

ANDAMIOS PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN MEDIANTE ELECTROHILADO DE LOS MISMOS

DESCRIPCIÓN

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la medicina, más específicamente al campo de la biomedicina, aún más específicamente andamios para la regeneración de tejidos y un procedimiento de obtención mediante electrohilado de los andamios.

La invención tiene aplicación en ingeniería tisular y terapia regenerativa.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

Las heridas de la piel tales como úlceras por presión, no presentan un ambiente propicio para que las células circundantes a estas heridas complejas puedan migrar y reparar el tejido apropiadamente, lo que conlleva a una sanación incompleta o inexistente en muchos casos.

20

El uso de biomateriales en Ingeniería de Tejidos ha tenido un importante impacto en los últimos años a partir de diferentes combinaciones de materiales y técnicas, con el fin de proporcionar a las células un soporte con integridad estructural y suministro de agentes biológicos que favorezca un microambiente específico del tejido, regule las funciones celulares y acelere los procesos de cicatrización (Lizarazo-Fonseca, L., Prieto, E. M., Graziano, R. V., Camacho, B., Salguero, G., & Cote, I. S. (2019). Andamios eletrohilados de poli (ϵ -caprolactona)/colágeno con uso potencial en regeneración de tejido cutáneo. Ciencia en Desarrollo, 10(2), 197-208.).

25

30

Se han descrito diferentes métodos de procesamiento de biomateriales que abarcan los hidrogeles, la impresión 3D , el electrohilado , entre otros. El electrohilado se ha mostrado como una técnica prometedora en el campo de la regeneración de piel debido a la biomímesis de las fibras con la estructura de la matriz extracelular.

35

El electrohilado es una técnica que ofrece una excelente relación volumen-área, permite obtener fibras con diámetros que van desde tamaños submicrométricos a escalas

nanométricas, es versátil e implica bajos costos de procesamiento.

Para esta técnica se pueden usar una amplia gama de materiales poliméricos, tanto naturales como sintéticos utilizados para fabricar andamios por esta técnica, entre ellos se encuentran: el poliácido láctico (PLA), el poli(ácido glicólico) (PGA) , el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), la poli (ϵ -caprolactona) (PCL) y polímeros naturales como el colágeno y el quitosano.

Estos polímeros se pueden preparar, de forma individual y en mezcla de polímeros naturales con sintéticos, con el fin de mejorar las propiedades de los andamios, teniendo en cuenta el sitio de implantación (Lizarazo-Fonseca, L., et al. (2019)).

Específicamente, en el estado de la técnica es conocido el uso de la policaprolactona para la generación de andamios biosintéticos por medio de electrohilado. Sin embargo, la policaprolactona presenta una excesiva hidrofobicidad lo que dificulta la atracción y crecimiento de las células.

En este sentido, Gautam y colaboradores (S Gautam, A. K. Dinda, and N.C. Mishra, *"Fabrication and characterization of PLC/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method"* Material Sci. Eng. C., vol 33 N°3, pp 1228-1235, 2013, doi:10.1016/j.msec.2012.12.015) combinaron la policaprolactona con gelatina para hacer andamios electrohilados y soportar el crecimiento de fibroblastos. Encontraron que dicha combinación era apta para permitir el crecimiento de las células mencionadas y, por lo tanto, tiene un gran potencial en la regeneración de tejidos como la piel. Usaron como solventes para la solución polimérica una mezcla de cloroformo, metanol y ácido acético.

Dorati y colaboradores (R. Dorati et al., *"Study on hydrophilicity and degradability of chitosan/poly(lactide-co-polycaprolactone) nanofibre blend electrospun membrane"*, Carbohydrate Polymers, Volume 199, 1 November 2018, Pages 150-160) hicieron una solución con un copolímero de policaprolactona y ácido poliláctico junto con quitosano en una mezcla de cloruro de metileno y dimetilformamida como solventes, la cual electrohilaron y obtuvieron andamios homogéneos. Vieron que fibroblastos de ratón se mantuvieron viables en estos andamios hasta 3 días.

Bakhsheshi y colaboradores (H.R. Bakhsheshi-Rad et al., *"Antibacterial activity and in vivo wound healing evaluation of polycaprolactone-gelatin methacryloyl-cephatexin*

electrospun nanofibrous" Materials Letters, Volume 256, 1 December 2019, 126618) electrohilaron exitosamente policaprolactona con metacrilato de gelatina. Los andamios obtenidos los lograron cargar con cefalexina para darles propiedades antibacterianas.

- 5 Zheng y colaboradores (Zheng, W., Wang, Z., Song, L., Zhao, Q., Zhang, J., Li, D., & Kong, D. (2012). "*Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model.*" Biomaterials, 33(10), 2880-2891) fabricaron injertos tubulares de pequeño diámetro (2,2 mm) mediante electrohilado de policaprolactona polimérica biodegradable, seguido de un recubrimiento superficial funcional con el péptido RGD.

- Alazzawi y colaboradores (Alazzawi, M., Kadim Abid Alsaheb, N., & Turkoglu Sasmazel, H. (2021). "*Core/Shell Glycine-Polyvinyl Alcohol/Polycaprolactone Nanofibrous Membrane Intended for Guided Bone Regeneration: Development and*
- 15 *Characterization.*" Coatings, 11(9), 1130) desarrollaron una membrana nanofibrosa compuesta de policaprolactona como cubierta y polivinil alcohol:Gly como núcleo, utilizando la técnica de electrohilado coaxial, caracterizándola morfológica, mecánica, física, química y térmicamente, destinada a la regeneración ósea guiada.

- 20 El documento CN110507860A hace referencia a un método para preparar vasos sanguíneos obtenidos por ingeniería tisular in situ y a la estructura resultante de dicho método. En diversas de las etapas del método y capas de la estructura generada se contempla el uso de la policaprolactona y el electrohilado de la misma.

- 25 Por su parte el documento US10245353B2 da a conocer un material de andamiaje biológico electrohilado hidrofílico que se prepara mezclando una solución acuosa de fibrinógeno y L-arginina o clorhidrato de la misma con una solución de Poly(L-lactido-co-epsilon-caprolactona) [P(LLA-CL)].

- 30 Por su parte, el documento WO19144741A1 hace referencia a un material de andamiaje que incluye un material de esqueleto fibroso cargado, el cual está cubierto con materiales biocompatibles cargados positivamente superpuestos alternativamente y materiales biocompatibles cargados negativamente mediante atracción electrostática. Las fibras se preparan mediante electrohilado y/o impresión 3D, obtenidas por
- 35 tratamiento de modificación de carga, que constituyen el material del esqueleto fibroso. Se contempla que la fibra sea un material polimérico biocompatible, que puede ser un material polimérico sintético orgánico y/o un material biopolimérico natural. Como

material polimérico sintético se menciona la policaprolactona.

El documento CN103520769A da a conocer un material de andamiaje de ingeniería de tejidos modificado utilizando factor de crecimiento (factor de crecimiento mecano, MGF) o su péptido E (MGF-Ct24E), compuesto de ácido poli L-láctico (PLLA) o policaprolactona (PCL) o una combinación de los mismos, que promueve la reparación de tejidos, particularmente la reparación de huesos, músculos, vasos sanguíneos y otros tejidos. El andamio de nanofibras PLLA, PCL o PLLA/PCL descrito se prepara mediante tecnología de electrohilado, y entrecruzando el factor de crecimiento MGF o MGF-Ct24E con el andamio de nanofibras obtenido.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad en el estado de la técnica de disponer de andamios mejorados, con mejores propiedades físicas (incluida, hidrofiliidad y morfología de las fibras) que permitan la atracción o migración y proliferación de células y que puedan ser utilizados para la regeneración tisular, más preferentemente la curación o reparación de heridas, incluso en situaciones adversas, tales como úlceras diabéticas o úlceras por presión.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra el espectro de espectroscopía infrarroja (FTIR) obtenido para cuatro formulaciones de andamios distintos: una de policaprolactona sola y tres de policaprolactona con distintos porcentajes en peso de glicina: 5%, 10% y 20%. Adicionalmente se realizó el espectro para polvo de glicina sola.

La figura 2 muestra los resultados de difracción de rayos X (DFRX) de la glicina sola (a) y de cuatro formulaciones de andamios distintos (b): una de policaprolactona sola y tres de policaprolactona con distintos porcentajes en peso de glicina: 5%, 10% y 20%.

La figura 3 muestra los resultados de ángulo de contacto (θ) a tiempo 0 frente al contenido de glicina (%) obtenidos para cuatro formulaciones de andamios distintos: una de policaprolactona sola (cuadrado) y tres de policaprolactona con distintos porcentajes en peso de glicina: 5% (circulo), 10% (triángulo) y 20% (triángulo invertido).

La figura 4 corresponde a los resultados obtenidos por microscopía electrónica de barrido (SEM) (5000x) para un andamio de policaprolactona.

La figura 5 corresponde a los resultados obtenidos por SEM (5000x) para un andamio preparado con una solución de policaprolactona y 5% de glicina.

5 La figura 6 corresponde a los resultados obtenidos por SEM (5000x) para un andamio preparado con una solución de policaprolactona y 10% de glicina.

La figura 7 corresponde a los resultados obtenidos por SEM (5000x) para un andamio preparado con una solución de policaprolactona y 20% de glicina.

10 La figura 8 corresponde a los resultados obtenidos por SEM (1000x) para un andamio preparado con una solución de policaprolactona y 10% de glicina.

La figura 9 corresponde a los resultados obtenidos por SEM (1000x) para un andamio preparado con una solución de policaprolactona y 20% de glicina.

15

La figura 10 muestra los resultados obtenidos para cuatro formulaciones de andamios distintos: una de policaprolactona sola (cuadrado) y tres de policaprolactona con distintos porcentajes en peso de glicina: 5% (circulo), 10% (triángulo) y 20% (triángulo invertido), respecto al diámetro medio de fibra de los andamios en función de la cantidad de glicina presente en la solución utilizada para el electrohilado del andamio.

20

La figura 11 muestra los resultados obtenidos para cuatro formulaciones de andamios distintos: una de policaprolactona sola (cuadrado) y tres de policaprolactona con distintos porcentajes en peso de glicina: 5% (circulo), 10% (triángulo) y 20% (triángulo invertido), respecto a la porosidad de los andamios en función de la cantidad de glicina presente en la solución utilizada para el electrohilado del andamio.

25

La figura 12 muestra los resultados obtenidos para cuatro formulaciones de andamios distintos: una de policaprolactona sola (cuadrado) y tres de policaprolactona con distintos porcentajes en peso de glicina: 5% (circulo), 10% (triángulo) y 20% (triángulo invertido), respecto al Módulo de Young de los andamios en función de la cantidad de glicina presente en la solución utilizada para el electrohilado del andamio.

30

35 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un andamio biosintético obtenido mediante el

electrohilado de policaprolactona y glicina, que permiten la atracción y proliferación celular, lo que hace que las células circundantes al andamio ayuden de forma efectiva a la reparación de las lesiones y heridas, incluso en situaciones adversas, tales como úlceras diabéticas o úlceras por presión.

5

La incorporación de la glicina en el andamio mejora la hidrofiliidad del material y la morfología de las fibras haciéndolas más delgadas. Adicionalmente, dado que la glicina es electrohilada juntamente con la policaprolactona, gracias a los parámetros usados en dicho procedimiento de electrohilado la glicina cambia su conformación estructural de Alfa (α) a Gamma (γ), mejorando así la adhesión y viabilidad de distintos tipos celulares.

10

En consecuencia, el andamio biosintético de la presente invención permite solucionar los problemas existentes en el estado de la técnica y mencionados anteriormente.

15

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un andamio que comprende policaprolactona ($C_6H_{10}O_2$)_n y glicina ($C_2H_5NO_2$), caracterizado porque el andamio se prepara mediante electrohilado conjunto de la policaprolactona y la glicina, y la glicina presenta una conformación estructural gamma.

20

El hecho de que el electrohilado de la policaprolactona y la glicina sea conjunto permite que la glicina quede efectivamente incluida en las fibras generadas. Esta inclusión de la glicina en las fibras electrohiladas de policaprolactona permite mejorar la hidrofiliidad y morfología de dichas fibras (las hace más delgadas y con morfología similar a la presente en la piel humana), lo que contribuye a que el andamio de la presente invención genere un ambiente idóneo para que una vez aplicada, las células circundantes puedan migrar, proliferar y ayudar en la reparación de lesiones, preferentemente heridas.

25

Adicionalmente, tal y como se ha indicado anteriormente el electrohilado conjunto permite que la glicina cambie su conformación estructural de alfa a gamma (el cambio se produce por la tensión a la que se ve sometida la glicina durante el proceso de electrohilado). Este hecho permite mejorar la adhesión y la viabilidad de diversos tipos celulares.

30

Preferentemente, las fibras del andamio de la presente invención son nanométricas y/o submétricas, más preferentemente nanométricas y submicrométricas. Más preferentemente, las fibras presentan un diámetro medio inferior a 300nm; más preferentemente las fibras presentan un diámetro medio inferior a 300 nm y superior a

35

100 nm; más preferentemente las fibras presenta un diámetro medio entre 275 nm y 100 nm; aún más preferentemente las fibras presentan un diámetro medio entre 160 y 140 nm.

- 5 Durante el proceso de electrohilado, una combinación de los grupos amino de la glicina generan una conductividad mayor en la solución y la diferencia de potencial (voltaje) aplicada durante el proceso, hacen que las fibras se alarguen y se hagan más delgadas con respecto a las fibras comunes de policaprolactona, esto hace que el andamio tenga una morfología similar a la que tiene la piel naturalmente. Sumado a lo anterior, la glicina
10 mejora la adhesión, viabilidad y proliferación celular en los andamios, efecto que es deseable en la reparación o regeneración de piel.

En una realización preferente, del andamio de la presente invención presenta una porosidad de al menos el 60%; más preferentemente de entre el 60% y el 90%; más
15 preferentemente de entre el 60% y el 69%; aún más preferentemente entre el 63% y el 67%.

También de forma preferente, el módulo de Young del andamio de la presente invención es de al menos 20 MPa, más preferentemente al menos 25 MPa, más preferentemente
20 al menos 30 MPa, más preferentemente entre 22,5 MPa y 52,5 MPa, aún más preferentemente entre 30 MPa y 47,5 MPa.

Preferentemente, el ángulo de contacto (θ) con el agua a tiempo 0 segundos del andamio de la presente invención inferior a 150, más preferentemente inferior a 140,
25 más preferentemente entre 140 y 100, aún más preferentemente entre 120 y 100.

El andamio de la presente invención presenta una estructura interna rugosa, preferentemente con perlas que facilita la adhesión y crecimiento de las células, más preferentemente los diámetros de las perlas son entre 3 y 8 μm . Esta estructura interna
30 viene dada por el efecto de la incorporación de la glicina en la manera explicada anteriormente.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención mediante electrohilado del andamio de la presente invención, que comprende
35 las siguientes etapas:

- a) Preparación de la solución polimérica de policaprolactona y glicina.
- b) Electrohilado de la solución polimérica obtenida en la etapa a) para obtener el

andamio de la presente invención.

En la etapa a), preferentemente, se prepara una solución con policaprolactona y glicina en una proporción 8:2, más preferentemente a una concentración de al menos 10% p/v (peso/volumen) en un solvente orgánico, más preferentemente entre el 10% p/v y el 20% p/v, aún más preferentemente del 10% p/v. El solvente orgánico es, preferentemente, el trifluoroetanol para síntesis ($C_2H_3F_3O$).

Tras la preparación de la solución polimérica dicha solución se deja, preferentemente, en agitación, aún más preferentemente, al menos 10 horas a 550-800 rpm y 50-65°C.

En la etapa b), preferentemente, la solución polimérica obtenida en la etapa a) se introduce en una jeringa con aguja de acero inoxidable. Esta jeringa se ubica en una bomba inyectora de jeringas la cual permitirá la dosificación controlada de la solución polimérica durante el electrohilado. Una placa de cobre recubierta con aluminio se ubica a 15cm de la punta de la aguja. Sobre esta placa se depositarán las fibras durante el electrohilado. Adicionalmente, una fuente de voltaje (preferentemente, con capacidad de proveer tensión eléctrica de hasta 30kV) se conecta a la aguja y a la placa colectora.

En una realización preferente, en la etapa b), la solución polimérica obtenida en la etapa a) se inyecta a una velocidad de 1 a 1,5 ml/h, preferentemente 1,3 ml/h, y se aplican entre 15-19kV de tensión eléctrica, preferentemente 17kV, (para volatilizar el solvente). El andamio obtenido presenta un color blanco.

Preferentemente, en la etapa b), tras el electrohilado, el andamio obtenido se debe dejar secar al menos 7 días a 37°C para obtener el andamio de la presente invención.

Se contempla que el andamio de la presente invención esté, preferentemente, en forma de membrana porosa. Esta membrana porosa sería apta para la infiltración celular y presentaría propiedades mecánicas adecuadas para la aplicación final del producto en, por ejemplo, la piel humana.

En una realización preferente la herida es una herida de la piel, más preferentemente, una herida aguda o crónica de la piel, aún más preferentemente, la herida es una úlcera diabética o una úlcera por presión.

En un aspecto final la presente invención se refiere a un método para la regeneración

tisular caracterizado porque comprende la administración de un andamio de la presente invención, a un paciente que necesite el tratamiento.

5 El andamio de la presente invención es de acuerdo a lo explicado anteriormente en la segunda realización de la presente invención.

Más preferentemente, en este aspecto final de la presente invención, la invención se refiere a un método para el tratamiento de una herida caracterizado porque comprende la administración de un andamio de la presente invención, a un paciente que necesite el tratamiento.

15 En una realización preferente la herida es una herida de la piel, más preferentemente, una herida aguda o crónica de la piel, aún más preferentemente, la herida es una úlcera diabética o una úlcera por presión.

El paciente que necesita el tratamiento es preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano.

20 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1. Procedimiento de obtención mediante electrohilado de un andamio de acuerdo con la presente invención

25 En el presente ejemplo se electrohicaron 4 formulaciones de andamios distintos, una de policaprolactona sola y 3 de policaprolactona con distintos porcentajes en peso de glicina: 5%, 10% y 20%. Adicionalmente se empleó una muestra de polvo de glicina sola.

30 Los parámetros de electrohilado utilizados para la fabricación de estos andamios fueron 17 kV, distancia entre la punta de la aguja y el colector de 15 cm y velocidad de inyección de 1,3 mL/h. A continuación, se exponen los resultados obtenidos para los andamios obtenidos.

35 **Resultados por espectroscopía infrarroja (FTIR)**

Para verificar que la policaprolactona y la glicina estaban presentes en las fibras y, por

lo tanto, se integraron adecuadamente en el andamio, se realizó una espectroscopía de infrarrojos (FTIR) utilizando la técnica de reflexión total atenuada (ATR) para los andamios y la técnica de pellets de KBr para la glicina. Los espectros del polvo de glicina y los andamios hechos de policaprolactona, y las mezclas de policaprolactona con 5%, 10% y 20% de glicina se muestran en Figura 1.

En los espectros obtenidos por FTIR la señal de 3180 cm^{-1} corresponde al estiramiento asimétrico del NH y la señal de 2100 cm^{-1} corresponde a giros del enlace NH_3 en el espectro de la α -glicina (T. P. Srinivasan, R. Indirajith, y R. Gopalakrishnan, “*Growth and characterization of α and γ -glycine single crystals*,” J. Cryst. Growth, vol. 318, no. 1, pp. 762–767, 2011, doi: 10.1016/j.jcrysgr.2010.11.117) una de las formas cristalinas de este aminoácido. En el espectro de la policaprolactona sola destacan los picos en los valores 2945 , 2865 y 1725 cm^{-1} , los dos primeros corresponden a vibraciones de enlaces CH_2 y el tercero a vibraciones de enlaces C=O (F. Rojo-Callejas, “*Tablas de Espectroscopía Infrarroja*,” Fac. Química - Dep. Programas Audiovisuales - Univ. San Carlos Guatemala, p. 11, 2000, [en línea]. Disponible el 22 de abril de 2022 en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_15437.pdf0Ahttp://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IRTablas_33080.pdf). Los cinco picos mencionados anteriormente están presentes en los tres espectros obtenidos de los andamios de la presente invención obtenidos con la mezcla de policaprolactona y glicina. En dichos andamios de la presente invención, además, se observa la aparición de un nuevo pico en el número de onda 3436 cm^{-1} , que está relacionado con el estiramiento simétrico de los enlaces NH, esto es característico de la γ -glicina (E. Ramachandran, K. Baskaran, y S. Natarajan, “*XRD, thermal, FTIR and SEM studies on gel grown γ -glycine crystals*,” Cryst. Res. Technol., vol. 42, no. 1, pp. 73–77, 2007, doi: 10.1002/crat.200610774), otra forma cristalina de la glicina.

Los diferentes picos obtenidos en FTIR se describen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Datos espectrales FTIR de policaprolactona, glicina y andamios hechos de policaprolactona y glicina.

Número de onda (cm^{-1})	Descripción
3436	Estiramiento simétrico NH
3180	Estiramiento asimétrico NH
2945	Vibración CH_2

2865	Vibración CH ₂
2100	Torsión NH
1725	Vibración C=O

Lo anterior indica que con el proceso de electrohilado la estructura cristalina de la glicina cambió de α -glicina a γ -glicina.

5 **Resultados de difracción de rayos X (DRX)**

Para estudiar la estructura cristalina de los andamios electrohilados se realizó un análisis de DRX. La policaprolactona es un polímero semicristalino y la glicina es un sólido cristalino con tres conformaciones estructurales diferentes (M. Rabesiaka, et al.,
10 “*Preparation of glycine polymorphs crystallized in water and physicochemical characterizations*,” J. Cryst. Growth, vol. 312, no. 11, pp. 1860–1865, 2010, doi: 10.1016/j.jcrysgr.2010.03.011) por lo que es importante analizar no sólo la estructura sino la contribución de ambos materiales en la cristalinidad total de los andamios.

15 El difractograma de la glicina (Figura 2A) mostró una estructura altamente cristalina correspondiente a la conformación α -glicina (M. Matsumoto, Y. Wada, y K. Onoe, “*Change in glycine polymorphs induced by minute-bubble injection during antisolvent crystallisation*,” Adv. Powder Technol., vol. 26, no. 2, pp. 415–421, 2015, doi: 10.1016/j.appt.2014.11.014). En la Figura 2B, el difractograma de la policaprolactona
20 mostró una región amorfa y dos picos cristalinos debido a que es un sólido semicristalino, esta característica se repitió en los difractogramas de la policaprolactona electrohilada y de los andamios hechos con las mezclas de policaprolactona y glicina. En este último caso, las mezclas con 5% y 10% de glicina mostraron un pico adicional a los de la policaprolacton en el ángulo $2\theta=30$, y la mezcla con 20% de glicina mostró
25 un pico adicional formado cerca del ángulo $2\theta=15$.

La intensidad de estos picos fue mayor a medida que se aumentó la cantidad de glicina, lo que indica que la glicina no sólo se integró con la policaprolactona, sino que lo hizo en una estructura cristalina que corresponde a la conformación de los cristales de γ -
30 glicina (M. Anis, et al., “*Novel report on γ -glycine crystal yielding high second harmonic generation efficiency*,” Opt. Mater. (Amst)., vol. 72, pp. 590–595, 2017, doi: 10.1016/j.optmat.2017.07.007). Esto confirmó que la estructura cristalina de la glicina cambió de α -glicina a γ -glicina, apoyando los resultados obtenidos con el FTIR y mostrados anteriormente.

Resultados de ángulo de contacto

La evaluación de la hidrofiliidad de los andamios se hizo midiendo el ángulo de contacto entre los andamios y una gota de agua. Para ver el efecto que tiene la glicina en los andamios, se consideró el tiempo de contacto de 0 segundos, ya que en ese momento es posible analizar directamente cuánto influye en esta propiedad el contenido de glicina. Un menor ángulo de contacto indica una mejor interacción entre el material y el agua y, por tanto, una mejor humectabilidad.

Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Figura 3.

Se observó que el ángulo de contacto disminuyó a medida que aumentó el contenido de glicina, lo que se debió a los grupos NH_2 y OH presentes en la glicina, que hicieron que los andamios de policaprolactona y glicina fueran más hidrófilos. El andamio con mejor rendimiento en la prueba de ángulo de contacto fue el que presentaba un 20% de glicina en la formulación utilizada para el electrohilado del andamio.

Resultados de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Una de las principales características necesarias para la aplicación de los andamios para la curación de heridas es conseguir un diámetro de fibra inferior a 300 nm y una porosidad superior al 60% para conseguir la estructura más parecida a la matriz extracelular presente en la piel (Z. Ma, M. Kotaki, y R. Inai, “*Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds*,” Tissue Eng., vol. 11, no. 1, pp. 101–109, 2005). Se utilizaron imágenes SEM para estudiar la morfología de los andamios fabricados.

Las imágenes obtenidas por SEM aparecen recogidas en las Figuras 4 a 7. Las fibras con diámetro micrométrico y orientación aleatoria aparecen claramente en las imágenes. Se observó que el diámetro de las fibras disminuyó a medida que aumentó el contenido de glicina en el andamio, siendo los andamios con 10% y 20% de glicina los de menor diámetro sin diferencia significativa entre ellos. Adicionalmente, y de forma sorprendente, se pudo observar que en los andamios fabricados utilizando un 10 o un 20% de glicina, se formaron perlas (ver Figuras 8 y 9), principalmente porque al reducirse la concentración de polímero en la solución, se provocaron diámetros menores en las fibras y la formación de estas estructuras internas del andamio tipo perlas.

En la Figura 10 se muestra la disminución del diámetro de las fibras a medida que aumenta el contenido de glicina. El diámetro de las fibras está fuertemente relacionado con la conductividad de la solución, y la conductividad pudo aumentar debido a los grupos amino proporcionados por la glicina (S. Ramakrishna, et al., “*An introduction to electrospinning and nanofibers*,” An Introd. to Electrospinning Nanofibers, pp. 1–382, Jan. 2005, doi: 10.1142/5894/SUPPL_FILE/5894_CHAP1.PDF). La mayor conductividad provocó un mayor estiramiento de las fibras en su recorrido desde la punta de la aguja hasta el colector durante el proceso de electrohilado y, por lo tanto, provocó menores diámetros de fibra en el andamio (Y. M. Ju, et al., “*Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels*,” 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.002).

En cuanto a la porosidad, la ideal para la aplicación de andamios en la regeneración de tejidos y, más preferentemente, de heridas, se encuentra entre el 60% y el 90% para mejorar la infiltración celular (Z. Yang, et al., “*Crystallization behavior of poly(ϵ -caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites*,” J. Appl. Polym. Sci., vol. 116, no. 5, pp. 2658–2667, 2010, doi: 10.1002/app). En la Figura 10 se puede apreciar que a medida que el contenido de glicina aumentó, la porosidad de los andamios tendió a aumentar. Sin embargo, todos los andamios evaluados tuvieron una porosidad superior al 60% y, por lo tanto, estuvieron dentro del rango para permitir una adecuada infiltración celular.

Resultados de módulo de Young

La evaluación del módulo de Young es esencial para verificar si los andamios pueden soportar las tensiones a las que se somete la piel. Por esta razón se midió esta propiedad en los diferentes andamios fabricados. Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Figura 11. Tal como se puede observar en dicha Figura, se pudo ver que con el menor contenido de glicina evaluado que es del 5%, el módulo de Young fue mayor que el presentado por el andamio fabricado sólo con el polímero, como si la glicina en dicha situación actuara como refuerzo de la estructura de policaprolactona, mientras que cuando el contenido de glicina aumentó al 10% y 20% esta propiedad volvió a tener valores similares o inferiores a los obtenidos por el polímero solo.

Es importante destacar, tal como ya se ha indicado anteriormente, que los andamios preparados con formulaciones con un 10% o un 20% de glicina son las únicas que presentan perlas en su morfología (ver Figura 8). Esta característica morfológica pudo

disminuir las propiedades mecánicas del material (A. Barhoum, M. Bechelany, y A. Hamdy, Handbook of Nanofibers. 2019).

Sin embargo, es interesante que, a pesar de la reducción del diámetro de las fibras y de la presencia de dichas perlas como estructura interna con la adición de glicina, al menos se mantuvieron propiedades mecánicas similares a las del polímero solo, validando el uso de los andamios de la presente invención para su aplicación en piel para la regeneración de heridas. En este sentido, cabe destacar que en el estado de la técnica se ha reportado el módulo de Young de andamios electrohilados fabricados con policaprolactona y gelatina, siendo dicho módulo de Young de 3 MPa y se afirma que este valor sería suficiente para un material utilizado en la reparación de tejidos (Z. Wang et al., “*Fabrication and in vitro evaluation of PCL/gelatin hierarchical scaffolds based on melt electrospinning writing and solution electrospinning for bone regeneration*,” Mater. Sci. Eng. C, vol. 128, no. May, p. 112287, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112287). Los andamios de la presente invención alcanzaron un módulo de Young mucho mayor y, por tanto, esto confirma que en lo relativo a esta propiedad podrían utilizarse en aplicaciones de reparación de tejidos y, más preferentemente, de la piel.

Resultados de viabilidad celular

Para estudiar la viabilidad de las células estromales mesenquimales (CEM) en los andamios de la presente invención, se utilizó el reactivo Live/Dead para determinar si dichos andamios tienen o no un efecto citotóxico y, por tanto, son adecuados para su uso como andamio para reparación de tejidos (y más preferentemente de heridas en la piel). Todas las células en las diferentes condiciones probadas fueron de color verde (células vivas) y sólo unas pocas fueron de color rojo (células muertas). Esto se pudo ver en tres tiempos (24h, 72h, 120h) para los cuatro andamios y el control. Esto indica que todos los andamios fabricados proporcionaron condiciones para mantener las células viables.

Conclusiones

Por tanto, se pudo concluir que la glicina, en las composiciones y andamios de la presente invención, cambió su conformación estructural de α a γ , lo que aportó buenas propiedades mecánicas, un cambio morfológico en las fibras haciéndolas más similares a las fibras naturales de la dermis, mejoró la hidrofiliidad y la viabilidad de células estromales mesenquimales en el andamio.

Los andamios con los mayores contenidos de glicina (10% y 20% en la formulación utilizada para la preparación del andamio de la presente invención) fueron los más aptos para su uso en reparación de piel debido a que fueron los que más se acercaron a la morfología de las fibras presentes en la dermis natural, se observaron estructuras internas en forma de perla que permiten una mejor adherencia celular, presentaron buenas propiedades mecánicas, buena hidrofiliidad y viabilidad celular adecuada.