

ANDAMIO DE POLI(ε-CAPROLACTONA)-COLÁGENO/TGF-β3

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo general de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, particularmente a un andamio de poli ε-caprolactona (PCL) y colágeno (COL) que comprende factor de crecimiento transformante (TGF-β3), con actividad en la regeneración o reparación de tejido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La ingeniería de tejidos es una ciencia que se ha descrito como una estrategia para diseñar y fabricar tejidos vivos utilizando biomateriales, involucrando la combinación de células, moléculas bioactivas y biomateriales que proporcionan soporte estructural y suministro de agentes biológicos, para el diseño y desarrollo de estructuras biológicas funcionales adecuadas para la sustitución, reparación o regeneración de tejidos u órganos dañados así como la renovación de partes perdidas debido a enfermedades, cáncer y trauma (C. Rovera et al. Mechanical behavior of biopolymer composite coatings on plastic films by depth-sensing indentation—A nanoscale study, *Journal of colloid and interface science*, **512**, 638-646 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.108>).

Las terapias convencionales para regeneración de tejido que se basan en autoinjertos y/o aloinjertos para cubrir el área afectada y lograr reducir los procesos de cicatrización, presentan limitaciones que por mencionar algunas, se centran en la falta de tejido disponible para suplir la demanda actual de pacientes que lo necesitan, el tratamiento a base de inmunosupresores que ponen en riesgo la vida de los pacientes, riesgo de infección, rechazo inmune y aparición de defectos cosméticos y funcionales (F. J. O'brien. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, **14**, 88-95 (2011). [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X), J. W. Su et al. Closure of a large

tracheoesophageal fistula using AlloDerm, *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, **135**, 706-707 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.11.014>).

Terapias celulares

Como alternativa al uso de injertos, se desarrolla la terapia celular que se centra en la reparación de tejidos lesionados y consiste en el trasplante de células individuales a un tejido receptor en cantidades suficientes para que sobrevivan y restauren la función del tejido (V. F. Segers et al. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*, **451**, 937 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature06800>). Dentro de los linajes específicos y células multipotentes que se usan se encuentran las células madre epidérmicas caracterizadas porque pueden regenerar epidermis, glándulas sebáceas y ocho tipos diferentes de células epiteliales del folículo piloso. Dado que las células madre epidérmicas tienen el potencial de regenerar la piel, varios ensayos clínicos se han centrado en ellas para ofrecer una opción de tratamiento alternativa en las lesiones importantes de la piel, como resultado de quemaduras extensas, infección o trauma.

Adicionalmente los queratinocitos humanos cultivados se pueden diferenciar y formar una barrera cutánea funcional que se puede trasplantar en pacientes que sufren lesiones graves por quemaduras. Actualmente, representan los productos celulares más utilizados en el mundo, por ejemplo, en el mercado farmacéutico se han desarrollado varios tipos de productos celulares destinados a la reparación de la piel en forma de queratinocitos autólogos o alogénicos confluentes o preconfluentes, con aplicaciones no solo para el tratamiento de quemaduras graves, sino también para casos de úlceras venosas o diabéticas.

Por otro lado, las células condrogénicas o condrocitos, son las únicas células presentes en el cartílago articular, son las responsables de sintetizar todos los componentes de la matriz articular y tienen capacidad de deformación adaptativa en respuesta a fuerzas mecánicas. Se usan para el tratamiento eficaz de lesiones de cartílago circunscritas (osteocondritis disecantes, condropatía rotuliana, condromalacia del tobillo, lesiones osteocondrales).

De otro modo las células estromales mesenquimales (CEM) son células multipotentes primitivas, con morfología fibroblastoide, originadas a partir de la capa germinal mesodermal, que tienen la capacidad de diferenciarse en osteocitos, condrocitos, adipocitos tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas células tienen propiedades inmunosupresoras y a través de la señalización paracrina favorecen los procesos de angiogénesis y reparación celular. Además, el que puedan diferenciarse a cartílago, hueso o grasa, hace posible su uso en el tratamiento de enfermedades o lesiones que afecten estos tejidos.

Las células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW) en particular estimulan a otras células para que comiencen a crear una gran variedad de procesos tales como formación de tejido nuevo, cicatrización, reparación de tejidos, curación de huesos, piel y ligamentos

A pesar de que las CEM-GW presentan innumerables características que las catalogan como una estrategia terapéutica posible, su aplicación también ha presentado limitaciones. Particularmente, las células que se trasplantan mediante inyección o infusión son poco retenidas en el sitio trasplantado, generando una tasa de injerto muy baja y por tanto reduciendo la eficacia del tratamiento (Y. Tabata. Biomaterial technology for tissue engineering applications, *Journal of the Royal Society interface*, **6**, S311-S324 (2009). <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0448.focus>, W. M. Saltzman et al. Building drug delivery into tissue engineering design, *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**, 177 (2002). <https://doi.org/10.1038/nrd744>, H. Naderi et al. Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems, *Journal of biomaterials applications*, **26**, 383-417 (2011). <https://doi.org/10.1177/0885328211408946>).

Se han estudiado entonces estrategias que favorezcan la retención de las CEM en el sitio, como por ejemplo el uso de coágulos de fibrina o soportes de colágeno. Adicionalmente, una vez se consigue la estabilidad de las células, resulta esencial garantizar la proliferación

y los perfiles de secreción de las CEM-GW lo cual puede lograrse manteniendo la viabilidad de las células e induciendo la producción de diversos factores.

Andamios como sustitutos dérmicos

Los andamios diseñados con el propósito de ser utilizados en regeneración o reparación de tejido, en particular como sustitutos dérmicos ideales deben tener las siguientes características (A.-T. N. Truong et al. Comparison of dermal substitutes in wound healing utilizing a nude mouse model, *Journal of burns and wounds*, **4** (2005), D. W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, **21**, 2529-2543, (2000), S. MacNeil, Biomaterials for tissue engineering of skin, *Materials Today*, **11**, 26-35, (2008), A. C. Colorado et al. Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión, *Revista Ingeniería Biomédica*, **7**, 11-23 (2013)):

- Estructuras tridimensionales y altamente porosas con una red de poros interconectados para el crecimiento celular y el transporte de nutrientes y residuos metabólicos de flujo;
- biocompatible y biorreabsorbible con una velocidad de degradación y reabsorción controlable para adaptarse al crecimiento de células/tejidos *in vitro* y/o *in vivo*;
- una química superficial adecuada para la unión celular, la proliferación y la diferenciación;
- propiedades mecánicas para coincidir con las de los tejidos en el sitio de implantación.

Factor de crecimiento transformante (TGF- β 3)

La familia de isoformas TGF- β 1, 2 y 3 desempeña una serie de roles cruciales en la reparación y regeneración de heridas dérmicas, que incluyen la regulación de la proliferación celular, la diferenciación, la migración, la invasión y la quimiotaxis de los compartimientos de tejido epitelial, fibroblástico, así como la proliferación, migración e invasión de células

endoteliales y la mediación en la formación de nuevos vasos sanguíneos (M. Valluru et al. Transforming growth factor- β and endoglin signaling orchestrate wound healing, *Frontiers in physiology*, 2, 89, (2011). <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00089>).

Las isoformas TGF- β están presentes en las tres etapas clásicas de la reparación de heridas dérmicas. En la etapa inflamatoria los TGF- β participan como potentes quimioatrayentes y mediadores de la inflamación para varios tipos de células inmunitarias, incluidos los neutrófilos y otras células polimorfonucleares. En la etapa de migración las tres isoformas de TGF- β promueven la reepitelización, estimulando la síntesis de matriz extracelular y promoviendo el reclutamiento de fibroblastos adyacentes a la herida, en esta etapa el TGF- β 1 promueve la migración de queratinocitos. Por último, en la etapa de remodelación el TGF- β 1 induce a la contractura de la herida, síntesis de colágeno I y III mientras que el TGF- β 3 regula esta producción para minimizar la formación de cicatrices (R. Gilbert et al. Signalling by transforming growth factor beta isoforms in wound healing and tissue regeneration, *Journal of developmental biology*, 4, 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/jdb4020021>).

El factor de crecimiento transformante (TGF- β 3) se une a las proteínas receptoras en la superficie de las células epiteliales y endoteliales, principalmente, en donde dicha unión desencadena la transmisión de señales dentro de la célula, controlando diversas actividades celulares, como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la motilidad y la muerte celular controlada. La proteína también participa en la formación de vasos sanguíneos, regulación del crecimiento óseo, cicatrización de heridas y función del sistema inmunológico.

El TGF- β 3 actúa a su vez, como un factor de transducción, los procesos de transducción de señales permiten a las células responder a las influencias del medio que les rodea. Así las células modulan todas sus funciones, desde las más generales hasta otras funciones como la secreción de factores, razón por la cual se atribuye a la presencia del TGF- β 3 el marcado aumento de TGF- β 2 en los andamios donde permanece este factor encapsulado.

Se han descrito diversos desarrollos para curación de heridas y regeneración de tejidos, relacionados con constructos a base de polímeros naturales o sintéticos, con o sin incorporación de células.

Por ejemplo, la patente [US9655995B2](#) divulga un andamio tridimensional de nanofibras y métodos para usar dichos andamios en reparación de tejido dañado, particularmente tejido cardíaco. Dicho andamio de nanofibras está compuesto por un polímero biodegradable como policaprolactona o poli (ϵ -caprolactona), el cual se electrohila para crear una estera de nanofibras que posteriormente se divide en tiras dispuestas en una o más capas que se tejen en una configuración de cestería mediante la técnica de noobing, es decir, en donde al menos dos de las capas de nanofibras se apilan ortogonalmente entre sí e imitan la estructura del tejido nativo.

Sobre dicho andamio se siembran una o más células relevantes que se seleccionan de células madre adultas, embrionarias, pluripotenciales o primarias, las cuales se adhieren, proliferan y organizan imitando las propiedades estructurales y mecánicas de un tejido, particularmente cardíaco.

La patente [US10034737B2](#) se refiere a un biomaterial para usarse como implante, que comprende un andamio nanofibroso hecho de polímeros tales como poli (ϵ -caprolactona) preferiblemente electrohilada o colágeno, recubierto con un par de gotas multicapa de polianiones y policationes que incorporan una molécula terapéutica, por ejemplo, factor de crecimiento transformante; permitiendo la liberación sostenida de dicha molécula en el sitio de implantación del biomaterial y opcionalmente, células vivas tales como osteoblastos, condrocitos, células madre mesenquimales, entre otras, que se encuentran dentro de un hidrogel de alginato o colágeno y se depositan sobre el andamio nanofibroso recubierto.

Otros autores, por ejemplo, Ghosal et al (Ghosal et al. 2016. Structural and surface compatibility study of modified electrospun poly(ϵ -caprolactone) (PCL) composites for skin tissue engineering. *AAPS PharmSciTech* **18**, 72-81 (2017). <https://doi.org/10.1208/s12249->

016-0500-8) han abordado la compatibilidad estructural y superficial de compuestos modificados de poli (ϵ -caprolactona) para la ingeniería de tejidos de piel. En este estudio se desarrollan nanofibras biodegradables de PCL recubiertas de colágeno o dióxido de titanio preparadas mediante la técnica de electrohilado.

Adicionalmente, Lizarazo et al (Lizarazo et al. 2019. Andamios eletrohilados de poli(ϵ -caprolactona)/colágeno con uso potencial en regeneración de tejido cutáneo. Ciencia en Desarrollo;10(2):197-208), analiza andamios electrohilados de poli(ϵ -caprolactona)/colágeno con uso potencial en regeneración de tejido cutáneo, en donde se desarrollaron constructos a partir de la mezcla de policaprolactona (PCL) y colágeno tipo I, cuyo objetivo fue la evaluación de la influencia del colágeno en las fibras de PCL. Para tal fin, se emplearon formulaciones de PCL/COL para la obtención de una matriz polimérica de andamiaje para la evaluación de su capacidad para permitir la adherencia de células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW). El artículo concluye que la adición de colágeno favorece los procesos de adhesión de las (CEM-GW), y que es posible obtener un andamio con propiedades adecuadas de soporte celular como candidato para tratamiento de heridas dérmicas.

Sin embargo, a pesar de la investigación y desarrollo en el campo, la pérdida de tejido, ya sea debido a determinadas patologías o debido a diferentes traumas, provocados por accidentes, continúa motivando el desarrollo de terapias en el área de la ingeniería de tejidos a través de las que se pueda restaurar y/o regenerar el tejido dañado reduciendo en gran medida el uso de autoinjertos, los problemas con la respuesta inmune de los aloinjertos, el favorecimiento de la efectividad de la terapia celular y la contribución a la aceleración de los procesos de cicatrización.

Por lo tanto, aún persiste la necesidad de productos desarrollados a partir de biomateriales adecuados que proporcionen a las células un soporte con integridad estructural y suministro de agentes biológicos, que favorezcan un microambiente específico del tejido para reemplazar un tejido dañado, induzcan la regeneración y restauración de la funcionalidad

apropiada del tejido celular, y regulen las funciones celulares y aceleren los procesos de cicatrización.

Por lo anterior, garantizar una terapia ideal para la cicatrización de heridas mediante un producto que promueva una curación rápida, que presente una elevada porosidad para lograr la correcta vascularización, que sea bio-activo y que contribuya a una formación mínima de cicatrices sin importar la causa de la pérdida del tejido, aun representa un desafío.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un andamio de poli(ϵ -caprolactona)-colágeno (PCL/COL) que comprende cápsulas de factor de crecimiento transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) con el fin de imitar la matriz extracelular de la piel, de alta importancia en la reepitelización cutánea y su método de elaboración por medio de la técnica de electrohilado. El andamio de la presente invención permite crear un microambiente propicio para la adhesión y proliferación de células, particularmente células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton como estrategia terapéutica en la regeneración de tejido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1A Estructura del andamio y la configuración por capas que comprende la encapsulación del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta 3$).

FIG. 1B Estructura del andamio y la configuración por capas que comprende la encapsulación del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta 3$) y adicionalmente una capa exterior de células.

FIG. 2 Microscopía electrónica de barrido para evaluación de la morfología de la membrana electrohilada de PCL. Se evidencian fibras obtenidas con el polímero precursor (PCL) que presentó un diámetro de fibra promedio de $1,12 \mu\text{m} \pm 0,15 \mu\text{m}$.

FIG. 3A-H Microscopía electrónica de barrido para evaluación de la morfología de las membranas PCL/COL1-8, respectivamente. Se evidencian estructuras fibrosas de tamaño sub-micrométrico orientadas al azar. El aumento en las fuerzas de alargamiento y la mayor inestabilidad de flexión dieron como resultado fibras de menor diámetro respecto a la membrana de PCL, debido a la presencia de la proteína colágeno caracterizada por estar cargada positivamente.

FIG. 4 Liberación del factor de crecimiento transformante $\beta 3$ vs tiempo. Cápsulas sobre el andamio (PCAT) y cápsulas en suspensión (Cápsulas +TGF- $\beta 3$). El TGF- $\beta 3$ (PCAT) tuvo una duración en su liberación de 8 días, en comparación con las cápsulas en suspensión que mostraron una liberación del factor en 5 días.

FIG. 5 Análisis de proliferación celular de las células CEM-GW en los andamios de PC, PCA, PCAT, después de un periodo de incubación de 1, 3, 5 y 7 días de cultivo. Los asteriscos denotan la diferencia estadísticamente significativa a $p < 0,05$ entre las diferentes formulaciones de los andamios con un nivel de significancia de 0,009 para un análisis de varianza de dos vías.

FIG. 6A-C Gráficas de los perfiles de secreción de los factores de crecimiento transformante β por CEM-GW cultivadas sobre los andamios PC, PCA, PCAT. Se muestra la producción de TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ y TGF- $\beta 3$, respectivamente por las CEM-GW cultivadas sobre los andamios, evidenciando que los perfiles de secreción de la isoforma de TGF- $\beta 2$ varían sustancialmente en la presencia de TGF- $\beta 3$.

FIG. 7A-E Gráficas de los perfiles de secreción de los factores angiopoyetina I, EGF, FGF-b, HGF, PDGFaa, VEGFaa, respectivamente por CEM-GW cultivadas sobre los andamios PCL, PCA, PCAT. Se evidencia que la secreción de FGF-b aumenta considerablemente debido a la conformación superficial del polímero en el andamio

electrohilado, mientras que la producción de los demás factores no se ve afectada por la estructura del andamio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención corresponde a un andamio obtenido a partir de diferentes biomateriales, particularmente la mezcla del poliéster poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y colágeno (COL) que proporciona una matriz polimérica de andamiaje para la inmovilización de factor de crecimiento transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$), para la adhesión, mantenimiento y proliferación de células, como una potencial estrategia terapéutica en la regeneración de tejido cutáneo.

Para propósitos de interpretar esta descripción, se aplicarán las siguientes definiciones y cuando sea apropiado, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural. Los términos utilizados en la descripción tienen los siguientes significados a menos que el contexto indique claramente lo contrario:

Andamio: construcción o estructura que proporciona un marco físico en el espacio tridimensional en el que se siembran células y es esencial para soportar células *in vitro* con un entorno agradable, que debería ser similar a sus condiciones naturales *in vivo*, proporcionando un microambiente tipo matriz extracelular (MEC - por su sigla en inglés) y que se caracteriza por comprender materiales que representan realmente la MEC específica de tejido. Como tales, los materiales de andamiaje permiten la protección de sustancias o células biológicamente activas del ambiente biológico. En la presente invención sin limitarse a ello, los andamios pueden sembrarse con las células deseadas e incorporarse con factores de crecimiento tisular para mejorar la funcionalidad celular.

Biomateriales: conjunto de materiales empleados para reproducir la función de los tejidos vivos en los sistemas biológicos que conforman un andamio, que son mecánicamente funcionales y fisiológicamente aceptables al ser temporal o permanentemente implantados en el cuerpo y que tratan de restaurar el defecto existente y, en algún caso, conseguir la

regeneración tisular. Los ejemplos de biomateriales aquí utilizados para la generación de andamios se caracterizan por su biocompatibilidad, pueden ser de origen natural, por ejemplo, sin limitarse a colágeno, gelatina, elastina, quitosano, ácido hialurónico o sintéticos como poli(lactida- glicolida) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

Colágeno (COL): biomaterial natural de tipo proteína compuesto por tres cadenas que forman una triple hélice, cuyas propiedades mecánicas, químicas y biológicas, comprenden su gran estabilidad, elevada fuerza tensora, extensibilidad, formación de agregados moleculares, retención de agua, capacidad para formar enlaces de entrecruzamiento, degradación por colagenasas, reabsorción tisular, semipermeabilidad, interacción con diferentes moléculas, antigenicidad reducida, favorece la adhesión celular, interacciona con plaquetas y produce la activación de los componentes del sistema de coagulación sanguínea.

Alginato: biomaterial natural de tipo polisacárido aniónico e hidrófilo, cuya estructura química se caracteriza porque contiene bloques de monómeros de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) enlazados (1-4) y exhibe propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no antigenicidad y capacidad de quelación, por lo que se emplea como matriz de soporte o sistema de administración para la reparación y regeneración de tejidos.

Policaprolactona (PCL): biomaterial sintético de tipo poliéster biodegradable que se compone de una secuencia de unidades de metileno, entre los que se forman grupos éster y es degradada por hidrólisis de sus vínculos ésteres en condiciones fisiológicas (tales como en el cuerpo humano) por lo que se emplea como biomaterial implantable.

Células estromales mesenquimales (CEM): corresponden a un grupo de células madre adultas aisladas de tejidos como la médula ósea, los cordones umbilicales y el tejido adiposo, que se diferencian en células de sus propios linajes o linajes atípicos en algunos casos, tales como osteocitos, condrocitos, adipocitos, miocitos e incluso hepatocitos y neuronas.

Células madre epidérmicas multipotentes: células que se encuentran en nichos de la epidermis interfolicular, glándulas sebáceas y en la envoltura externa de la raíz del folículo piloso, llamada “bulge”. Esta reserva de células madre epiteliales es capaz de regenerar epidermis, glándulas sebáceas y ocho tipos diferentes de células epiteliales del folículo piloso.

Queratinocitos humanos: células que forman la mayor parte de la epidermis, en humanos representan alrededor del 95% de las células epidérmicas. Tienen un origen ectodérmico y se organizan formando un epitelio estratificado plano queratinizado. La proximidad por los numerosos complejos de unión tipo desmosoma que existen entre queratinocitos permite mantener la cohesión y la integridad de la epidermis. Estas células producen queratina y además producen citoquinas que son moléculas solubles con funciones de regulación de las células epiteliales y células dérmicas. Los queratinocitos forman las 4 capas de la epidermis a saber, la capa basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso y la capa córnea.

Condrocitos: son las únicas células presentes en el cartílago articular, sintetizan y secretan los componentes orgánicos de la matriz extracelular que son básicamente colágeno, ácido hialurónico, proteoglicanos y glicoproteínas, y según las características de la matriz se distingue cartílago hialino y fibroso.

Factor de crecimiento transformante β (TGF- β): una citoquina implicada en procesos celulares como hematopoyesis, proliferación, angiogénesis, diferenciación, migración y apoptosis celular. Particularmente, las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2 presentes en las heridas de un adulto se encuentran involucradas en todas las fases de la cicatrización dando como resultado la formación de una cicatriz, mientras que las heridas embrionarias expresan niveles altos de TGF- β 3, que repara una herida y no genera cicatriz, es decir induce una respuesta regenerativa.

Electrohilado: técnica para elaborar fibras ultrafinas a partir de polímeros naturales y sintéticos que tienen diámetros que van desde tamaños submicrométricos a escalas nanométricas. En el proceso de electrohilado, la solución polimérica es sometida a un campo eléctrico hasta un valor crítico, donde las fuerzas eléctricas repulsivas superan las fuerzas de tensión superficial generando la evaporación del solvente y colectando únicamente una fibra de polímero.

TFE: 2,2,2-trifluoroetanol, es el compuesto orgánico con formula química $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$, las tres moléculas de flúor le dan al alcohol una constante de ionización alta y una capacidad de enlace de hidrógeno muy fuerte, lo que lo convierte en un solvente orgánico ampliamente utilizado en el proceso de electrohilado.

HFP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, es un disolvente polar de alto poder ionizante ideal para disolver poliamidas y ésteres. Se usa como solvente polar y exhibe fuertes propiedades de enlace de hidrógeno, disolviendo sustancias que son aceptores de enlace de hidrógeno, como amidas, éteres y una amplia gama de polímeros, incluidos aquellos que no son solubles en los solventes orgánicos más comunes.

Membranas de PCL/COL

Los andamios de la presente invención se encuentran formados por membranas de diferentes mezclas de poli(ϵ -caprolactona)-colágeno. En una modalidad el colágeno empleado es colágeno tipo I.

Es conocido en el estado de la técnica que la fabricación de andamios emplea por lo general concentraciones de colágeno que varían entre 50 y 75% respecto a la PCL, las cuales se caracterizan por producir andamios con una disminución significativa en características físicas como resistencia y rigidez dada la alta proporción de polímero natural respecto al polímero sintético. Así mismo, las grandes cantidades de colágeno, contribuyen a que la PCL forme dominios de gran tamaño dentro de las fibras y se concentre en la periferia de la

misma, enmascarando el colágeno en su interior y con ello eliminando las propiedades biológicas de este. (V. Y. Chakrapani et al. Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid, *Journal of Applied Polymer Science*, **125**, 3221-3227 (2012). <https://doi.org/10.1002/app.36504>, Zhang, Y., et al. Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecules*, **6** (5), 2583-2589 (2005). <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm050314k>, Powell et al. Engineered human skin fabricated using electrospun collagen–PCL blends: morphogenesis and mechanical properties. *Tissue Engineering Part A*, **15** (8), 2177-2187 (2009). <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2008.0473>. Tillman et al, The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials*, **30** (4), 583-588 (2009). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208007813?via%3Dihub>. Se ha observado que dichas variaciones en la concentración de colágeno no son significativas en el diámetro de las fibras obtenidas, mientras que resultan costosas debido a la alta proporción de esta proteína.

En la presente invención, los polímeros se mezclan en diferentes proporciones, por ejemplo, PCL/COL entre 19:1 y 9:1. Las membranas obtenidas con concentraciones de colágeno menores al 1%, no solo permiten el crecimiento celular y la disminución del diámetro de fibra sino la obtención de un producto menos costoso que exhibe propiedades biológicas mejoradas.

Particularmente, dichas membranas comprenden bajas concentraciones de colágeno con respecto a la PCL, en tanto estas reducen significativamente el diámetro de la fibra, con respecto al polímero precursor.

En una modalidad particular de la presente invención las membranas se obtienen por medio de la técnica de electrohilado, con el fin de obtener una matriz polimérica de andamiaje. Dado que la proteína utilizada contiene grupos amida que hacen que la conductividad de la

solución aumente, se ve favorecido el alargamiento de la fibra durante el proceso de electrohilado, dando como resultado fibras de menor diámetro.

Las membranas de PCL/COL de la presente invención se obtienen mediante disolución de los polímeros en un solvente adecuado, seleccionado entre TFE, HFP, dimetilformamida y cloroformo. En una modalidad particular de la presente invención, la matriz polimérica se obtiene solubilizando los polímeros en 2,2,2 trifluoroetanol con una concentración total de polímero (PCL/COL) de 9% en peso. La PCL se mezcla con colágeno en una proporción 19:1, obteniendo una concentración particular de 85,5 mg/mL de y 4,5 mg/mL de los polímeros en el solvente, respectivamente.

Las membranas de PCL/COL de la presente invención se caracterizan por parámetros físicos como un diámetro de fibras de 200 a 400 nm, porosidad entre 50 y 75% e hidrofobicidad a un ángulo de contacto de 60 a 80° a 0 segundos y ángulo de contacto de 5 a 15° a 5 segundos. El diámetro de fibra puede estar entre alrededor de 235 y 355 nm. En una modalidad, las membranas de PCL/COL del andamio se caracterizan por un diámetro de fibra de 295,5 nm y una porosidad de 57,57%.

La hidrofobicidad está definida por un ángulo de contacto en 0 segundos de $71,45 \pm 5,87^\circ$ y un ángulo de contacto en 5 segundos: $10,13 \pm 2,59^\circ$.

Las propiedades mecánicas y térmicas que exhiben las membranas de PCL/COL corresponden con un módulo de Young de $6,986 \pm 2,398$ MPa, porcentaje de deformación de 114,08 %, entalpía de fusión (ΔH_m) de 63,35 J/g, temperatura de fusión (T_m) de 57,31 °C y porcentaje de cristalinidad (X_c) de 45,41 %. La medida del módulo de Young corresponde a un valor cercano al reportado en la literatura para los tejidos del cuerpo humano, particularmente, los parámetros ΔH_m , T_m y X_c son similares en la caracterización térmica de la PCL debido a la alta proporción de este polímero en la solución.

Factor de crecimiento transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$)

En el andamio de la presente invención, la capa intermedia está conformada por factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta 3$). Es conocido que el TGF- $\beta 3$ en inyección sobre heridas cutáneas reduce la respuesta inflamatoria y puede limitar la producción de tejido fibrótico. Sin embargo, este factor es inestable a temperatura ambiente lo que limita su uso para administración y su preservación dado que es una proteína susceptible de perder su actividad con cambios de pH o temperatura leves (A. Roberts et al. The transforming growth factor- β s, *Peptide growth factors and their receptors I*, 419-472 (1991). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3210-0_8, G. M. Saed et al. Transforming growth factor beta isoforms production by human peritoneal mesothelial cells after exposure to hypoxia, *American Journal of Reproductive Immunology*, **43**, 285-291, (2000). <https://doi.org/10.1111/j.8755-8920.2000.430507.x>).

Diferentes mecanismos de estabilización del factor incluyen la inmovilización química dentro o sobre una matriz y la encapsulación física en el sistema de administración. La inmovilización implica la unión química o la interacción de afinidad entre el polímero y el factor de crecimiento, mientras que el método físico se basa en la encapsulación, difusión y liberación controlada del factor de crecimiento desde el sustrato.

En la presente invención, el TGF- $\beta 3$ se encuentra encapsulado e inmovilizado en una matriz. La encapsulación es beneficiosa porque minimiza la exposición del factor a condiciones difíciles durante el procesamiento protegiendo su actividad. Además, los materiales empleados en la encapsulación e inmovilización confieren resistencia mecánica, porosidad y tasas de degradación relevantes que permiten implantarlos. La encapsulación se puede llevar a cabo con materiales como polímeros sintéticos, incluidos poli (α -hidroxiácidos), poli (ortoésteres), poli (anhídridos), poli (aminoácidos), dextrina, poli (glucósido) (PGA), poliácido (l-láctico) (PLA), sus copolímeros y polímeros naturales como la fibroína, la

queratina, el colágeno, la gelatina, el fibrinógeno, la elastina, el quitosano, el ácido hialurónico, el almidón, la carragenina, la celulosa y el alginato.

En una modalidad particular de la presente invención, el TGF- β 3 se encuentra encapsulado en alginato de calcio, el cual exhibe propiedades encapsulantes adecuadas para mantener la bioactividad del TGF- β 3 y garantizar su biodisponibilidad en el tiempo.

Células de la capa exterior del andamio

De acuerdo con la presente invención, el andamio de PCL/COL y TGF- β 3 puede comprender una capa exterior, la cual se encuentra formada por células que se seleccionan entre progenitoras mesenquimales, epiteliales (queratinocitos y células madre epiteliales multipotentes) y/o condrogénicas (condrocitos o condroblastos).

Las células de la capa exterior, se caracterizan por ser células capaces de producir factores seleccionados entre factores angiogénicos, epiteliales, e inmunomoduladores. Particularmente y sin ser una limitante, dichos factores son seleccionados entre factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGFb), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGF- β 2), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), factores neurotróficos seleccionados entre factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina-3 (NT3), neurotrofina-4 (NT4), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), quimiocinas seleccionadas entre quimiocinas CCL5 (RANTES), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1,) eotaxina, interferón gamma-proteína inducible 10 (IP-10), CXCL1, CXCL, CXCL5, CXCL6, CXCL8, citoquinas, factores de crecimiento hematopoyético seleccionados entre factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor inhibidor de leucemia (LIF), interleuquinas IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-11 y factores angiogénicos seleccionados entre angiopoyetina 1, angiogenina, factor de crecimiento placentario (PLGF), trombospondina 2 y endostatina.

En una modalidad las células progenitoras mesenquimales son células estromales mesenquimales (CEM), particularmente células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW), ubicadas estructuralmente sobre la capa superior o inferior de PCL/COL.

Estructura y función de los andamios para regeneración o reparación de tejido

El andamio de PCL/COL-TGF- β 3 de la presente invención tiene una estructura de múltiples capas, en donde una capa conformada por factor de crecimiento transformante (TGF- β 3) encapsulado se dispone e inmoviliza en medio de una capa superior y una inferior de membrana de PCL/COL. Opcionalmente, una capa exterior de células se encuentra dispuesta sobre una de las capas superior o inferior más superficiales del andamio.

Con esta disposición estructural (denominada tipo sánduche) la membrana de PCL/COL permite que el factor de crecimiento encapsulado migre hacia la lesión cutánea sin perder propiedades fisicoquímicas y biológicas, sirviendo de soporte que dirige la acción del TGF- β 3 mediante una liberación sostenida del mismo. Adicionalmente, la adición de CEM en la superficie del andamio permite que el TGF- β 3 estimule la producción de diversos factores celulares que cumplen funciones de moduladores inmunes que junto al TGF- β 3 ejercen un efecto sinérgico en el proceso de regeneración de piel y fortalecimiento de la inmunidad del tejido tratado.

El andamio de PCL/COL-TGF- β 3 también puede tener una disposición que comprende tantas capas de PCL/COL y TGF- β 3 como se requieran de acuerdo al espesor de la lesión cutánea y las enfermedades de base del paciente.

Lo anterior hace que la composición del andamio pueda favorecer la adhesión, mantenimiento y proliferación de células. En una modalidad particular, las células son CEM-GW como una potencial estrategia para la regeneración de tejido cutáneo.

Método de elaboración

El método de elaboración de los andamios de PCL/COL de la presente invención comprende la preparación de las soluciones poliméricas de policaprolactona y colágeno (PCL/COL) en un solvente adecuado, seleccionado entre TFE, HFP, dimetilformamida, cloroformo, acetona, en cantidades entre 300 y 500 μL obteniendo una concentración de los polímeros en solución de entre 9 y 12% p/v, en una proporción PCL:COL de entre 19:1 y 9:1.

En una modalidad particular, el solvente empleado es 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), debido a que posee un alto valor de constante dieléctrica que favorece la reducción del diámetro y los defectos de las fibras resultantes durante el proceso de electrospinning.

En una modalidad particular, los polímeros PCL y COL se encuentran en una concentración de 85,5 mg/mL y 4,5 mg/mL, respectivamente, para una concentración de 9% p/v de polímeros totales en el solvente.

Posteriormente, las soluciones de los polímeros se procesan mediante técnicas como liofilización de los polímeros en solución (Chang et al. The application of type II collagen and chondroitin sulfate grafted PCL porous scaffold in cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials*, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, **92** (2) 712-723 (2010). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.32198>), impresión 3D de PCL con recubrimiento de colágeno (Yeo et al. Preparation and characterization of 3D composite scaffolds based on rapid-prototyped PCL/ β -TCP struts and electrospun PCL coated with collagen and HA for bone regeneration. *Chemistry of materials*, **24** (5), 903-913, (2012). <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cm201119q>) y fundición (Ahn et al. A new hybrid scaffold constructed of solid freeform-fabricated PCL struts and collagen struts for bone tissue regeneration: fabrication, mechanical properties, and cellular activity. *Journal of*

Materials Chemistry, , **22** (31), 15901-15909 (2012). <https://doi.org/10.1039/C2JM33310D>) para obtener la membrana de PCL/COL. En la presente invención, las membranas de PCL/COL se obtienen mediante la técnica de electrohilado, de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 13.

En una modalidad particular, el volumen de la solución electrohilada para la obtención de las membranas corresponde a 300 μ L.

En una modalidad particular, el proceso de electrohilado se lleva a cabo a temperatura ambiente con valores de humedad entre 50 y 55%. Después del electrohilado, los andamios se secan al vacío durante 24 horas para eliminar los remanentes de solvente.

La encapsulación del factor de crecimiento transformante TGF- β 3 se lleva a cabo mediante la generación de tres soluciones 1) solución de alginato de sodio (2% p/v), 2) solución de TGF- β 3 y 3) solución de cloruro de calcio (3% p/v) y las cápsulas se obtienen mediante el método de extrusión.

La encapsulación del TGF- β 3 en alginato de calcio para la posterior inmovilización en una membrana polimérica, permite diseñar sistemas de entrega de manera controlada, con una potencial aplicación directa sobre la lesión, que favorezca la formación de vasos sanguíneos, regule la inflamación crónica, minimice la formación de cicatrices, acelerando los procesos de reparación.

Una vez encapsulado el factor de crecimiento se utiliza un montaje de electrohilado vertical, en donde se electrohila una capa de solución polimérica PCL/COL, se disponen las cápsulas sobre la membrana y se electrohila una nueva capa de 300 μ L de solución polimérica, utilizando el método protocolo anteriormente descrito. Las cápsulas quedan así inmovilizadas en el andamio en forma de sánduche. Los andamios se almacenan en cámara húmeda a 4°C.

Opcionalmente, sobre una de las membranas más externas del andamio es posible cultivar una capa externa adicional de células, como por ejemplo seleccionadas entre progenitoras mesenquimales, epiteliales y/o condrogénicas. En una modalidad, dichas células de la capa externa corresponden con células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW). Para el cultivo de las células se siguió el procedimiento del Ejemplo 13.

Mediante el método desarrollado se obtiene un andamio que exhibe propiedades fisicoquímicas adecuadas como matriz biológica, que garantiza la disponibilidad de factor de crecimiento TGF- β 3 en el tiempo conservando su bioactividad.

Aplicaciones de los andamios de PCL/COL-TGF- β 3

Los andamios de PCL/COL-TGF- β 3 de la presente invención pueden utilizarse como sustitutos de piel que logran la completa reparación del tejido, conservación de la elasticidad cutánea, disminución en la formación de la cicatriz, entrega controlada del factor de crecimiento que permite una liberación sostenida a lo largo del tiempo, permitiendo que el TGF- β 3 desempeñe un papel clave la reparación del tejido, reduciendo los tiempos de cicatrización, mejorando el aspecto y la funcionalidad del tejido. Por lo anterior, los andamios desarrollados en la presente invención proporcionan diversos beneficios para la reparación o regeneración de tejido, incluyendo reparación o regeneración de tejido ante cualquier pérdida ocurrida por razones como trastornos genéticos, trauma térmico, heridas crónicas o agudas e incluso intervenciones quirúrgicas, que pueden generar lesiones profundas que no es posible tratar con éxito mediante tratamientos convencionales y ponen en riesgo la vida de los pacientes.

Adicionalmente, y dependiendo del tipo celular que se cultive sobre el andamio se puede usar en el tratamiento de lesión tisulares en piel o en cartílago. Si las células sembradas, son de origen epitelial o mesenquimal se emplea en el tratamiento de quemaduras, úlceras vasculares y diabéticas. Cuando se incorporan células de origen condrogénico o mesenquimal se pueden

usar en el tratamiento de lesiones de cartílago circunscritas (osteocondritis disecantes, condropatía rotuliana, condromalacia del tobillo, lesiones osteocondrales).

La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Elaboración de los andamios de poli ϵ -caprolactona (PCL) colágeno (COL)/ factor de crecimiento transformante (TGF- β 3)

Para la fabricación del andamio se usaron pellets de poli ϵ -caprolactona (MW) $\sim$ 80.000 g/mol (PCL, Sigma Aldrich) y colágeno tipo I de piel de becerro (Sigma-Aldrich) en solución con el solvente orgánico 2,2,2-trifluoroetanol $\geq 99\%$ (TFE, Merck), en donde se varió la relación de los polímeros policaprolactona (PCL) y colágeno en solución en 19:1 y 9:1 p/p, la concentración de los mismos en 9 y 12% p/v y el volumen de la solución para electrohilado en 300 μ L y 500 μ L. De la solución de 300 μ L se obtuvo una membrana de 8x8 cm y 40 μ m de espesor y de la solución de 500 μ L una membrana de 8x8 cm y 70 μ m de espesor.

La Figura 1 ilustra esquemáticamente la estructura de los andamios de la invención.

A continuación, se muestran las composiciones desarrolladas para la fabricación del andamio PCL/COL:

Nombre de la muestra	Características			1PCL (80.000 Da) 440744-Sigma		Colágeno tipo I (calfskin) C9791-Sigma	
	Volumen de solución en 2,2,2-trifluoroetanol (μL)	Proporción (p/p)	Concentración de los polímeros en solución (% p/v)				
				Cantidad en mg	Concentración	Cantidad en mg	Concentración
PCL/COL1	300	19:1	9	25,65	85,5 mg/mL	1,65	4,5 mg/mL
PCL/COL2	500	19:1	9	42,75	85,5 mg/mL	2,25	4,5 mg/mL
PCL/COL3	300	9:1	9	24,30	81 mg/mL	2,70	9 mg/mL
PCL/COL4	500	9:1	9	40,50	81 mg/mL	4,50	9 mg/mL
PCL/COL5	300	19:1	12	34,2	114 mg/mL	1,80	6 mg/mL
PCL/COL6	500	19:1	12	57,0	114 mg/mL	3,00	6 mg/mL
PCL/COL7	300	9:1	12	32,4	108 mg/mL	3,6	12 mg/mL
PCL/COL8	500	9:1	12	5,40	108 mg/mL	6,00	12 mg/mL

Tabla 1. Formulaciones de PCL/COL desarrolladas para la producción de andamios

Para evaluar la influencia de la adición de colágeno en las membranas de PCL, adicional a las combinaciones mostradas en la Tabla 1 se hizo una solución de referencia de PCL sin colágeno, en concentraciones de 90mg/mL (9% p/v) y 120mg/mL (12% p/v) en TFE, las soluciones se mantuvieron bajo agitación magnética a 500 rpm por seis horas a temperatura ambiente.

Para identificar las propiedades de los andamios obtenidos a partir de las formulaciones ejemplificadas en la Tabla 1, se caracterizaron las membranas PCL/COL obtenidas por medio de técnicas como (SEM), ángulo de contacto, (FT-IR), (XPS), (TGA), (DSC). La evaluación de las propiedades fisicoquímicas se muestra en los ejemplos siguientes.

La caracterización de los andamios se llevó a cabo en función de cuatro aspectos generales, con el fin de identificar y establecer la influencia del colágeno en el soporte polimérico de PCL. El primero fue analizar las propiedades estructurales y morfológicas de los andamios,

por medio de técnicas como espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC), ángulo de contacto, espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), microscopía electrónica de barrido (SEM) y propiedades mecánicas. El segundo fue evaluar la liberación del factor de crecimiento de las microcápsulas por medio del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El tercer aspecto fue determinar la viabilidad de los andamios con ensayo de citotoxicidad mediante prueba de resazurina y proliferación celular *in vitro* mediante el seguimiento por microscopía de fluorescencia y cuarto, se evaluó la funcionalidad del constructo mediante la producción de factores de crecimiento (transformante β , b-FGF, VEGF-A, HGF) y marcadores de diferenciación epitelial involucrados en los procesos de regeneración de tejido cutáneo de las células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW) estimuladas por los andamios, mediante tecnología Luminex®.

Ejemplo 2: Evaluación de la morfología de las fibras

La morfología de las membranas de PCL/COL y las membranas de PCL control se determinó mediante observación por microscopía electrónica de barrido (SEM) (JEOL-JSM-7600F). La Figura 2 enseña la morfología de las membranas de PCL, mientras que las Figuras 3A a 3H ilustran las membranas de PCL/COL. Las muestras se visualizaron utilizando aumentos entre 5000x y 10000x para determinar los diámetros de las fibras y estimar el tamaño de los poros mediante el software de análisis de imágenes.

Por medio de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido se definió el diámetro de fibra promedio y el porcentaje de porosidad para cada formulación del diseño de los andamios de PCL/COL, los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Muestra	Proporción (p/p)	Concentración (%)	Volumen (mL)	Diámetro de fibra (nm)		Porosidad (%)
				Media	σ	
PCL/COL1	19:1	9	0,3	295,5	59,2	57,57
PCL/COL2	19:1	9	0,5	353,1	92,0	52,08
PCL/COL3	9:1	9	0,3	233,8	67,7	55,20
PCL/COL4	9:1	9	0,5	339,5	83,8	51,47
PCL/COL5	19:1	12	0,3	295,9	41,1	59,98
PCL/COL6	19:1	12	0,5	290,2	83,2	54,45
PCL/COL7	9:1	12	0,3	263,0	54,3	58,43
PCL/COL8	9:1	12	0,5	327,4	78,4	49,78
PCL	-	9	0,5	1,12 μm	0,15 μm	32,47

Tabla 2. Resultados de diámetro de fibra y porosidad para las formulaciones de PCL/COL

El uso de diferentes proporciones de colágeno con respecto a la PCL y diferentes porcentajes de peso total de la muestra, indicaron variaciones bajas entre los promedios de diámetro de fibra, encontrando que se pueden utilizar bajas concentraciones de colágeno a bajos volúmenes con un resultado similar.

La reducción del diámetro de fibra evidenciado en las fibras del andamio de PCL/COL respecto al de PCL sin colágeno se atribuyen al uso una proteína que contiene grupos amida a lo largo de su conformación estructural, lo que hace que la conductividad de la solución aumente. Al aumentar la conductividad de la solución, se puede aumentar la inestabilidad de la flexión durante el electrohilado, por lo tanto, la trayectoria del chorro se hace más larga y se induce a un mayor estiramiento de la solución provocando la reducción del diámetro de la fibra. El aumento en las fuerzas de alargamiento y la mayor inestabilidad de flexión dieron como resultado fibras de menor diámetro con respecto a las fibras obtenidas con el polímero precursor (PCL).

La porosidad mostro una tendencia inversa al diámetro de fibra, por lo cual, se puede inferir que, al disminuir el tamaño de la fibra, aumenta el porcentaje de porosidad del andamio y también su área superficial.

Los andamios con menos volumen electrohilado presentaron un mayor porcentaje de porosidad, debido a que al electrohilar una mayor cantidad de solución se presenta un efecto de apantallamiento en las fibras, limitando los poros del andamio. Al disminuir el volumen de solución electrohilada aumenta la humectabilidad de los andamios, debido a que el medio de cultivo puede penetrar mejor en las fibras, esta afirmación se sustenta con el análisis de ángulo de contacto.

La porosidad es un factor crucial en la fabricación de andamios con potencial aplicación en la reparación de tejidos, en tanto la naturaleza porosa es esencial para facilitar la infiltración y proliferación celular. Un alto grado de porosidad garantiza un intercambio suficiente de gas y nutrientes, para el mantenimiento celular y posterior curación de heridas. Las formulaciones que presentan un volumen de electrohilado de 0,3 mL, presentarán mejores características de proliferación y mantenimiento celular que las formulaciones con un mayor electrohilado.

Es posible evidenciar que la técnica de electrohilado proporcionó un mecanismo para la producción de andamios fibrosos, con una alta porosidad, una amplia distribución de diámetros de poro, una alta relación de volumen por superficie de área y similitudes morfológicas con respecto a las fibras de colágeno que integran la matriz extracelular nativa (MEC).

Particularmente, en el cuerpo humano la membrana basal es una estructura fibrosa de 40 a 220 nm, constituida por colágeno tipo IV y laminina, en donde los diámetros de fibra de los andamios de PCL/COL exhiben un acercamiento considerable a este valor con un promedio de diámetro de $299,8 \text{ nm} \pm 69,96 \text{ nm}$.

Ejemplo 3. Ensayos de hidrofobicidad

Se realizó estableciendo el ángulo tangente de una gota de líquido con una superficie sólida en la base. El ángulo de contacto de la caída de líquido sobre una superficie sólida, se define por el equilibrio mecánico de la caída bajo la acción de tres tensiones interfaciales: solido-vapor γ_{sv} , solido-liquido γ_{sl} y liquido-vapor γ_{lv} . Este equilibrio es conocido como la ecuación de Young.

La interacción entre la gota y los andamios de PCL/COL y PCL se realizó utilizando el software Pinnacle Studio y un goniómetro (Ramehart inc Modelo 100-07-00). Una gota de 2 μL de agua destilada se depositó sobre la superficie de los andamios y los ángulos se calcularon desde el contacto de la gota con el soporte en el software (ImageJ).

La humectabilidad de la superficie es una propiedad importante de los biomateriales y puede afectar la adhesión, mantenimiento y proliferación de las células. El ángulo de contacto que se genera del contacto con el agua en el andamio se puede utilizar para evaluar la humectabilidad, por lo que para tener una idea del comportamiento que tendrán los andamios en un entorno fisiológico es importante conocer las características de mojado de las membranas, con el fin de garantizar la adhesión y proliferación celular.

A continuación, se muestran los valores de ángulo de contacto para los andamios de PCL Y PCL/COL:

Andamio	Angulo de contacto en dos tiempos (°)			
	0 s		5 s	
	Media	σ	Media	σ
PCL/COL1	71,45	5,87	10,13	2,59
PCL/COL2	116,45	2,93	47,17	3,53
PCL/COL3	73,25	9,11	35,92	2,89
PCL/COL4	106,27	2,71	46,12	3,12
PCL/COL5	99,24	6,07	41,36	3,31
PCL/COL6	103,33	2,54	60,14	4,19
PCL/COL7	93,17	1,47	35,31	1,54
PCL/COL8	108,73	2,76	57,84	2,84
PCL	138,70	2,71	138,70	2,71

Tabla 3. Resultados de ángulo de contacto para las formulaciones de PCL/COL

La mayoría de los polímeros sintéticos, incluida PCL, son hidrófobos debido a la baja presencia de grupos carbonilo en su cadena, mientras que los polímeros naturales como las proteínas (colágeno) son hidrófilos.

Luego de combinar el colágeno con PCL, se observó que la gota de agua se absorbió dentro de los primeros 5 segundos de contacto con las fibras del andamio, dando como resultado un ángulo de contacto inferior a 60° a los 5 segundos, es decir, la adición de colágeno a la matriz polimérica de PCL, aporta al andamio grupos carboxílicos y grupos amida que reducen la hidrofobicidad del andamio hasta un 50% en el momento del contacto de la gota de agua con el andamio, convirtiendo a los andamios en superficies altamente humectables, parámetro de gran importancia para el cultivo celular.

Se concluye entonces que la adición de colágeno a la PCL modificó la hidrofobicidad favoreciendo el cultivo celular debido a que los andamios presentaron ángulos de contacto menores a los 90°, considerándolos como superficies humectables.

De acuerdo a lo anterior, los andamios que presentan un volumen más alto de solución electrohilada presentan un ángulo mayor, debido a que la permeabilidad de se ve reducida por el mayor número de fibras, evidenciando la resistencia de estos para ser humectados, resultado que se confirma con los porcentajes de porosidad calculados mediante microscopía electrónica de barrido.

En cuanto a la cantidad de colágeno presente en las diferentes formulaciones, no se encontró evidencia que en los andamios con mayor proporción; la gota se absorbiera más rápido, lo cual infiere que el colágeno en pequeñas proporciones puede lograr cambiar la polaridad del andamio.

Ejemplo 4. Análisis de pérdida de masa por TGA

Este análisis permite realizar medidas para determinar la composición de los materiales y predecir su estabilidad en un intervalo de temperaturas definido para cada tipo de material, siendo útil para caracterizar materiales que presentan pérdida o ganancia de peso debido a la descomposición, oxidación o deshidratación.

Las transiciones térmicas de los andamios se determinaron en un equipo TGA Q5000 de TA Instruments, se colocaron aproximadamente 5 mg de muestra y se sometió en un rango de temperaturas, que comprendieron desde la temperatura ambiente (Estimados inventores, especificar en grados centígrados a que equivale este valor) hasta 250°C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo la atmósfera de N₂.

La determinación de las energías y temperaturas de transición se llevó a cabo utilizando el software TA Universal Analysis.

Los resultados se analizaron para cada pérdida de masa en cada material, en donde la curva TGA de la matriz de control de PCL muestra que la temperatura de descomposición de la

PCL se evidenció a los 346,02 °C con una pérdida de masa del 93,54%, mostrando la degradación térmica de una sola etapa.

El termograma del colágeno exhibe una pérdida de peso en varias etapas, la primera de 42,71 °C que corresponde a la pérdida de agua adquirida por hidratación de las fibras de colágeno, cuya masa representa un 3,38%, y la segunda a los 137,63°C correspondiente a la pérdida de agua ligada a la molécula de colágeno y ruptura de cadenas polipeptídicas con una pérdida de masa del 12,26%, la degradación del colágeno tipo I es aproximadamente a partir de los 210 °C.

Para el colágeno utilizado, la descomposición se dio sobre los 246,85°C, correspondiente a la degradación de los grupos orgánicos de la molécula, alrededor de un 42,25% de la masa total de la muestra. La masa restante se termina de degradar cerca de los 520°C dejando un residuo del 17,26%.

Andamio	Concentración	Proporción	Temperatura de descomposición (°C)	Pérdida masa (%)
PCL/COL2	9%	19:1	307,69	90,01
PCL/COL4	9%	9:1	306,55	83,86
PCL/COL6	12%	19:1	321,91	91,29
PCL/COL8	12%	9:1	325,12	79,65

Tabla 4. Resultados del análisis de estabilidad térmica para las formulaciones de PCL/COL

Los termogramas de TGA el andamio de PCL mostró una línea continua hasta alcanzar la temperatura de descomposición. Las fibras de PCL/COL, en cambio, presentaron una pérdida de peso progresiva antes de la temperatura de descomposición y una disminución en la temperatura de degradación en los andamios de PCL/COL, atribuida a la liberación de moléculas de agua de las fibras y la descomposición del colágeno.

Los andamios PCL/COL 6 y 8 presentan una mayor temperatura de desnaturalización debido a que comprenden una mayor concentración de polímero sintético, asemejándose a la temperatura de degradación de la PCL.

En el caso de los andamios PCL/COL 4 y 6 que presentan una mayor concentración de colágeno, se evidencia la reducción en la pérdida de masa sobre la temperatura de descomposición, debido a la eliminación de sustancias volátiles aportadas por el colágeno en los andamios.

En las etapas de descomposición en el análisis de TGA se observó que las señales para PCL y colágeno no fueron constantes para todas las mezclas, pero varían en un pequeño grado y sugieren la interacción entre colágeno y PCL, por lo que la propiedad térmica de una podría verse afectada por la otra. Sugiriendo que la razón de las variaciones en las propiedades térmicas se deba por una posible interacción de los grupos amida de colágeno con grupos carboxilo de PCL.

Ejemplo 5. Análisis de grupos funcionales por FT-IR

Con el fin de confirmar una posible interacción de la PCL con el colágeno, las matrices electrohiladas obtenidas de diversas combinaciones de colágeno y PCL se sometieron a análisis FT-IR.

La caracterización de los grupos funcionales de los andamios se determinó en el equipo Nicolet 6700 Thermo Scientific utilizando espectroscopia infrarroja con una transformada de Fourier con reflexión total atenuada, en donde la muestra se caracterizó utilizando un rango de medición de 4000 a 500 cm^{-1} a temperatura ambiente.

Para el colágeno tipo I usado en la elaboración de los andamios, las vibraciones de estiramiento de NH, las vibraciones de CH₂, las vibraciones de C=O de los enlaces de amida,

las vibraciones de flexión de -NH, las vibraciones de flexión de CH₂ y las vibraciones de C-N pueden observarse respectivamente en 3309, 2938, 1724, 1548, 1375 y 1292 cm⁻¹.

Los picos observados para PCL solo a 2940 y 2865 cm⁻¹ se deben a vibraciones de CH₂, la señal intensa a 1728 cm⁻¹ corresponde a las vibraciones de C=O, a 1452 cm⁻¹ vibraciones de flexión de CH₂ y a 1240 C-O-C vibración de tensión asimétrica, que sugieren que el proceso de electrohilado no modifica la composición.

Con respecto a los espectros FT-IR de las diferentes formulaciones de PCL/COL realizadas, la señal de intensidad disminuida con respecto al FT-IR del PCL, observada a 1724 cm⁻¹ se atribuye a la disponibilidad reducida de C=O de PCL en la interacción con el colágeno, las vibraciones de C=O observadas a 1630 cm⁻¹ sugieren que las fibras de colágeno están bien dispersas y como resultado los enlaces de amida pueden estar altamente deslocalizado en el grupo C=O adyacente.

Los ligeros cambios en las señales de los espectros de FT-IR con respecto al PCL, evidencian las interacciones que ocurren entre el colágeno y la PCL durante el proceso de electrohilado del siguiente modo:

Señal (cm ⁻¹)					Descripción
PCL/COL 2	PCL/COL4	PCL/COL 6	PCL/COL 8	PCL	
2942	2941	2942	2942	2940	Estiramiento asimétrico CH ₂
2865	2864	2866	2865	2865	Estiramiento simétrico CH ₂
1724	1726	1723	1725	1724	Estiramiento C=O
1465	1463	1465	1463	1452	Vibraciones de flexión de CH ₂
1290	1290	1292	1292	1292	Estiramiento en la fase cristalina C-O, C-O y C-C
1236	1236	1236	1238	1240	C-O-C vibración de tensión asimétrica
1164	1166	1164	1168	1185	Estiramiento en fase amorfa O- C-O

1047	1047	1047	1047	1066	Estiramiento simétrico C-O-C
------	------	------	------	------	------------------------------

Tabla 5. Señales de FT-IR para las formulaciones de PCL/COL y PCL

El estado de la técnica sugiere el uso de alta concentración de colágeno para lograr identificar la presencia de los grupos nitrogenados en el andamio, sin embargo, en la presente invención se logró determinar que las relaciones bajas de polímero natural frente al polímero sintético pueden lograr resultados similares, disminuyendo costos de producción de los andamios.

Ejemplo 6. Análisis de transiciones por DSC

Para la determinación de transiciones térmicas de los andamios las muestras fueron secadas en un desecador con una bomba de vacío marca VacuuBrand modelo RZ 2,5. Luego se colocaron alrededor de 10mg de muestra, en un equipo TA Instruments DSC Q100.

Para la muestra de PCL y una de PCL/COL 19:1 al 12% en solución THF se hizo un ciclo de -50°C a 150°C regresando a -50°C con una velocidad de calentamiento de 20°C/min bajo una atmosfera de N₂, para las demás muestras se utilizó una rama de calentamiento de 25°C hasta 150°C.

Para el análisis de las transiciones de la PCL se realizó un ciclo de calentamiento del PCL, que iba desde los -60 °C hasta los 150 °C y uno de enfriamiento desde los 150 °C nuevamente hasta -60 °C, arrojando valores de temperatura de cristalización (T_c) de 32,39°C, temperatura de fusión (T_m) de 57,42°C y temperatura de transición vítrea (T_g) de 59,53°C.

Para el colágeno, dado que este se puede deshidratar o desnaturalizar cuando se calienta, los picos endotérmicos característicos en el termograma de DSC se evidencian a los 79,50 °C debido a la eliminación de agua libre, con un alto valor de entalpía 119,7 J/g y una segunda señal cerca de los 186,51 °C con una entalpía de 85,14 J/g, estas señales a menudo se han denominado temperatura de deshidratación del colágeno (TDcol). Los andamios de PCL/COL mostraron mayor estabilidad en comparación con el colágeno natural.

En el análisis por DSC de las diferentes mezclas del andamio, los picos alrededor de 57,42 °C corresponden al punto de fusión de PCL y los picos alrededor de 186,51 °C corresponden a la fusión (desnaturalización) del colágeno. En las curvas correspondientes a diferentes relaciones de PCL/COL se observó enmascaramiento de la desnaturalización del colágeno, lo cual puede ser debido a la alta proporción de PCL en los andamios.

Estos resultados confirman los encontrados en el análisis de TGA, debido a que no hubo pérdida de peso evidente, hasta 155 °C, pues la desnaturalización del colágeno no produce sustancias volátiles, que podrían afectar la masa del residuo.

Adicionalmente, se calculó el porcentaje de cristalinidad (X_c) de los andamios de PCL/COL y PCL mediante la siguiente ecuación:

$$X_c (\%) = \left[\Delta H_{m \text{ sample}} \left(\frac{J}{g} \right) / \Delta H_m^\circ \left(\frac{J}{g} \right) \right] \times 100$$

Donde $\Delta H_m^\circ = 139,5 \text{ J/g}$, entalpía de fusión de la PCL 100% cristalina.

El porcentaje de cristalinidad de los andamios de PCL/COL se ve afectado por la concentración de colágeno presente en las fibras, así, el porcentaje de cristalinidad de la PCL/COL es menor que la del andamio PCL y para los andamios de PCL/COL 19:1 la cristalinidad fue superior que los andamios 9:1, tal y como se evidencia a continuación:

Andamio	Concentración	Proporción	ΔH_m (J/g)	T_m (°C)	X_c (%)
PCL/COL 2	9%	19:1	63,35	57,31	45,41
PCL/COL 4	9%	9:1	57,94	57,10	41,53
PCL/COL 6	12%	19:1	63,85	56,36	45,79
PCL/COL 8	12%	9:1	58,28	56,60	41,77
PCL	9%	-	59,29	57,97	42,50

Tabla 6. Punto de fusión, entalpía y porcentaje de cristalinidad para las formulaciones de PCL/COL y PCL

El porcentaje de cristalinidad (X_c) de los andamios está relacionada con el rápido proceso de solidificación del electrohilado, ya que este proceso dificulta el desarrollo de la cristalinidad, porque las cadenas no tienen tiempo suficiente para formar cristales. Un alto porcentaje de cristalinidad afecta la adhesión celular debido a que las células presentan preferencias sobre superficies amorfas.

La baja variabilidad entre los porcentajes de cristalización entre el polímero puro y el polímero en combinación con colágeno se deben a la diferencia en la velocidad de inyección en la obtención de las fibras, en el caso de la solución de PCL se utilizó un flujo mayor, este flujo hace que se disminuya el tiempo de recristalización del polímero antes de la formación de las fibras.

Por ejemplo, en una modalidad los valores de entalpia (ΔH_m) fue de 63,35 J/g, temperatura de fusión (T_m) de 57,31 °C y porcentaje de cristalinidad (X_c): 45,41 %.

Ejemplo 7. Análisis de la superficie del andamio mediante XPS

Las mediciones de espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) constituyen una herramienta para monitorear los cambios en la superficie que aparecen después de varios tratamientos físico-químicos, por lo tanto, se empleó como técnica para la caracterización química superficial de los andamios de 2 a 3 nm de profundidad.

Se realizaron en un microscópico de fotoelectrones VG-ESCALAB usando una fuente de rayos X monocromática de Mg ($h = 1253,6$ eV). Los espectros se obtuvieron con un paso constante de energía $E_0 = 50$ eV con un ángulo de despegue de electrones de 45° con respecto a la superficie normal. El análisis de deconvolución de espectros se realizó con el software Origin 9®.

Se analizó la superficie de los andamios con el fin de conocer las moléculas presentes en la superficie que hace que se adhieran las células a los andamios.

Para el espectro de PCL puro se detectaron las señales de C1s y O1s, en el caso de C1s se presentaron cuatro señales (C-C/C-H a 284,6 eV, C-O a 285,7 eV, O-C-O a 287,5 eV O-C=O a 288,7) y para O1s dos señales (*O-C=O a 533,1 eV y O-C=O* a 531,7 eV) las cuales corresponden al análisis XPS reportado en la literatura para la PCL.

Así entonces de acuerdo con los resultados obtenidos por XPS, se confirma que el proceso de fabricación de los andamios no genera ningún cambio en la superficie del material, con lo que podemos garantizar que la adhesión celular se está produciendo en el material polimérico utilizado.

Como se muestra a continuación, los resultados de XPS de andamios de PCL/COL mostraron una señal atribuida a N 1s, para el andamio que presenta mayor proporción de colágeno (PCL/COL 4) lo cual confirma la presencia de colágeno en la superficie del andamio, para las demás combinaciones el colágeno es indetectable debido a la proporción tan elevada de PCL con respecto a la proteína, infiriendo que la proteína no se ubica en la superficie de los andamios.

ANDAMIO	C 1s			O 1s	
	C-C/C-H	C-O	O-C=O	O-C=O*	*O-C=O
PCL/COL 2	284,57874	285,57837	288,57312	531,95498	533,36438
PCL/COL 4	284,78134	285,52783	288,8203	531,79012	533,37947
PCL/COL 6	284,66801	285,60847	288,81377	531,6042	532,98452
PCL/COL 8	284,66306	285,83827	288,67867	531,86443	533,40293

Tabla 7. Señales C 1s y O 1s para las formulaciones de PCL/COL

Ejemplo 8. Propiedades mecánicas del material

La resistencia a la tracción de las nanofibras electrohiladas se determinó utilizando una máquina universal de prueba de tracción INSTRON 5500R (Instron Inc., MA, EE. UU.), utilizando celda de carga de 500 N a una velocidad de cruceta de 10 mm/min [0,4 pulg/min] sobre la muestra.

Los andamios se evaluaron mediante tensión uniaxial según la norma ASTM D1708, en donde el módulo de Young de las muestras se estimó a partir de la pendiente de la curva de descarga en la región de carga máxima. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados fueron reproducibles en cada espécimen.

Los andamios de PCL y PCL/COL se evaluaron mediante tensión uniaxial según ASTM D1708.

A continuación, se evidencian los valores para módulo de Young y el porcentaje de deformación obtenidos para los diferentes andamios:

Nombre Muestra	Características			Propiedades Mecánicas		
	Volumen (mL)	Proporción (p/p)	[] (%)	Módulo de Young (MPa)		Deformación (%)
				Media	σ	
PCL/COL1	0,3	19:1	9	6,986	2,398	114,08
PCL/COL2	0,5	19:1	9	7,928	3,414	149,33
PCL/COL3	0,3	9:1	9	7,092	2,335	143,40
PCL/COL4	0,5	9:1	9	6,455	0,625	138,07
PCL/COL5	0,3	19:1	12	11,692	2,144	171,18
PCL/COL6	0,5	19:1	12	12,145	1,922	147,85
PCL/COL7	0,3	9:1	12	10,298	3,493	148,66
PCL/COL8	0,5	9:1	12	11,18	1,095	160,88

PCL	0,5	-	9	21,242	1,608	112,67
PCL	0,5	-	12	22,634	2,484	159,33

Tabla 8. Resultados de módulo de Young y porcentaje de deformación para las formulaciones de PCL/COL y PCL

Debido a la formación de estructuras porosas (parámetro importante en el intercambio de nutrientes en los estudios biológicos) la técnica de electrohilado disminuye significativamente las propiedades mecánicas de los materiales, por ejemplo, un andamio de PCL de 80kD obtenido por extrusión puede llegar a presentar un módulo de Young de 190 ± 6 MPa frente al $22,634 \pm 2,484$ encontrado para la membrana electrohilada de PCL.

Para las formulaciones desarrolladas en la presente invención se encontró que aquellos andamios que contienen colágeno presentan disminución en el módulo de Young en comparación con los andamios de PCL, esto es debido a que los andamios de PCL presentan fibras más gruesas y menor área de poro, que incide directamente en esta propiedad, además de las posibles interacciones electrostáticas que se generan entre la proteína y las cadenas poliméricas del poliéster que disminuyen la resistencia a la deformación, ya que las proteínas no presentan grandes propiedades mecánicas.

Los andamios de PCL/COL con un volumen electrohilado mayor presentaron módulos de Young con un incremento leve debido a que al tener mayor volumen de solución el número de fibras presente es mayor y por ende se reduce la porosidad, generando andamios con un grado mayor de tenacidad. En cuanto a la cantidad de colágeno no se evidenciaron diferencias significativas en los módulos de Young, infiriendo que se pueden usar la concentración más baja de colágeno sin representar un cambio significativo con las membranas de mayor concentración. En cuanto a la concentración en peso del andamio, los del 12% en peso total presentaron módulos de Young más altos debido al incremento del PCL en la membrana.

El comportamiento elástico con posterior deformación sin formación de cuello fue un comportamiento evidente en la prueba esfuerzo vs deformación, ya que no se observó reducción del área transversal antes de la rotura.

El polímero puro PCL y los andamios que contienen colágeno presentan módulos de Young y esfuerzo final notablemente inferior en algunos casos hasta la tercera parte del módulo de Young del andamio de PCL, esto también puede ser producto de las posibles interacciones electrostáticas generadas entre la proteína y las cadenas poliméricas del poliéster que vuelven los andamios menos tenaces, ya que las proteínas no presentan grandes propiedades mecánicas. Los porcentajes de deformación antes de la rotura sobrepasan el 100% de deformación valores que llegan hasta el 171% de deformación, atribuido a los diámetros de fibra de los andamios ya que al estar en tamaños submicrométricos y presentar área de poro mayores al 50% se puede presentar un reordenamiento de las fibras debido a la tensión ejercida que le confieren al material la posibilidad de elongarse sin generar roturas.

Los andamios de polímeros naturales a menudo tienen malas propiedades mecánicas y aunque los andamios de polímeros sintéticos tienen propiedades mecánicas mejoradas, no poseen afinidad biológica inherente. Por lo tanto, las membranas compuestas de polímeros sintéticos y naturales generan un andamio con una combinación óptima de integridad mecánica y función biológica.

La medición del módulo de Young de los andamios es un parámetro vital para estimar la semejanza a las características de la piel, por lo tanto, para establecer una comparación con las propiedades de la piel, la siguiente tabla reporta los valores como módulos de Young de la piel encontrados en la literatura:

Referencia	Fuente de Piel	Módulo de Young
Ankersson et al.	Abdomen	4,96 MPa
Annaidh et al.	-	10 MPa
Jacquemoud et al.	Frente	14 MPa, 140 MPa y 35 MPa (para deformación longitudinal, transversal y cortante)
Gallagher et al.	Espalda	8,33 MPa
Ottenio et al.	Abdomen	4,02 ± 3,81 MPa

Tabla 9. Módulos de Young de la piel

Según los valores de módulo de Young o elasticidad obtenidos para los andamios de PCL/COL se pudo inferir que los andamios presentan propiedades elásticas con valores similares a los reportados para diferentes zonas de la piel, por lo cual los andamios de PCL/COL se podrían catalogar como un buen candidato para ser usados como reemplazo dérmico.

Ejemplo 9. Ensayo de adhesión celular

Se evaluó la citocompatibilidad de los andamios, midiendo la adhesión celular de las células de la capa exterior sembradas sobre una de las membranas PCL/COL del andamio, por ejemplo, células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton humanas GFP (CEM-GW), para lo cual, se sembraron CEM-GW transducidas con proteína verde-fluorescente (CEM-GW-GFP) y wild-type (CEM-GW).

La evolución de la adhesión celular de CEM-GW-GFP sobre los andamios de PCL/COL con andamios de PCL puro se realizó mediante microscopía fluorescente invertida a las 24 h, 48 h, 15 días y 22 días para el primer ensayo y 24h, 48h, 72h, 96h y 120h para el segundo ensayo.

La proliferación de células CEM-GW sembradas en los andamios se evaluó utilizando un ensayo de viabilidad y proliferación celular de resazurina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.

UU.). Las CEM-GW se sembraron en una densidad de 5×10^4 células sobre los andamios de 1 cm diámetro en una placa de 24 pozos.

Se permitió que las células se adhirieran durante 24 horas, después de las cuales el medio se cambió por 500 μ l de una solución al 10% de resazurina en medio de cultivo fresco. Después de incubar las células durante 3 horas, se midieron alícuotas de 100 μ L usando un lector de microplacas (Synergy; BioTek, EE. UU) a 450 y 570 nm y la absorbancia de fondo se midió a 450 nm.

Los datos se representaron como la media $\pm$ la desviación estándar. La significancia estadística fue probada usando una prueba t de Student, y las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$.

Después de 1, 3, 6, 9, 12 días de cultivo, se evaluó la actividad rédox en el citosol de las células viables mediante la reducción de la resazurina, tal y como se evidencia en la Figura 5.

La determinación de la viabilidad de las células mantenidas en cultivo *in vitro* supone un requisito necesario, si se tiene previsto llevar estos andamios a una implantación *in vivo*.

Con el fin de seleccionar el andamio con mejor formulación para la adhesión, mantenimiento y proliferación de las CEM-GW, se realizó un monitoreo del cultivo de CEM-GW GFP sobre los andamios, *in vitro*. Se analizaron imágenes de fluorescencia de los andamios en cuatro tiempos (24h, 48h, 15 días y 22 días) y se comparó morfología y confluencia de las células en los andamios de PCL y PCL/COL.

Las formulaciones que contenían colágeno (particularmente PCL/COL 1 y PCL/COL 2), evidenciaron una respuesta positiva de adhesión celular, las células a las 24h presentaban una morfología fibroblastoide propia de las CEM-GW, además a lo largo del periodo del cultivo las células proliferaron de forma gradual sobre el andamio.

Para las demás formulaciones PCL/COL 3 a PCL/COL 8 las células a las 24h, tenían morfología circular, que indica que las células presentaban problemas para la adhesión al andamio, luego de las 48h las células toman la morfología fibroblastoide y se evidencia su proliferación en el tiempo.

Para el caso del andamio de PCL las células a las 24h, tenían morfología circular, que indica que las células presentaban problemas para la adhesión al andamio, atribuido a la hidrofobicidad del material.

Ejemplo 10. Análisis estadístico

Se analizó el diseño estadístico 2³, con el fin de determinar si la asociación entre cada una de las variables respuesta obtenidas experimentalmente (grado de adhesión celular por medio del seguimiento por microscopía de fluorescencia de las CEM-GW, diámetro de fibra y porcentaje de porosidad obtenidos por medio del análisis de la imágenes de microscopía electrónica de barrido SEM, y ángulo de contacto determinado en un goniómetro) y cada variable incluida en el modelo (volumen electrohilado, proporción y concentración) son estadísticamente significativas.

Se comparó el p-valor de cada una de las variables respuesta con el nivel de significancia para evaluar la hipótesis nula. La hipótesis nula corresponde a que el coeficiente del término es igual a cero, lo que implica que no hay asociación entre las variables y la respuesta.

Mediante el software estadístico R se analizó el modelo estadístico contemplado al inicio del estudio, en la siguiente tabla se muestran las variables de diseño frente a las variables respuesta obtenidas experimentalmente.

Nombre	Matriz de experimentos			Variables			Variable respuesta			
				Volumen (mL)	Proporción	[] (%)	Adhesión (%)	Diámetro de fibra (nm)	Porosidad (%)	Angulo de contacto (°)
PCL/COL1	-	-	-	0,3	19:1	9	70	295,5	57,57	10,13
PCL/COL2	+	-	-	0,5	19:1	9	60	353,1	52,08	47,17
PCL/COL3	-	+	-	0,3	9:1	9	50	233,8	55,20	35,92
PCL/COL4	+	+	-	0,5	9:1	9	20	339,5	51,47	46,12
PCL/COL5	-	-	+	0,3	19:1	12	18	295,9	59,98	41,36
PCL/COL6	+	-	+	0,5	19:1	12	15	290,2	54,45	60,14
PCL/COL7	-	+	+	0,3	9:1	12	14	263,0	58,43	35,31
PCL/COL8	+	+	+	0,5	9:1	12	12	327,4	49,78	57,84

Tabla 10. Relación entre las variables de estudio y las variables respuesta del diseño estadístico para las formulaciones de PCL/COL

Para los valores de grado de adhesión, el coeficiente de determinación del modelo fue de R^2 0,8452, este valor infiere que la variable respuesta se ajusta al modelo de estudio, indicando el grado de relación que existe entre la varianza de la regresión del modelo y la varianza de la variable respuesta. Con nivel de significancia de 0,01541 se rechaza la hipótesis nula y se afirma que existe una asociación entre las variables y la respuesta del estudio, en este caso la variable que más presenta significancia en la respuesta es la concentración total del andamio, indicando que los andamios de menor concentración total favorecen la adhesión celular en los andamios.

Para los valores de diámetro de fibra, el coeficiente de determinación del modelo fue de R^2 0,6399, valor que se aleja de la linealidad del modelo, por lo cual se infiere que la variable respuesta no tuvo un buen ajuste al modelo de estudio. Con un nivel de significancia de 0,2216 se acepta la hipótesis nula que supone que no existe una asociación entre las variables y la respuesta del estudio, infiriendo que la variable de diámetro de fibra es independiente a los parámetros del modelo de estudio.

Respecto al porcentaje de porosidad, el coeficiente de determinación del modelo fue de R^2 0,9171, este valor indica que la variable respuesta se ajusta al modelo de estudio. La variable de estudio que más que más afecta la variable respuesta es volumen de solución electrohilada indicando que los volúmenes más bajos de solución permiten un mayor porcentaje de porosidad en el andamio. Con nivel de significancia de 0,01253 se rechaza la hipótesis nula y se afirma que existe una asociación entre las variables y la respuesta del estudio.

Para el valor de ángulo de contacto, el coeficiente de determinación del modelo fue de R^2 0,8112 este valor sugiere que la variable respuesta se ajusta al modelo de estudio. En los niveles máximos de volumen de solución electrohilada y concentración total del andamio se presenta un incremento en el ángulo de contacto presentó un nivel de significancia de 0,04245 se rechaza la hipótesis nula y se afirma que existe una asociación entre las variables y la respuesta del estudio.

Ejemplo 11. Evaluación de la eficiencia de encapsulación de las cápsulas cargadas con TGF- β 3

El TGF- β 3 es una proteína susceptible de perder su actividad con cambios de pH o temperatura leves.

Buscando una estrategia de liberación que minimizara el riesgo de desnaturalización de la proteína y que garantizara la presencia de la proteína por más tiempo se desarrolló la obtención de cápsulas mediante gelificación iónica por extrusión a partir de alginato de sodio debido a su bioseguridad y su inercia hacia proteínas encapsuladas.

Las cápsulas de alginato de calcio obtenidas por el método de extrusión presentaron un tamaño promedio de $1,56 \text{ mm} \pm 0,66 \text{ mm}$, el tamaño de las cápsulas es proporcional al calibre de la jeringa utilizado, las cápsulas mostraron una superficie lisa, uniforme con un fe $0,03 \pm 0,002$ que las catalogan como cápsulas con alto factor de esfericidad. La distribución de

tamaño uniforme y la alta esfericidad de las cápsulas se puede atribuir al control de las variables del proceso de gelificación iónica: concentración de la solución de alginato, distancia de caída de la gota y tiempo de inmersión en CaCl_2 .

El alginato es un polisacárido aniónico, mientras que el factor de crecimiento transformante $\beta 3$ presenta carga positiva, el cual puede interactuar electrostáticamente con la cadena del polímero, permitiendo que el factor quede físicamente inmovilizado en las cápsulas del polisacárido. Esta interacción química garantiza la conservación de las propiedades biológicas del factor al someter las cápsulas a agentes ambientales o cambios de temperatura. La membrana permeable de las cápsulas y la degradación del polímero permitió que el factor de crecimiento inmovilizado se solubilizara en medios polares y se liberara en el tiempo.

Se analizó el total de proteína en el sistema para inferir la cantidad que debería estar presente en cada cápsula de alginato de calcio, para lo cual se suspendieron 500 ng de TGF- $\beta 3$ en 200 μL de solución de alginato de sodio, luego de la gelificación iónica se calculó que por cada 200 μL de solución se obtienen 40 cápsulas de alginato de calcio que contienen 12,5 ng de TGF- $\beta 3$ por cada cápsula. Se adicionaron 5 cápsulas por cm^2 de andamio, obteniendo una concentración teórica de 62,5 ng de TGF- $\beta 3$ por andamio.

Se cuantifico la cantidad encapsulada de TGF- $\beta 3$ en las cinco cápsulas por medio de cuantificación por ELISA, adicionando ácido cítrico a un pozo generando la ruptura de las cápsulas y cuantificando la cantidad total del factor en la solución, obteniendo este valor experimental y conociendo el valor teórico. La eficiencia de encapsulación (%EE) mediante la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{42745,1 \text{ pg/mL}}{62500 \text{ pg/mL}} \times 100$$
$$\%EE = 68,39\%$$

Ejemplo 12. Adición de las cápsulas cargadas de TGF- β 3 en los andamios de PCL/COL

Luego de evaluar las características descritas en el Ejemplo 10 y la viabilidad celular se escogió la formulación PCL/COL 1 para hacer la adición de las microcápsulas cargadas del factor de crecimiento transformante TGF- β 3 y evaluación de la adición de las cápsulas cargadas con TGF- β 3 en el andamio.

Ejemplo 13. Método de obtención del andamio PCL-COL/ TGF- β 3

Para los efectos de la presente invención el andamio ejemplificado a continuación se encuentra con el factor de crecimiento transformante (TGF- β 3) encapsulado.

a- Electrohilado de la membrana: Se disolvieron los polímeros en trifluoroetanol a una concentración de 9% de peso total de los polímeros en la solución, donde 19 partes corresponden a PCL y 1 parte a COL. La solución se agitó magnéticamente a 500 rpm durante 6 horas a temperatura ambiente.

Cada solución se cargó en jeringas de 10 mL con aguja de punta roma con diámetro interno de 0,8 mm y se incorporó en el sistema de inyección (inyector NE modelo 4000 Syringe Pump Company) del equipo de electrohilado (fuente de alimentación HV 350R Unlimited Company Amherst). Para las soluciones de poli ϵ -caprolactona/Colágeno (PCL/COL) se aplicó un voltaje de 19 Kv, una distancia de la aguja al colector de 15 cm y un flujo de 0,6 mL/h.

También se fabricó un andamio control de solo policaprolactona, para ello a la solución de PCL al 9 %, se aplicó un voltaje de 19 KV, una distancia de la aguja al colector de 15 cm y se aumentó el flujo 1 mL/h debido al cambio de viscosidad que presentan la solución. Se utilizó un colector de cobre de 10x10 cm recubierto con aluminio. Transcurrido el tiempo de

homogenización de los polímeros en la solución, esta se cargó en una jeringa de 10 ml y se incorporó en el sistema de inyección del equipo de electrohilado. Las matrices poliméricas se obtuvieron a 19 Kv, 15 cm de distancia de la aguja al colector y un flujo constante de la solución de 0.6 mL/h. El proceso de electrohilado se llevó a cabo a temperatura ambiente con valores de humedad entre 50 y 55%. Los andamios se secaron al vacío durante 24 horas para eliminar posibles remanentes de solvente en las fibras.

- b- Encapsulación: Para la encapsulación se generaron tres soluciones:
- Solución de alginato de sodio (sal sódica de ácido algínico de algas pardas Sigma-Aldrich) (2% p/v): Se disolvieron 0,20 g alginato de sodio en 10 mL de agua ultra pura, esta solución se dejó bajo agitación magnética a 500 rpm durante 3 horas a 30°C, luego la solución homogénea se esterilizó por filtración en filtro de 0,45µm.
 - Solución de TGF-β3 (Sigma-Aldrich): se adicionaron 50µL de PBS que contenía 1% de BSA como proteína portadora a 500 ng para reconstituir el factor de crecimiento que se encuentra liofilizado, esta solución se agitó a 100 rpm por 10 min.
 - Solución de cloruro de calcio (Sigma-Aldrich) (3% p/v): se disolvieron 6 g de CaCl₂ en 200 mL de agua ultra pura esta solución se dejó bajo agitación magnética a 500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Las soluciones anteriores se almacenaron a 4°C previo a su uso, con el fin de evitar la desnaturalización del factor de crecimiento en la fabricación de las cápsulas.

Las cápsulas de alginato de calcio cargadas de TGF-β3 se obtuvieron por el método de extrusión como se describe a continuación:

Se mezclaron 50µL de solución de TGF-β3 con 200 µL de solución de alginato de sodio a 100 rpm por 30 min, esta solución se resuspendió varias veces para garantizar la completa homogenización. La suspensión espesa mixta se dejó caer a través de una aguja de 30G en

un vaso de precipitados que contenía 100 mL de solución de CaCl_2 que estaba bajo agitación magnética constante. Las cápsulas se formaron instantáneamente cuando la solución de alginato entró en la solución de CaCl_2 , se mantuvo la agitación por 30 min. Finalmente, se retiró el exceso de solución CaCl_2 , lavando las cápsulas con solución salina 0,9% tres veces y se almacenaron en PBS 1X hasta su uso.

La eficiencia de encapsulación (%EE) de TGF- β 3 en las cápsulas de alginato de calcio fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{m_e}{m_T} \times 100$$

Donde m_e corresponde a la cantidad de TGF- β 3 encapsulado (dato obtenido generando el rompimiento de las cápsulas en suspensión y cuantificando la cantidad de factor liberada), y m_T es la cantidad de TGF- β 3 adicionada a la solución de alginato de sodio. Datos mostrados en el Ejemplo 11.

c- Inmovilización de las cápsulas de factor en las membranas de PCL/COL: Para la introducción de las cápsulas de alginato de calcio cargadas con TGF- β 3 en los andamios, se utilizó un montaje de electrohilado vertical, en donde primero se electrohila 250 μL de una capa de solución polimérica, se ubican las cápsulas de 1,5 mm de diámetro sobre dicha membrana y se electrohila una nueva capa de 50 μL de solución polimérica, en donde las cápsulas quedan inmovilizadas en el andamio, en forma de sánduche. Los andamios se almacenaron en cámara húmeda a 4°C.

d- Disposición de la capa externa de células: Finalmente, a través de la siguiente metodología se cultivaron CEM-GW sobre el andamio:

Se irradiaron los andamios con rayos gamma con el fin de eliminar posibles patógenos presentes en las fibras. Simultáneamente, las CEM-GW en pase 4 se sembraron en frascos de cultivo T75 hasta alcanzar un 70 - 80% de confluencia. El desprendimiento de células adherentes se logró mediante una incubación de 5 minutos en tripsina al 0,05% - solución de

EDTA al 0,25%, a 37°C. Luego, las células se centrifugaron y el sedimento se suspendió en medio de cultivo fresco. Después, las células se sembraron sobre los andamios a una densidad de 5×10^4 células/cm² andamio.

Se observó adherencia y morfología celular durante el experimento, utilizando células transducidas con proteína verde-fluorescente (CEM-GW-GFP). La evolución de la adhesión celular de CEM-GW-GFP sobre los andamios se realizó mediante microscopía fluorescente invertida a los 24 h, 48 h, 15 días y 22 días y para el ensayo de liberación de factores 24h, 48h, 72h, 96h y 120h.

Ejemplo 14. Perfil de liberación de TGF-β3 en las cápsulas de alginato y en el andamio de PCL/COL

La cantidad de TGF-β3 liberado en el tiempo se cuantificó por medio del método ligando a enzima ELISA, con el fin de estimar el porcentaje de TGF-β3 liberado para cada tiempo con los datos experimentales obtenidos de la cuantificación. Una vez obtenida la cantidad de proteína en cada caso, se determinó la cantidad de este que se libera en cada tiempo.

Los cálculos se realizaron utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Proteína Liberada} = \frac{m(L)}{m(C)} \times 100$$

Donde:

$m(L)$: masa de TGF-β3 liberada por las cápsulas.

$m(C)$: masa de TGF-β3 en las cápsulas.

% Proteína liberada: TGF-β3 liberado por las cápsulas.

Tiempo (días)	PCAT (PCL/COL 1 con inmovilización de cápsulas de alginato de calcio con el factor de crecimiento)			Cápsulas+ TGF- β 3		
	m(L)	m(C)	% proteína liberada	m(L)	m(C)	% proteína liberada
1	10437,86	43403,56	24,04	5515,39	35924,34	15,35
2	17691,30	43403,56	40,76	12703,82	35924,34	35,36
3	23234,95	43403,56	53,53	17213,13	35924,34	47,91
4	28835,13	43403,56	66,43	24135,91	35924,34	67,18
5	34924,21	43403,56	80,46	35924,34	35924,34	100,00
6	40216,34	43403,56	92,65			
7	43074,34	43403,56	99,24			
8	43403,56	43403,56	100,00			

Tabla 11. Perfil de liberación de TGF- β 3 sobre el andamio PCAT vs cápsulas de TGF- β 3

Se evaluó la liberación en el tiempo de las cápsulas infiltradas en el andamio (PCAT) y las cápsulas directamente en el sistema de liberación (cápsulas+TGF- β 3). Así como se evidencia en la Figura 4 el TGF- β 3 encapsulado e incorporado en el andamio (PCAT) tuvo una duración en su liberación de 8 días, mientras que las cápsulas en suspensión mostraron una liberación del factor en 5 días, por lo que dichos resultados sugieren una ampliación en el tiempo de disponibilidad del factor incorporado al andamio.

Estas diferencias en el tiempo de liberación se pueden atribuir a que las perlas en el sistema PCAT presentan un refuerzo adicional, otorgado por las fibras de PCL/COL que recubren la perla, mientras que, para el sistema de las cápsulas en suspensión, la agitación constante del sistema de liberación y los regulares cambios de medio hacen que las cápsulas se debiliten y presenten posibles daños físicos.

Es bien sabido que los sistemas de liberación controlada deben tener una dosis máxima apropiada para el tejido donde se va a hacer el implante. Estudios alrededor del tema sugieren que para las terapias *in vivo* en reparación de tejido conectivo, las cantidades de TGF- β 3

puede estar dentro de un amplio rango de dosis desde 50-250 ng o 100 ng/mL hasta 5 µg/m. Sin embargo, la aplicación de dosis altas (> 900 ng/mL TGF-β3) se ha asociado con efectos secundarios como, por ejemplo, inflamación y erosión del tejido.

Por lo tanto, se evaluó la dosis máxima de TGF-β3 liberada para el andamio PCAT, la cual fue de 42745,13 ± 2525,90 pg/mL, que en comparación con las cápsulas que fue de 35924,34 ± 3108,19 pg/mL, los dos sistemas presentaban la misma cantidad de cápsulas, las diferencia entre las concentraciones se atribuye principalmente a la variabilidad del factor contenido en cada cápsula.

Luego de realizar los tres ajustes lineales consolidados en la siguiente tabla, se evidencia que los puntos experimentales que muestran un mayor ajuste a una línea recta, y que el valor del factor de correlación R² próximo a 1 corresponde a n= 0.

MATERIAL	ORDEN CERO $\frac{mL(\frac{pg}{mL})}{mC(\frac{pg}{mL})}$		PRIMER ORDEN $\frac{mL(\ln(\frac{pg}{mL}))}{mC(\ln(\frac{pg}{mL}))}$		SEGUNDO ORDEN $\frac{mL(\frac{1}{\frac{pg}{mL}})}{mC(\frac{1}{\frac{pg}{mL}})}$	
	R ²	K	R ²	K	R ²	K
PCAT	0,9657	0,1137	0,8869	0,0181	0,7438	-0,3805
Cápsulas	0,9713	0,2011	0,9557	0,0418	0,646	-0,0007

Tabla 12. Cinética de liberación del TGF-β3

Por lo tanto, la cinética de liberación es de orden 0 y la constante cinética es la siguiente:

$$k = 0,1137 \left(\frac{pg}{ml}\right)/día \text{ Para el andamio con cápsulas infiltradas en el andamio y}$$

$$k = 0,2011 \left(\frac{pg}{ml}\right)/día \text{ Para las cápsulas en suspensión.}$$

Lo que sugiere que para el sistema PCAT en un día se libera el 11,37% del total de TGF- β 3 y para las cápsulas cargadas de TGF- β 3 se libera 20,11% diario del total de TGF- β 3 encapsulado.

La cinética de liberación de orden cero se refiere a la posibilidad de prolongar la presencia de la proteína sin aumentar la dosis en el tiempo. En una dosificación tradicional, tras la administración de una dosis de proteína, la concentración alcanza un máximo a partir del cual esta disminuye hasta que la proteína haya sido utilizada por completo.

En vista de lo anterior, la encapsulación en alginato de calcio resultó ser una metodología adecuada en la entrega controlada del factor de crecimiento en el tiempo, el uso de un soporte polimérico para adicionar las cápsulas ayuda a preservar por más tiempo la liberación del factor, principalmente por las posibles interacciones electrostáticas que se pueden presentar debido a la naturaleza aniónica del alginato y catiónica de la proteína, esto sumado al soporte adicional otorgado por las fibras que recubren las cápsulas, actuando como una barrera protectora adicional.

Así entonces para el andamio PCAT la liberación fue en ocho días con un orden de reacción 0 y una constante de liberación de $226,73 \left(\frac{pg}{ml}\right)/h$, se comparó con la liberación de las cápsulas en suspensión, para las cuales hubo un tiempo de liberación de 5 días con una constante de liberación de $301,04 \left(\frac{pg}{ml}\right)/h$.

Ejemplo 15. Seguimiento del andamio de PCL/COL 1 con adición de cápsulas de alginato de calcio cargadas con TGF- β 3

Posterior a la inmovilización de las cápsulas cargadas con TGF- β 3 en el andamio PCL/COL se realizó nuevamente un seguimiento por microscopía de fluorescencia con células CEM-GW-GFP en donde se evaluaron tiempos más cortos (24h, 48h, 72h, 96h y 120h) que los tenidos en cuenta para los ensayos de adhesión celular desarrollados sobre las membranas.

La evaluación de la proliferación celular, se llevó a cabo como se muestra en la Figura 5, en tres condiciones diferentes 1) para el andamio de PCL/COL 1 (PC), 2) para el andamio PCL/COL 1 con cápsulas de alginato de calcio inmovilizadas en las fibras (PCA), y 3) para el andamio PCL/COL 1 con cápsulas de alginato de calcio cargadas con TGF- β 3 inmovilizadas en las fibras (PCAT).

No se evidencian diferencias significativas en cuanto a proliferación de CEM-GW-GFP para los andamios de PCA, infiriendo que el alginato de calcio no genera citotoxicidad, por lo que presenta una respuesta de proliferación positiva.

Para el caso de PCAT, este andamio presenta una liberación en el tiempo de TGF- β 3, que es evidente por el progresivo aumento de proliferación de las CEM-GW-GFP, debido a que el TGF- β 3 desempeña una función esencial en los procesos de reparación y regeneración de los tejidos, ya que desencadenan efectos biológicos como la proliferación, celular, la generación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y la migración celular (quimiotaxis).

Ejemplo 16. Análisis de proliferación celular de las células CEM-GW por ensayo de resazurina

Se evaluó *in vitro* la proliferación celular mediante seguimiento de microscopía de fluorescencia y el método de reducción de resazurina, con la finalidad de establecer la citotoxicidad relativa de los materiales utilizados para la conformación de los andamios.

Debido a la propiedad de las células vivas por mantener un ambiente reductor dentro de su citoplasma y mitocondrias, es posible emplear un agente redox como el indicador resazurina que cambia de la forma oxidada (azul) a la forma reducida (roja).

Los valores de absorbancia se trataron con la siguiente ecuación para obtener el % de reducción de resazurina.

$$\frac{(\varepsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 - (\varepsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 \text{ muestra}}{(\varepsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 - (\varepsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 \text{ control de crecimiento positivo}} \times 100$$

Con los datos obtenidos del lector de placas ELISA y aplicando la ecuación descrita se realizó el análisis de la proliferación celular sobre los andamios de PC, PCA y PCAT, en donde como se especificó en el Ejemplo 15 y la Figura 5, PC se refiere a PCL/COL 1, PCA a PCL/COL 1 con inmovilización de cápsulas de alginato de calcio sin el factor de crecimiento y PCAT a PCL/COL 1 con inmovilización de cápsulas de alginato de calcio con el factor de crecimiento.

	PC (%)	PCA (%)	PCAT (%)
12 h	45,31±2,68	45,56±5,10	49,22±3,33
24 h	44,77±7,23	56,91±7,15	65,17±1,51
48 h	56,68±7,73	52,45±3,79	66,09±9,65
72 h	62,85±6,57	60,66±6,03	75,18±4,96

Tabla 13. Viabilidad de las células CEM-GW sobre los andamios PC, PCA y PCAT

El análisis de proliferación muestra que los andamios PCAT con el TGF-β3 encapsulado presentan una diferencia significativa en la proliferación celular con respecto los demás andamios (Fig. 5), esto debido a que el factor de crecimiento transformante humano β3 (TGF-β3) es una proteína bio-activa multifuncional generalmente involucrada en la regulación, proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de muchos tipos diferentes de células. Es también un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular (MEC) por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales; además, induce la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de matriz extracelular.

Las imágenes de fluorescencia y el análisis de reducción indican que el factor de crecimiento transformante β3 encapsulado en alginato de calcio no perdió su bioactividad durante la preparación de las cápsulas ni en el proceso de esterilización de los andamios.

Ejemplo 17. Evaluación del perfil secretor de factores en las CEM-GW sobre los andamios

Las CEM-GW se cultivaron sobre los andamios de i) policaprolactona/colágeno (PCL/COL), ii) PCL/COL con cápsulas de alginato sin TGF- β 3 (PCA) y iii) PCL/COL con cápsulas de alginato con TGF- β 3 (PCAT).

Una vez cultivadas las CEM-GW sobre los andamios de PC, PCA y PCAT se colectó el sobrenadante hasta las 12, 24, 48, 72 y 96 de cultivo, se aclaró mediante una centrifugación de 6 minutos a 1200 rpm, y se almacenó a -20°C hasta su uso. Finalmente se evaluó la producción de TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, PDGF $\alpha\alpha$, FGF-b, HGF, EGF, VEGF-AA y angiopoyetina I mediante un inmunoensayo basado en microesferas magnéticas. Luminex LxSAHM R&D Systems Minneapolis, Canadá, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, para la activación de TGF- β , se tomaron alícuotas de 100 μ L de muestra recogida para cada tiempo y cada donante, a este medio se le añadió 25 μ L de HCL 1N, luego 25 μ L. NaOH/HEPES, cada solución se disolvió en 200 μ L de medio acondicionado y se adicionan 100 μ L de muestra tratada a la placa de 96 pozos. Sin embargo, para la detección de los otros factores se tomaron alícuotas de 50 μ L se colocan directamente en la placa de 96 pozos. Luego de colocadas las muestras, se adiciona 50 μ L de micropartículas magnéticas, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación constante.

Terminado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados a la placa y en seguida se adicionó una mezcla de anticuerpos de biotina y se incubó durante una hora a temperatura ambiente, después del lavado, se añadió estreptavidina-PE a las micropartículas durante 30 minutos y se incubó nuevamente a temperatura ambiente. Las micropartículas se lavaron y se re-suspendieron antes de leerlas en el Luminex/100. Los datos se trataron con el software GraphPad prism 7, para observar el comportamiento de las citoquinas a lo largo del tiempo para cada andamio.

El perfil de secreción para TGF- β 1 (Fig. 6A) muestra que existe una concentración considerable, de aproximadamente 9213,20 μ g/mL de este factor. En los diferentes andamios existe una tendencia de consumo de este factor presente en el medio de cultivo.

El TGF- β 3 solo se presenta en los andamios con factor encapsulado, debido a que las CEM-GW no producen este factor (Fig. 6C). TGF- β 1 tiene un espectro muy amplio de funciones, las cuales dependen del estado de activación celular, de su concentración, del equilibrio de expresión de otras citoquinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa.

En cuanto a los perfiles de secreción para el TGF- β 2 (Fig. 6B) en el tiempo mostró diferencias significativas en la secreción según el soporte de cultivo, es notable un marcado incremento en la secreción de este factor en los andamios de PCAT.

El andamio PCAT mostró diferencias significativas respecto a los demás andamios, debido a que el TGF- β 3 encapsulado induce otros eventos intracelulares, tales como la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular.

En la Figura 7E y B se puede observar que los andamios cultivados con células van consumiendo los factores, generando una tendencia de disminución de los mismos en el tiempo. Las células en las diferentes matrices siguen un comportamiento similar de aprovechamiento, que se relaciona directamente con la proliferación celular. En concordancia con los datos obtenidos para el porcentaje de viabilidad relativa de las matrices poliméricas por el ensayo de resazurina (Fig. 5), donde se observa el aumento en la actividad metabólica celular sobre los andamios a lo largo del tiempo, con una diferencia significativa para la membrana de TGF β 3 luego de las 72 h (p-valor 0,009), atribuido a la presencia del factor de crecimiento transformante humano β 3 (TGF- β 3) que es una proteína bio-activa multifuncional involucrada en los procesos de proliferación, migración y supervivencia celular (Tang, Q.O., et al. TGF- β 3: a potential biological therapy for enhancing chondrogenesis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2009. **9**(6), 689-701), (Lebrin, F., et

al. TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovascular research*, 2005. **65**(3), 599-608).

En la Figura 7F, se observa una producción de VEGFaa en los andamios sin TGF- β 3 aunque menor. Lo más relevante, es la reducción del factor ante la presencia de TGF- β 3, debido principalmente a que el VEGFaa además de ser un factor angiogénico estimula la epitelización y la producción de colágeno (Zografou, A., et al. Improvement of skin-graft survival after autologous transplantation of adipose-derived stem cells in rats. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 2011. **64**(12),1647-1656), (Capla, J.M., et al. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006. **117**(3).836-844), (Bao, P., et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*, 2009. **153**(2), 347-358).

La hiperactividad de este factor causa un exceso en su acumulación sobre la matriz extracelular y fibrosis, por lo cual se presenta una aparente inhibición de la producción de VEGFaa cuando hay una aplicación exógena de TGF- β 3, principalmente debido a que este es un factor antifibrótico que modula la producción y deposición de colágeno principalmente tipo I asociado con mejores resultados de curación de heridas y reducción de cicatrices (Tang, Q.O., et al. TGF- β 3: a potential biological therapy for enhancing chondrogenesis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2009. **9**(6), 689-701).

En la Figura 7C se observa que las CEM-GW cultivadas en la placa de poliestireno (control) presentan una producción constante de FGF-b, con un máximo de 60,79 pg/mL. Particularmente, en los andamios se presenta una inducción a la producción del factor, cuatro veces mayor que la del control, comportamiento que se evidencia en todas las matrices poliméricas, alcanzando valores de 272,74 pg/mL, este notable aumento se atribuye a la conformación superficial del polímero electrohilado y a la estructura microporosa que favorece la adhesión celular, la difusión de nutrientes, las expresiones de factores relacionadas a la reepitelización y la formación de vasos sanguíneos (Turnbull, G., et al. 3D

bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 2018. **3**(3), 278-314), (Gregor, A., et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *Journal of biological engineering*, 2017. **11**(1)3).

La presencia de este factor es muy importante durante la reparación de heridas ya que promueve la migración celular a través de receptores de superficie como las integrinas, durante la formación de tejido de granulación. Investigaciones previas han demostrado que el FGF-b participa en la inhibición del cambio fenotípico transitorio de los fibroblastos de tejido de granulación en miofibroblastos y regula su proceso de apoptosis, promoviendo la reparación del tejido sin formación de cicatrices (Shi, H., et al. The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair in vitro and in vivo. *PloS one*, 2013. **8**(4)), (Spyrou, G.E., et al. The effect of basic fibroblast growth factor on scarring. *British journal of plastic surgery*, 2002. **55**(4), 275-282), (Akasaka, Y., et al. Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2004. **203**(2), 710-720). Además, modula la producción de colágeno tipo I y III e interviene en la deposición del mismo acelerando los procesos de cicatrización (Shi, H., et al. The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair in vitro and in vivo. *PloS one*, 2013. **8**(4)). Estas características, catalogan al FGF-b como un agente terapéutico promisorio para los procesos de regeneración de tejido cutáneo.

En la Figura 7A se observa que, aunque hay angiopoyetina en el medio, a las 24 horas las células del control empiezan a producirla, mientras que las células cultivadas sobre los andamios la empiezan a producir luego de las 96 horas. La angiopoyetina I estimula la formación de tejido de granulación al actuar como quimioatrayentes para neutrófilos, macrófagos y fibroblastos, por lo tanto, son moduladores importante de la angiogénesis durante la cicatrización de heridas mediante la regulación celular. Este factor es aprovechado del contenido de promedio de angiopoyetina I presente en el medio que corresponde a 7272,96 pg/mL durante las primeras 72 h de cultivo.

En la Figura 7D se observa una alta producción del HGF en el control con un valor de producción máximo de 15754,414 pg/mL a las 96 h, como en las células cultivadas en los andamios y no hay diferencias significativas (p-valor = 0,7045), lo cual indica que los andamios no inhiben la producción del factor con respecto a las células cultivadas sobre la placa de cultivo. El HGF desempeña un papel promotor en la regeneración, protección y homeostasis de los tejidos (Matsumoto, K., et al. HGF–Met pathway in regeneration and drug discovery. *Biomedicines*, 2014. **2**(4),275-300). Además, tiene un papel inhibidor en la progresión de la inflamación crónica y es un factor antifibrótico involucrado en los procesos de dediferenciación de las células epidérmicas (Li, J., et al. HGF accelerates wound healing by promoting the dedifferentiation of epidermal cells through-integrin/ILK pathway. *BioMed research international*, 2013).

Por lo anterior se puede inferir que la secreción de factores por las CEM-GW puede variar sustancialmente dependiendo de la composición del material con el que se fabrica el andamio y la adición de proteínas o péptidos conjugados. Estudios previos afirman que los biomateriales usados para elaborar andamios pueden modificar el comportamiento de las CEM en cultivo, debido a los cambios en el microambiente que le proporciona el andamio (Lane, S.W. D.A. Williams et al., Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature biotechnology*, 2014. **32**(8), 795), (Anderson, H., et al. Mesenchymal stem cell fate: applying biomaterials for control of stem cell behavior. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2016. **4**, 38). Ciertos materiales se usan en la estimulación de estas células para controlar la diferenciación y/o la producción de factores para un linaje celular particular (Qazi, T., et al. Biomaterials that promote cell-cell interactions enhance the paracrine function of MSCs. *Biomaterials*, (2017) **140**, 103-114).

A continuación, se muestra la cuantificación de la producción de factores de las CEM-GW sobre los andamios:

La producción de factores en (pg/mL) a las 72 horas de cultivo celular sobre los andamios, el control son las células sobre la placa de cultivo

	PC	PCA	PCAT	Control
PDGF$\alpha\alpha$	282,51 $\pm$ 214,55	190,24 $\pm$ 113,31	536,45 $\pm$ 490,90	202,29 $\pm$ 167,06
EGF	8,91 $\pm$ 1,37	8,26 $\pm$ 3,17	3,91 $\pm$ 1,50	6,13 $\pm$ 3,78
FGFβ	266,95 $\pm$ 139,52	209,53 $\pm$ 59,69	347,80 $\pm$ 43,92	37,66 $\pm$ 28,04
VEGF	88,69 $\pm$ 64,41	75,23 $\pm$ 52,83	17,66 $\pm$ 7,26	780,04 $\pm$ 12,75
Ang I	7707,98 $\pm$ 3999,47	7404,85 $\pm$ 866,40	5718,52 $\pm$ 1089,40	10465,40 $\pm$ 2661,47
HGF	4503,19 $\pm$ 3146,43	6331,13 $\pm$ 2752,01	3331,62 $\pm$ 835,14	8253,33 $\pm$ 577,35
TGF-β1	10799,01 $\pm$ 3094,89	9583,60 $\pm$ 1571,14	10758,38 $\pm$ 1366,67	10294,13 $\pm$ 1775,48
TGF-β2	33,41 $\pm$ 14,73	25,04 $\pm$ 16,44	355,39 $\pm$ 43,37	95,19 $\pm$ 20,97
TGF-β3	0	0	24524,66 $\pm$ 2117,57	0

Tabla 14. Cuantificación de la producción de factores producidos por las CEM-GW sobre los andamios

Con los resultados evidenciados en los ejemplos queda demostrado que los andamios PCAT son viables para la generación de un andamio con CEM y los resultados obtenidos sugieren que los andamios generados podrían ser un posible sustituto de piel, que a largo plazo se podrían emplear en el tratamiento de lesiones cutáneas ocasionadas por quemaduras, úlceras diabéticas y/o vasculares.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un andamio de poli(ϵ -caprolactona)-colágeno (PCL/COL) que comprende cápsulas de factor de crecimiento transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) y su método de elaboración por medio de la técnica de electrohilado. El andamio de la presente invención constituye una matriz polimérica para la adhesión, mantenimiento y proliferación de células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW), como estrategia terapéutica en la regeneración de tejido.