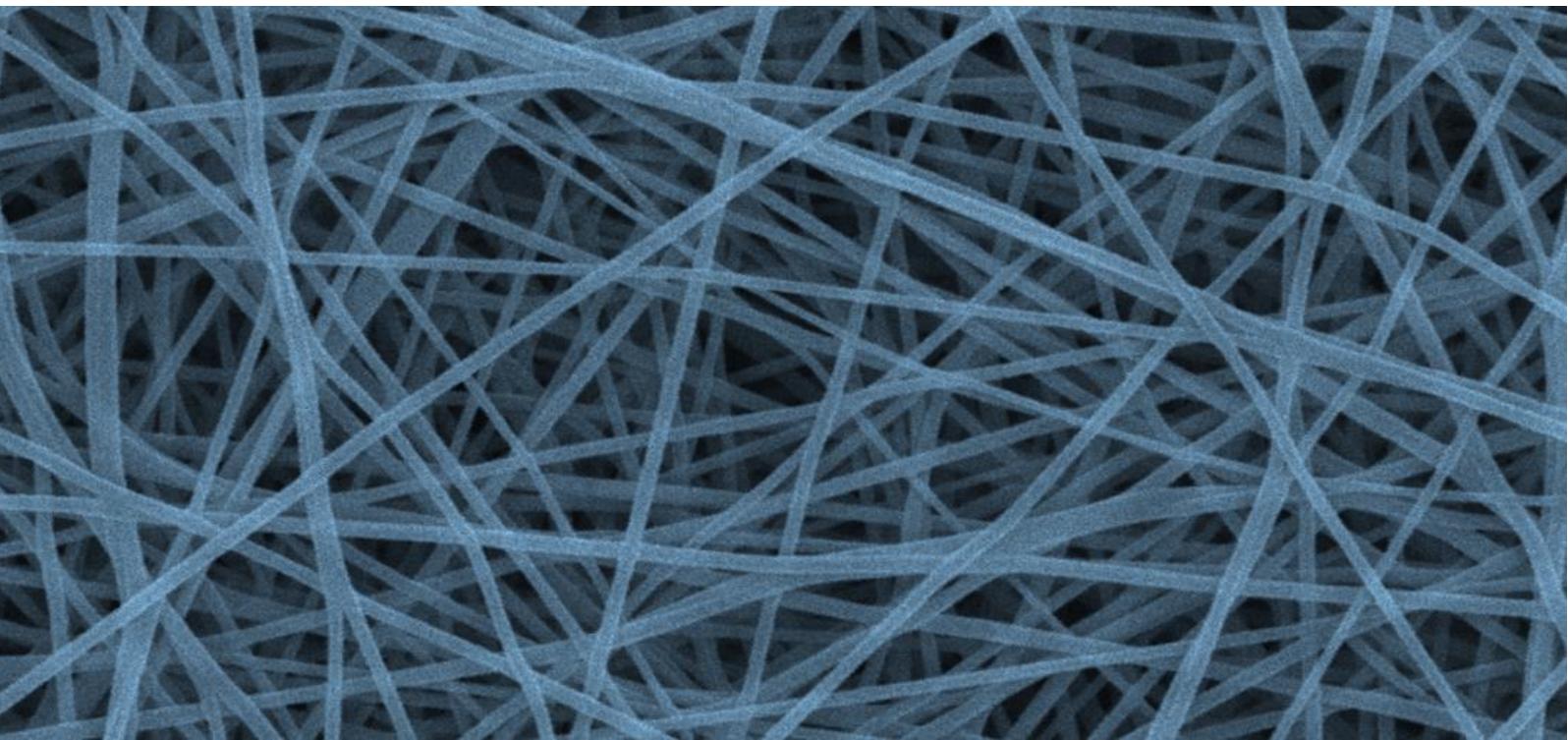


UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DICIEMBRE DE 2020

# FABRICACIÓN DE MATRICES NANOFIBROSAS BASADAS EN GELATINA PARA CULTIVO CELULAR

Proyecto final presentado por Rocío Jazmín Sabbatella  
para aspirar al grado de Ingeniera en Materiales

**Directores:** Dr. Gustavo Abraham y Dra. Ana Agustina Aldana





RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## Resumen

El diseño de biomateriales biomiméticos destinados al cultivo de células madre es una herramienta fundamental para el estudio del comportamiento celular; comprender el desarrollo, regeneración y daño de los tejidos; y de esta forma lograr controlar el destino celular para producir tejidos basados en células madre. Las matrices utilizadas para este fin no sólo deben imitar las propiedades biológicas de la matriz extracelular (MEC) sino también sus características morfológicas y topográficas. El presente trabajo está enfocado en la fabricación y caracterización de matrices nanofibrosas basadas en gelatina metacrilada (GelMA) utilizando la técnica de electrohilado. Para controlar las propiedades de hinchamiento y degradación de la GelMA, se emplearon dos estrategias: por un lado la incorporación de polietilenglicol dimetacrilato (PEGDMA) como entrecruzante y por otro el mezclado con PCL. En primer lugar, se optimizaron los parámetros del proceso de electrohilado con el fin de obtener matrices nanofibrosas electrohiladas tanto de fibras al azar como alineadas de mezclas GelMA/PEGDMA (relación en masa 4:1, 2:1 y 1:1) y GelMA/PCL (relación en masa 3:2). Todas las matrices fueron entrecruzadas con luz UV utilizando Irgacure 2959 como foto-iniciador. Las matrices fueron caracterizadas respecto a su morfología, propiedades térmicas y características superficiales mediante SEM, DSC, TGA, FTIR y ángulo de contacto. Las micrografías corroboraron la obtención de matrices nanofibrosas libres de defectos de fibras al azar y alineadas. Las mezclas GelMA/PEGDMA 2:1 y GelMA/PCL 3:2 presentaron la mejor procesabilidad al utilizar ambas configuraciones de colector y fueron caracterizadas en cuanto a su hinchamiento y degradación. Luego de una semana de inmersión en PBS a 37°C, las matrices electrohiladas no se degradaron completamente. Los resultados muestran la viabilidad de la mezcla con PCL y del uso de PEGDMA como entrecruzante químico para regular la degradación de matrices basadas en gelatina metacrilada; siendo de interés para aplicaciones en cultivo celular.

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero mencionar a las personas que me acompañaron durante mis años de estudio y contribuyeron a mi desarrollo académico y personal:

- Al Dr. Gustavo Abraham, por confiar en mí y permitirme formar parte de su grupo de investigación.
- A la Dra. A. Agustina Aldana por su constante enseñanza, calidez, confianza y estímulo durante el transcurso del trabajo. Este proyecto no habría sido posible sin su apoyo, entusiasmo y dedicación.
- A Matthäus Popov Pereira Da Cunha, Pablo Cortez, Nayla Lores y todo el equipo de Polímeros Biomédicos por recibirme. Su compañía y buena predisposición hicieron también posible este trabajo.
- A la Universidad Nacional de Mar del Plata, a la Facultad de Ingeniería y a todos los profesores por brindarme una formación de excelencia.
- A mi familia por su apoyo y afecto que me acompañaron durante todos los años de estudio. Especial reconocimiento merece mi mamá, quien entregó parte de su vida al trabajo para hacer posible mis sueños; a ella, eternamente agradecida.
- A Luciano, Agustín, Angie y Lucía por su amistad que logró superar la distancia y el escaso tiempo libre de estos últimos años. A Camila y Martín, mis fieles compañeros, por todos los trabajos prácticos grupales, la paciencia, la convivencia, la amistad y el amor; sin duda lo mejor que me llevo de esta experiencia.

A todos los mencionados, mis más sinceros agradecimientos.

## Índice

1. Introducción .....	9
1.1. Cultivo celular .....	10
1.2. Paradigma biomimético .....	12
1.3. Métodos electrodinámicos de obtención de matrices tridimensionales biomiméticas .....	13
1.3.1. Electrohilado de soluciones poliméricas .....	14
1.4. Biomateriales poliméricos.....	20
1.4.1. Polímeros naturales .....	21
1.4.2. Polímeros sintéticos.....	23
2. Objetivos.....	25
3. Materiales .....	25
4. Métodos.....	26
4.1. Obtención de las matrices .....	26
4.1.1. Preparación de las soluciones poliméricas .....	26
4.1.2. Electrohilado .....	26
4.1.3. Fotoentrecruzamiento de las matrices .....	27
4.2. Caracterización de las soluciones poliméricas .....	27
4.2.1. Viscosidad .....	27
4.2.2. Tensión superficial .....	28
4.3. Caracterización de las matrices electrohiladas .....	29
4.4. Caracterización morfológica .....	29
4.4.2. Caracterización química .....	29
4.4.3. Caracterización superficial .....	30
4.4.4. Caracterización térmica .....	30
4.4.5. Hinchamiento .....	30
4.4.6. Degradación .....	31
5. Resultados.....	31
5.1. Caracterización de las soluciones poliméricas .....	31
5.2. Obtención de las matrices electrohiladas.....	33
5.3. Caracterización morfológica .....	35
.....	38

5.4. Caracterización superficial .....	41
5.5. Caracterización química .....	42
5.6. Caracterización térmica.....	43
5.7. Hinchamiento y degradación .....	46
6. Escalado del proceso de obtención de matrices electrohiladas para cultivo celular .....	47
7. Conclusiones .....	50
8. Proyecciones .....	50
Referencias .....	51

## Listado de Figuras

Figura 1. Las células madre residen en un microentorno que consiste en diversos factores químicos, mecánicos y físicos que afectan su comportamiento. ....	11
Figura 2. Interacción de las células en matrices con diferentes arquitecturas [12]...	14
Figura 3. Esquema típico del proceso de electrohilado [10]. ....	15
Figura 4. Efecto de las cargas inducidas en la forma de la gota eyectada de la aguja. Al aumentar la intensidad del campo eléctrico: a) goteo normal, b) micro-goteo, c) cono de Taylor intermitente y d) jet continuo del cono de Taylor [20].....	18
Figura 5. Esquemas de distintos tipos de colectores: a) plano, b) cilindro rotatorio y c) colector con micropatrón. ....	19
Figura 6. Síntesis y fotoentrecruzamiento de la GelMA: a) reacción de la gelatina y el anhídrido metacrílico (la modificación ocurre en las aminas primarias y los grupos hidroxilo) b) los radicales libres generados del fotoiniciador inician la polimerización y dan lugar a una red entrecruzada [39]......	23
Figura 7. Reacción de fotopolimerización del PEGDMA que resulta en una red polimérica entrecruzada. ....	24
Figura 8. a) Colector plano y b) tambor rotatorio utilizados para obtener fibras al azar y alineadas, respectivamente. ....	27
Figura 9. Perfil de la gota de solución durante el análisis de la tensión superficial. .	28
Figura 10. Tensión superficial como función de la concentración de GelMA en la solución .....	33
Figura 11. Fotografía de algunas de las matrices producidas: a) GPEG 2:1 alineadas, b) GPCL alineadas, c) PCL – GPEG 2:1 al azar y d) PCL - GPCL alineadas .....	34
Figura 12. Matriz de GPEG 4:1 al azar: a) Micrografías a 200x y 1000x, b) Distribución de tamaño de fibras. ....	35
Figura 13. Matriz de GPEG 2:1 al azar: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras. ....	36
Figura 14. Matriz de GPEG 1:1 al azar: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras. ....	36

Figura 15. Matriz de GPCL al azar: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras. ....	38
Figura 16. Matriz de GPCL alineadas: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras. ....	38
Figura 17. Matriz de GPEG 2:1 alineadas: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras. ....	39
Figura 18. Matriz de GPEG 2:1 alineadas sin entrecruzar: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras. ....	39
Figura 19. Análisis de la orientación de las fibras: micrografías e histogramas ilustrando la direccionalidad de las matrices GPCL y GPEG 2:1.....	40
Figura 20. Histogramas ilustrando el porcentaje de alineación ( $\pm 20^\circ$ ) de las matrices GPCL y GPEG 2:1 obtenidas con el colector rotor (900rpm) .....	41
Figura 21. Ángulo de contacto de las matrices: entrecruzadas al azar y alineadas (izq.), y GelMA/PCL sin entrecruzar alineadas donde se observa una elongación de la gota en la dirección de las fibras (dcha.) .....	41
Figura 22. Espectro FTIR de las matrices y materias primas .....	43
Figura 23. Resultados del análisis termogravimétrico de la GelMA y las matrices GPCL y GPEG.....	44
Figura 24. Curvas de DSC de las matrices entre $-10^\circ\text{C}$ a $300^\circ\text{C}$ a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .....	45
Figura 25. Hinchamiento (izq.) y degradación (dcha.) <i>in vitro</i> de las matrices GPCL y GPEG 2:1 en función del tiempo de inmersión en PBS a $37^\circ\text{C}$ por 7 días.....	46

### Listado de Tablas

Tabla 1. Concentración de las soluciones GelMA/PCL y GelMA/PEGDMA. ....	26
Tabla 2. Viscosidad y tensión superficial de las soluciones poliméricas.....	32
Tabla 3. Parámetros de procesamiento utilizados en el electrohilado .....	34
Tabla 4. Parámetros de procesamiento utilizados de las matrices bicapa. ....	35
Tabla 5. Diámetro medio y área aproximada de perlas en las matrices GPCL .....	37

Tabla 6. Análisis de los termogramas: temperatura al comienzo y a la máxima velocidad de degradación, y masa remanente a 700°C. ....	44
Tabla 7. Costos de fabricación estimados de 480.000 insertos de cultivo anuales de GelMA/PEGDMA para microplacas de 12 pocillos. ....	48
Tabla 8. Ejemplos de productos para cultivo celular 3D disponibles en el mercado.	49

## 1. Introducción

Una de las principales áreas de interés en la ciencia de materiales está relacionada con materiales destinados a aplicaciones médicas o biomateriales, donde el comportamiento en contacto con tejidos o fluidos fisiológicos resulta crítico. Los crecientes descubrimientos y el desarrollo de la ciencia e ingeniería de biomateriales surgen de una necesidad mundial de mejorar la calidad de vida de las personas. La definición de biomateriales ha ido cambiando con el tiempo; actualmente se entiende como biomateriales a aquellos diseñados de forma tal que puedan dirigir el curso de cualquier procedimiento terapéutico o diagnóstico por medio de interacciones con los componentes de sistemas vivos [1]. Estos se han convertido en un componente importante en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades.

Millones de pacientes al año experimentan pérdidas funcionales o daños en órganos, tejidos u otras partes del cuerpo. La medicina regenerativa ha surgido como una nueva alternativa hacia la reparación de tejidos u órganos dañados en respuesta a los numerosos problemas asociados a los trasplantes e implantes tradicionales. Esta utiliza dos tipos de estrategias: terapia celular e ingeniería de tejidos. La primera estimula la respuesta curativa innata para promover la regeneración utilizando células y factores de crecimiento, evitándose las complicaciones quirúrgicas. Sin embargo, las células aisladas poseen un límite en la capacidad de reconstrucción de tejido, por lo tanto, cuando el daño es mayor las células requieren un modelo para guiarse. Para lograr esto, la ingeniería de tejidos hace uso de células; factores de crecimiento; y materiales que proveen un soporte y microentorno favorable para las células, y propician la regeneración de los tejidos

En ingeniería de tejidos, las células son cultivadas *in vitro* en una matriz que luego se implanta en el paciente con el objetivo de reemplazar las células muertas con células de formas características y funciones específicas que permiten restaurar el tejido perdido. Las células se obtienen principalmente del paciente (fuente autóloga), aunque se puede recurrir a un donante (fuente alogénica). Sin embargo, existen algunos problemas asociados a su empleo: el crecimiento de células específicas en grandes cantidades es una tarea difícil; la reducción del crecimiento celular y proliferación luego de la implantación; y la diferencia en la capacidad de crecimiento de las células *in vivo* e *in vitro*: en algunos órganos las células tienen una alta

capacidad regenerativa *in vivo*, mientras que su crecimiento *in vitro* puede ser difícil [2]. Los descubrimientos en el campo de la biología de células madre abren camino a nuevas terapias en la medicina regenerativa. La capacidad de las células madre de autorrenovarse, dividirse y diferenciarse en distintos linajes las hace una atractiva fuente de células para aplicaciones clínicas. A pesar de los avances en este campo, la implementación de terapias basadas en células madre aún es limitada. Esto se debe a que aún resta mucho por dilucidar en lo referido a las reglas que gobiernan el destino celular y consecuentemente el desarrollo de los tejidos y órganos [3].

El progreso en la ingeniería de tejidos ha ayudado a la creación de matrices que pueden ser utilizadas para el control del destino de las células madre. Una matriz utilizada para este propósito debe proveer un sustrato para la adhesión, proliferación, autorrenovación, diferenciación y migración de las células.

### **1.1. Cultivo celular**

La investigación biomédica moderna utiliza esencialmente dos bancos de prueba experimentales: animales y células cultivadas. Los sistemas animales logran representar la complejidad biológica *in vivo*, sin embargo, las células humanas son estudiadas en un entorno que no representa necesariamente el organismo del que provienen y se tiene un control limitado de las respuestas celulares y los mecanismos individuales. Los ensayos *in vitro* convencionales realizados en placas de Petri, frascos, microplacas e insertos de cultivo permiten el control de los factores externos, observar y manipular las células y, al ser las células homogéneas, los resultados experimentales son más consistentes. Sin embargo, estos sistemas carecen de las características estructurales y las señales presentes en los tejidos; los cambios temporales y espaciales de los factores regulatorios físicos y moleculares; y las fuerzas dinámicas y factores sistémicos que provee la circulación de sangre. Como resultado, los estudios *in vitro* frecuentemente no pueden predecir lo que se encuentra en los modelos animales o los estudios clínicos, aumentando así el tiempo y costo, y disminuyendo la efectividad de las estrategias terapéuticas [4].

El cultivo celular se utiliza en una gran variedad de aplicaciones biológicas como lo son el estudio de la fisiología y biología celular, el análisis de drogas en la industria farmacéutica, para comprender los mecanismos de diferentes enfermedades, observar el proceso de regeneración celular y en la evaluación de nuevos

biomateriales [5]. La evolución del conocimiento del último medio siglo conocido como biología celular depende en gran medida de la disseminación de células cultivadas como sistema de investigación aceptado para comprender las funciones y la estructura celular.

Durante el desarrollo y regeneración de tejidos, las células madre atraviesan una secuencia de renovación, especialización y unión que surge de la interacción con múltiples factores del entorno (Figura 1). Los cuatro grupos de factores claves son: (1) las moléculas regulatorias (oxígeno, nutrientes, citosina), (2) otras células (contexto tridimensional, contactos célula-célula, señales paracrinas y autocrinas), (3) la MEC (factores inmovilizados y secretados, estructura, topología, rigidez), y (4) los factores físicos (flujo de corte, compresión, tracción, señales eléctricas). Estos actúan en conjunto, con efectos sinérgicos y en competencia. El estudio de los efectos individuales y combinados de las señales regulatorias no es una tarea trivial y no puede lograrse utilizando los métodos tradicionales de cultivo celular debido a que estos son muy diferentes al microentorno *in vivo*. La investigación del uso de células madre para ingeniería de tejidos requiere entonces la generación de condiciones de cultivo tridimensionales que imiten el microentorno *in vivo* en el que se encuentran las células madre.

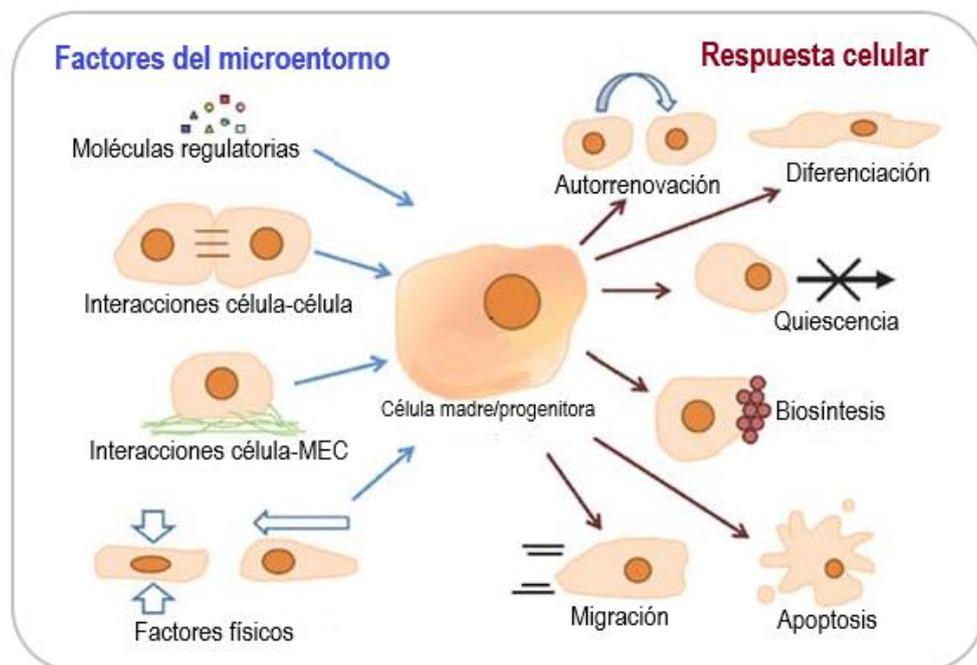


Figura 1. Las células madre residen en un microentorno que consiste en diversos factores químicos, mecánicos y físicos que afectan su comportamiento.

## 1.2. Paradigma biomimético

En el cuerpo, cada célula está rodeada de una red tridimensional compleja de fibras basadas en proteínas y polisacáridos llamada matriz extracelular (MEC). La MEC está compuesta, entre otros, por fibras de colágeno, ácido hialurónico, proteoglicanos y fibronectina, los cuales proveen a las células de señales químicas, mecánicas y topográficas que influyen en su comportamiento [6]. La organización de la MEC es usualmente jerárquica desde lo nano hacia lo macro. De esta manera proporciona un soporte estructural a los tejidos que puede presentar un amplio rango de propiedades mecánicas en función de variaciones en su composición y organización. La MEC dirige la adhesión y migración celular, así como también regula el crecimiento celular, el metabolismo y las señales de diferenciación.

Dada la importancia de la MEC en los procesos celulares fundamentales, nuevas generaciones de biomateriales sintéticos están siendo desarrollados imitando sus características para su uso como microentornos extracelulares tridimensionales con el fin de facilitar la implantación, adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como el desarrollo de nuevos tejidos. Estos biomateriales llamados biomiméticos proveen a las células de señales bioquímicas y biofísicas necesarias para su desarrollo, ya que las células responden a factores del entorno como topografía, rigidez, gradiente de sitios de adhesión celular, campos eléctricos, química superficial y composición del material [7].

El cultivo celular involucra la colocación de células en un entorno que no es natural. A pesar de que los sistemas de cultivo celular convencionales en dos dimensiones (2D) proveen una forma rápida y económica de estudiar las propiedades *in vitro*, las células son forzadas a adaptarse a una superficie rígida plana que es completamente diferente a la estructura tridimensional de la MEC. Esto resulta en un comportamiento diferente de las células incluso respecto a la proliferación y diferenciación [2, 8]. El cultivo celular en 3D es cada vez más utilizado debido a que fenómenos biológicos como la expresión genética, supervivencia, proliferación, adhesión, migración, desarrollo y diferenciación de las células ocurren de manera similar a lo que sucede *in vivo* [5]. Se ha demostrado en numerosos ensayos *in vitro* que las células responden a características topográficas que van desde el rango submicrométrico al nanométrico. Uno de los efectos más conocidos es la alineación y elongación de las células en la dirección de patrones unidireccionales presentes en el sustrato. También se ha

demostrado que la respuesta de las células depende del tipo de célula, y del tamaño y geometría de las características topográficas.

### **1.3. Métodos electrodinámicos de obtención de matrices tridimensionales biomiméticas**

Las matrices tridimensionales (3D) son una alternativa ingenieril *in vitro* a la MEC para la expansión y organización de las células cultivadas que actúan como modelo estructural e instructivo para las células y los tejidos que se forman. Se han utilizado varios métodos y materiales para fabricar matrices para cultivo celular en 3D. Su elección depende de las características tridimensionales, la composición química y propiedades mecánicas deseadas. Los métodos de fabricación pueden clasificarse en cuatro categorías: (1) métodos que resultan en una topografía regular diseñada de forma precisa (fotolitografía, polimerización de dos fotones, impresión por microcontacto); (2) métodos que resultan en topografías irregulares como fibras y poros o que simplemente incrementan la rugosidad superficial (electrohilado, colaje de soluciones poliméricas con lixiviación de porógenos o separación de fase/emulsificación); (3) métodos que buscan imitar de forma precisa las características tridimensionales de los tejidos (deposición química de vapor); (4) y métodos basados en hidrogeles o MECs descelularizadas [6].

Entre las matrices disponibles, las nanofibras han sido utilizadas en diversas aplicaciones biomédicas debido a que poseen características funcionales atractivas: proveen de un entorno similar al de muchas MECs, una gran relación superficie/volumen, porosidad interconectada y son capaces de guiar a las células a adherirse y proliferar en su superficie [9]. En estas matrices con características superficiales en la escala nanométrica las células interactúan con una superficie en las tres dimensiones, similar a lo que ocurre en la MEC. Por el contrario, cuando las características superficiales son mucho más grandes que el tamaño de las células estas se adhieren a la superficie del sustrato adquiriendo una conformación plana, al igual que en superficies de los recipientes de cultivo convencionales (Figura 2) [10]. De esta forma, las matrices nanofibras poseen una mayor área para la absorción de proteínas y presentan más sitios de adhesión para los receptores de membrana.

Existen diversas técnicas para la fabricación de nanofibras poliméricas, entre ellas el electrohilado es la técnica preferida dado que es relativamente sencilla, versátil,

rentable, requiere un herramental simple y es adecuada para producir fibras ultrafinas a partir de una variedad de polímeros sintéticos y naturales [11]. Además, es una técnica eficiente para la fabricación a mayor escala de materiales nanofibrosos.

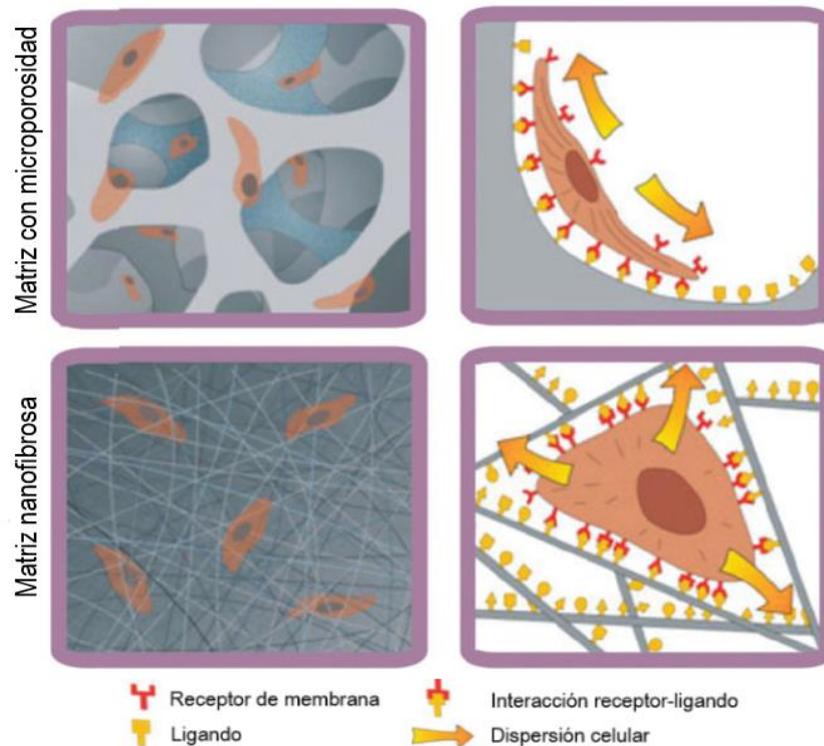


Figura 2. Interacción de las células en matrices con diferentes arquitecturas [12].

### 1.3.1. Electrohilado de soluciones poliméricas

El electrohilado es una técnica que utiliza fuerzas electroestáticas para producir fibras poliméricas de tamaño submicrométrico y nanométrico. La técnica puede ser utilizada para generar fibras de una amplia variedad de tipos de polímeros: sintéticos, naturales, biodegradables, no degradables, o mezclas de estos [11]. Las matrices electrohiladas encuentran aplicación en el campo de biomateriales en sistemas de liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos, cicatrización de heridas, como recubrimiento de implantes y otras superficies de dispositivos biomédicos, entre otras [10].

En la Figura 3 se muestra un esquema del proceso de electrohilado. Durante el electrohilado, se aplica una diferencia de potencial entre una aguja que contiene el polímero fundido o en solución y un colector. En ausencia de un campo eléctrico una gota de polímero se mantiene en la punta de la aguja por tensión superficial del líquido. En presencia de un campo eléctrico se inducen cargas en la gota de polímero

desestabilizándola. La repulsión entre las cargas inducidas produce una fuerza que se opone a la tensión superficial y al aumentar el campo la gota se elonga, formando lo que se conoce como el cono de Taylor. Si la diferencia de potencial es suficiente para superar la tensión superficial, un chorro continuo es eyectado de la punta del cono de Taylor acelerándose hacia el colector. Luego de viajar una distancia corta, el chorro experimenta inestabilidades como movimientos tipo latigazo (*whipping*) como consecuencia de la interacción entre el campo de atracción electrostático aplicado y las fuerzas repulsivas de las cargas inducidas en la superficie del chorro. Asimismo, al viajar el chorro el solvente se evapora (o el polímero solidifica) y fibras del polímero sólido son depositadas en el colector opuestamente cargado o a tierra formando la matriz [11, 13].

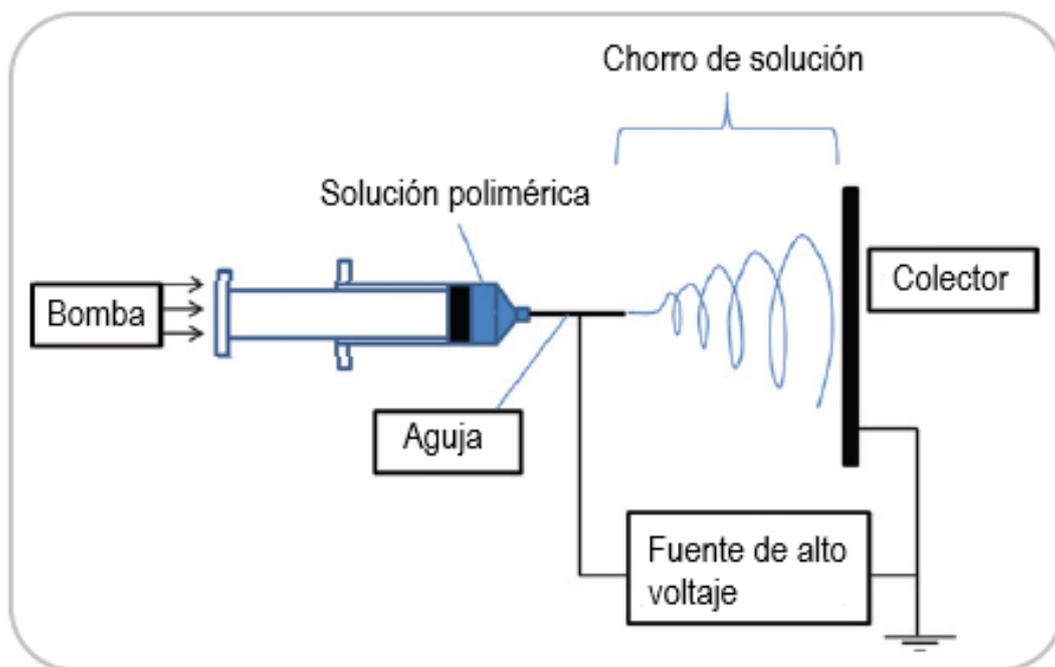


Figura 3. Esquema típico del proceso de electrohilado [10].

El uso eficaz y eficiente de la técnica requiere de la optimización de varios factores: parámetros del proceso, de la solución y ambientales. La morfología, disposición espacial y tamaño de las fibras, así como la porosidad, el área superficial y la topografía de las matrices pueden ajustarse variando estos parámetros [14].

### **1.3.1.1. Propiedades de la solución polimérica**

Las propiedades intrínsecas de la solución ejercen una gran influencia en la morfología de las fibras obtenidas. Entre las propiedades más relevantes se encuentran: la naturaleza del solvente y la concentración, viscosidad, tensión superficial y conductividad de la solución polimérica.

La elección del solvente es crítica para lograr la disolución de un polímero dado. Además de la solubilidad del polímero en el solvente, es importante considerar su temperatura de ebullición como indicativo de su volatilidad. En general, se prefieren solventes volátiles ya que esto aumenta la velocidad de solidificación del chorro de solución durante su trayectoria hacia el colector, evitando el secado incompleto que produce morfología de fibras planas tipo listón o fusión de las fibras. Los solventes altamente volátiles deben evitarse ya que puede producirse su evaporación en la punta de la aguja, resultando en la obstrucción del flujo de polímero. La morfología de las fibras y la porosidad de la matriz puede regularse utilizando un solvente o mezcla de solventes [15, 16].

Las fuerzas viscoelásticas son las responsables de contrarrestar las fuerzas de estiramiento generadas por la repulsión electrostática del chorro cargado. A concentraciones de polímero bajas, y viscosidad baja, el chorro se rompe debido a la tensión superficial conduciendo a la formación de gotas antes de alcanzar el colector. Al aumentar la concentración de polímero, y la viscosidad de la solución, el enmarañamiento de las cadenas poliméricas aumenta, siendo el chorro menos propenso a romperse debido a las mayores fuerzas viscoelásticas, obteniéndose fibras. Sin embargo, a concentraciones por encima de un cierto límite la viscosidad de la solución se vuelve muy alta, interrumpiendo el flujo de polímero a través de la aguja [17, 18]. La obtención de fibras ocurre entonces en un rango óptimo de viscosidad determinado, para cada sistema solvente-polímero, por la concentración de polímero en la solución. Asimismo, la morfología de las fibras y la presencia de defectos en la matriz final varían dentro de este intervalo. Un aumento en la viscosidad contribuye a la estabilidad del chorro y por lo tanto a la obtención de fibras más uniformes.

La concentración de polímero y su naturaleza no sólo afectan la viscosidad de la solución sino también su tensión superficial. Para obtener fibras, es necesario vencer la tensión superficial de la solución de forma de lograr el estiramiento del chorro.

Cuanto más elevada es la tensión superficial, mayor será la diferencia de potencial requerida en el proceso. Generalmente, un aumento en la concentración de polímero disminuye la tensión superficial de la solución.

Por último, la conductividad de la solución determina su capacidad de transporte de carga, siendo ésta mayor para soluciones de alta conductividad. El chorro formado a partir de una solución de alta conductividad se ve sometido a mayores fuerzas de estiramiento al aplicar una cierta diferencia de potencial. En términos generales, se ha observado que un incremento en la conductividad de la solución resulta en una disminución en el diámetro medio de las fibras [19].

### **1.3.1.2. Parámetros del proceso**

Por su parte, los parámetros del proceso tales como la diferencia de potencial aplicada, la distancia entre la aguja y el colector, la velocidad de flujo, y el tipo de colector también influyen en gran medida en la obtención y características de las fibras.

El efecto la diferencia de potencial en la obtención de fibras depende de cada sistema en particular. Para cada uno de ellos existe un valor crítico para el cual la fuerza de repulsión electrostática producto de las cargas inducidas en la solución polimérica o el polímero fundido es suficiente para superar la tensión superficial y formar un chorro continuo (Figura 4) [14]. Un incremento en el potencial por encima de este valor produce un aumento las cargas inducidas y consecuentemente un mayor estiramiento del microchorro, obteniéndose fibras más finas [16]. Sin embargo, si la diferencia de potencial es muy grande, el solvente se evapora rápidamente, reduciendo la etapa de estiramiento de las cadenas, y aumentando el diámetro medio de las fibras.

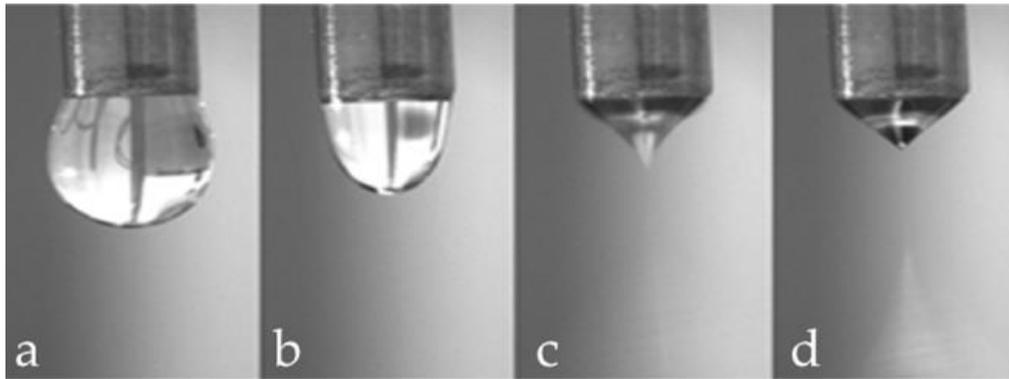


Figura 4. Efecto de las cargas inducidas en la forma de la gota eyectada de la aguja. Al aumentar la intensidad del campo eléctrico: a) goteo normal, b) micro-goteo, c) cono de Taylor intermitente y d) jet continuo del cono de Taylor [20].

La velocidad de flujo a través de la aguja influye en el diámetro de las fibras, la porosidad y la geometría de la matriz electrohilada. Para mantener la forma del cono de Taylor en la punta de la aguja y evitar morfologías tipo perla, es necesaria una mínima velocidad de flujo que reemplace la solución o polímero fundido que se va perdiendo al eyectarse el chorro. Un aumento en la velocidad de flujo está asociado a un incremento en el diámetro medio de fibras y el tamaño de poros de la matriz, debido a que el volumen de polímero disponible en la punta de la aguja es mayor. Si la velocidad de flujo es muy alta, las fibras no logran secarse por completo antes de llegar al colector, observándose una mayor aparición de morfologías tipo perlas [11].

Por otro lado, la distancia entre la aguja y el colector determina el tiempo que tendrá el solvente para evaporarse, afectando el tamaño y morfología de las fibras obtenidas. A distancias pequeñas, el tiempo no será suficiente para que se evapore todo el solvente, resultando en fibras de morfología plana debido al secado incompleto [11, 13]. En general, al incrementar esta distancia el diámetro de las fibras decrece debido a que el chorro experimenta un mayor estiramiento.

Existen una gran variedad de tipos de colectores y de su elección dependerá la disposición de las fibras electrohiladas [21]. Se pueden obtener fibras al azar, alineadas, radiales, siguiendo un patrón, etc. Para la obtención de fibras al azar se utilizan normalmente colectores planos, mientras que fibras alineadas pueden obtenerse con colectores cilíndricos o discos rotatorios (Figura 5).

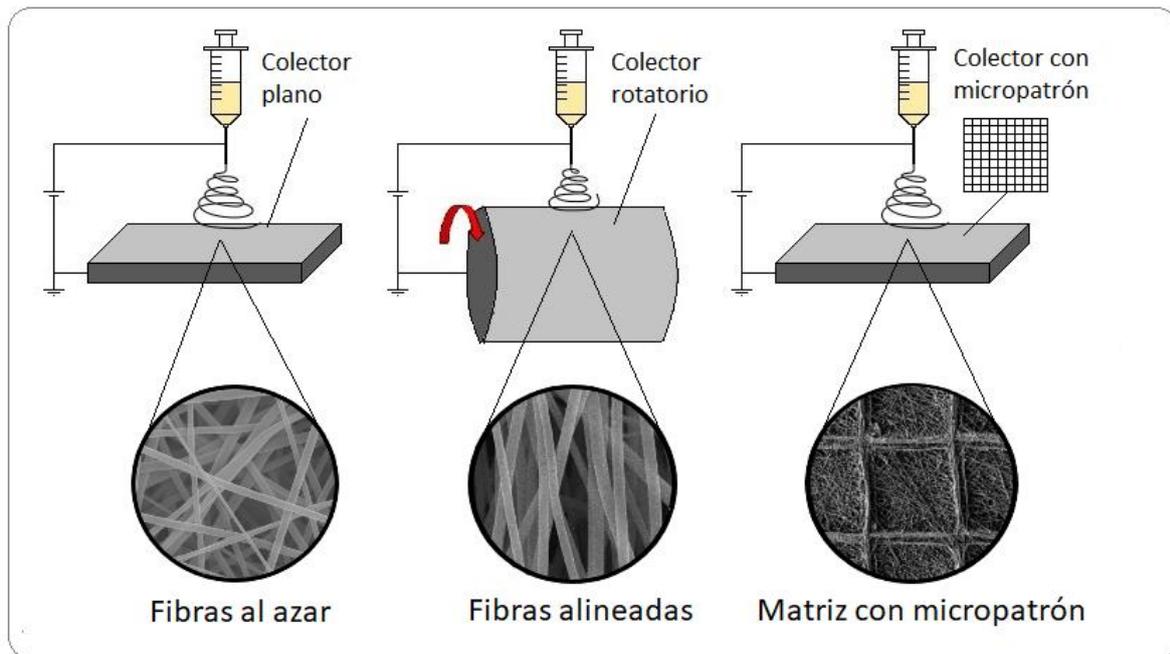


Figura 5. Esquemas de distintos tipos de colectores: a) plano, b) cilindro rotatorio y c) colector con micropatrón.

La posibilidad de crear estructuras ordenadas tiene implicancias en el desempeño de las matrices. Se ha demostrado en numerosos trabajos de investigación, que el alineamiento de las fibras afecta el comportamiento de distintas líneas celulares favoreciendo procesos de adhesión y diferenciación [22, 23].

### 1.3.1.3. Condiciones ambientales

Factores ambientales tales como la humedad relativa, la temperatura y la velocidad del aire también influyen en el tamaño y morfología de las nanofibras [13]. La temperatura produce efectos opuestos sobre dos variables que influyen en el diámetro medio de fibras: la velocidad de evaporación del solvente y la viscosidad de la solución polimérica. A menor temperatura, menor será la velocidad de evaporación, ocurriendo la solidificación más lentamente; el microchorro se encuentra entonces expuesto a las fuerzas de estiramiento por más tiempo, obteniéndose fibras más finas. Por otro lado, a menores temperaturas, las cadenas poliméricas poseen menor movilidad y la viscosidad de la solución es mayor, imponiendo mayor resistencia al estiramiento [24].

La humedad influye tanto en el secado del microchorro como en la dispersión de cargas superficiales en él. Se ha reportado que disminuir la humedad en la que se lleva a cabo el electrohilado conduce a un aumento en el diámetro medio de las fibras.

Cuando el solvente es acuoso, este efecto puede explicarse por el aumento de velocidad de evaporación del solvente debido a la mayor diferencia entre la presión de vapor del solvente y la presión parcial de este, fuerza impulsora para la evaporación. Si la evaporación se produce rápidamente, el chorro es expuesto al estiramiento de las cadenas poliméricas producto de la diferencia de potencial por menos tiempo. En cambio, cuando el solvente no es acuoso, la velocidad de evaporación del solvente no se ve afectada; sin embargo, si el polímero es hidrofílico en condiciones de alta humedad puede producirse una absorción de agua del ambiente, lo cual causa que las nanofibras solidifiquen más lentamente y que el estiramiento de las cadenas continúe por más tiempo, resultando en fibras más finas [25, 24]. Por otro lado, durante el electrohilado, una parte de la carga inducida en el chorro es disipada debido a que las moléculas de vapor de agua en el ambiente crean caminos conductivos. Cuando la humedad disminuye, la disipación de carga disminuye y la densidad de carga en el chorro aumenta, ocasionando la rotura de las fibras [26]. La sensibilidad y el efecto de cambios en la humedad ambiente dependen de la naturaleza del sistema solvente-polímero utilizado.

#### **1.4. Biomateriales poliméricos**

Los biomateriales abarcan metales, cerámicos, polímeros y compuestos. Se pueden procesar través de diversas técnicas para obtener piezas, recubrimientos, fibras, filmes, espumas, entre otros. La elección del biomaterial para una dada aplicación estará guiada por las propiedades mecánicas, químicas y biológicas óptimas para su aplicación y el entorno biológico donde será utilizado.

Entre los requerimientos para que una matriz pueda ser utilizada en cultivo celular para guiar las funciones celulares se encuentran: buena biocompatibilidad; velocidad de degradación tal que permita llevar a cabo el cultivo; propiedades mecánicas adecuadas; topografía y química superficial apropiada para la adhesión y proliferación celular; y la capacidad para incorporar principios bioactivos y factores de crecimiento. Además, el material debe poder ser procesado para obtener la arquitectura tridimensional deseada.

Los polímeros presentan ventajas en términos de su biocompatibilidad y procesabilidad, y por ello son ampliamente utilizados en aplicaciones biomédicas como materiales para reproducir el entorno de la MEC.

### 1.4.1. Polímeros naturales

Los polímeros naturales son macromoléculas presentes en la naturaleza. Estos pueden ser obtenidos a partir de componentes de la MEC (colágeno, elastina, fibrina, ácido hialurónico, Matrigel™) u otras fuentes naturales (alginato, quitosano, celulosa) [27]. El atractivo de estos polímeros se debe a que son reconocidos por sistemas biológicos, su inherente biocompatibilidad, y su relativa abundancia [28]. Asimismo, al ser obtenidos a partir de fuentes naturales pueden incluir componentes presentes en tejidos humanos, lo cual provee ventajas adicionales como propiedades mecánicas similares a los tejidos naturales [29]. Sin embargo, la variabilidad en sus propiedades, el control limitado de sus propiedades fisicoquímicas, su posible inmunogenicidad, la dificultad para esterilizarlos y su purificación constituyen limitaciones a superar [30]. Además, la fabricación de matrices a partir de polímeros naturales está condicionada por sus pobres propiedades mecánicas.

El colágeno es una proteína fibrosa y uno de los componentes principales de la matriz extracelular. A pesar de que ha sido ampliamente utilizado en regeneración de tejidos, presenta desventajas como la posibilidad de toxicidad debida a residuos de catalizador e iniciador durante el entrecruzamiento necesario para mejorar su estabilidad y propiedades mecánicas. La gelatina es un biopolímero ampliamente utilizado obtenido a partir de la desnaturalización del colágeno vía hidrólisis. La gelatina ha comenzado a ganar relevancia ya que el proceso de desnaturalización provee una menor antigenicidad, mejor solubilidad y reduce las variaciones estructurales debido a que se pierde la estructura terciaria del colágeno [31, 32]. Además, conserva la biocompatibilidad y biodegradabilidad y posee un menor costo que el colágeno [33].

Tanto el colágeno como la gelatina poseen en su estructura primaria veinte aminoácidos diferentes en proporciones variables. Esta estructura primaria no se ve afectada durante la hidrólisis y provee de la secuencia de reconocimiento RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), motivo de unión celular para la adhesión mediada por integrinas, y de sitios de degradación como metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) [34, 35]. Asimismo, de acuerdo a la literatura ambos mejoran la infiltración, adhesión, propagación y proliferación celular.

Las propiedades de la gelatina dependen de la fuente de colágeno (usualmente bovina o porcina), edad del animal, tipo de colágeno, y del tipo de conversión de colágeno a gelatina (hidrolisis ácida o alcalina). La disolución y pérdida de las estructuras tridimensionales de la gelatina en condiciones fisiológicas es aún un desafío a superar. Por este motivo se utilizan diversos métodos para estabilizar la estructura de la gelatina, entre ellos: por medio de un entrecruzamiento químico o mezclando físicamente con otros polímeros [22, 36].

La funcionalización de los grupos funcionales que contienen aminos en la gelatina con grupos metacrilato se utiliza para obtener un biomaterial fotopolimerizable llamado GelMA (Figura 6). La GelMA es un biomaterial que posee similitudes con los componentes en la matriz extracelular de tejidos naturales y ha sido extensamente investigada para estudios celulares y aplicaciones en ingeniería de tejidos debido a su buena biocompatibilidad, por su baja antigenicidad, y por sus propiedades fisicoquímicas modulables mediante el entrecruzamiento de los grupos funcionales introducidos [37]. El entrecruzamiento fotoquímico tiene lugar sólo en presencia de un fotoiniciador y mediante la exposición a una fuente externa de luz UV. El fotoiniciador usualmente utilizado es Irgacure 2959 debido a su baja toxicidad a las concentraciones utilizadas [32]. Este entrecruzamiento resulta en un hidrogel con rigidez y densidad que pueden controlarse variando la masa de polímero seco, grado de funcionalización, concentración de fotoiniciador, intensidad de la luz ultravioleta y tiempo de exposición [32, 34]. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son pobres y experimenta una rápida degradación enzimática, lo cual limita sus aplicaciones biomédicas. Para superar esta limitación, la GelMA se combina con otros polímeros naturales y sintéticos [37, 38].

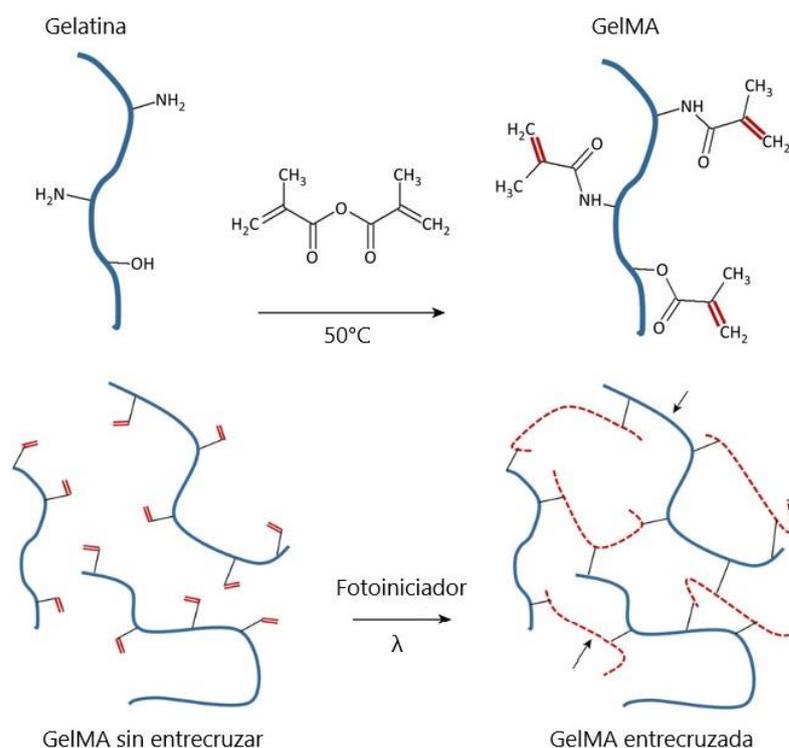


Figura 6. Síntesis y fotoentrecruzamiento de la GelMA: a) reacción de la gelatina y el anhídrido metacrílico (la modificación ocurre en las aminas primarias y los grupos hidroxilo) b) los radicales libres generados del fotoiniciador inician la polimerización y dan lugar a una red entrecruzada [39].

#### 1.4.2. Polímeros sintéticos

A diferencia de los polímeros naturales, los polímeros sintéticos permiten un mayor control sobre sus propiedades durante la síntesis y pueden ser procesados mediante diferentes técnicas, pudiendo ser conformado en una gran variedad de formas [40]. La selección de diferentes monómeros, iniciadores, condiciones de reacción, así como la presencia de aditivos, determina propiedades tales como cristalinidad, temperatura de transición vítrea y de fusión, peso molecular y grupos funcionales del polímero resultante [41]. Esto permite que puedan ser diseñados para satisfacer un propósito específico. En general, los polímeros sintéticos poseen buenas propiedades mecánicas y estabilidad térmica; sus propiedades químicas y mecánicas son más uniformes y predecibles; y son libres de inmunogenicidad [27, 41].

La policaprolactona (PCL) es un polímero semicristalino y uno de los poliésteres más utilizados en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, buena resistencia mecánica y biodegradabilidad [37, 41]. Es miscible en una gran variedad de solventes y puede ser mezclado con diferentes polímeros para formar soluciones

miscibles. Sin embargo, es hidrofóbico, no promueve la adhesión celular y su degradación *in vivo* requiere varios años. Se ha reportado que la degradación de un sistema de PCL de alto peso molecular ( $M_n=50.000$ ) requiere tres años para su completa remoción del cuerpo [42]. Una forma de superar estas limitaciones es combinándolo con otros biomateriales para mejorar su hidrofiliidad, biodegradabilidad y regular sus propiedades mecánicas [37, 43].

El polietilenglicol (PEG) es un polímero sintético soluble en agua cuya unidad repetitiva es el óxido de etileno. Es hidrofílico, no inmunogénico y su toxicidad es baja. Posee una resistencia intrínseca a la adsorción de proteínas y adhesión celular, lo cual lo vuelve un material bioinerte [37, 41]. Tanto polímeros como oligómeros de PEG son usualmente modificados reemplazando los grupos hidroxilos por grupos acrilatos (PEGDA) o metacrilatos (PEGDMA) obteniéndose un derivado entrecruzable. La reacción de entrecruzamiento puede obtenerse por polimerización térmica o fotopolimerización [44]. Cuando la reacción es fotoiniciada, la polimerización por radicales libres ocurre en presencia de un fotoiniciador expuesto a luz UV. Cada monómero de PEGDMA tiene dos grupos metacrilatos los cuales pueden reaccionar con hasta otros dos grupos metacrilato creando enlaces covalentes. De esta manera, cada monómero puede unirse covalentemente hasta con otros cuatro monómeros resultando en una red entrecruzada (Figura 7) [45].

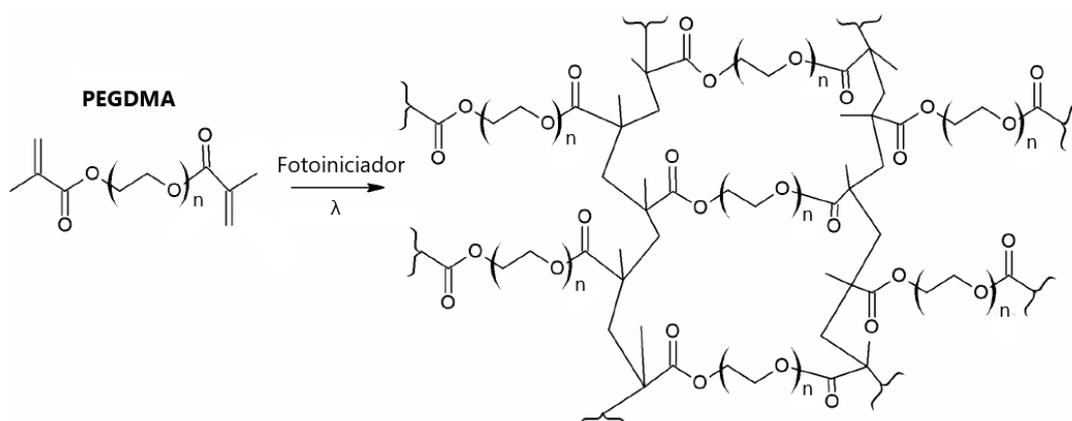


Figura 7. Reacción de fotopolimerización del PEGDMA que resulta en una red polimérica entrecruzada.

Los hidrogeles basados en PEG son uno de los sistemas de biomateriales más adaptables ya que sus propiedades pueden controlarse variando el peso molecular, composición química, la cantidad y tipo de iniciador, y el grado de entrecruzamiento

[46, 45]. Además, poseen una baja biodegradabilidad debida a la estabilidad hidrolítica de los enlaces éter, lo cual los hace adecuados como material para aplicaciones en cultivo celular. Sin embargo, éstos no pueden utilizarse solos ya que no proveen de un entorno ideal para la adhesión celular y formación de tejido; es por esto que se los mezcla con polímeros biocompatibles.

## **2. Objetivos**

El objetivo principal de este proyecto es obtener matrices electrohiladas biomiméticas basadas en GelMA para que en su potencial uso en cultivo celular influyan en el proceso de diferenciación de células madre a través de control de la topografía y composición del biomaterial. Los objetivos específicos propuestos son:

- Optimizar el procesamiento por electrohilado de soluciones basadas en GelMA para la obtención de fibras con distintas morfologías (al azar y alineadas) a partir del uso de distintos colectores.
- Modular el tiempo de degradación mediante dos estrategias: (1) agregando distintas cantidades de un entrecruzante biocompatible (PEGDMA) o (2) mezclando con polímero de mayor tiempo de degradación (PCL).
- Caracterizar la morfología y propiedades de las distintas matrices obtenidas.
- Evaluar la posibilidad de escalar el/los material/es adecuados para la aplicación y comparar con materiales comerciales semejantes.

## **3. Materiales**

La gelatina metacrilada (GelMA) con un grado de funcionalización de 71% fue sintetizada previamente a partir de gelatina tipo A de piel porcina con Resistencia de Gel 300 y anhídrido metacrílico (MAA) comprados a Sigma-Aldrich [34]. Se empleó además poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL,  $M_n=80.000$ , Sigma-Aldrich) y polietilenglicol dimetacrilato (PEGDMA,  $M_n=550$ , Sigma-Aldrich). El ácido acético glacial fue comprado a Aldrich y el metanol a Laboratorios Cicarelli. El fotoiniciador Irgacure® 2959 fue donado por BASF (Nienburg, Alemania). La solución buffer-fosfato salina (PBS) fue preparada en el laboratorio (0,1 M, pH=7,4).

## 4. Métodos

### 4.1. Obtención de las matrices

Las matrices nano y microfibrosas de GeIMA/PCL y GeIMA/PEGDMA se fabricaron por electrohilado de soluciones poliméricas.

#### 4.1.1. Preparación de las soluciones poliméricas

Se prepararon soluciones de GeIMA/PEGDMA y GeIMA/PCL en ácido acético glacial empleando distintas relaciones en masa (Tabla 1). Para la solución GPCL primero se disolvió la PCL en el ácido acético mediante agitación magnética y luego se agregó GeIMA. Para las soluciones GPEG primero se disolvió GeIMA en el ácido acético y luego se agregó PEGDMA; una vez homogéneas se les agregó el fotoiniciador (0,5% m/v) y se las dejó 30 min en agitación antes de ser electrohiladas.

Tabla 1. Concentración de las soluciones GeIMA/PCL y GeIMA/PEGDMA.

Solución	PCL (% p/p)	GeIMA (% p/p)	PEGDMA (% p/p)
<b>GPCL</b>	8	12	-
<b>GPEG 4:1</b>	-	20	5
<b>GPEG 2:1</b>	-	17	8
<b>GPEG 1:1</b>	-	12,5	12,5

#### 4.1.2. Electrohilado

Las matrices fueron fabricadas utilizando un equipo de electrohilado (Modelo 2.2.D-350, Yflow S.D.). Los parámetros del proceso (velocidad de flujo, diferencia de potencial y distancia de la aguja al colector) se optimizaron para obtener fibras de cada mezcla. Se procesó a una distancia colector-aguja de entre 15-20 cm, a una velocidad de flujo entre 0,2-0,6 ml/h aplicando una tensión entre 8-12 kV. Las soluciones preparadas se cargaron en una jeringa de polipropileno de 10 ml conectada a un tubo de poliamida con una aguja de acero inoxidable (18 G) en el otro extremo. La aguja y el colector se conectaron a una fuente de polaridad positiva y negativa, respectivamente. Se emplearon dos tipos de colectores de aluminio: plano y rotor

(Figura 8) para obtener fibras al azar y alineadas. Las condiciones de humedad y temperatura se mantuvieron durante los procesamientos entre  $24,5\pm 1,5^{\circ}\text{C}$  y  $39\pm 6\%$ , respectivamente. Una vez obtenidas, las matrices se secaron bajo vacío a temperatura ambiente para eliminar el solvente que pudiera haber quedado luego del procesamiento.

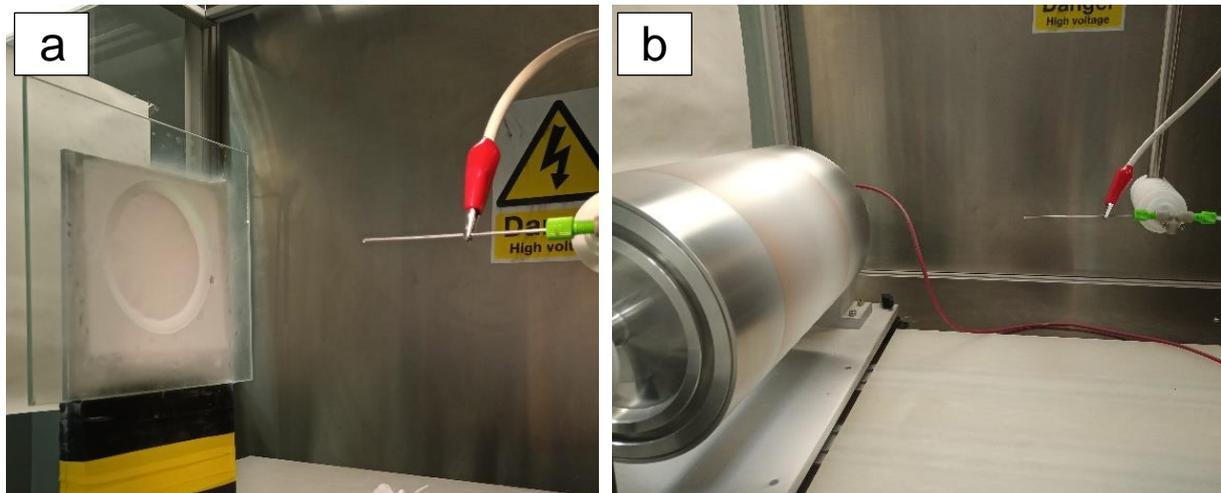


Figura 8. a) Colector plano y b) tambor rotatorio utilizados para obtener fibras al azar y alineadas, respectivamente.

Se fabricaron además matrices bicapa con el fin de facilitar la manipulación. Para esto, primero se electrohiló una capa de PCL a partir de una solución 20%p/p de PCL en ácido acético y luego la solución de GelMA de interés.

#### 4.1.3. Fotoentrecruzamiento de las matrices

El entrecruzamiento de las matrices se llevó a cabo rociando las membranas con una solución del fotoiniciador al 1% en metanol y exponiéndolas a una fuente de luz UV (Lámpara UVL-28, 365 nm) a 2,5 cm durante 10 min. Luego del entrecruzamiento las muestras fueron secadas en una cámara de vacío a temperatura ambiente.

### 4.2. Caracterización de las soluciones poliméricas

#### 4.2.1. Viscosidad

La viscosidad de las soluciones fue determinada a temperatura ambiente utilizando un viscosímetro MYR de la serie VR 3000 con un adaptador de pequeño volumen. Se

utilizó un husillo tipo TR8 y las velocidades de rotación seleccionadas fueron 20 rpm para las matrices GPCL y GPEG 4:1, y 50 y 100 rpm para las matrices GPEG 2:1 y GPEG 1:1, respectivamente.

#### 4.2.2. Tensión superficial

La tensión superficial de las soluciones se obtuvo con un goniómetro (Modelo 500, Ramé-Hart Instruments Co., USA) utilizando la técnica de la gota colgante. Para ello, el equipo tomó imágenes de una gota de la solución que pendía de una aguja justo antes de su caída. Las imágenes se analizaron de forma automática con el software DROPimage Advanced utilizando la siguiente ecuación:

$$\gamma = \frac{(\Delta\rho * g * R_0^2)}{\beta}$$

Donde  $\Delta\rho$  es la diferencia de densidad entre la gota y el fluido circundante;  $g$  es la aceleración de la gravedad;  $R_0$ , es el radio de curvatura en el ápice de la gota, y  $\beta$  es el factor de forma. Cuando la gota es lo suficientemente grande para permitir medir  $D_s$ ,  $\beta$  se define como:

$$\beta = -0.12836 + 0.7577 * \sigma - 1.7713 * \sigma^2 + 0.5426 * \sigma^3$$

$$\sigma = \frac{D_s}{D_e}$$

Siendo  $D_e$  el diámetro máximo y  $D_s$  el diámetro a una distancia  $D_e$  de la punta de la gota (Figura 9).

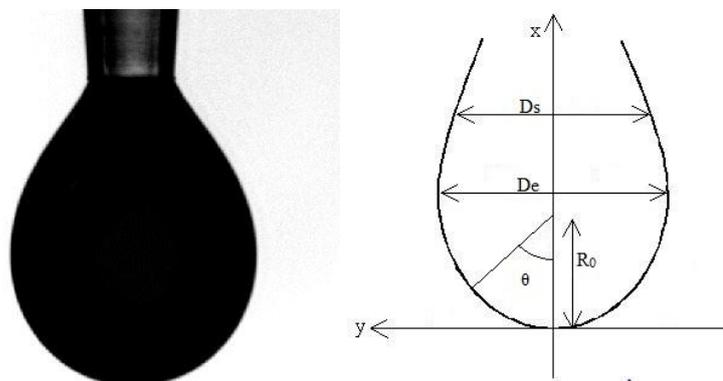


Figura 9. Perfil de la gota de solución durante el análisis de la tensión superficial.

### **4.3. Caracterización de las matrices electrohiladas**

#### **4.4. Caracterización morfológica**

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (JSM-6460 /LV, JEOL USA, Inc., USA) para observar la morfología de las matrices electrohiladas. Las muestras fueron inicialmente recubiertas con Pb/Au en una cámara de vacío a 5000 mTorr para luego ser analizadas utilizando un haz de electrones acelerado a 15 kV. A partir de las micrografías se determinaron los siguientes parámetros estructurales:

##### **4.4.1.1. Diámetro de fibras**

Se determinó el diámetro de 100 fibras distintas en una micrografía de cada sistema utilizando el software Image-Pro Plus. A partir de estos valores se obtuvo un histograma y valor medio del diámetro de fibras para cada matriz.

##### **4.4.1.2. Orientación de fibras**

La orientación de las fibras se determinó utilizando el complemento Directionality de ImageJ el cual aplica una transformada de Fourier para analizar la dirección de las fibras. Por otra parte, para evaluar el grado de alineación se utilizó el ángulo de cada fibra proporcionado por Image-Pro Plus y se sustrajo el ángulo medio de fibra del valor de las fibras individuales con el objetivo de normalizar la alineación. Luego se graficó el histograma del ángulo de fibra para cada matriz dentro  $\pm 90^\circ$  y el porcentaje de fibras alineadas se calculó considerando alineada a una fibra si su ángulo se encontraba a  $\pm 20^\circ$ .

#### **4.4.2. Caracterización química**

##### **4.4.2.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

Las matrices se analizaron utilizando un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) (Nicolet 6700, Thermo Scientific, Inc., USA) en el intervalo de números de onda de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

### **4.4.3. Caracterización superficial**

#### **4.4.3.1. Ángulo de contacto**

El ángulo de contacto de las matrices se midió con un goniómetro (Modelo 500, Ramé-Hart Instruments Co., USA) utilizando el método de la gota sésil. Se recortaron cuadrados de las distintas matrices, se depositó una gota de agua destilada (MilliQ) sobre la superficie de cada matriz con una micropipeta y se obtuvieron los ángulos de contacto con el software DROPimage Advanced. Se tomaron imágenes de las gotas durante la medición utilizando una cámara CDD. El procedimiento fue repetido tres veces para cada matriz.

### **4.4.4. Caracterización térmica**

#### **4.4.4.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Para determinar las propiedades térmicas (temperatura de transición vítrea, entalpía de fusión, temperatura de fusión) de los componentes puros y las matrices obtenidas luego del electrohilado se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (Pyris 1, PerkinElmer Inc., USA). Se realizó un barrido de nitrógeno con el siguiente programa térmico: las muestras se mantuvieron 1 min a 10°C y luego se aplicó una velocidad de calentamiento de 10°C/min hasta alcanzar 300°C.

#### **4.4.4.2. Análisis termogravimétrico (TGA)**

Con el objetivo de determinar la estabilidad térmica de las matrices (rango de estabilidad, temperaturas de degradación) se realizó un análisis termogravimétrico (TGA-50, Shimadzu Scientific Instruments, USA). Las muestras se calentaron de 25 a 700°C a una velocidad de 10°C/min en una atmósfera de nitrógeno.

### **4.4.5. Hinchamiento**

Se cortaron cuadrados de aproximadamente 1 cm de lado de las matrices bicapa y se los colocó en viales previamente pesados. Luego se pesó el conjunto en una balanza analítica ( $W_o$ ) y se calculó la masa de muestra ( $W_m$ ) como la diferencia. Cada muestra fue inmersa en 2 ml de solución buffer fosfato (PBS) de pH=7,4 y los viales se

introdujeron en una incubadora a 37°C. Luego de 1h, 3h, 6h, 1d, 3d y 7d se retiró el PBS, se quitó el excedente de líquido de las paredes de los viales y se pesaron nuevamente ( $W_f$ ). El grado de hinchamiento se calculó como:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = 100 \times \frac{(W_f - W_o)}{W_m}$$

#### 4.4.6. Degradación

Se evaluó la degradación de las matrices con el tiempo en PBS a 37°C. Para ello se secaron en una cámara de vacío a temperatura ambiente las muestras anteriormente inmersas en PBS a 37°C durante 1, 3 y 7 días (Sección 4.3.4.) y luego se pesaron dentro de los viales ( $W_d$ ). Se calculó la degradación como la pérdida de masa utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta M(\%) = 100 \times \frac{(W_o - W_d)}{W_m}$$

## 5. Resultados

La gelatina metacrilada ha demostrado ser un biopolímero con propiedades biológicas óptimas dada su estructura proteica y la presencia de secuencias del RGD que favorecen la adhesión celular [31]. Particularmente, en nuestro grupo de investigación, se han desarrollado previamente matrices electrohiladas de GelMA como soporte para cultivo celular [34]. Sin embargo, la necesidad de un mayor control en las propiedades de degradación e hinchamiento de las matrices de GelMA motivó el desarrollo de este trabajo. De esta forma, se fabricaron matrices de GelMA/PCL y de GelMA/PEGDMA para analizar la influencia del mezclado con un polímero de menor velocidad de biodegradación y de un entrecruzamiento químico en las propiedades del biomaterial.

### 5.1. Caracterización de las soluciones poliméricas

Se evaluaron dos propiedades intrínsecas de las soluciones poliméricas que afectan el proceso de electrohilado: la tensión superficial y la viscosidad. Los resultados para las distintas soluciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Viscosidad y tensión superficial de las soluciones poliméricas.

<b>Solución</b>	<b>Tensión superficial (mN/m)</b>	<b>Viscosidad (mPa.s)</b>
<b>GPCL</b>	24,90 ± 0,01	990 ± 25
<b>GPEG 4:1</b>	29,76 ± 0,08	360 ± 25
<b>GPEG 2:1</b>	27,17 ± 0,03	110 ± 10
<b>GPEG 1:1</b>	25,17 ± 0,01	80 ± 5

En las soluciones GPEG se observa una mayor viscosidad al aumentar la cantidad relativa de GelMA. Este incremento está relacionado a un aumento en el volumen hidrodinámico, es decir, el volumen ocupado por la configuración adoptada por la cadena polimérica y el solvente embebido en ella. Esto puede atribuirse a la mayor interacción electrostática debida al incremento de las especies cargadas resultantes de la disolución de la GelMA en el ácido acético y al impedimento estérico causado por las cadenas de GelMA, de mayor peso molecular que el PEGDMA. La solución GPCL presentó el mayor valor de viscosidad, lo cual puede relacionarse al alto peso molecular de la PCL. La mayor interacción entre las cadenas de GelMA y PCL, ambas de alto peso molecular, limita el movimiento de cadenas, lo cual se ve reflejado en un aumento de la viscosidad.

Se puede observar una tendencia a aumentar la tensión superficial al aumentar la cantidad relativa de GelMA en la solución. Además, los valores de las soluciones GPCL y GPEG 1:1 son similares, lo cual puede estar dado por similitud en la concentración de GelMA de ambas soluciones. Para poder observar esto mejor en la Figura 10 se muestra un gráfico de la tensión superficial en función de la concentración de GelMA en la solución.

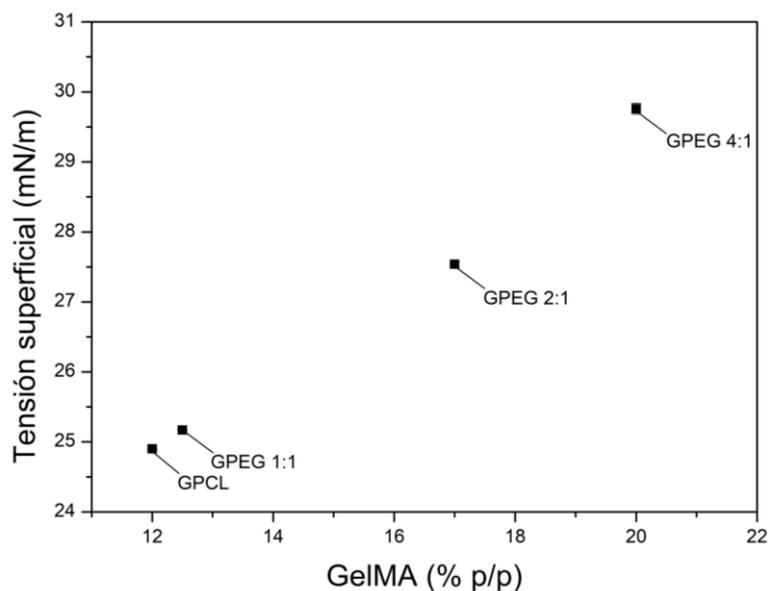


Figura 10. Tensión superficial como función de la concentración de GelMA en la solución

## 5.2. Obtención de las matrices electrohiladas

Las condiciones bajo las cuales se obtuvieron las matrices y los parámetros de procesamiento utilizados se detallan en la Tabla 3. Estos fueron ajustados durante el procesamiento observando la forma de la gota de solución desde la cual se origina el microchorro y la deposición sobre el colector buscando lograr la formación del cono de Taylor y una eyección continua de fibras del extremo del mismo. Las matrices obtenidas (Figura 11) presentaron un espesor suficiente para poder ser desmoldadas y manipuladas al cabo de 3-5h de procesamiento. Sin embargo, las matrices colectadas en el tambor rotatorio mostraron espesores inferiores debido a la mayor superficie de recolección (Figura 11.b). El tiempo de procesamiento es un aspecto relevante al considerar la escalabilidad de la producción de las matrices. Por lo tanto, con el fin de acortar los tiempos de recolección, para los estudios de hinchamiento, de degradación y biológicos se realizaron matrices con una primera capa de PCL (2h, 20cm, +13kV, -2kV, 1ml/h) por sobre la cual se electrohiló la solución de interés (Tabla 4). De esta forma, se obtuvieron matrices con un espesor tal que permite el desmolde y manipulación.

Tabla 3. Parámetros de procesamiento utilizados en el electrohilado

Orientación	Matriz	Distancia al colector (cm)	T + (kV)	T - (kV)	V <sub>flujo</sub> (ml/h)
Al azar	GPCL	20	8,5	1	0,2
	GPEG 4:1	15	9	1	0,2
	GPEG 2:1	15	10	1	0,6
	GPEG 1:1	15	9	1	0,2
Alineadas	GPCL	20	9	2	0,2
	GPEG 2:1	15	10	2	0,6

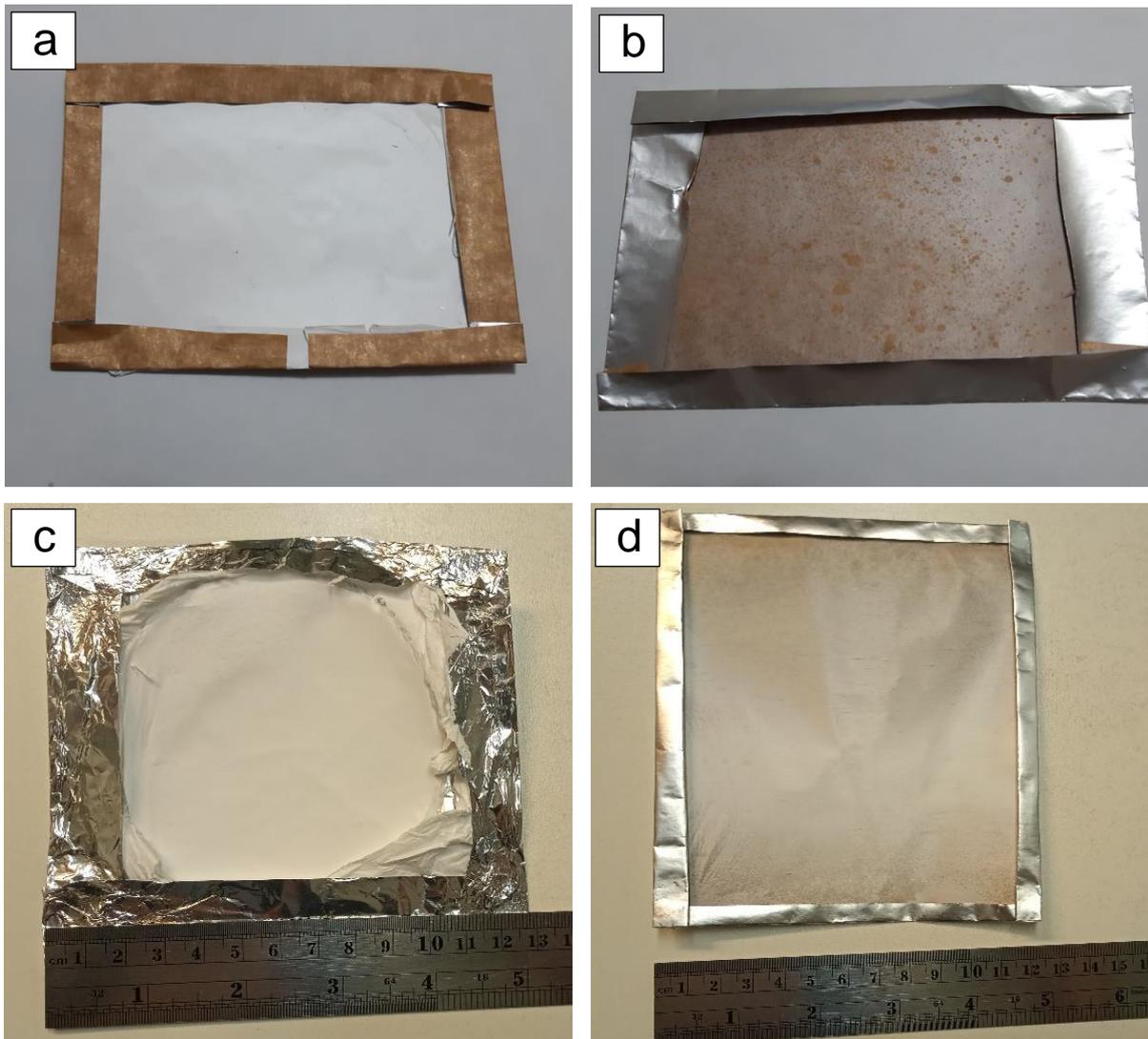


Figura 11. Fotografía de algunas de las matrices producidas: a) GPEG 2:1 alineadas, b) GPCL alineadas, c) PCL – GPEG 2:1 al azar y d) PCL - GPCL alineadas

Tabla 4. Parámetros de procesamiento utilizados de las matrices bicapa.

Orientación	Matriz	Distancia al colector (cm)	T + (kV)	T - (kV)	V <sub>flujo</sub> (ml/h)
Al azar	GPCL	20	11	2	0,2
	GPEG 2:1	15	10	1	0,6
Alineadas	GPCL	15	11	2	0,2
	GPEG 2:1	15	10	1	0.6

### 5.3. Caracterización morfológica

Las micrografías SEM de las matrices obtenidas utilizando los parámetros detallados en la Tabla 3 junto con la distribución de tamaño de fibras y el valor diámetro medio de fibra para cada sistema se muestran de la Figura 12 a la Figura 17. En todos los casos se obtuvieron matrices de morfología nano y microfibrosa. No fue posible obtener fibras alineadas a partir de las soluciones de GPEG 4:1 y 1:1, lo cual se puede atribuir a una mayor viscosidad de la solución producto de la acción conjunta de la menor temperatura ambiente al momento de procesar y la corriente de aire generada por el tambor rotatorio frente a la punta de la aguja. Esto pudo haber ocasionado una irrupción en el flujo al taparse la aguja y que el electrohilado se vea impedido [11].

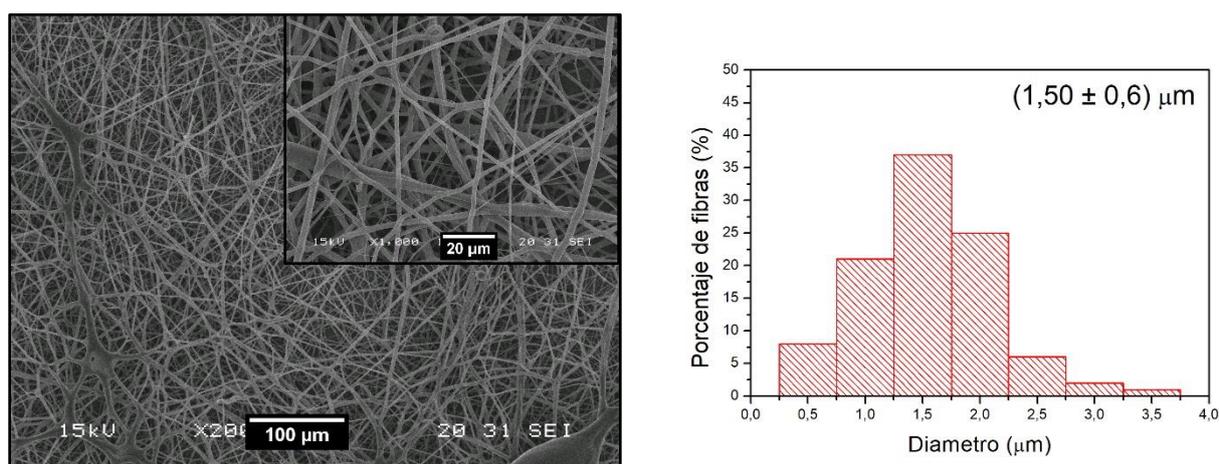


Figura 12. Matriz de GPEG 4:1 al azar: a) Micrografías a 200x y 1000x, b) Distribución de tamaño de fibras.

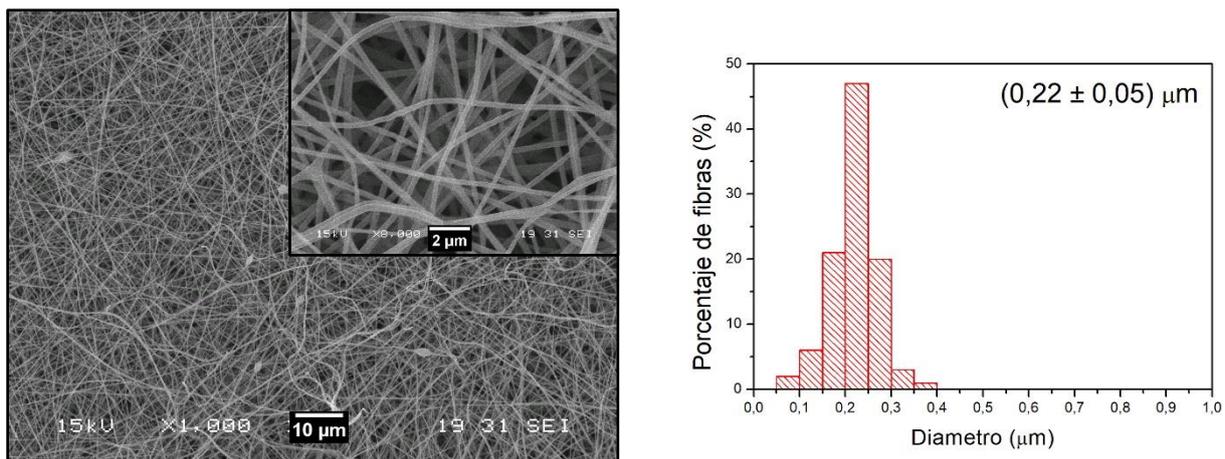


Figura 13. Matriz de GPEG 2:1 al azar: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras.

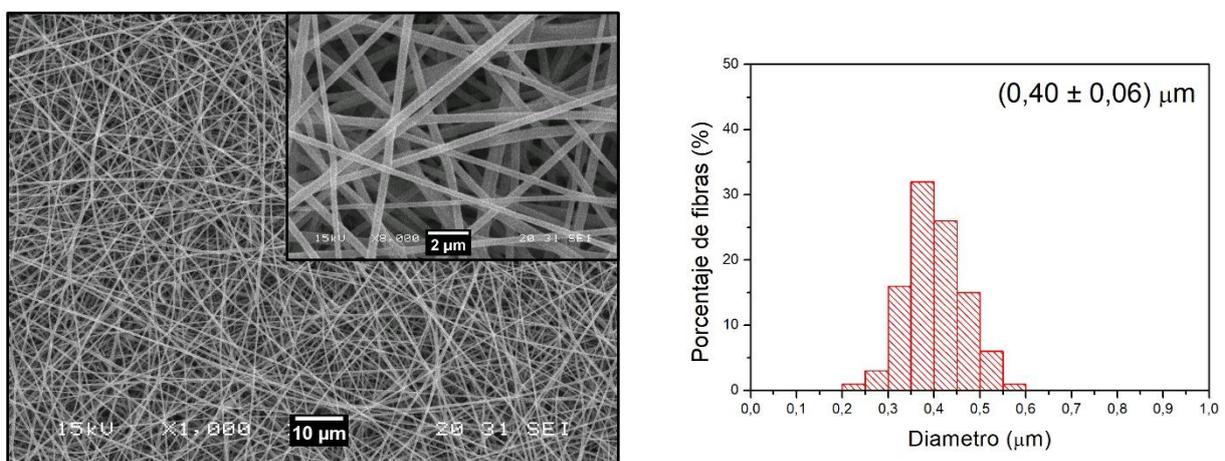


Figura 14. Matriz de GPEG 1:1 al azar: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras.

Las micrografías de matrices al azar de GPEG (Figura 12 a Figura 14) muestran una morfología principalmente fibrosa. En menor medida, se observó la aparición de fibras con perlas y fusión de fibras en las matrices. Al disminuir la cantidad de relativa de GelMA, la morfología y diámetro de fibra se tornó más homogéneo. Probablemente, estas diferencias en la morfología se deben a los distintos parámetros del proceso utilizados y las condiciones ambientales al momento de procesar, así como de las propiedades intrínsecas de cada solución. Es posible que la aparición de perlas se deba la mayor tensión superficial de la solución polimérica al aumentar la cantidad relativa de GelMA. Una elevada tensión superficial puede ocasionar que el enmarañamiento de cadenas poliméricas se rompa en fragmentos antes de llegar al colector causando la formación de fibras con perlas [13]. Es por esto que soluciones

que presentan una elevada tensión superficial tienen una tendencia a formar fibras con perlas durante el electrohilado, mientras que aquellas con menor tensión superficial tienden a formar fibras más uniformes y continuas [47]. Al mismo tiempo, la mayor viscosidad de las soluciones al aumentar la relación GelMA/PEGDMA pudo resultar en un secado incompleto del microchorro, provocando que las fibras se fusionen, como se ha sido reportado para otros sistemas [11].

Se obtuvo un tamaño medio de fibra de  $1,5 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ,  $0,22 \pm 0,05 \mu\text{m}$  y  $0,4 \pm 0,06 \mu\text{m}$  en las matrices GPEG al azar 4:1, 2:1 y 1:1, respectivamente. La primera presentó un tamaño medio de fibra un orden de magnitud mayor respecto de las relaciones 2:1 y 1:1, lo cual puede atribuirse a la mayor viscosidad de la solución GPEG 4:1. Las fuerzas viscoelásticas en el microchorro resisten las fuerzas repulsivas que tienden a estirarlo que resultan de las cargas inducidas en la superficie por la diferencia de potencial eléctrico, obteniéndose fibras más gruesas [11].

Las matrices con PCL presentaron fibras más finas y con una distribución más estrecha de tamaño de fibras respecto a las matrices con PEGDMA. Matrices con diámetro medio de fibras y morfología similares a las obtenidas en este trabajo se han reportado para matrices de PCL electrohiladas a partir de soluciones 12% p/v [43]. El menor diámetro de fibra de estas matrices puede estar relacionado a la mayor distancia aguja-colector y menor concentración de polímero en la solución utilizadas para este sistema respecto a las matrices GPEG. Además, presentaron una mayor densidad de perlas que las observadas en GPEG, tanto en la matriz al azar como en la alineada (Tabla 5). Este tipo de morfologías no fibrosas en principio no pueden ser consideradas defectos en matrices destinadas al cultivo celular, y su efecto en el comportamiento de las células en particular deberá ser evaluado.

Tabla 5. Diámetro medio y área aproximada de perlas en las matrices GPCL

	<b>Diámetro medio de perla (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Área de perlas en la matriz (%)</b>
<b>GPCL al azar</b>	$1,5 \pm 0,5$	5
<b>GPCL alineadas</b>	$1.4 \pm 0,7$	2

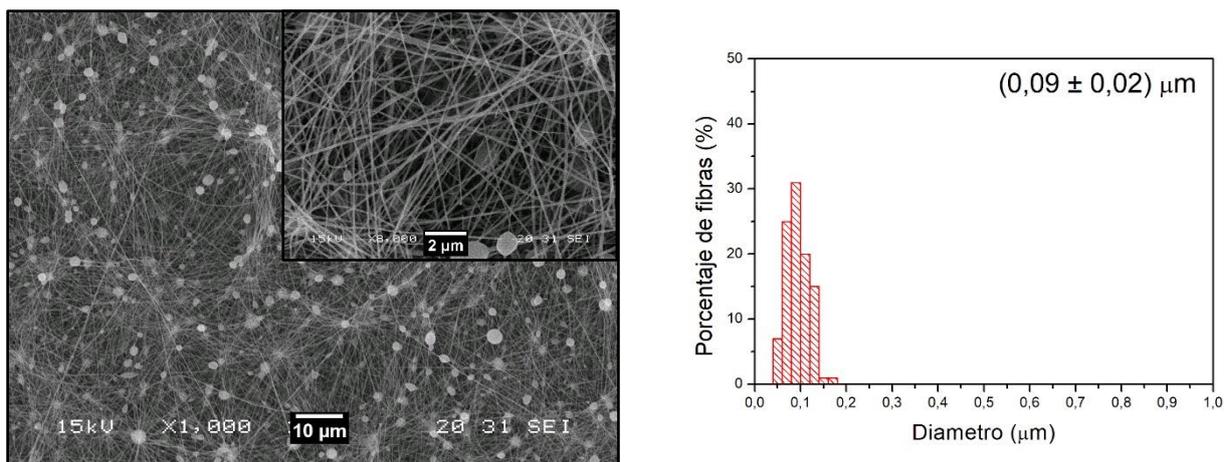


Figura 15. Matriz de GPCL al azar: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras.

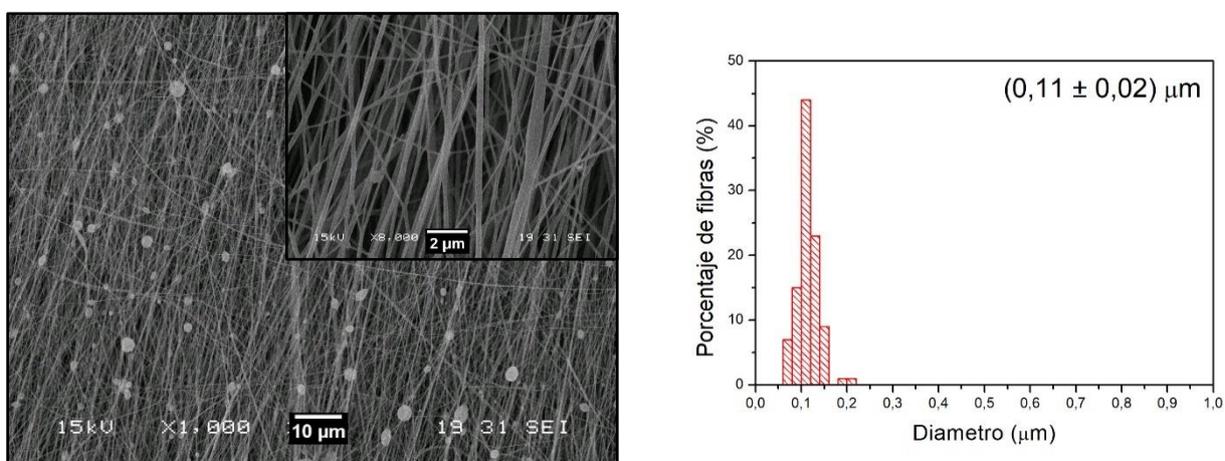


Figura 16. Matriz de GPCL alineadas: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras.

En la Figura 17 y Figura 18 se muestran las micrografías de la matriz GPEG 2:1 alineada sin entrecruzar y entrecruzada, respectivamente. No se observan cambios en la morfología y distribución de tamaño de fibras luego del rociado con la solución conteniendo el fotoiniciador y del entrecruzamiento.

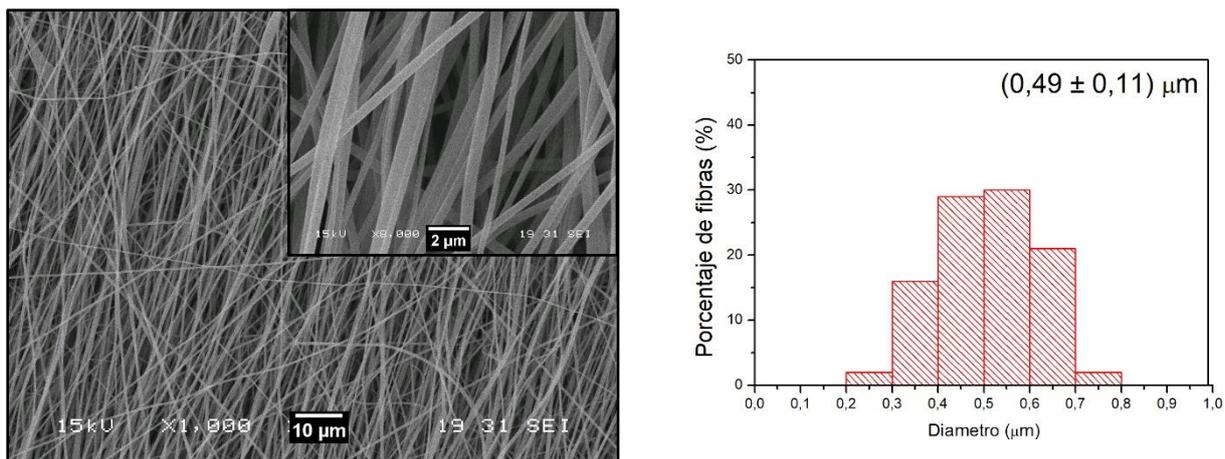


Figura 17. Matriz de GPEG 2:1 alineadas: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras.

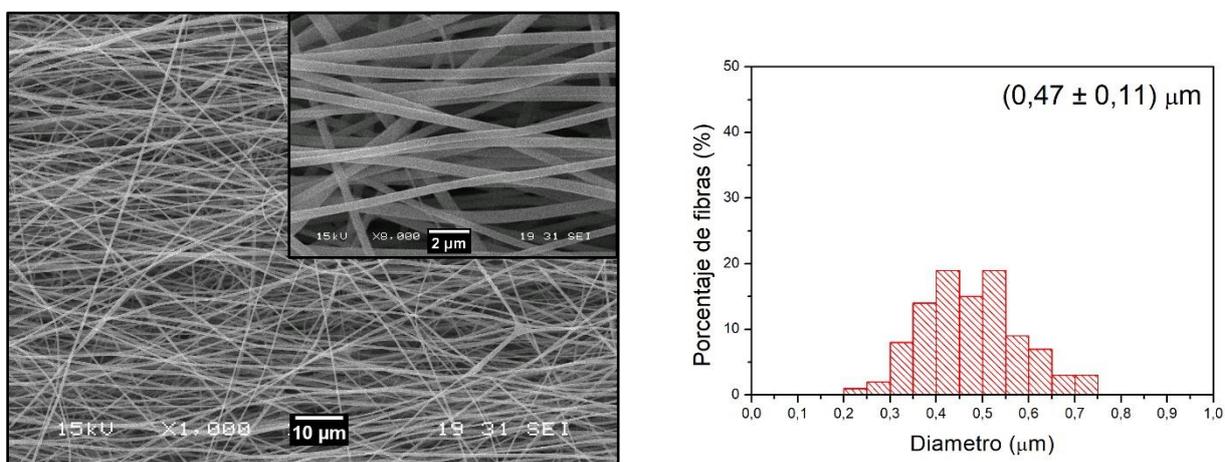


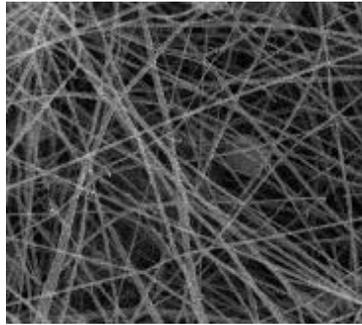
Figura 18. Matriz de GPEG 2:1 alineadas sin entrecruzadas: a) Micrografías a 1000x y 8000x, b) Distribución de tamaño de fibras.

El análisis de la direccionalidad de las fibras utilizando el método por Transformada de Fourier para ambas configuraciones de colector se muestra en la Figura 19 para las matrices GPCL y GPEG 2:1. Como se esperaba, las fibras obtenidas en el colector plano no presentan una orientación preferencial, mientras que las fibras colectadas en el colector rotatorio se encuentran mayoritariamente alineadas en una dirección. El grado de alineación se estimó como el porcentaje de fibras orientadas a  $\pm 20^\circ$  obteniéndose al utilizar el colector rotor un 70% para la matriz GPCL y 64% para la matriz GPEG 2:1 (Figura 20).

## GPCL

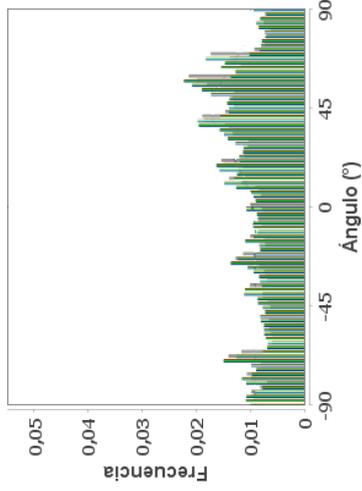
## GPEG 2:1

**A**

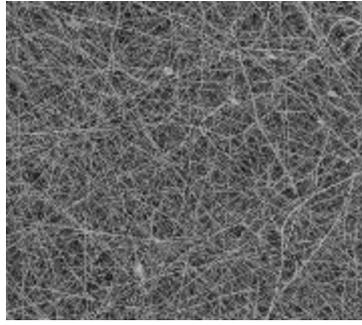


al azar

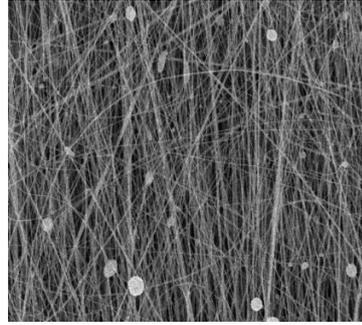
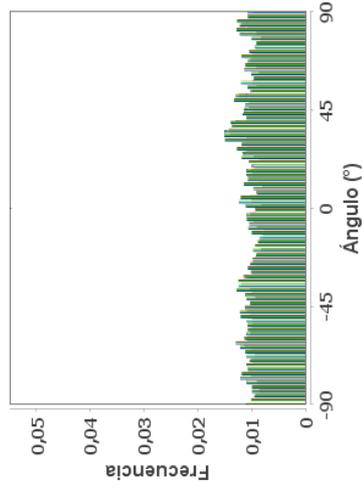
**B**



**C**



**D**



alineadas

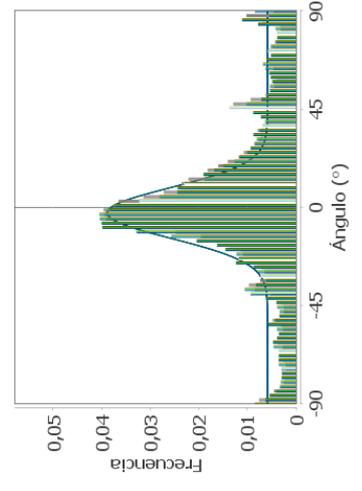
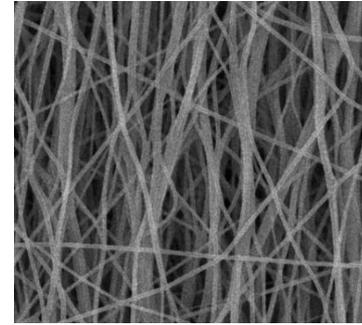
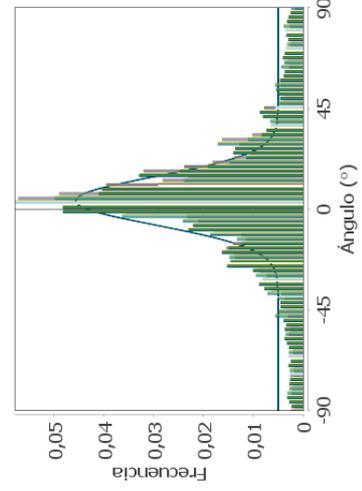


Figura 19. Análisis de la orientación de las fibras: micrografías e histogramas ilustrando la direccionalidad de las matrices GPCL y GPEG 2:1

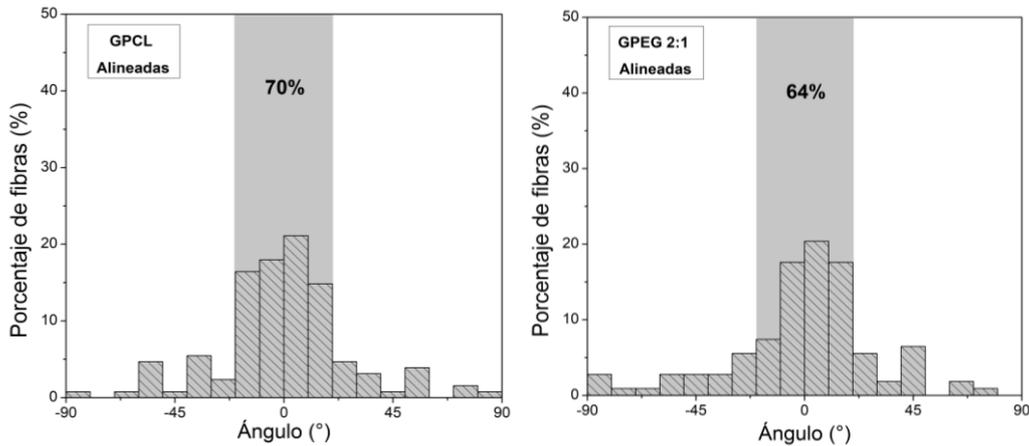


Figura 20. Histogramas ilustrando el porcentaje de alineación ( $\pm 20^\circ$ ) de las matrices GPCL y GPEG 2:1 obtenidas con el colector rotor (900rpm)

#### 5.4. Caracterización superficial

El ángulo de contacto (Figura 21) de las matrices electrohiladas se determinó como medida de la hidrofiliidad. Esta propiedad es crítica ya que influye directamente en las interacciones célula-biomaterial que tienen lugar en la superficie [48].

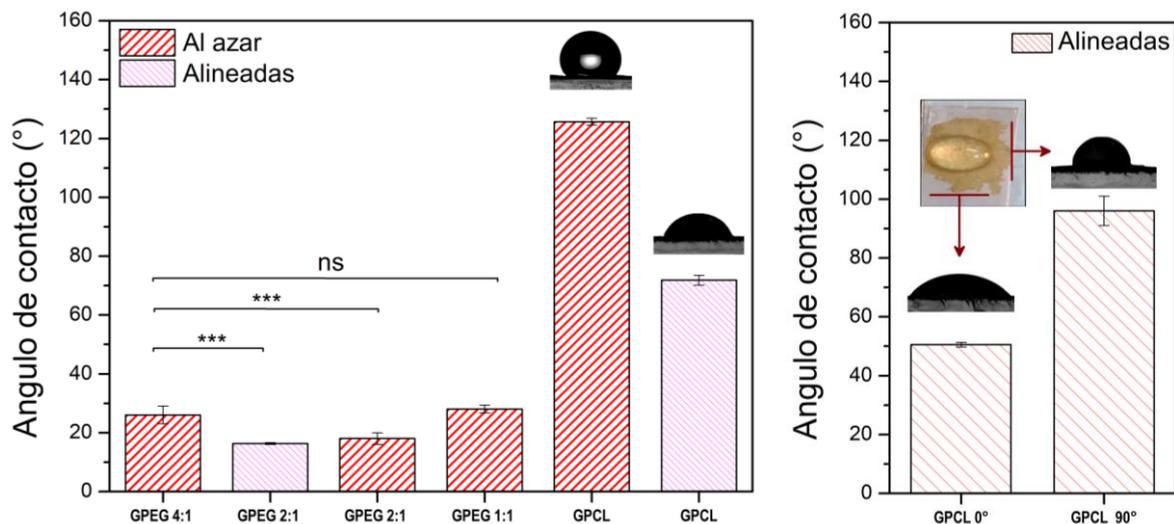


Figura 21. Ángulo de contacto de las matrices: entrecruzadas al azar y alineadas (izq.), y GelMA/PCL sin entrecruzar alineadas donde se observa una elongación de la gota en la dirección de las fibras (dcha.).

Los valores de ángulo de contacto para las matrices de GPEG corroboraron la característica hidrofílica de la superficie polimérica y son menores a reportados para matrices de GelMA donde se midieron ángulos de contacto de entre  $40\text{-}60^\circ$  [34]. Esto posiblemente se deba al alto carácter hidrofílico del PEGDMA.

Las diferencias en los valores medidos para las distintas relaciones GelMA/PEGDMA están dadas por las diferencias en la composición química y la morfología de las matrices. El PEGDMA es más hidrofílico y se esperaría que un aumento en su cantidad relativa disminuyera el ángulo de contacto. Sin embargo, un aumento en la cantidad relativa de PEGDMA puede estar relacionado a un mayor entrecruzamiento de las cadenas debido a la presencia de una mayor cantidad de grupos funcionales polimerizables. En todas las matrices GPEG, luego de unos segundos las gotas se adsorbían.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de la PCL, las matrices GPCL presentaron mayores ángulos de contacto respecto a los de las matrices GPEG. Se observó un aumento del ángulo de contacto luego de irradiar con luz UV, probablemente debido al entrecruzamiento de los grupos metacrilato en la GelMA.

En las matrices alineadas se observó un comportamiento direccional de la gota de agua al elongarse en la dirección de las fibras. La Figura 21 muestra el ángulo de contacto en la dirección de las fibras de GPCL y perpendicular a éstas. Luego de un minuto las gotas permanecieron en la superficie.

## 5.5. Caracterización química

En la Figura 22 se muestran los espectros FTIR de las matrices y las materias primas. Los picos principales de los componentes pudieron ser identificados en los espectros de las matrices electrohiladas. Las bandas asociadas a las proteínas en la GelMA aparecieron alrededor de  $1629\text{ cm}^{-1}$  (amida I),  $1537\text{ cm}^{-1}$  (amida II) y  $1442\text{ cm}^{-1}$  (amida III) correspondientes a vibraciones de estiramiento del enlace C=O, flexión del enlace N-H, y estiramiento del enlace C-N y flexión del N-H, respectivamente [49]. También es posible observar el estiramiento del enlace N-H (amida A) a  $3289\text{ cm}^{-1}$ . No se identificaron diferencias entre los espectros antes y después de entrecruzar las matrices. El modo vibracional del enlace C=C del grupo metacrilato, usualmente utilizado para seguir la cantidad de enlaces C=C sin reaccionar, se superpone con la banda de la amida primaria de la gelatina a aproximadamente  $1537\text{ cm}^{-1}$  con lo cual no puede distinguirse en los espectros [38, 50, 51]. Asimismo, tanto el PEGDMA como la GelMA presentan en su estructura el grupo funcional éter, con lo cual el pico a  $1168\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento C-O-C se encuentra en las matrices antes y luego de irradiar con luz UV [52]. La diferencia en la cantidad relativa de PEGDMA entre las

matrices puede visualizarse a través del aumento en la intensidad del pico a 1714  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del enlace carbonilo en el grupo acrilato. Los picos identificados correspondientes a la PCL incluyen 2939  $\text{cm}^{-1}$  y 2858  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento asimétrico y simétrico del  $\text{CH}_2$ , respectivamente), 1718  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento del grupo carbonilo), 1290  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento enlaces C-O y C-C), 1247  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento COC asimétrico) y 1170  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento C-O-C) [53].

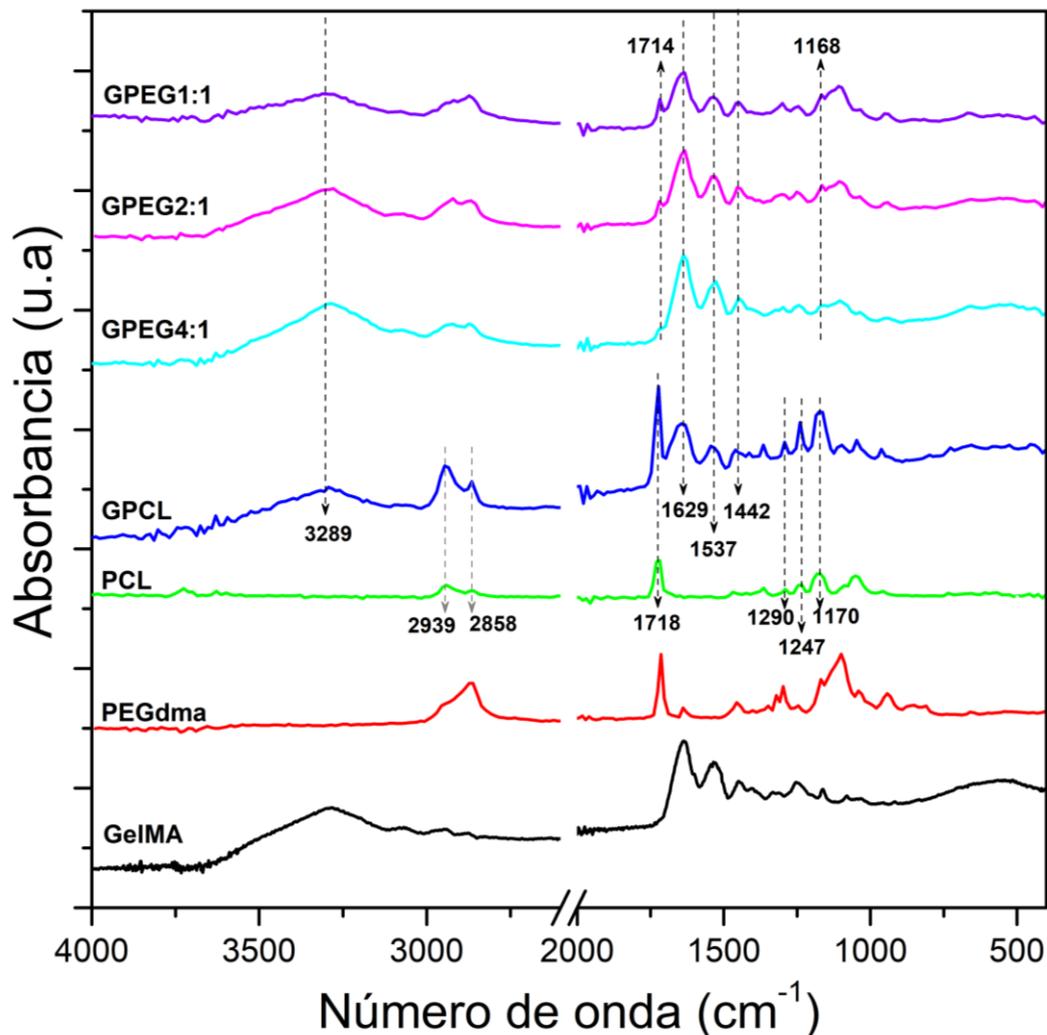


Figura 22. Espectro FTIR de las matrices y materias primas

## 5.6. Caracterización térmica

En la Figura 23 y en la Tabla 6 se muestran los resultados del análisis termogravimétrico. Todas las matrices GPEG experimentaron una pérdida de masa de 6-8% entre los 25-120°C debido a la evaporación del agua adsorbida en las matrices, siendo ligeramente mayor a mayor contenido de GelMA. Estas matrices

mostraron un comportamiento similar a la GelMA, comenzando la degradación del biopolímero a aproximadamente 280°C. Por otra parte, la matriz GPCL presentó una curva de una sola etapa. Para esta muestra la pérdida de masa por debajo de 120°C fue menor al 1% debido a su carácter hidrofóbico, observado en su ángulo de contacto de  $129 \pm 3$ . Esta matriz resultó ser estable hasta 375°C, temperatura a la cual comenzó a degradarse; similar al comportamiento observado en la literatura para las matrices de PCL [54].

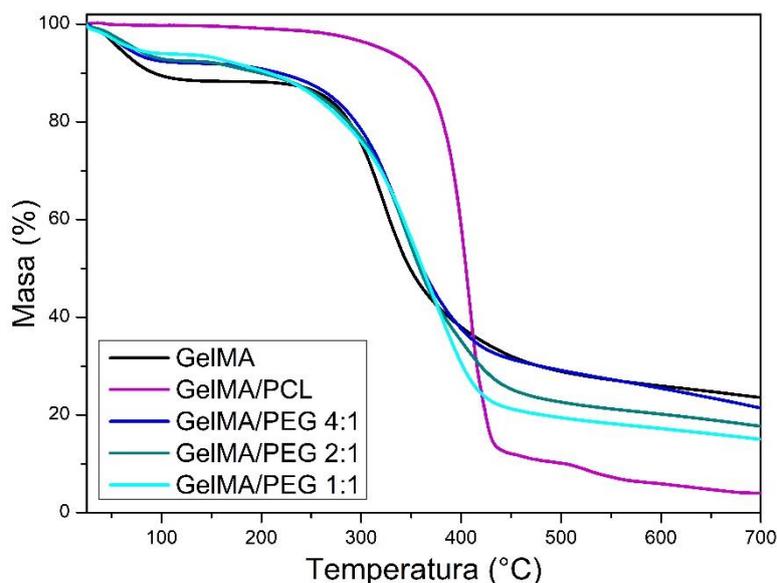


Figura 23. Resultados del análisis termogravimétrico de la GelMA y las matrices GPCL y GPEG.

Tabla 6. Análisis de los termogramas: temperatura al comienzo y a la máxima velocidad de degradación, y masa remanente a 700°C.

	<b>GeIMA</b>	<b>GPCL</b>	<b>GPEG 4:1</b>	<b>GPEG 2:1</b>	<b>GPEG 1:1</b>
<b>T<sub>onset</sub> (°C)</b>	279	375	282	282	278
<b>T<sub>vmax</sub> (°C)</b>	324	408	339	343	366
<b>Masa<sub>700°C</sub> (%)</b>	24	4	21	18	15

Como puede observarse en la Tabla 6, la temperatura a la que tuvo lugar la máxima velocidad de degradación es mayor al aumentar la cantidad relativa de PEGDMA. Esto puede confirmar un mayor entrecruzamiento de las matrices con mayor cantidad de PEGDMA. En la tabla también se observa que la masa remanente a 700°C de las

matrices GPEG se asemeja más el valor de la GelMA al aumentar la cantidad relativa de GelMA en la solución.

De acuerdo con la literatura, el DSC de la gelatina comercial revela una transición de segundo orden seguido de una transición endotérmica de primer orden a temperaturas en el rango de 80-90°C y 110-115°C, respectivamente. La primera es atribuida a la movilidad de los aminoácidos en la cadena peptídica relacionadas a las regiones amorfas, mientras que la segunda es debida a la desnaturalización de la proteína [34, 55]. En la Figura 24 se presentan los resultados del DSC de las distintas matrices electrohiladas. La matriz GPCL presentó un pico agudo a 59°C correspondiente a la fusión de los cristales de PCL, consistente con la literatura [38]. Sin embargo, no fue posible observar las transiciones relacionadas a la gelatina en la curva de la matriz GPCL. La entalpía de fusión observada para esta muestra fue de 71,5 J g<sup>-1</sup>.

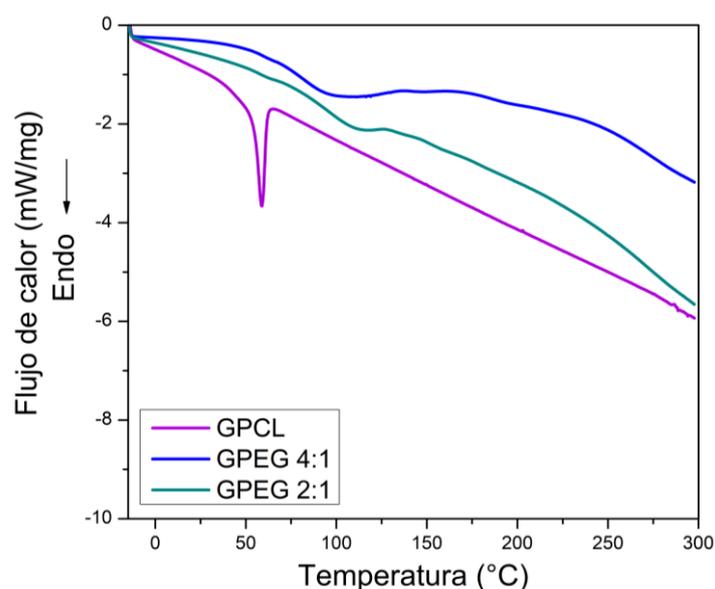


Figura 24. Curvas de DSC de las matrices entre -10°C a 300 °C a 10°C/min.

Las muestras GPEG presentaron un pico endotérmico ancho alrededor de 100°C que puede atribuirse a la pérdida de agua por evaporación observada en el TGA. Tampoco fue posible observar los eventos correspondientes a la gelatina en las matrices GPEG. Como se sugiere en la literatura, la cápsula de aluminio perforada permite a los volátiles escapar de la muestra, lo cual causa que los datos obtenidos sean menos sensibles en el rango en el que tiene lugar esta pérdida de masa [55]. A temperaturas muy altas las matrices GPEG presentaron un cambio de pendiente correspondiente a

la degradación del polímero, en correspondencia con lo observado en el análisis termogravimétrico.

### 5.7. Hinchamiento y degradación

Para su aplicación en cultivo celular, las membranas electrohiladas deben ser estables en condiciones fisiológicas (pH=7,4 y 37°C). Con el objetivo de evaluar la estabilidad de las membranas GPCL y GPEG 2:1, se determinó la pérdida de masa en función del tiempo de inmersión en PBS (pH=7,4) a 37°C por un periodo de 7 días. Asimismo, se evaluó el grado de hinchamiento a distintos tiempos de inmersión. Los resultados se presentan en la Figura 25.

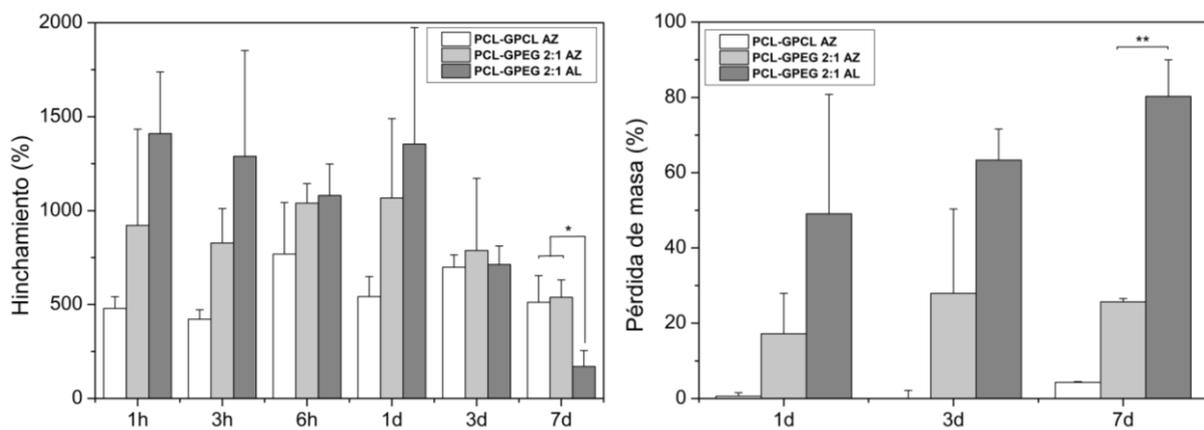


Figura 25. Hinchamiento (izq.) y degradación (dcha.) *in vitro* de las matrices GPCL y GPEG 2:1 en función del tiempo de inmersión en PBS a 37°C por 7 días.

Al cabo de una hora las membranas alcanzaron su máximo grado de hinchamiento, manteniéndose sin cambios significativos luego de 3 y 6 horas. El grado de hinchamiento de la matriz GPCL fue de aproximadamente el 500%. En un principio, no se observaron diferencias significativas en el hinchamiento de las matrices GPEG y GPCL; sin embargo, al cabo de 7 días se puede observar en la figura un menor hinchamiento de las matrices GPEG 2:1 alineadas respecto a las otras. Esto se debe a la mayor pérdida de masa que experimentaron estas luego de una semana de inmersión.

En todos los casos, se observa una tendencia a aumentar la pérdida de masa de las membranas con el tiempo de inmersión. En las matrices GPEG, esta pérdida de masa puede atribuirse a la acción conjunta de dos efectos: la disolución de las cadenas poliméricas sin entrecruzadas y un desenmarañamiento del arreglo de fibras que

constituye las matrices electrohiladas. La mayor pérdida de masa de las matrices alineadas puede entenderse como una mayor facilidad para erosionar estas en comparación a las obtenidas con el colector plano, en donde las matrices están formadas por un arreglo de fibras que se superponen y enredan consigo mismas y otras fibras. Por otra parte, debido a la baja velocidad de degradación de la PCL, la membrana GPCL exhibió la menor degradación, siendo  $4,3\pm 0,2$  % luego de 7 días.

Tanto el entrecruzamiento químico como la mezcla con un polímero de menor velocidad de biodegradabilidad permiten modular la estabilidad de las membranas basadas en GelMA en condiciones fisiológicas. La capacidad del biomaterial para estimular la diferenciación celular va a estar dada por la estabilidad en su estructura y propiedades mecánicas, siendo de importancia en la diferenciación los primeros días según sea el tipo de línea celular.

## **6. Escalado del proceso de obtención de matrices electrohiladas para cultivo celular**

En este proyecto, las membranas fueron electrohiladas a partir de un equipo con un arreglo que utiliza una sola aguja consiguiéndose una velocidad de producción entre 0,2-1 ml/h. Cuando se plantea la producción a gran escala de membranas nanofibrosas, los equipos de electrohilado utilizan configuraciones con múltiples agujas o superficies embebidas en la solución polimérica con el objetivo de incrementar la velocidad de producción. Los arreglos sin agujas pueden consistir en cilindros rotatorios o cables a los cuales constantemente se los provee de la solución y de los cuales emergen los jets. De esta forma se pueden alcanzar, dependiendo del sistema polimérico a electrohilar, velocidades de producción de 50-5000 m<sup>2</sup>/día.

Con el objetivo de evaluar la inserción en el mercado de insumos para cultivo celular de las matrices nanofibrosas electrohiladas en este proyecto, se realizó una estimación de los costos asociados al escalado de la producción de estas membranas utilizando la matriz GPEG 2:1 (Tabla 7). El costo unitario de producción de cada inserto se estimó 0,37 USD considerando una producción anual de 480.000 insertos de tamaño tal para ser utilizados en microplacas de 12 pocillos (equivalente a 40.000 microplacas).

Tabla 7. Costos de fabricación estimados de 480.000 insertos de cultivo anuales de GelMA/PEGDMA para microplacas de 12 pocillos.

<b>Costos variables (USD/año)</b>	
Materias primas	18.700
Mano de obra	14.000
Supervisión	3.500
Servicios	1.100
Mantenimiento	32.000
Suministros	2.800
Gastos de laboratorio	2.800
<b>Costos fijos (USD/año)</b>	
Depreciación	80.000
Impuestos	12.000
Seguros	6.000
Dirección y administración	4.200
<b>Total</b>	<b>177.100</b>

Actualmente se encuentran disponibles en el mercado internacional productos para cultivo celular tales como placas de Petri, microplacas e insertos para microplacas que hacen uso de membranas con composición y características morfológicas que simulan el entorno in vivo (Tabla 8). Matrigel™ es un material disponible en el mercado derivado de extractos de la sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) en ratones. Es ampliamente utilizado ya que está compuesto por proteínas presentes en la MEC y presenta factores de crecimiento que tienen lugar de forma natural en el tumor [56]. Este material simula la complejidad del entorno extracelular y ha demostrado ser óptimo para el cultivo de células madre embrionarias; mejorar la adhesión y crecimiento de varios tipos de células; y promover la angiogénesis y diferenciación celular. Sin embargo presenta una gran variabilidad en su composición, es

potencialmente antígeno y los productos que contienen Matrigel™ son muy costosos (29 USD frente a 4-5 USD para las membranas de PCL del mismo tamaño) [57]. A diferencia de estos, las membranas basadas en GelMA propuestas en este proyecto resultan una opción económica. La GelMA también posee similitudes con los componentes en la matriz extracelular de tejidos naturales y, dada la presencia de secuencias RGD, favorece la adhesión celular. Además, tanto la GelMA como el PEGDMA, a diferencia del Matrigel™, permiten que las propiedades fisicoquímicas del biomaterial sean modulables, lo cual tiene una gran influencia en el destino de las células madre.

Tabla 8. Ejemplos de productos para cultivo celular 3D disponibles en el mercado.

Empresa	Producto	Descripción	Tamaño	Precio (USD/u)	Imagen
Corning Inc.	Inserto de cultivo BioCoat™ Matrigel™ con matriz Corning™ Matrigel	Membrana de PET (tamaño de poro 8µm) recubiertas de Matrigel™	Para placa de 6 pocillos	29 [58]	
Merck	Insertos de cultivo Millicell® para microplacas	Membranas microporosas de PTFE, MF-Millipore (ésteres mixtos de celulosa) o PC	Para placa de 6 pocillos	6-9 [59]	
Nanofiber Solutions	Insertos de cultivo para microplacas	Membranas de PCL nanofibras electrohiladas de fibras alineadas o al azar que encajan en placas de cultivo estándar	Para placa de 12 pocillos	2-3 [60]	
			Para placa de 6 pocillos	4-5 [60]	
	Placa de Petri	Placa de Petri con membrana electrohilada nanofibrosa de PCL de fibras alineadas o al azar	Φ=60mm Φ=100mm	25-30 [60]	
The Electrospinning Company	Microplaca	Microplaca con membrana de PLLA nanofibrosa electrohilada extraíble de fibras al azar	12 pocillos	165 [61]	

## 7. Conclusiones

En los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos en la obtención de matrices que puedan imitar por completo la complejidad de los tejidos naturales y la variedad de interacciones célula-matriz que se encuentra *in vivo*.

En este trabajo se logró optimizar el proceso de electrohilado de mezclas GelMA/PEGDMA y GelMA/PCL para obtener exitosamente matrices con características topográficas controlables partir de una técnica sencilla. Una vez obtenidas las matrices, estas se entrecruzaron utilizando luz UV para superar las limitaciones de la baja estabilidad de la gelatina en medios acuosos; esto se logró sin introducir cambios en las características morfológicas de las matrices y permitió modular las propiedades de hinchamiento y degradación de las mismas. En resumen, se obtuvieron matrices que podrían influir en el proceso de diferenciación de células madres mediante el control de la topografía y composición química del biomaterial.

## 8. Proyecciones

Cabe mencionar que si bien se logró lo propuesto en el plan de este proyecto, dada la situación actual en relación al COVID-19 los siguientes estudios se realizarán en un futuro:

- Determinación del tamaño y distribución de poros de las matrices. Las estructuras porosas interconectadas permiten que las células penetren en la matriz y facilitan el intercambio de nutrientes y desechos.
- Propiedades mecánicas de las matrices.

Por otro lado, en colaboración con el Dr. Diego Bustos y la Dra. Marina Uhart Laboratorio de Integración de Señales Celulares (IHEM-nuevo edificio, FCM U.N.Cuyo-CONICET) se está llevando a cabo la evaluación de las membranas como soportes para el cultivo de células madre. Estos estudios también se vieron retrasados por la pandemia.

## Referencias

- [1] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna y D. Williams, «Key terminology in biomaterials and biocompatibility,» *Current Opinion in Biomedical Engineering*, vol. 10, pp. 45-50, 2019.
- [2] T. Ha, «Biomimetic scaffolds for stem cell-based tissue engineering,» *Biomimetic Biomaterials: Structure and Applications*, pp. 181-206, 2013.
- [3] M. Tewary, N. Shakiba y P. W. Zandstra, «Stem cell bioengineering: building from stem cell biology,» *Nat Rev Genet*, vol. 19, pp. 595-614, 2018.
- [4] G. Vunjak-Novakovic y D. T. Scadden, «Biomimetic Platforms for Human Stem Cell Research,» *Cell Stem Cell*, vol. 8, nº 3, pp. 252-261, 2011.
- [5] D. Choi, S. Choi, H. Kang, H. J. Min, R. Lee, M. Ikram, F. Subhan, S. Jin, Y. Jeong, J.-Y. Kwak y S. Yoon, «Bioactive fish collagen/polycaprolactone composite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for 3D cell culture,» *Journal of Biotechnology*, vol. 205, pp. 47-58, 2015.
- [6] L. Wang y R. Carrier, «Biomimetic Topography: Bioinspired Cell Culture Substrates and Scaffolds,» de *Advances in Biomimetics*, InTech, 2011, pp. 453-472.
- [7] P. X. Ma, «Biomimetic materials for tissue engineering,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, nº 2, pp. 184-198, 2008.
- [8] M. Mirbagheri, V. Adibnia, B. R. Hughes, S. D. Waldman y X. a. H. D. K. Banquy, «Advanced cell culture platforms: a growing quest for emulating natural tissues,» *Mater. Horiz.*, vol. 6, pp. 45-71, 2019.
- [9] S. Wang, F. Hu, J. Li, S. Zhang, M. Shen y M. Huang, «Design of electrospun nanofibrous mats for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells,»

*Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 14, nº 7, pp. 2505-2520, 2017.

- [10] P. Mouthuy y H. Ye, «5.04- Biomaterials: Electrospinning,» de *Comprehensive Biotechnology*, Oxford, 2015, pp. 23-36.
- [11] V. Pillay, C. Dott, Y. Choonara, C. Tyagi, L. Tomar, P. Kumar, L. du Toit y V. Ndesendo, «A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications,» *Journal of Nanomaterials*, vol. 2013, p. 22, 2013.
- [12] E. S. Place, J. H. George y C. K. Williams, «Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering,» *Chem Soc Rev*, vol. 38, nº 4, pp. 1139-1151, 2008.
- [13] A. Haider, S. Haider y I.-K. Kang, «A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology,» *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 11, pp. 1165-1188, 2018.
- [14] M. J. Laudenslager y W. M. Sigmund, «Electrospinning,» de *Encyclopedia of Nanotechnology*, Dordrecht, Springer, 2012, pp. 769-775.
- [15] J. Lannutti, T. M. Reneker, D. Tomasko y D. Farson, «Electrospinning for tissue engineering scaffolds,» *Materials Science and Engineering*, vol. 27, nº 3, pp. 504-509, 2007.
- [16] T. J. Sill y H. A. von Recum, «Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 29, nº 13, pp. 1989-2006, 2008.
- [17] S. Theron, E. Zussman y A. L. Yarin, «Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions,» *Polymer*, vol. 45, nº 6, pp. 2017-2030, 2004.

- [18] J. Venugopal, Y. Z. Zhang y S. Ramakrishna, «Electrospun nanofibers: biomedical applications,» *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers N*, vol. 218, pp. 35-45, 2005.
- [19] B. Sun, T. Long, H. D. Zhang, M. Li, J. L. Duvail, X. Y. Jiang y H. L. Yin, «Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning,» *Progress in Polymer Science*, vol. 39, nº 5, pp. 862-890, 2014.
- [20] A. De Mori, M. Peña Fernández, G. Blunn, G. Tozzi y M. Roldo, «3D Printing and Electrospinning of Composite Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering,» *Polymers*, vol. 10, nº 3, p. 285, 2018.
- [21] W. E. Teo y S. Ramakrishna, «A review on electrospinning design on nanofibre assemblies,» *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 89-106, 2006.
- [22] A. Aldana y G. Abraham, «Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 523, p. 441–453, 2017.
- [23] C. Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki y S. Ramakrishna, «Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering,» *Biomaterials*, vol. 25, nº 5, pp. 877-886, 2004.
- [24] S. De Vriente, T. Van Camp, A. Nelvig, B. Hangström, P. Westbroek y K. De Clerck, «The effect of temperature and humidity on electrospinning,» *Journal of Materials Science*, vol. 44, nº 5, pp. 1357-1362, 2008.
- [25] J. Pelipenko, J. Kristl, B. Jankovic, S. Baumgartner y P. Kocbek, «The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 456, nº 1, pp. 125-134, 2013.

- [26] R. M. Nezarati, M. B. Eifert y E. Cosgriff-Hernandez, «Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology,» *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 19, nº 10, pp. 810-819, 2013.
- [27] A. Sionkowska, «Current research on the blends of natural and synthetic polymers,» *Progress in Polymer Science*, vol. 36, pp. 1254-1276, 2011.
- [28] G. Khang, S. J. Lee, M. S. Kim y H. B. Lee, «Biomaterials: Tissue Engineering and Scaffolds,» *Encycl. Med. devices Instrum*, 2006.
- [29] H. Naderi, M. M. Matin y A. R. Bahrami, «Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems,» *J. Biomater. Appl*, vol. 26, nº 4, pp. 383-417, 2011.
- [30] L. A. Dos Santos, «Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties,» *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 2017.
- [31] K. Yue, G. Trujillo de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayoi, N. Annabi y A. Khademhosseini, «Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels,» *Biomaterials*, vol. 73, pp. 254-271, 2015.
- [32] A. A. Aldana, M. I. Rial-Hermida, G. A. Abraham, A. Concheiro y C. Alvarez-Lorenzo, «Temperature-sensitive biocompatible IPN hydrogels based on poly(NIPA-PEGdma) and photocrosslinkable gelatin methacrylate,» *Soft materials*, vol. 15, nº 4, pp. 341-349, 2017.
- [33] X. Zhao, Q. Lang, L. Yildirimer, Z. Y. Lin, W. Cui, N. Annabi, K. W. Ng, M. R. Dokmeci, A. M. Ghaemmaghami y Khademhosseini, «Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering,» *Adv. Healthc. Mater*, vol. 5, nº 1, pp. 108-118, 2016.

- [34] A. Aldana, L. Malatto, M. Rehman, A. Bocaccini y G. Abraham, «Fabrication of Gelatin Methacrylate (GelMA) Scaffolds with Nano-and Micro-Topographical and Morphological Features,» *Nanomaterials*, vol. 9, p. 120, 2019.
- [35] M. Yeh, Y. Liang, K. Cheng, N.-T. Dai, C. Liu y J. Young, «A Novel Cell Support Membrane for Skin Tissue Engineering: Gelatin Film Cross-Linked with 2-Chloro-1-Methylpyridinium Iodide,» *Polymer (Guildf)*, vol. 52, nº 4, pp. 996-1003, 2011.
- [36] J. Thiele, Y. Ma, S. M. C. Bruekers, S. Ma y W. T. S. Huck, «25th Anniversary Article: Designer Hydrogels for Cell Cultures: A Materials Selection Guide,» *Advanced Materials*, vol. 26, pp. 125-148, 2014.
- [37] M. M. M. De Paula, N. J. Bassous, S. Afewerki, S. V. Harb, P. Ghannadian, F. R. Marciano, B. Cruz Viana, C. R. Tim, T. J. Webster y A. Oliveira Lobo, «Understanding the impact of crosslinked PCL/PEG/GelMA electrospun nanofibers on bactericidal activity,» *PLoS ONE*, vol. 13, nº 12, 2018.
- [38] A. Oliveira Lobo, S. Afewerki, M. Machado de Paula, P. Ghannadian, F. Marciano, Y. Zhang, J. T. Webster y A. Khademhosseini, «Electrospun nanofiber blend with improved mechanical and biological performance,» *International Journal of Nanomedicine*, vol. 13, p. 7891–7903, 2018.
- [39] B. J. Klotz, D. Gawlitta, A. J. W. P. Rosenberg, J. Malda y F. P. W. Melchels, «Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair.,» *Trends Biotechnol.*, vol. 34, nº 5, pp. 394-407, 2016.
- [40] E. S. Place, J. H. George, C. K. Williams y M. M. Stevens, «Synthetic Polymer Scaffolds for Tissue Engineering,» *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, nº 4, p. 1139–1151, 2009.
- [41] X. Tang, T. Kottappally, P. Lee, S. E. Fard, M. D. Harmon, K. Tran y X. Yu, «Chapter 21 - Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative

Medicine,» de *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier Science, 2014, pp. 351-371.

- [42] K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker y A. R. Boccaccini, «Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 27, nº 18, p. 3413–3431, 2006.
- [43] L. Liverani y A. R. Boccaccini, «Versatile Production of Poly(Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents,» *Nanomaterials*, vol. 6, nº 4, pp. 1-15, 2016.
- [44] K. Zhang, C. J. Simon, N. Washburn, J. Antonucci y S. Lin-Gibson, «In Situ Formation of Blends by Photopolymerization of Poly(ethylene glycol) Dimethacrylate and Polylactide,» *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 1615-1622, 2005.
- [45] S. Bäckström, J. Benavente, R. Berg, K. Stibius, M. Larsen, H. Bohr y C. Hélix-Nielsen, «Tailoring Properties of Biocompatible PEG-DMA Hydrogels with UV Light,» *Materials Sciences and Applications*, vol. 3, nº 6, pp. 425-431, 2012.
- [46] M. Browning, S. Cereceres, P. Luong y E. Cosgriff-Hernandez, «Determination of the in vivo degradation mechanism of PEGDA hydrogels,» *J Biomed Mater Res Part A*, vol. 102A, p. 4244–4251, 2014.
- [47] A. Zaitoon y L. Lim, «Effect of Poly(ethylene oxide) on the Electrospinning Behavior and Characteristics of Ethyl Cellulose Composite Fibers,» *Materialia*, p. 100649, 2020.
- [48] B. J. Papenburg, E. D. Rodrigues, M. Wessling y D. Stamatialis, «Insights into the role of material surface topography and wettability on cell-material interactions.,» *Soft Matter*, vol. 6, pp. 4377-4388, 2010.

- [49] P. Dallas, D. Niarchos, D. Vrbanic, N. Boukos, S. Pejovnik, C. Trapalis y e. al, «Interfacial polymerization of pyrrole and in situ synthesis of polypyrrole/silver nanocomposites.,» *Polymer*, vol. 48, nº 7, pp. 2007-2013, 2007.
- [50] P. Ferreira, P. Santos, P. Alves, M. Carvalho, K. de Sá, S. Miguel y I. Correia, «Photocrosslinkable Electrospun Fiber Meshes for Tissue Engineering Applications,» *European Polymer Journal*, vol. 97, pp. 210-219, 2017.
- [51] H. Shin, B. Olsen y A. Khademhosseini, «The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules,» *Biomaterials*, vol. 33, nº 11, pp. 3143-3152, 2012.
- [52] A. Killion, L. Geever, D. Devine y K. Kennedy, «Mechanical properties and thermal behaviour of PEGDMA hydrogels for potential bone regeneration application,» *Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials*, vol. 4, nº 7, pp. 1219-1227, 2011.
- [53] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. Prabhakaran, M. Morshed, M. Nasr-Esfahani y S. Ramakrishna, «Electrospun poly(3-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 29, nº 34, pp. 4532-4539, 2008.
- [54] L. Liverani, J. Lacina, J. A. Roether, E. Boccardi, M. S. Killian, P. Schmuki, D. W. Schubert y A. R. Boccaccini, «Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun PCL/chitosan fibers by using benign solvents,» *Bioactive materials*, vol. 3, nº 1, pp. 55-63, 2018.
- [55] I. Mukherjee y M. Rosolen, «Thermal transitions of gelatine evaluated using DSC sample pans of various seal integrities,» *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 114, 2013.
- [56] C. Gomillion, «6.22 Adipose Tissue Engineering,» de *Comprehensive Biomaterials II*, Elsevier, 2017, p. 403–415.

- [57] A. E. Aisenbrey y W. L. Murphy, «Synthetic alternatives to Matrigel,» *Nature Reviews Materials*, vol. 5, nº 7, p. 539–551, 2020.
- [58] <https://www.fishersci.es/>, «Fisher Scientific».
- [59] <https://www.sigmaaldrich.com/>, «Sigma Milipore».
- [60] <http://www.nanofibersolutions.com>, «Nanofiber Solutions».
- [61] <https://www.amsbio.com>, «Amsbio».
- [62] S. Megelski, J. S. Stephens, D. Bruce Chase y J. Rabolt, «Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers,» *Macromolecules*, vol. 35, nº 22, pp. 8456-8466, 2002.
- [63] S. Huan, G. Liu, G. Han, W. Cheng, Z. Fu, Q. Wu y Q. Wang, «Effect of experimental parameters on morphological, mechanical and hydrophobic properties of electrospun polystyrene fibers,» *Materials*, vol. 8, nº 5, p. 2718, 2015.
- [64] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi y A. Khademhosseini, «Synthesis, Properties and Biomedical Applications of Gelatin Methacryloyl (GelMA),» *Biomaterials*, vol. 73, pp. 254-271, 2015.
- [65] F. L. He, D. W. Li, J. He, J. J. Liu, F. Ahmad, Y. L. Liu, X. Deng, Y. J. Ye y D. C. Yin, «A novel layer-structured scaffold with large pore sizes suitable for 3D cell culture prepared by near-field electrospinning,» *Materials Science & Engineering C*, vol. 86, pp. 18-27, 2017.
- [66] P. Bhattacharjee, «Electrospinning and Polymer Nanofibers: Process Fundamentals,» de *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier, 2011, pp. 497-512.