffolds for Skin, Sociedad Polimerica de México, Advances in Polymer Science, MACROMEX 2014, XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Polimerica de México, Nuevo Vallarta, México, 2014:43-47, ISSN: 2448- 627.
 66. Leonardo Sanchez Saldaña, Eliana Sáenz Anduaga, Antisépticos y desinfectantes, Dermatología peruana, 2005, Vol. 15(2):82-103.

67. Thews Gerhard, Mutshler Ernest, Vaupel Peter, Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre, Manual para farmacéuticos y biólogos, Ed. Reverté, 1983, p.p. 739-740.
68. Mathew N. Nicholas, BMSc, Marc G. Jeschke, Cellularized Bilayer Pullulan-Gelatin Hydrogel for Skin Regeneration, Tissue Engineering Part. A, Vol.2 (9), 2016: 754-764.

Seyed Babak Mahjour, Xiaoling Fu, Xiaochuan Yang, Jason Fong, Farshid Sefat, Hongjun Wang, Rapid creation of skin substitutes from human skin cells and biomimetic nanofibers for acute full-thickness wound repair, Burns. 2015; 41(8): 1764-1774.
69. <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/queratinocito.php>
70. <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/queratinocito.php>
71. <http://www.nanomedicine.com/NMI.htm>

Anexos

Productividad del trabajo

Artículos publicados

Graciela Ruíz-Velasco, Francisco Martínez-Flores, Juan Morales-Corona, Roberto Olayo-Valles, Roberto Olayo. *Polymeric Scaffolds for Skin*, (2017) Macromolecular Symposia, 374(1):1-4.

Ruiz-Velasco G., Martínez-Flores F., Morales-Corona J., Olayo R., *Andamios poliméricos para la generación de una piel artificial*, Tópicos especiales en física, encuentro de estudiantes de posgrado, 1, 1, 97-104, 2016.

Trabajos en congresos

Polymeric Scaffolds for Skin., Ruiz Velasco G., Martínez-Flores F., Morales-Corona J., R. Olayo-González., XXVII Congreso de la Sociedad Polimérica de México and 3rd US-Mexico Symposium on Advances in Polymer Science. Nuevo Vallarta, Nayarit México., Diciembre de 2014. Memorias pág. 43.

Andamios electrohilados de PGA y PLLA recubiertos de PPy-I para cultivo de células de piel., Ruiz-Velasco G., Martínez-Flores F., Morales-Corona J., R. Olayo., XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México., Coatzacoalcos, Veracruz. Noviembre de 2013.

Andamios electrohilados de PGA y PLLA recubiertos de PPy-I para cultivo de células de piel., Ruiz-Velasco G., Martínez-Flores F., Morales-Corona J., R. Olayo., XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México., Coatzacoalcos, Veracruz. Noviembre de 2013. Memorias pág. 49.

Andamios electrohilados de PGA y PLLA recubiertos de PPy-I sintetizados por plasma para la generación de una piel artificial., Ruiz-Velasco G., Martínez -Flores F., Morales-Corona J., R. Olayo., V Leopoldo García-Colín Mexican Meeting on Mathematical and Experimental Physics. Segundo Encuentro de Estudiantes de Posgrado, El Colegio Nacional, México D.F. Septiembre de 2013.

Polymeric Scaffolds for Skin, VII international Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, Puebla, Puebla, México, September 21-25, 2015.

Polymeric Scaffolds for Skin. 3rd US-Mexico Symposium on Advances in Polymers Science, Nuevo Vallarta, México, December 3-6, 2014.

Seminarios

Caracterización de andamios de PGA y PLLA modificados superficialmente con plasma de PPy-I para el diseño de un soporte dérmico, Seminario de Polímeros, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, 21 de Junio de 2017.

Desarrollo de un andamio polimérico para la generación de una piel artificial. Seminario de Polímeros, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, CDMX, 4 de Junio de 2014.

Andamios electrohilados de PGA y PLLA recubiertos de PPy-I para cultivo de células de piel., Seminario del Posgrado en Física, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, CDMX, 29 de Octubre de 2013.

Andamios electrohilados de PLLA y PGA recubiertos de PPy-I con aplicaciones al cultivo de células de piel., Seminario de Polímeros, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, CDMX, 23 de Octubre de 2013.