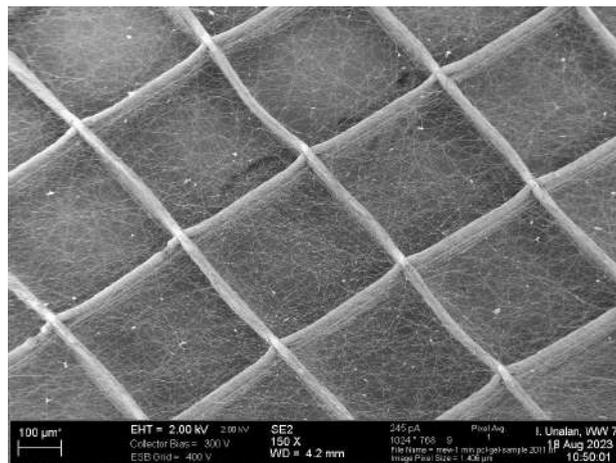


UNMDP - Facultad de Ingeniería - Departamento de Ingeniería en
Materiales

FAU - Technische Fakultät - Instituto de Biomateriales

**DESARROLLO DE MATRICES CON MORFOLOGÍA
JERÁRQUICA A TRAVÉS DE UNA COMBINACIÓN DE
ELECTROHILADO Y ELECTRO-ESCRITURA DE FUNDIDO
(MEW)**



Proyecto final para optar al grado de Ingeniero en Materiales.

Autor: Pascual Ezequiel Agliano. DNI: 41148898. Nro. de Legajo: 14281.

Dirección en UNMDP: Dr. Gustavo Abel Abraham
(gus.abraham@gmail.com).

Dirección en FAU, Alemania: Dr. Aldo Roberto Boccaccini
(aldo.boccaccini@fau.de), Dra. Irem Ünalan (irem.uenalan@fau.de).

Mar del Plata, Octubre 2024.



RINFI es desarrollado por 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

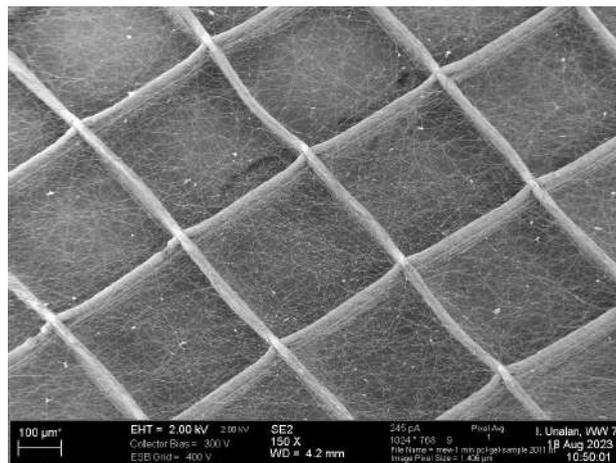


Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

UNMDP - Facultad de Ingeniería - Departamento de Ingeniería en
Materiales

FAU - Technische Fakultät - Instituto de Biomateriales

**DESARROLLO DE MATRICES CON MORFOLOGÍA
JERÁRQUICA A TRAVÉS DE UNA COMBINACIÓN DE
ELECTROHILADO Y ELECTRO-ESCRITURA DE FUNDIDO
(MEW)**



Proyecto final para optar al grado de Ingeniero en Materiales.

Autor: Pascual Ezequiel Agliano. DNI: 41148898. Nro. de Legajo: 14281.

Dirección en UNMDP: Dr. Gustavo Abel Abraham
(gus.abraham@gmail.com).

Dirección en FAU, Alemania: Dr. Aldo Roberto Boccaccini
(aldo.boccaccini@fau.de), Dra. Irem Ünalán (irem.uenalan@fau.de).

Mar del Plata, Octubre 2024.

Agradecimientos

- En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Aldo Boccaccini, por permitirme realizar mi trabajo final en el prestigioso Instituto de Biomateriales de la FAU. Además por su constante apoyo y excelente predisposición durante mi estadía en Alemania. También quiero agradecer a mis directores, el Dr. Gustavo Abraham y la Dra. Irem Ünalán por haberme guiado durante el desarrollo de esta tesis. A todos ellos les agradezco por haberme dado la oportunidad de aprender de todo su conocimiento y experiencia.
- A los jurados, el Dr. Matthäus Popov, la Dra. Florencia Montini Ballarin y la Dra. Silvia Ceré, por tomarse el tiempo para la corrección de este trabajo y por sus valiosos aportes.
- A los organizadores del proyecto IDEAR por brindarme la oportunidad de viajar a Alemania y realizar mi proyecto final. Quiero expresar mi gratitud a la Dra. Silvia Simison, al Dr. Lisandro Escalada, a la Dra. María Andrea Camerucci y al Dr. Flavio Soldera por coordinar este proyecto.
- A los profesores y a la Universidad Nacional de Mar del Plata por guiarme a lo largo de este camino.
- A mis padres, Mario y Cecilia, por su cariño y apoyo incondicional y por brindarme la oportunidad de dedicarme plenamente a mi formación académica durante todos estos años.
- A mi novia, Rocío, por ser la mejor compañera que podría haber deseado. Por estar siempre a mi lado, incluso a pesar de la distancia, compartiendo los buenos y los malos momentos. Por motivarme, aconsejarme, ser una fuente de inspiración y por transmitir siempre esa alegría que la distingue.
- A mi hermana, Aldana, por su cariño y por mostrarme su apoyo en cada etapa de mi vida.
- A Iván, Lautaro y Mateo por su amistad e incondicionalidad durante nuestra estadía en Alemania.
- A mis amigos y compañeros de facultad, por transitar este camino juntos y hacer todo más sencillo.
- A toda mi familia, mis abuelas Alicia y María, Eduardo, Mariana y Facundo por formar parte de mi vida a lo largo de todo este trayecto.

- A Hernán, Joaco, Mauri, Fran, Lucho, Nico y Pedro, por regalarme una amistad que continúa a lo largo de los años y que siempre me ha acompañado.

Índice

1. Resumen.....	6
2. Abstract.....	7
3. Introducción.....	9
3.1 Ingeniería de tejidos.....	9
3.2 Materiales para la ingeniería de tejidos.....	11
3.3 La piel, estructura y funciones.....	12
3.4 Ingeniería de tejidos para la cicatrización de heridas.....	14
3.5 Técnicas de fabricación de andamios.....	14
3.6 Electro-escritura de fundido (MEW).....	16
3.6.1 Fundamento teórico.....	16
3.6.2 Diseño de andamios mediante MEW.....	18
3.6.2.1 Diseño del diámetro de fibra.....	18
3.6.2.2 Diseño de la geometría macroscópica.....	19
3.6.2.3 Diseño de la microarquitectura.....	19
3.6.3 Calidad de los andamios fabricados mediante MEW.....	20
3.6.3.1 Estabilidad de impresión.....	20
3.6.3.2 Precisión en la colocación de la fibra.....	20
3.6.4 Policaprolactona (PCL).....	21
3.7 Electrohilado de soluciones.....	22
3.8 Combinación de técnicas de fabricación.....	24
4. Objetivos.....	25
5. Materiales.....	26
6. Métodos.....	26
6.1 Obtención de matrices impresas mediante MEW.....	26
6.2 Obtención de la capa electrohilada.....	27
6.3 Caracterización morfológica, composicional e hidrofiliidad.....	28
6.3.1 Microscopía óptica.....	28
6.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	29
6.3.3 Espectroscopía infrarroja.....	29
6.3.4 Ángulo de contacto.....	29
6.4 Comportamiento mecánico.....	29
6.5 Proliferación celular in vitro.....	31
6.6 Morfología celular.....	31
6.7 Estudios de biodegradación in vitro.....	31
6.8 Análisis estadístico.....	33
7. Resultados y discusión.....	34
7.1 Obtención de matrices impresas mediante MEW.....	34
7.2 Obtención de la capa electrohilada.....	35
7.3 Caracterización morfológica, composicional e hidrofiliidad.....	37
7.3.1 Microscopía electrónica.....	37
7.3.2 Espectroscopía infrarroja.....	43

7.3.3 Ángulo de contacto.....	44
7.3.4 Comportamiento mecánico.....	47
7.4 Proliferación celular in vitro.....	49
7.5 Morfología celular.....	51
7.6 Estudios de biodegradación in vitro.....	53
7.6.1 Absorción de agua.....	53
7.6.2 Pérdida de peso.....	55
8. Conclusión.....	58
9. Trabajo a futuro.....	59
10. Bibliografía.....	60

Listado de Figuras

Figura 1. Trío de componentes principales de la ingeniería de tejidos. 7.

Figura 2. Fotomicrografía que muestra las capas de la piel humana teñida con hematoxilina y eosina (HyE). 11.

Figura 3. Esquema típico de un equipo MEW. 15.

Figura 4. Secuencia fotográfica que muestra la evolución del cono de Taylor con el tiempo, indicado después del inicio de aplicación de alto voltaje. 16.

Figura 5. Equipo típico de electrospinning. 21.

Figura 6. a) Impresora MEW utilizada para la obtención de la estructura micrométrica. b) Cabezal de impresión y andamio impreso sobre el colector. 25.

Figura 7. Equipo de electrohilado utilizado para depositar las nanofibras sobre las matrices impresas. 26.

Figura 8. Muestra en marco de papel sometida a ensayo de tracción. 28.

Figura 9. Incubadora utilizada para los ensayos de degradación. 31.

Figura 10. Micrografía óptica a diferentes aumentos de estructura impresa con los parámetros óptimos. 33.

Figura 11. Micrografías ópticas a diferentes aumentos de las muestras luego de realizar el electrohilado. 34.

Figura 12. Micrografías SEM a diferentes aumentos de estructura impresa al utilizar los parámetros óptimos. 35.

Figura 13. Micrografías SEM a diferentes aumentos e histograma de estructura 1 min PCL-GEL. 38.

Figura 14. Micrografías SEM a diferentes aumentos e histograma de estructura 5 min PCL-GEL. 39.

- Figura 15.** Micrografías SEM a diferentes aumentos e histograma de estructura 15 min PCL-GEL. 40.
- Figura 16.** Espectros de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de los andamios fabricados. 41.
- Figura 17.** Perfil de gotas de agua sobre las superficies de las muestras. 42.
- Figura 18.** Ángulos de contacto de las distintas muestras. 43.
- Figura 19.** Resultados obtenidos del ensayo de tracción de las muestras. a) Curvas tensión-deformación. b) Constante elástica. c) Resistencia a la tracción. d) Elongación a la rotura. 45.
- Figura 20.** Viabilidad de los NHDF luego de la exposición a los andamios durante uno y siete días. 47.
- Figura 21.** Morfología de los NHDF luego de 7 días de cultivo para los distintos andamios. 49.
- Figura 22.** Absorción de agua de las muestras PCL MEW y 15 min PCL-GEL luego de 1, 7 y 28 días. 51.
- Figura 23.** Pérdida de peso de las muestras PCL MEW y 15 min PCL-GEL para 1, 7 y 28 días. 53.
- Figura 24.** Micrografías SEM de muestra PCL MEW luego de 7 días en PBS. 53.
- Figura 25.** Micrografías SEM de muestra PCL MEW luego de 28 días en PBS. 54.
- Figura 26.** Micrografías SEM de muestra 15 min PCL-GEL luego de 7 días en PBS. 54.
- Figura 27.** Micrografías SEM de muestra 15 min PCL-GEL luego de 28 días en PBS. 54.

1. Resumen

Las estructuras poliméricas y/o compuestas tridimensionales (3D) son uno de los componentes fundamentales de la ingeniería de tejidos, ya que forman microambientes que imitan la matriz extracelular (MEC) y sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas (Giannitelli et al., 2015; Z. Wang et al., 2021). Este trabajo aborda el estudio de estructuras poliméricas jerárquicas con características morfológicas micro-nanométricas fabricadas mediante electro-escritura de fundido (*melt electrowriting* o MEW) y su aplicación en la cicatrización de heridas. Esta estrategia combina técnicas de impresión 3D utilizando modelado por deposición fundida y electrohilado. Para la microestructura, fabricada usando MEW, se utilizó policaprolactona (PCL) de grado médico. Luego, sobre las matrices impresas, se depositó una membrana de nanofibras electrohiladas, fabricada a partir de una solución de PCL y gelatina. El tiempo de electrohilado se varió entre 0, 1, 5 y 15 minutos, resultando en cuatro tipos de muestras: PCL MEW, 1 min PCL-GEL, 5 min PCL-GEL y 15 min PCL-GEL, respectivamente. Una vez producidas las estructuras, se realizó la caracterización morfológica utilizando imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, se analizó la hidrofiliidad de las muestras determinando el ángulo de contacto, y se verificó la composición química mediante espectroscopía infrarroja (FTIR). También se realizaron pruebas mecánicas de tracción, y se analizó la degradación de las matrices al sumergirlas en solución salina tamponada (PBS). Finalmente, se realizó un ensayo de viabilidad celular *in vitro* utilizando fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF). Como se esperaba, la presencia de nanofibras de gelatina incrementó la hidrofiliidad. Las pruebas de tracción mostraron que las estructuras presentan propiedades mecánicas que podrían ser adecuadas para la cicatrización de heridas. Las muestras modificadas por electrohilado mostraron mayor viabilidad de NHDF. Esto podría atribuirse al hecho de que las nanofibras aumentan el área disponible para la adhesión y proliferación celular (Z. Wang et al., 2021), y a la presencia de gelatina, que contiene dominios moleculares presentes en la MEC de la piel (Negut et al., 2020). Es importante señalar que no se observaron efectos citotóxicos, lo que confirma la biocompatibilidad de las estructuras. Por otro lado, las matrices mostraron absorción

de PBS en los microporos formados por las fibras impresas. Esto, junto con la hidrofiliidad proporcionada por la gelatina, podría ser útil para absorber exudados y mantener la herida húmeda durante la regeneración de la piel (Gaspar-Pintilieșcu et al., 2019). En conclusión, la combinación de las técnicas de electrohilado y MEW permitió la creación de estructuras 3D con propiedades mecánicas, biológicas y químicas que podrían ser adecuadas para la cicatrización de heridas.

2. Abstract

Three-dimensional (3D) polymeric and/or composite structures are one of the fundamental components of tissue engineering, as they form microenvironments that mimic the extracellular matrix and its physicochemical, mechanical, and biological properties (Giannitelli et al., 2015; Z. Wang et al., 2021). This work addresses the study of hierarchical polymeric structures with micro-nanometric morphological characteristics fabricated through melt electrowriting (MEW) and their application in wound healing. This strategy combines 3D printing techniques using fused deposition modeling and electrospinning. The microstructure was fabricated by MEW, using medical-grade polycaprolactone (PCL). Then, a membrane of electrospun PCL-gelatin nanofibers was deposited onto the printed matrices. The electrospinning time was varied between 0, 1, 5, and 15 minutes, resulting in four types of samples: PCL MEW, 1 min PCL-GEL, 5 min PCL-GEL, 15 min PCL-GEL, respectively. Once the structures were produced, morphological characterization was performed using scanning electron microscopy (SEM). Additionally, the hydrophilicity of the samples was analyzed by determining the contact angle, and the chemical composition was verified using infrared spectroscopy (FTIR). Tensile mechanical tests were also conducted, and the degradation of the matrices was analyzed by immersing them in PBS. Finally, an in vitro cell viability assay was performed using Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF). As expected, the presence of gelatin nanofibers increased hydrophilicity. Tensile tests showed that the structures exhibit mechanical properties that could be suitable for wound healing. The samples modified by electrospinning showed higher NHDF viability. This could be attributed to the fact that the nanofibers increase the available area for cell adhesion and proliferation (Z. Wang et al., 2021), and to the presence of gelatin, which contains

molecular domains found in the extracellular matrix of the skin (Negut et al., 2020). It is important to note that no cytotoxic effects were observed, confirming the biocompatibility of the structures. On the other hand, the matrices showed absorption of Phosphate-Buffered Saline (PBS) in the micropores formed by the printed fibers. This, together with the hydrophilicity provided by gelatin, could be useful for absorbing exudates and keeping the wound moist during skin regeneration (Gaspar-Pintiliescu et al., 2019). In conclusion, the combination of electrospinning and MEW techniques allowed the creation of 3D structures with mechanical, biological, and chemical properties that could be suitable for wound healing.

3. Introducción

3.1 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un área interdisciplinar que involucra la biología celular, la ingeniería de biomateriales, y la medicina (Jafari et al., 2017). El objetivo principal es fabricar matrices tridimensionales que, en conjunto con moléculas biológicamente activas y células, provean un ambiente adecuado para restaurar, mantener o mejorar tejidos u órganos dañados (Figura 1) (Dvir et al., 2011). Esta construcción tridimensional (también llamada andamio) actúa como reemplazo de la MEC, dando soporte a las células e interactuando con ellas para formar nuevo tejido (Jafari et al., 2017). La MEC es un medio de integración fisiológico no celular en el que están inmersas las células. La MEC está formada por un entramado de proteínas y carbohidratos que se disponen en el espacio entre las células y que se sintetiza y secreta por las propias células (Sell et al., 2010).

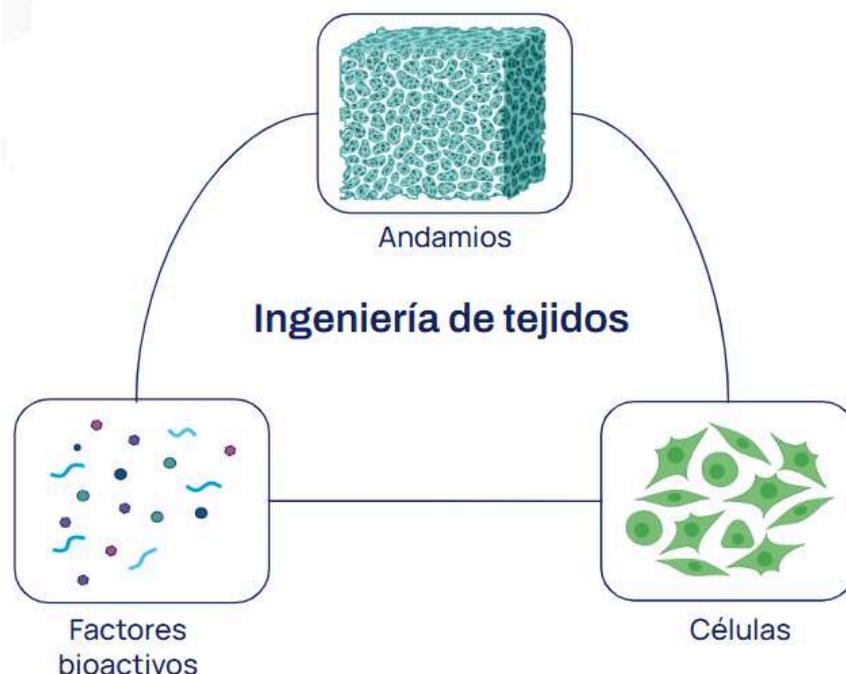


Figura 1. Tríptico de componentes principales de la ingeniería de tejidos (Adaptado de Rodríguez Doblado et al., 2021).

Los andamios son típicamente sembrados con células y ocasionalmente con factores de crecimiento en un biorreactor. Pueden ser cultivados *in vitro*, para sintetizar tejidos que luego se implantan en el sitio dañado, o implantados directamente en el defecto a reparar, de manera que la regeneración es inducida *in vivo*. A lo largo de los años, se han producido numerosas matrices a partir de una gran variedad de biomateriales y diferentes tecnologías de fabricación, con el fin de regenerar distintos tejidos y órganos. Independientemente del tipo de tejido, existen factores clave al diseñar o evaluar el desempeño de una matriz para su uso en ingeniería de tejidos (O'Brien, 2011):

Biocompatibilidad: El primer criterio de cualquier andamio para la ingeniería de tejidos es que debe ser biocompatible. Las células deben adherirse, funcionar normalmente y migrar hacia la superficie y eventualmente a través del andamio, y comenzar a proliferar antes de depositar nueva MEC. Después de la implantación, el andamio debe provocar una reacción inmune insignificante para evitar una respuesta inflamatoria suficientemente severa que pueda reducir la cicatrización o causar el rechazo por parte del cuerpo. Además, los productos de degradación de la matriz deben ser no tóxicos (O'Brien, 2011).

Biodegradabilidad: Los andamios no están diseñados para ser permanentes. El objetivo de la ingeniería de tejidos es reemplazar a la matriz tridimensional temporalmente. Por lo tanto, el andamio debe ser biodegradable para permitir que las células produzcan su propia MEC (O'Brien, 2011). Para esto, la velocidad de degradación debe aproximarse idealmente a la velocidad de formación del nuevo tejido (Negut et al., 2020).

Porosidad: Los andamios deben tener una estructura porosa interconectada y una alta porosidad para garantizar los procesos de migración, proliferación y nutrición celular (O'Brien, 2011). La vascularización es el proceso mediante el cual se desarrollan vasos sanguíneos dentro de ciertos tejidos (Ross y Pawlina, 2015), los cuales permiten la difusión adecuada de nutrientes hacia las células dentro del andamio y hacia la MEC formada por estas células. Además, la estructura porosa interconectada es necesaria para permitir la difusión de productos de desecho fuera del andamio. Con respecto al tamaño medio de poros, este debe ser lo

suficientemente grande como para que las células migren hacia el interior de la estructura, pero lo suficientemente pequeños como para conformar una superficie de adhesión lo suficientemente alta. Por lo tanto, para cualquier andamio, existe un rango crítico de tamaños de poro que puede variar dependiendo del tipo de célula utilizado y del tejido que se esté reparando (O'Brien, 2011).

Propiedades mecánicas: Idealmente, los andamios deben tener propiedades mecánicas consistentes con el sitio anatómico en el que se van a implantar, además de ser lo suficientemente resistentes como para soportar la manipulación (O'Brien, 2011).

3.2 Materiales para la ingeniería de tejidos

Considerando estas características, los biomateriales son los candidatos principales que pueden cumplir con estos requerimientos. Con respecto a la definición de biomaterial, ha cambiado considerablemente durante los últimos 50 años. Inicialmente, el objetivo era lograr una funcionalidad que se asemejara a la del tejido nativo, igualando sus propiedades mecánicas y sin producir una respuesta adversa en el huésped (ejemplos: cemento óseo, acero inoxidable). Los biomateriales de segunda generación (titanio, hidroxiapatita) fueron diseñados para uso biológico y tienen propiedades bioactivas, es decir, capacidad de formar un vínculo entre los tejidos y el implante. Muchos de los materiales mencionados anteriormente mantienen relevancia clínica, pero el campo de la ingeniería de tejidos se está dirigiendo hacia el uso de biomateriales que se integran con el tejido adyacente y son bioinductivos; es decir, materiales que mejoran la capacidad regenerativa de un tejido u órgano dado. Estos materiales son completamente opuestos a los biomateriales "inertes" de hace 50 años (Hench y Thompson, 2010).

Existen polímeros naturales y sintéticos, cerámicos, o incluso materiales compuestos que pueden ser clasificados como biomateriales. Los polímeros sintéticos tienen varias ventajas, entre ellas: propiedades mecánicas ajustables de acuerdo a la aplicación, alta reproducibilidad y baja respuesta inmunológica. Sin embargo, poseen una capacidad limitada para estimular el medio celular nativo. Por el contrario, los polímeros naturales usualmente contienen dominios moleculares

que pueden brindar soporte y guiar a las células en varias etapas de su desarrollo y por lo tanto pueden mejorar la interacción biológica del andamio con el tejido nativo. Entre sus desventajas se destacan sus limitadas propiedades mecánicas, la falta de reproducibilidad, y el potencial de inducir una respuesta inmunológica adversa (Ozdil y Aydin, 2014; Sell et al., 2010)

3.3 La piel, estructura y funciones

La piel forma la cubierta externa del cuerpo y es su órgano más grande, ya que constituye del 15% al 20% de su masa total (Ross y Pawlina, 2015). Consta de dos estratos principales:

- **Epidermis:** Está compuesta por un epitelio estratificado. Tiene un rol crucial en el mantenimiento de las condiciones internas del cuerpo (homeostasis) y en su protección contra el ambiente externo y el ingreso de bacterias patogénicas (Negut et al., 2020).
- **Dermis:** Está conformada por un tejido conectivo que aporta resistencia mecánica y espesor a la piel. En este caso, las células del tejido conjuntivo están muy separadas entre sí, a través de la MEC que ellas mismas secretan. Está conformada por dos capas de estructura bien definida: la dermis papilar y la reticular. La dermis papilar es la capa más superficial y consiste en tejido conjuntivo laxo ubicado justo debajo de la epidermis. Aquí, las fibras de colágeno son escasas, de diámetro pequeño y tienen una disposición irregular. Posee muchos tipos de células. Una de ellas, el fibroblasto, produce las fibras de colágeno y el componente amorfo de la MEC. Otros tipos celulares presentes, como los linfocitos y los macrófagos, entre otros, están asociados con el sistema de defensa del cuerpo. En esta capa también se concentran la mayor parte de los vasos sanguíneos que irrigan la epidermis y las terminaciones nerviosas sensoriales (Ross y Pawlina, 2015). La dermis reticular, por otro lado, es profunda con respecto a la dermis papilar. Si bien su espesor varía en diferentes partes de la superficie corporal, siempre es bastante más gruesa y contiene menos células que la dermis papilar. Normalmente, estas células son de un solo tipo, el fibroblasto. Además, se caracteriza por gruesos haces de fibras de

colágeno en alta proporción, que ofrecen una solidez considerable (Ross y Pawlina, 2015).

Los dos estratos principales de la piel humana (dermis y epidermis) se observan en la Figura 2.



Figura 2. *Fotomicrografía que muestra las capas de la piel humana teñida con hematoxilina y eosina (HyE). Se observan claramente sus dos capas principales: la epidermis y la dermis. La epidermis, la capa más superficial, está formada por un epitelio estratificado plano. La dermis, por su parte, se divide en dos subcapas: la capa papilar, que es la más superficial y adyacente a la epidermis, y la capa reticular, situada más profundamente. Aunque el límite entre estas dos subcapas no es fácilmente visible, la capa papilar se distingue por su mayor densidad celular, mientras que la capa reticular presenta haces de fibras de colágeno más gruesas, los cuales son claramente visibles en la parte inferior de la imagen. En contraste, las fibras de colágeno de la capa papilar son más delgadas. (Ross y Pawlina, 2015).*

Justo debajo de la dermis puede encontrarse la hipodermis, que contiene cantidades variables de tejido adiposo organizado en lobulillos separados por tabiques de tejido conjuntivo (Ross y Pawlina, 2015).

3.4 Ingeniería de tejidos para la cicatrización de heridas

Una ruptura de la piel puede debilitar las funciones de la misma a nivel local y provocar deshidratación, infecciones y, en algunos casos, la muerte (Negut et al., 2020). El proceso de cicatrización de heridas cutáneas es increíblemente complejo, dependiente de una interacción entre varios factores que trabajan en conjunto para restaurar la piel lesionada y recuperar su función de barrera. Esta secuencia de eventos ocurre normalmente en la gran mayoría de las heridas superficiales; sin embargo, puede desviarse en numerosos pasos del proceso y resultar en una herida crónica (Han y Ceilley, 2017). Entre las causas que pueden retardar el proceso de remodelación de la piel se encuentran el estado nutricional del individuo, condiciones vasculares y cardíacas, diabetes, etc (Negut et al., 2020). Pero incluso las heridas simples, creadas después de acontecimientos menores como cirugías ambulatorias o golpes, requieren cuidados adecuados, y es comprensible que los pacientes puedan estar preocupados por las posibles cicatrices resultantes. Es por ello que la cicatrización de heridas ha recibido mucha atención, desde el punto de vista de la ciencia básica y comercial (Han y Ceilley, 2017).

Generalmente, los vendajes utilizados para la cicatrización de heridas son económicos y proporcionan una barrera física de protección, aunque no aceleran el proceso de curación ni son capaces de tratar infecciones. La ingeniería de tejidos, mediante la introducción de andamios, ha surgido como una forma de tratamiento alternativa. Estas matrices deben cumplir con los requerimientos mencionados en la sección 3.1, además de presentar flexibilidad para acomodarse a distintos tipos de heridas, absorber fluidos manteniendo al mismo tiempo un microambiente húmedo, y proporcionar señales bioquímicas que incentiven el proceso de curación (Negut et al., 2020).

3.5 Técnicas de fabricación de andamios

En los últimos años, se han desarrollado un gran número de tecnologías de fabricación para la construcción de matrices tridimensionales porosas para ingeniería de tejidos. En conjunto con los materiales utilizados, son de gran importancia al determinar las propiedades finales y la estructura del andamio. Entre

las técnicas de fabricación convencionales, se encuentran el colado de soluciones seguido por la lixiviación de porógenos, la liofilización, la separación de fases inducida térmicamente, el tratamiento con fluidos supercríticos, entre otras (Mabrouk et al., 2020).

En particular, la manufactura aditiva (AM) o prototipado rápido es una tecnología que permite construir estructuras tridimensionales a partir de un modelo digital, mediante el agregado de material capa a capa. Para producir objetos físicos en tres dimensiones mediante la tecnología de manufactura aditiva es necesario utilizar un software de diseño asistido por computadora (CAD) o un escáner. Entre las ventajas de este conjunto de técnicas se pueden mencionar; la capacidad de obtener productos con formas más complejas con un gran control dimensional, y la posibilidad de personalizar los productos médicos. Bajo el término de impresión 3D, se pueden distinguir varios métodos de fabricación, como impresión por aglutinante (por ejemplo, impresión de chorro de tinta sobre lecho de polvo), extrusión de material (por ejemplo, modelado por deposición fundida (FDM), extrusión de gel o pasta), impresión de material (por ejemplo, impresión de chorro de tinta), fusión de lecho de polvo (por ejemplo, sinterización láser directa de metal (DMLS) y sinterización láser selectiva (SLS)) y polimerización de tanque utilizando radiación (por ejemplo, proyección digital de luz (DLP) y estereolitografía (SLA)). Estos métodos varían en la construcción del dispositivo, la selección de materiales, los métodos de unión de capas, la eficiencia de producción y las características del objeto obtenido, como su precisión geométrica, acabado superficial, estructura y propiedades mecánicas (Szymczyk-Ziółkowska et al., 2020).

La manufactura aditiva se está utilizando cada vez más en el campo de biomateriales, ingeniería de tejidos, y biofabricación. En general, las tecnologías de fabricación tienen una resolución de impresión en el rango de 50 a 500 micrones. Para la ingeniería de tejidos, que busca replicar la microarquitectura de los tejidos, es necesaria la capacidad de imprimir a escalas pequeñas en el rango de los nanómetros y los micrómetros. Estos pequeños diámetros de fibra se pueden conseguir utilizando técnicas electrohidrodinámicas (EHD), como electrohilado de soluciones, electrohilado de fundidos, y MEW (Kade y Dalton, 2021).

3.6 Electro-escritura de fundido (MEW)

3.6.1 Fundamento teórico

MEW es una técnica de AM que tiene la capacidad de producir fibras en el rango de los micrómetros. Un dispositivo de MEW consiste de un cabezal de impresión con un sistema de calentamiento para fundir el material, que luego se suministra a una boquilla de metal (Figura 3). El cabezal de la impresora está configurado con un sistema de movimiento asistido por computadora, de manera que se realiza una escritura directa sobre un colector. La extrusión del polímero a través de la boquilla se logra gracias a un sistema que en general utiliza aire a presión, mientras se aplica una diferencia de potencial entre la boquilla y el colector, generándose un campo eléctrico (Kade y Dalton, 2021). Esta tensión estabiliza la caída del fluido, evitando el flujo interrumpido (caída en gotas) que ocurre para fluidos no cargados electrostáticamente (inestabilidades de Plateau Raleigh). Esta deposición continua de fluido a bajas velocidades de flujo es la que permite obtener fibras submicrométricas (Dalton, 2017).

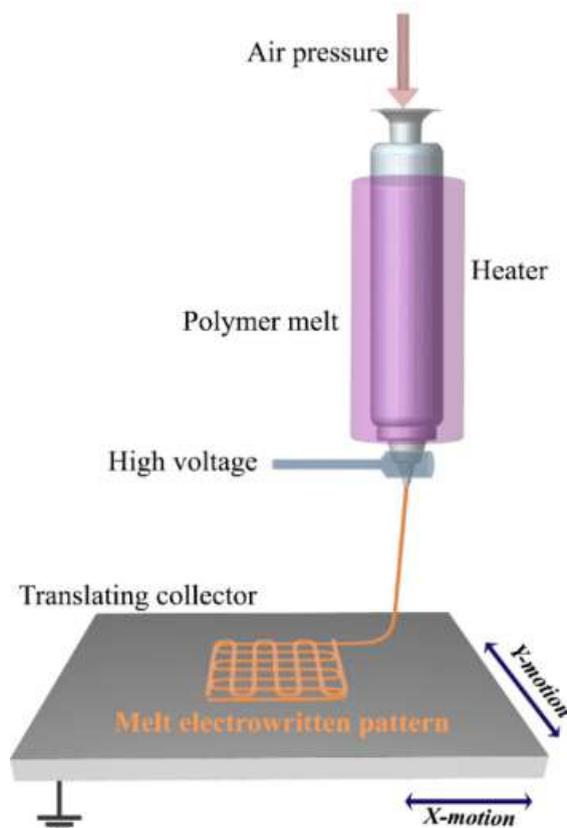


Figura 3. Esquema típico de un equipo MEW (Afghah et al., 2019).

La aplicación del campo eléctrico concentra las cargas en la gota de fluido en el punto más cercano al colector. Dado que se trata de un polímero fundido, con alta viscosidad y escasa cantidad de especies capaces de cargarse eléctricamente (en comparación con sistemas a base de disolventes), el campo eléctrico tarda más de un minuto en superar la tensión superficial de la gota en la punta de la boquilla. Cuando esto sucede, el polímero fundido comienza a estrecharse desde la gota inicial formando un microchorro delgado. El comienzo de este chorro y el fluido restante en la punta de la boquilla se denomina cono de Taylor. La Figura 4 muestra cómo ocurre la iniciación del chorro en MEW (Kade y Dalton, 2021).

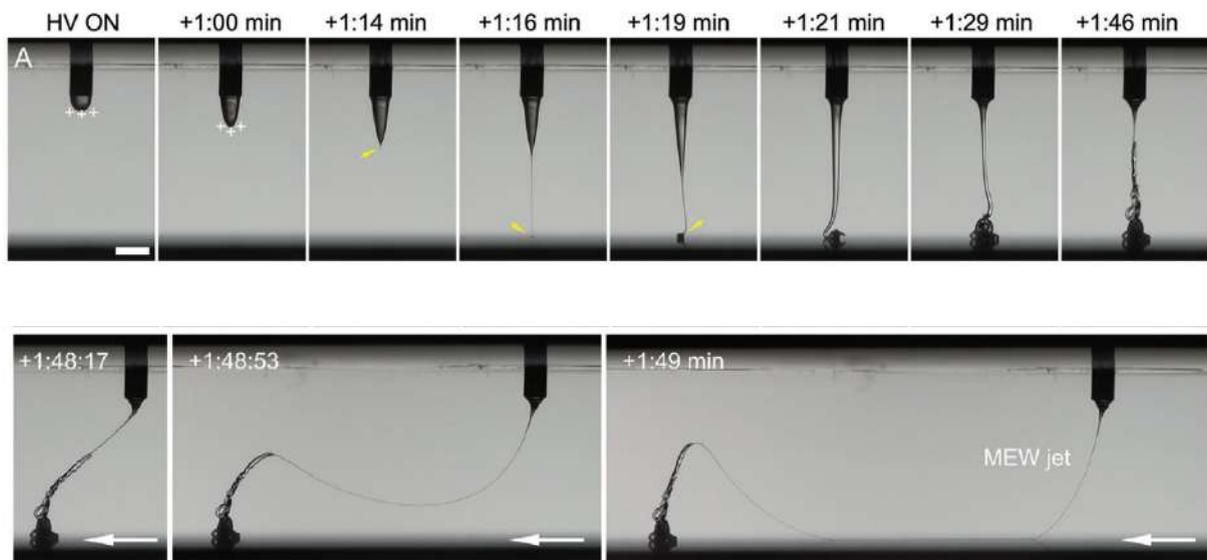


Figura 4. Secuencia fotográfica con el tiempo indicado después del inicio de aplicación de alta tensión. Cuando se aplica un campo eléctrico a una gota de PCL fundido, las cargas se acumulan en la superficie del líquido más cercana al colector. A medida que la gota aumenta de volumen, se distorsiona después de +1:00 min, lo que conduce a una columna de fluido y un chorro a +1:16 min (flecha amarilla). Se requieren otros 30 segundos para que el volumen excesivo en el cono de Taylor sea atraído hacia el colector, momento en el que (+1:48 min), el chorro MEW está listo para la escritura directa (Kade y Dalton, 2021).

Dependiendo de la velocidad del cabezal de impresión (o del colector en algunos casos), el chorro se puede depositar en línea recta, siempre que se supere la velocidad crítica de traslación (CTS). Esta CTS se define como la velocidad por encima de la cual el chorro es depositado en línea recta (Hrynevich et al., 2018). La estabilidad del chorro, en conjunto con el movimiento asistido por computadora del cabezal de impresión, permiten la deposición definida del material sobre el colector. La solidificación del material en el camino hacia el colector permite el proceso de impresión capa por capa (Kade y Dalton, 2021).

3.6.2 Diseño de andamios mediante MEW

La arquitectura de los andamios fabricados mediante MEW (incluyendo el diámetro de fibra, el tamaño de poros, la forma de los poros, etc.) puede afectar fuertemente el comportamiento celular en varios aspectos como la adhesión (Z. Wang et al., 2021), alineación (Constante et al., 2021), proliferación y migración celular (Bakirci et al., 2020). Por lo tanto, se han realizado numerosos estudios para modificar la complejidad estructural macroscópica y microscópica de los andamios obtenidos por MEW. A continuación, se describe brevemente cómo se pueden controlar algunos de los parámetros más importantes.

3.6.2.1 Diseño del diámetro de fibra

Es un parámetro clave debido a que define las propiedades mecánicas y estructurales del andamio, las cuales deben ser controladas dependiendo del tejido a regenerar.

Si se considera la conservación de masa y se asume compresibilidad cero del chorro polimérico, el diámetro medio de fibra puede ser calculado como:

$$d = \sqrt{\frac{Q_{out}}{\pi \cdot v}} \quad \text{Ecuación 1}$$

en donde Q_{out} es el valor medio del caudal volumétrico de salida Q_{out} y v es la velocidad del cabezal de impresión. Así, el diámetro de la fibra disminuye al aumentar v . Además, cualquier parámetro que modifique el caudal volumétrico de

salida, incluyendo aquellos relacionados con el proceso (presión aplicada, y diámetro de la boquilla) y el material (temperatura del material, peso molecular y tipo de material), tendrá un efecto en el diámetro de fibra producido (Bakirci et al., 2020; F.-L. He et al., 2017).

Por otro lado, según el principio de MEW, el diámetro del chorro decrece continuamente durante el trayecto de vuelo, hasta que finalmente es igual al diámetro de la fibra al llegar al punto de deposición. Por lo tanto, al aumentar la distancia entre la boquilla y el colector, disminuirá el diámetro de fibra producido (Ashour y Xu, 2022).

3.6.2.2 Diseño de la geometría macroscópica

La geometría macroscópica de los andamios fabricados por MEW es definida principalmente por la geometría del colector que recibe las fibras impresas. En general, hay dos tipos principales de geometrías de colectores que se asignan a movimientos característicos; una placa traslacional plana y un mandril rotatorio cilíndrico. Según las geometrías de colectores específicas adoptadas para la fabricación, los andamios pueden clasificarse como andamios planos o andamios tubulares en términos de geometría macroscópica (Jungst et al., 2015; McColl et al., 2018; van Genderen et al., 2021).

3.6.2.3 Diseño de la microarquitectura

La microarquitectura de los andamios fabricados por MEW puede evaluarse caracterizando el diámetro de fibra, el tamaño y la forma de los poros. En cuanto al tamaño de poro, la tecnología MEW no impone un límite superior. Sin embargo, como ya se mencionó, la ingeniería de tejidos establece un tamaño óptimo que va desde decenas a cientos de micrómetros para asegurar una correcta función y proliferación celular (Brennan et al., 2019). Por otro lado, la interacción electrostática de la fibra impresa y el chorro polimérico no permite que el tamaño de poro impreso por MEW sea arbitrariamente pequeño. En cuanto a la forma del poro, suele definirse por el micropatrón formado por la posición relativa de las fibras intersectadas, que a su vez está en gran medida determinada por las

especificaciones de diseño de la trayectoria de la herramienta. Basándose en si se presenta un patrón de unidad repetitiva para el diseño del andamio, los andamios pueden clasificarse en aquellos que poseen una distribución homogénea o heterogénea de geometrías de poros para una especificación de diámetro de fibra constante. Además, existe una categoría especial de andamios heterogéneos, que están diseñados para poseer diámetros de fibra no uniformes (Jin et al., 2020).

3.6.3 Calidad de los andamios fabricados mediante MEW

La calidad de los andamios fabricados mediante MEW está determinada principalmente por la uniformidad de la fibra (estabilidad de impresión) y la precisión en la colocación de la fibra. Dado que la impresión mediante MEW depende de múltiples variables del proceso y del material, el control de calidad en el proceso de MEW es uno de los principales problemas a abordar (Cao et al., 2023).

3.6.3.1 Estabilidad de impresión

Además del diámetro de la fibra, la uniformidad de la fibra es otro parámetro importante a controlar. Excepto en algunas ocasiones especialmente diseñadas, en general se prefiere la impresión de fibras continuas de diámetro constante, lo cual requiere un estado de impresión estable. El mantenimiento de la estabilidad de impresión es más similar a un problema de optimización sistemática que implica ajustes combinatorios de múltiples procesos y parámetros de material, lo cual es mucho más complicado que el control del diámetro de la fibra (Cao et al., 2023). Existe un valor de tensión crítica por debajo del cual ocurre la “pulsación de fibra” o *fiber pulsing* (oscilación indeseada del diámetro de la fibra). Esto se debe principalmente a la fluctuación del volumen del cono de Taylor, que aumenta a causa de una fuerza eléctrica incapaz de extraer suficiente polímero del cono. Cuando el volumen del cono de Taylor alcanza un valor crítico, se deposita en el colector un chorro polimérico de mayor espesor (Cao et al., 2022).

3.6.3.2 Precisión en la colocación de la fibra

La precisión en la colocación de la fibra puede definirse como la diferencia entre el patrón de colocación de la fibra programado (camino que realiza el cabezal) y el

patrón impreso. Por lo tanto, se debe evitar esta desviación del patrón de impresión programado si se quiere mejorar la precisión en la deposición. Principalmente se pueden distinguir dos tipos de desviaciones; la desviación de fibra relacionada con la carga y la relacionada con la trayectoria de la herramienta. La desviación de fibra relacionada con la carga se produce por la distorsión del campo eléctrico, ya sea por la carga residual en las fibras depositadas u otros factores, como la falta de planaridad del colector, etc. En contraste, la desviación de fibra relacionada con la trayectoria de la herramienta está dada por el cambio direccional en la trayectoria de la herramienta programada (Cao et al., 2023).

Desviación de fibra relacionada a la carga

En el proceso MEW, el polímero se carga positivamente a través de la emisión de campo (emisión de electrones al medio circundante gracias a la acción de un campo eléctrico local de alta intensidad (Collins et al., 2012)) y la disociación de carga (el campo eléctrico aplicado causa la disociación de las moléculas del polímero, lo que resulta en la generación de iones positivos y negativos (Collins et al., 2012)). Durante la deposición del chorro en el colector, la mayoría de las cargas pueden disiparse, pero debido a la conductividad del polímero fundido, las fibras impresas conservan una carga residual. Esta carga residual suele ser negativa en las primeras capas impresas, debido a una alta disipación de carga. Esto significa que, si la distancia entre las fibras es pequeña, el chorro polimérico (cargado positivamente) puede ser atraído por las fibras impresas previamente, lo que resulta en una superposición (Kim et al., 2021). Por otro lado, al aumentar el número de capas la carga se vuelve gradualmente positiva, por lo que puede producirse una repulsión entre el chorro polimérico y las fibras ya impresas (J. He et al., 2022).

3.6.4 Policaprolactona (PCL)

Actualmente, la policaprolactona es el material más utilizado para imprimir andamios mediante MEW. La PCL es un poliéster sintético semicristalino y biodegradable, capaz de ser procesado mediante esta técnica gracias a su baja temperatura de fusión y rápida solidificación. Además, tiene aplicación clínica gracias a que está aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA)

y ofrece una degradación lenta de hasta varios años. Además, ha sido bien estudiada su aplicación en ingeniería biomédica; como parte de otras tecnologías de fabricación (electrohilado, por ejemplo), e interaccionando con diferentes tipos de células. Para MEW, la PCL más ampliamente usada es la de grado médico, la cual es fabricada usando buenos principios de manufactura (GMP) y por lo tanto se caracteriza por ser de alta pureza. En la práctica, ha permitido obtener la calidad de impresión más alta. La PCL, sin embargo, es un polímero hidrofóbico que carece de propiedades bioactivas, aunque es capaz de favorecer el anclaje celular y la proliferación gracias a la adsorción de proteínas (Kade y Dalton, 2021). El aire atrapado debido a esta hidrofobicidad, no es favorable para el medio de cultivo celular, por lo que se han realizado muchos estudios con el objetivo de modificar la superficie de las fibras de PCL para incrementar su carácter hidrofílico y mejorar su interacción con las células (Bas et al., 2017; Blum et al., 2019).

3.7 Electrohilado de soluciones

Por otro lado, el proceso de electrohilado de solución involucra la disolución de un polímero en un solvente (o mezcla de solventes) y la utilización de una diferencia de potencial eléctrico para impulsar la solución polimérica desde una aguja hacia un colector. El campo eléctrico de alta intensidad está generado por dos electrodos con cargas opuestas y debe ser capaz de establecer una fuerza electrostática que permita vencer la tensión superficial de la solución y deforme la superficie formando una geometría conocida como cono de Taylor. Esta fuerza produce la aceleración del microchorro y su expulsión hacia el plato colector (Ristovski et al., 2015). El equipamiento básico consiste de una fuente de alta tensión, un sistema de infusión a jeringa, una aguja (boquilla) conectada a la jeringa, y un colector metálico (Kishan y Cosgriff-Hernandez, 2017), como se puede ver en la siguiente Figura (5).

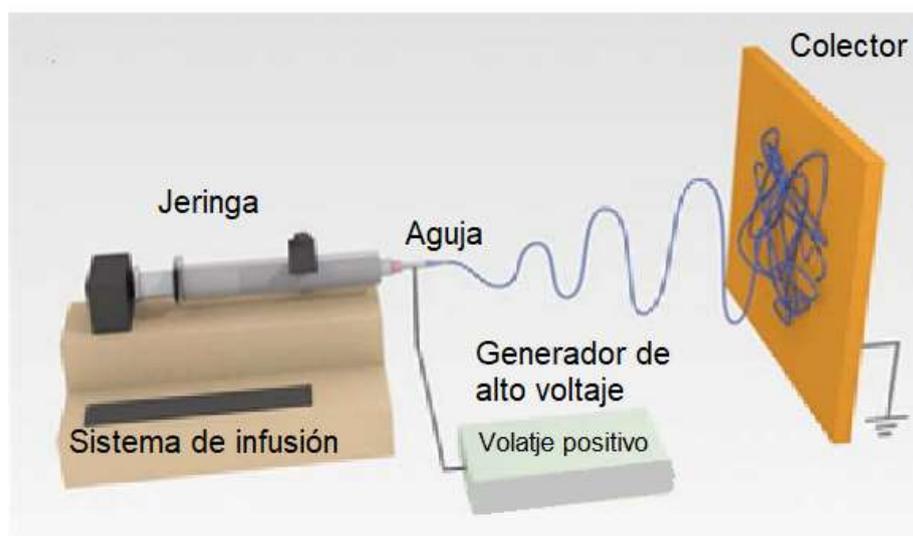


Figura 5. Equipo típico de electrospinning (Kishan y Cosgriff-Hernandez, 2017).

A pesar de que esta técnica puede crear fibras con diámetros en la escala de nanómetros, la evaporación del solvente durante la extrusión de la fibra provoca importantes inestabilidades, lo que reduce considerablemente el control preciso sobre la ubicación de la fibra, un fenómeno comúnmente denominado "*fiber whipping*". El valor de la tensión utilizada en electrohilado es mayor al valor utilizado en MEW, y es el responsable de ocasionar las inestabilidades eléctricas que permiten obtener fibras de dimensiones nanométricas (Dalton, 2017).

La PCL, es uno de los polímeros sintéticos más prometedores para aplicaciones en la cicatrización de heridas, tiene una excelente procesabilidad también mediante electrohilado y, en comparación con los polímeros naturales, altas propiedades mecánicas. Sin embargo, la biodegradabilidad, adhesión celular y las respuestas de proliferación en PCL son limitadas. Por otro lado, la gelatina, polímero natural derivado del colágeno que contiene componentes moleculares presentes en la MEC de la piel, promueve las propiedades de adhesión y proliferación celular. Por lo tanto, la combinación de PCL y gelatina en fibras electrohiladas debería conducir a la obtención de estructuras con mejores propiedades mecánicas y físicas junto con una biocompatibilidad adecuada (Unalan et al., 2019).

3.8 Combinación de técnicas de fabricación

En general, cada tecnología de fabricación posee sus ventajas y limitaciones en cuanto a la resolución, velocidades de fabricación, materiales posibles, etc. Así, una combinación de diferentes técnicas abre nuevas oportunidades para la fabricación de andamios de estructura jerárquica. Los desafíos actuales como la imitación del tejido natural en cuanto a resolución y complejidad, son requerimientos que muchas veces no se pueden alcanzar con una sola técnica. Por lo tanto, la combinación de al menos dos técnicas de fabricación es vista como una tendencia emergente claramente necesaria (Dalton et al., 2020).

En particular, la técnica de MEW, gracias a su capacidad de producir estructuras de geometría controlada, permite alcanzar buenas propiedades mecánicas en el andamio. Sin embargo, como ya se mencionó, esta técnica produce fibras de tamaño micrométrico, mucho más grandes que aquellas que conforman la nanoestructura de la MEC. Las nanofibras fabricadas mediante electrohilado han sido ampliamente estudiadas para ingeniería de tejidos debido a su alta porosidad y alta área superficial específica (Z. Wang et al., 2021), y a su morfología y arquitectura que son similares a las presentes en la MEC de la piel, la cual está compuesta mayormente por fibras de colágeno (Chong et al., 2007).

El propósito de este trabajo es la fabricación y caracterización de andamios mediante la combinación de las técnicas de MEW y electrohilado, con el objetivo de obtener estructuras de morfología jerárquica que aprovechen las ventajas de cada tecnología de fabricación. Se utilizarán PCL y gelatina para mejorar la funcionalidad de los andamios.

4. Objetivos

- Obtener matrices impresas basadas en PCL mediante tecnología MEW y modificación superficial con electrohilado empleando solventes benignos.
- Caracterizar las estructuras fibrosas mediante SEM, FTIR, ensayos mecánicos y propiedades superficiales.
- Determinar el comportamiento de la degradación hidrolítica de las matrices preparadas.
- Determinar el comportamiento biológico para valorar la citocompatibilidad de las matrices.
- En base a los resultados obtenidos, evaluar la potencial aplicación de los andamios en la curación de heridas.

5. Materiales

Se utilizó PCL de grado médico (PURABSORB PC12, Polycaprolactone, PURAC, Países Bajos) para imprimir la microestructura de MEW. Para la capa electrohilada, se usó gelatina (~300 g Bloom, Tipo A), PCL (Mn = 80 kDa) y ácido acético glacial (GAA), adquiridos de la empresa Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany).

Para los estudios celulares se utilizó la línea celular de NHDF, que fue obtenida del Centro de Investigación Traslacional (TRC) de Erlangen.

6. Métodos

6.1 Obtención de matrices impresas mediante MEW

La estructura microfibrosa se obtuvo empleando el equipo MEW (Bioscaffolder 3.1, GeSiM) que se observa en la Figura 6. Se partió de parámetros de procesamiento ajustados previamente en el grupo de trabajo para la impresión de PCL. Se imprimieron estructuras cuadradas de 1,41 cm de lado con 15 capas y poros cuadrados, siguiendo un patrón de 90° entre capas y con una distancia entre fibras adyacentes (d) de 0.350 mm. Antes de comenzar la impresión MEW, los pellets de PC12 se calentaron durante una hora a 85°C en el cartucho de la impresora hasta fundirse completamente. Luego, el polímero fue extruído a una presión de salida de 37 kPa, con una velocidad de movimiento del cabezal de impresión de 28 mm/s, y aplicando una tensión de 4kV entre la boquilla y la plataforma de la impresora, separadas por una distancia de alrededor de 0,55 mm.

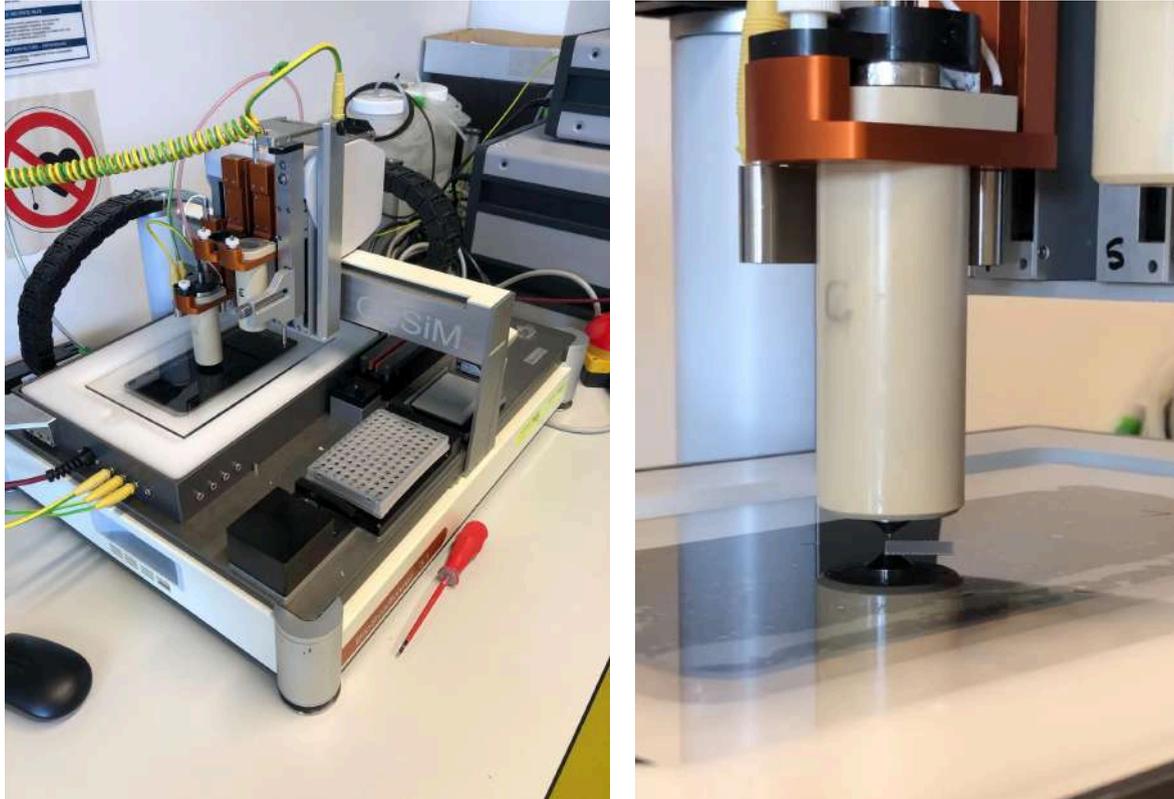


Figura 6. a) Impresora MEW utilizada para la obtención de la estructura micrométrica. b) Cabezal de impresión y andamio impreso sobre el colector.

6.2 Obtención de la capa electrohilada

Sobre las matrices impresas mediante MEW se depositó una membrana nanofibrosa a través de la técnica de electrohilado. Para la fabricación de la solución, primero se disolvió el polvo de gelatina (4,8%, p/v) en el solvente GAA (90%, v/v) durante 30 min a 40°C. Una vez que la gelatina se disolvió, se añadieron pellets de PCL (11,2 %, p/v) y se colocó la mezcla en un agitador magnético durante toda la noche a temperatura ambiente. De esta manera, la concentración total de polímero en GAA fue fijada en 16% p/v. Luego se produjeron las membranas, bajo condiciones ambientales constantes y definidas (temperatura (T): 25°C y humedad relativa (RH): 25%), utilizando el equipo de electrohilado que se detalla en la Figura 7 (Medical electrospinning machine, EC-16 CLI, IME Technologies, Netherlands). La solución fue cargada en una jeringa plástica de 3 mL, equipada con una aguja de calibre 23 G, y suministrada a 0.6 mL/h. Se colocó una lámina de aluminio alrededor

del tambor utilizado como colector, al cual se le aplicó una velocidad de giro. Este tambor permitió realizar el proceso de electrohilado simultáneamente sobre varias muestras alineadas con la punta de la aguja. La distancia entre la aguja y el colector fue de 12 cm. Para el electrohilado, se aplicó una tensión de +19 kV en la aguja y -1 kV en el colector. Además, durante el proceso, se ajustó el flujo de nitrógeno a 8 mL/min para optimizar la formación del cono de Taylor. El tiempo de electrohilado se varió entre 0, 1, 5 y 15 minutos, obteniéndose así 4 tipos de muestras: PCL MEW, 1 min PCL-GEL, 5 min PCL-GEL, 15 min PCL-GEL, respectivamente. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente en la oscuridad hasta su posterior análisis.

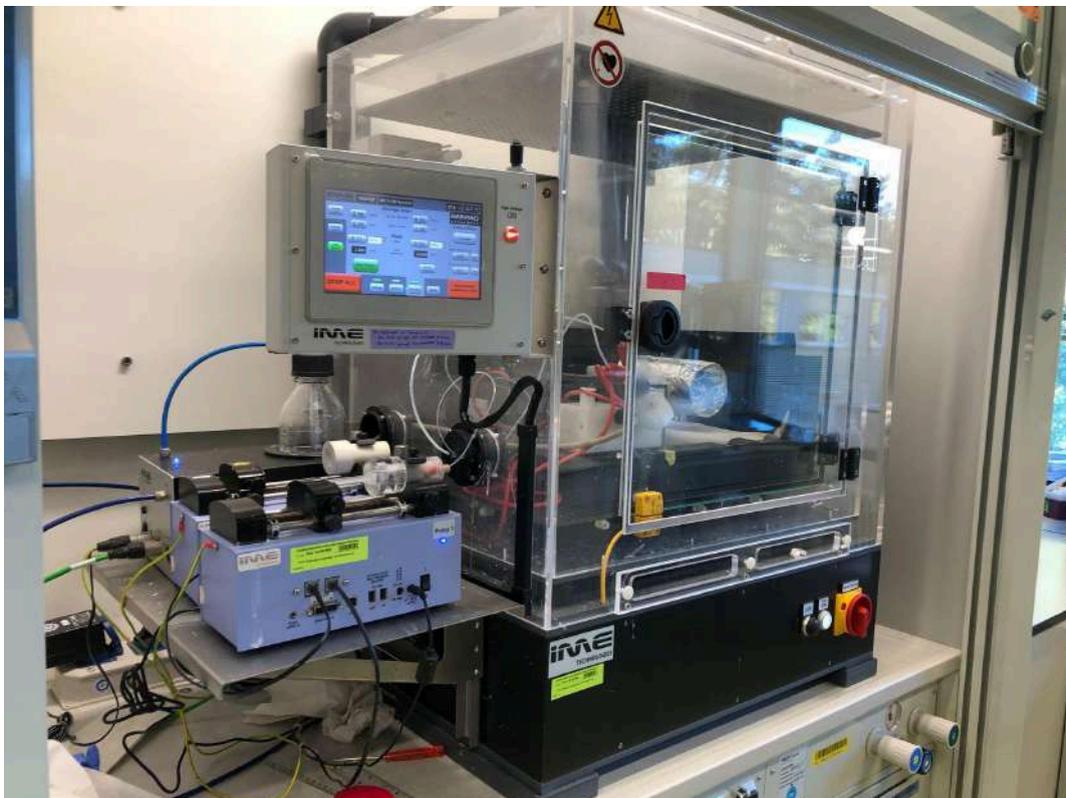


Figura 7. *Equipo de electrohilado utilizado para depositar las nanofibras sobre las matrices impresas.*

6.3 Caracterización morfológica, composicional e hidrofiliidad.

6.3.1 Microscopía óptica

Luego de depositar la capa electrohilada, los cuatro tipos de muestras se observaron con un microscopio óptico (Stemi 508, Zeiss) para su análisis cualitativo.

6.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

También se observaron muestras con un microscopio electrónico de barrido (Zeiss Auriga) en condiciones de alto vacío, aplicando una tensión de aceleración de 2kV al haz de electrones. Se obtuvieron imágenes en modo de electrones secundarios (SE) a diferentes aumentos para cada muestra, y se realizó una comparación cualitativa entre las micrografías a distintos tiempos de electrohilado, antes y después del ensayo de degradación. A partir de las imágenes y de la utilización del software Image J (NIH), se determinó el diámetro de fibra promedio de la capa impresa y la electrohilada y el tamaño de poro promedio de la capa impresa. Para ello, se midió la longitud de diez poros y el diámetro de diez fibras en dos muestras impresas. En cuanto a la capa electrohilada, se analizaron tres imágenes de SEM, una por cada tiempo de electrohilado, midiendo el diámetro de 45 nanofibras en cada imagen.

6.3.3 Espectroscopía infrarroja

Se analizó la presencia de los grupos funcionales característicos de la gelatina y la PCL mediante la técnica de FTIR utilizando el modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR). Para ello se utilizó un espectrofotómetro IRAffinity 1S-Shimadzu (Kyoto, Japan), donde se realizaron 42 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} en el rango de número de onda $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

6.3.4 Ángulo de contacto

Para la determinación del ángulo de contacto se utilizó un goniómetro (DSA30 Expert, Kruss, Germany) y gotas de agua destilada. Se analizaron 3 muestras de cada tipo y se realizaron 10 mediciones por muestra.

6.4 Comportamiento mecánico

Para los distintos tipos de matrices, se determinó el comportamiento mecánico antes del ensayo de degradación, utilizando una máquina de ensayos de tracción (Instron 5967). Se ensayaron 6 muestras de cada tipo a una velocidad de 1 mm/min. Para ello, se cortaron marcos de papel cuadrados de 2 cm de lado. Las muestras fueron cortadas con un ancho de 0.3 cm y luego se midió el largo (L_0), ancho (w) y espesor

(e) de cada una utilizando un calibre digital de resolución 0.01 mm. Una vez colocadas dentro del marco de papel utilizando cinta bifaz, se realizaron los ensayos de tracción como se muestra en la Figura 9.

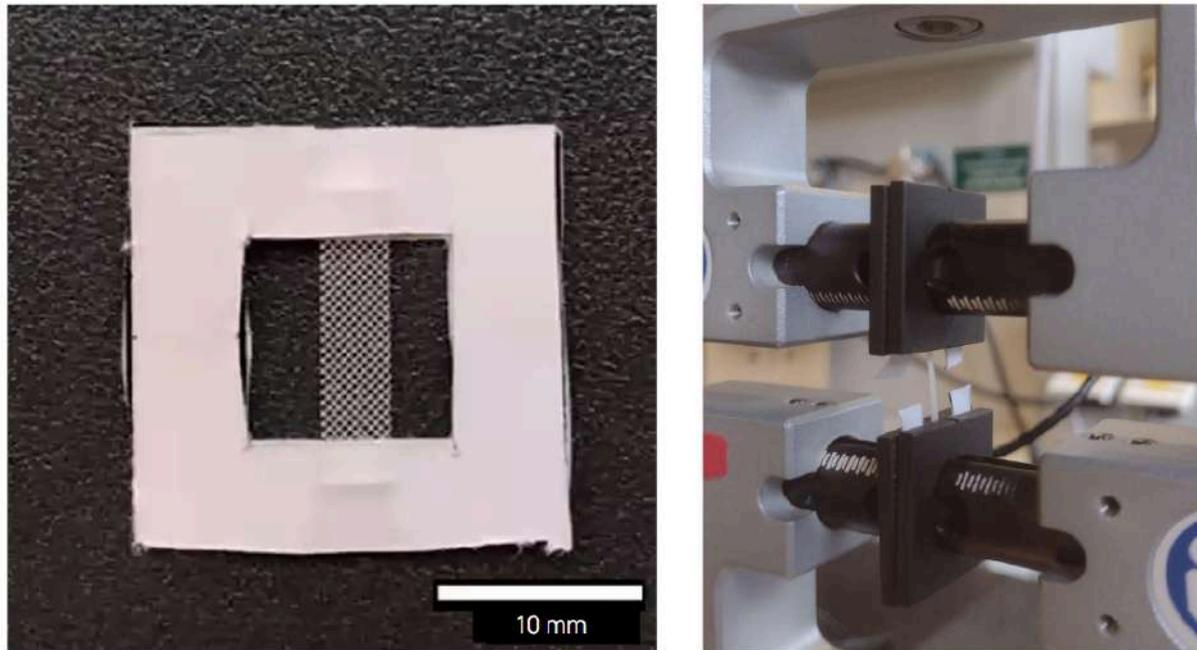


Figura 9. *Muestra en marco de papel sometida a ensayo de tracción.*

A partir de los datos de fuerza y desplazamiento obtenidos, se obtuvieron las curvas de tensión-deformación. Para la tensión, se utilizó la ecuación 5 que se muestra a continuación:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde F es la fuerza registrada por la máquina y el área A es el área transversal inicial, que es igual al valor de espesor (e) multiplicado por el valor de ancho (W). Para la deformación, se empleó la ecuación 6:

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde ΔL representa el desplazamiento de las mordazas a cada tiempo y L_0 la longitud inicial de cada muestra.

Una vez obtenidas las curvas de tensión-deformación para cada muestra, se determinaron los valores promedio de constante elástica, resistencia a la tracción y elongación a la rotura, siguiendo la norma ASTM D638, para analizar la influencia del tiempo de electrohilado en las propiedades mecánicas.

6.5 Proliferación celular *in vitro*

La proliferación celular *in vitro* de las estructuras de MEW se investigó mediante el kit de ensayo de proliferación celular WST-8 (Sigma Aldrich, Alemania) utilizando el método de contacto directo según la norma ISO 10993-5. En primer lugar, las células NHDF se cultivaron en DMEM con alta concentración de glucosa, suplementada con 10% de FBS y 1% de PS, e incubadas a 37°C en 5% de CO₂. En paralelo, las estructuras de 1,41 cm de ancho × 1,41 cm de largo se colocaron en placas de 12 pocillos y se esterilizaron bajo irradiación UV durante 30 minutos en cada lado. Una vez que las células NHDF alcanzaron una confluencia del 80%, se sembraron en las estructuras a una densidad de 5 × 10⁴ células por pocillo. Después de sembrar las células, todas las estructuras de MEW se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 1 y 7 días. Finalmente, la viabilidad celular se analizó mediante el ensayo WST-8 (5% (v/v)), y la absorbancia se midió a 450 nm con un lector de microplacas. La viabilidad celular se calculó según la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular = \left(\frac{Absorbancia\ muestra - Absorbancia\ blanco}{Absorbancia\ Ref - Absorbancia\ blanco} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

Se utilizaron estructuras nativas de PCL como referencia; el blanco era una solución de WST-8. Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.6 Morfología celular

Para valorar la adhesión celular, se evaluó la morfología de las células adheridas a los materiales investigados. Así, las células sembradas en las muestras se secaron mediante un método de secado en punto crítico y se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido.

6.7 Estudios de biodegradación *in vitro*

La degradación *in vitro* de las matrices PCL MEW y 15 min PCL-GEL se evaluó sumergiendo las muestras en 6 mL de solución PBS (pH 7,4) a 37°C durante 1, 7 y 28 días. Se emplearon 3 muestras para cada condición de composición y tiempo de ensayo.

La composición de la solución de PBS fue de 1.2g NaCl, 0.03g KCl, 0.216g Na₂HPO₄ y 0.037g KH₂PO₄ en 150mL de agua. Las muestras fueron pesadas antes de empezar con los experimentos (peso inicial, W1). Los recipientes con las muestras sumergidas fueron colocados en una incubadora (Imperial III radiant heat incubators 302-1, Lab line Instruments INC, USA) a 37°C (temperatura corporal) con una agitación orbital media de 150 rpm, como se puede ver en la Figura 8.

El grado de hinchamiento (absorción de agua) fue medido por un método gravimétrico. Las muestras se removieron de la solución y fueron pesadas, antes y después de secar con papel (peso mojado, W2 y W3, respectivamente). Luego, fueron secadas en vacío por un período de 72 horas y pesadas nuevamente (peso seco, W4). Finalmente, se calculó la absorción de agua y la pérdida de peso utilizando las siguientes ecuaciones (ecuaciones 8, 9 y 10):

$$\text{Absorción de agua (\%)}: \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

$$\text{Absorción de agua (\%)}: \frac{W_3 - W_1}{W_1} \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

$$\text{Pérdida de peso (\%)}: \frac{W_1 - W_4}{W_1} \times 100 \quad \text{Ecuación 10}$$



Figura 8. *Incubadora utilizada para los ensayos de degradación.*

6.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa RStudio, versión 4.4.1 (The R Foundation for Statistical Computing). Se realizaron comparaciones de medias utilizando test de Tukey para determinar diferencias estadísticas en el ángulo de contacto, las propiedades mecánicas, la absorción de agua, la pérdida de peso y la viabilidad celular. Para todos los casos el intervalo de confianza utilizado fue del 95%.

7. Resultados y discusión

7.1 Obtención de matrices impresas mediante MEW

Las matrices impresas se muestran en la Figura 10. Se observa que las fibras fueron depositadas en línea recta y de forma precisa de acuerdo con la arquitectura prevista, manteniendo un diámetro uniforme.

Para su fabricación, se emplearon los parámetros de impresión previamente establecidos por el grupo de investigación. Sin embargo, los parámetros iniciales generaron estructuras débiles, difíciles de manipular y de despegar del colector. Para mejorar estas propiedades, se incrementó la presión en 5 kPa, lo que permitió aumentar el caudal de material a la salida de la boquilla y, en consecuencia, obtener fibras más gruesas. Este ajuste mejoró significativamente la resistencia de las matrices durante la manipulación, manteniendo la velocidad del cabezal en 28 mm/s.

Por otro lado, durante el proceso de impresión, resultó imprescindible eliminar las burbujas de aire del polímero fundido, para que la presión sea efectivamente aplicada y no ocurran variaciones en el caudal. Esto se logró al comprimir el material utilizando una herramienta manual.

Cada conjunto de muestras impresas fue inspeccionado manual y visualmente, asegurando que tengan cierta flexibilidad y translucidez, características de las muestras de PCL. Las estructuras opacas con capacidad de deformación nula indicaron la degradación del material y fueron descartadas. Ante esta situación, también se procedió a cambiar el polímero dentro de la boquilla. Esta degradación podría ser debido a que el material permanece a altas temperaturas durante varias horas, lo que genera una disminución del peso molecular y de las propiedades mecánicas, además de cambios en el aspecto (Kade y Dalton, 2021; Paxton et al., 2021; Pielichowski et al., 2023).

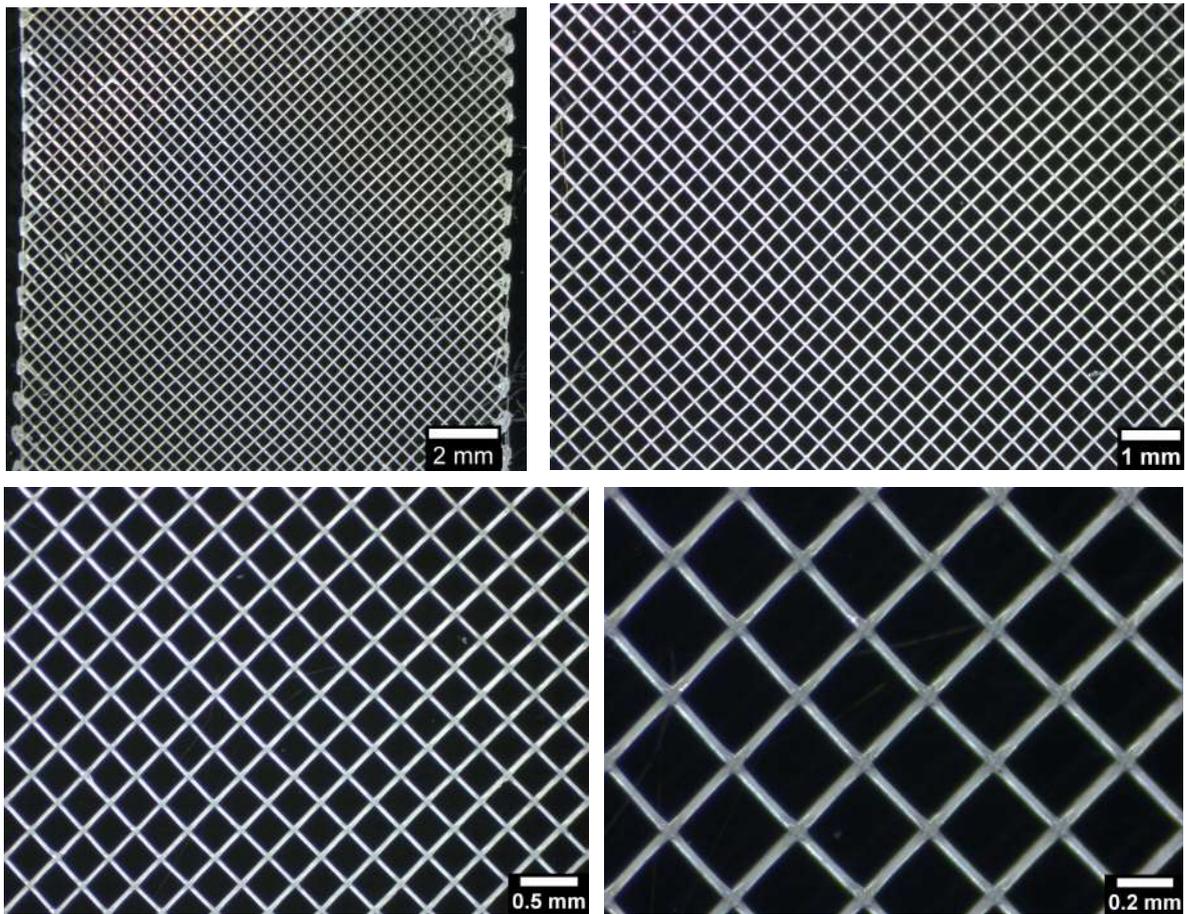


Figura 10. *Micrografía óptica a diferentes aumentos de estructura impresa con los parámetros óptimos.*

7.2 Obtención de la capa electrohilada

Una vez producidas las estructuras MEW, sobre su superficie se depositó una capa de nanofibras mediante electrohilado. Al variar el tiempo de electrohilado, se obtuvieron tres tipos de muestras, que se pueden observar en las micrográficas de la Figura 11. En todos los casos las nanofibras fueron depositadas de manera homogénea a lo largo de todo el andamio y no se observó delaminación. Además, como era de esperar, al incrementar el tiempo de electrohilado aumentó la densidad de nanofibras sobre la superficie.

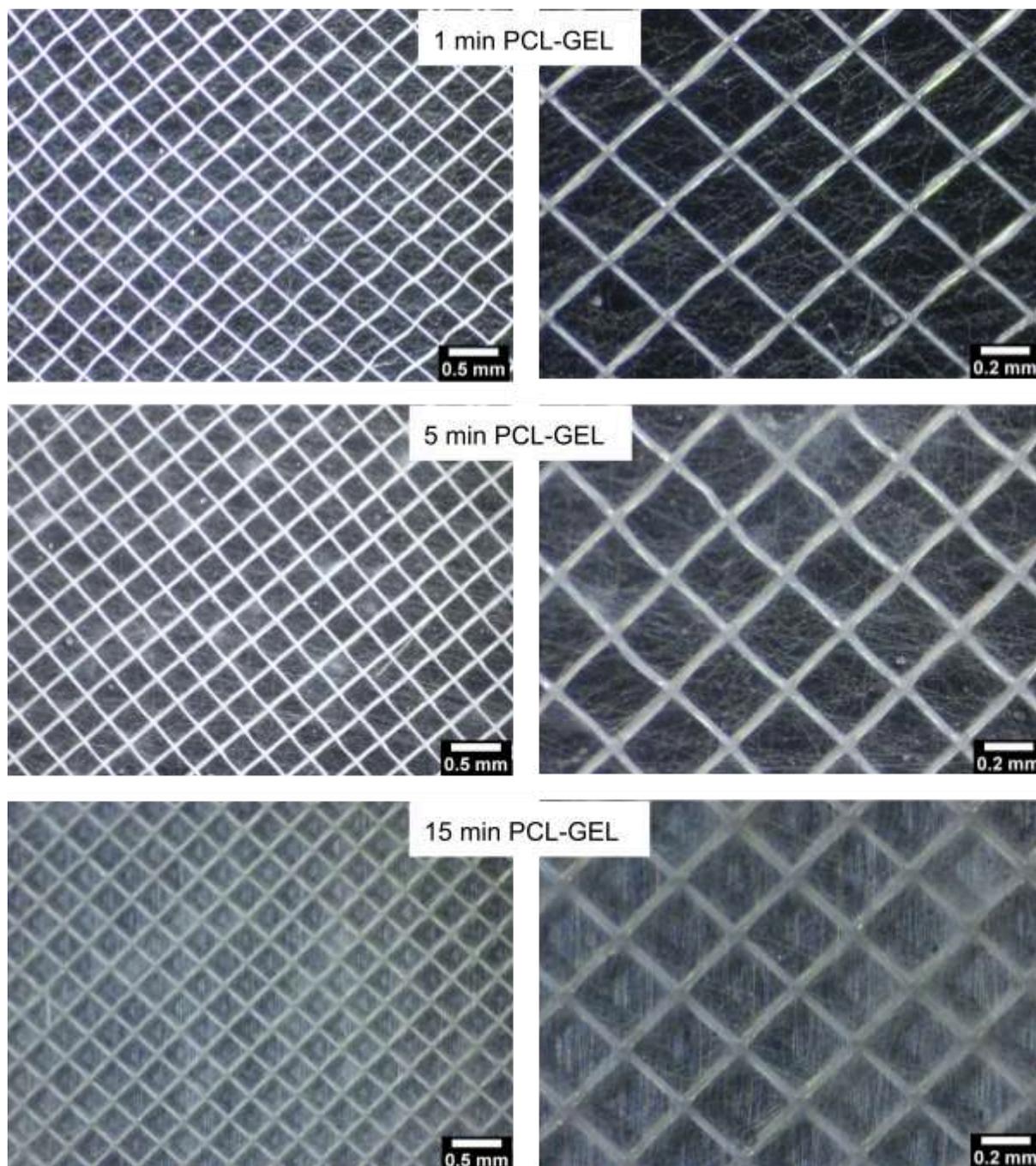


Figura 11. *Micrografías ópticas a diferentes aumentos de las muestras luego de realizar el electrohilado.*

7.3 Caracterización morfológica, composicional e hidrofiliicidad

7.3.1 Microscopía electrónica

Microestructura MEW

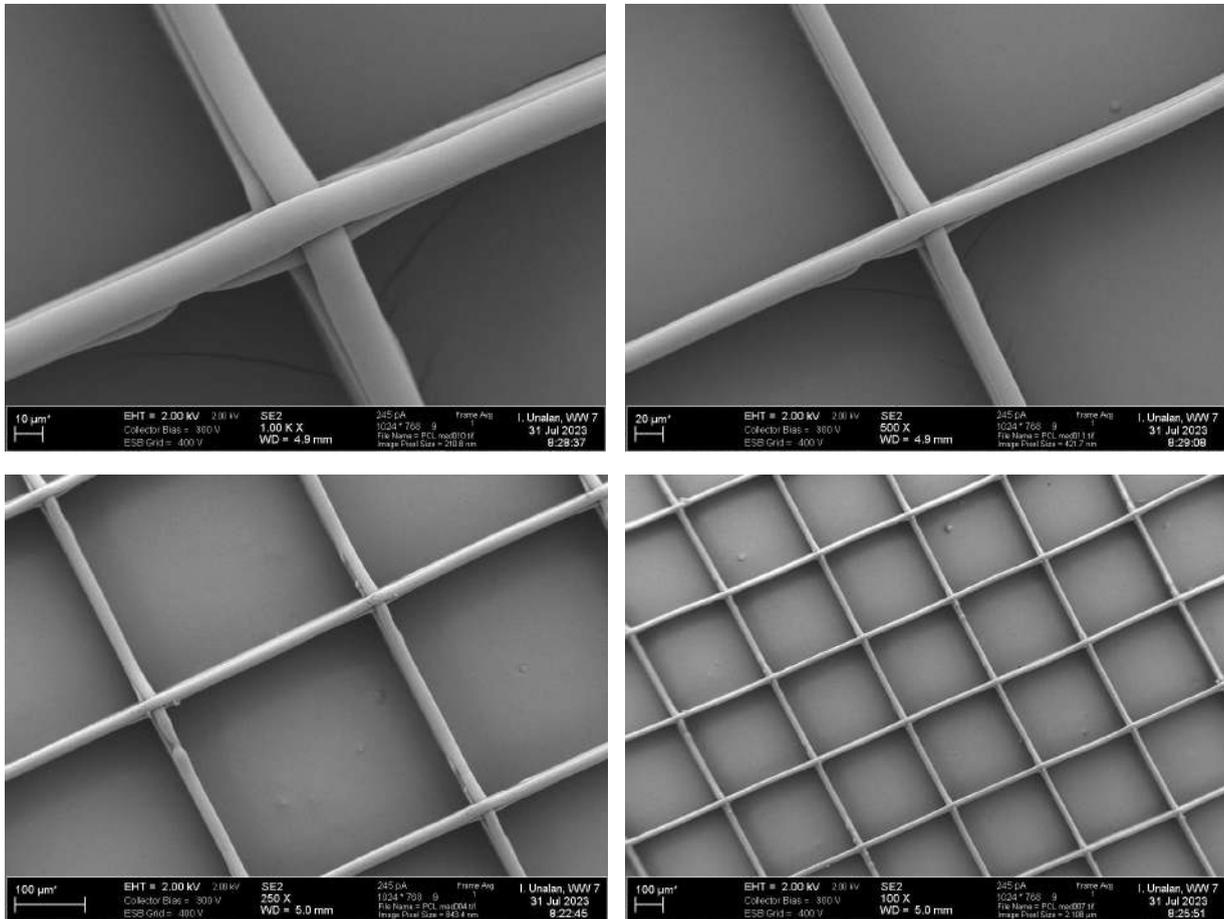


Figura 12. Micrografías SEM a diferentes aumentos de estructura impresa al utilizar los parámetros óptimos.

Las micrografías SEM de las muestras impresas se pueden ver en la Figura 12. Como se mencionó a partir de las micrografías ópticas, las fibras están depositadas en línea recta y de forma precisa de acuerdo con la arquitectura prevista. Sin embargo, en las imágenes SEM se pueden ver algunas discontinuidades a lo largo de las fibras, que podrían deberse al efecto de pulsación de fibra o *fiber pulsing* (oscilación en el diámetro de la fibra).

El *jet lag* (L), se define como la distancia entre el punto de contacto del chorro polimérico y la proyección de la boquilla sobre el colector, y se ha demostrado que la variación de L a lo largo del proceso de impresión conduce a diámetros no uniformes (Nadernezhad et al., 2021), como podrían ser los observados en nuestras imágenes SEM. Cao y colaboradores (2022), con el objetivo de mejorar la uniformidad del diámetro de fibra impreso, desarrollaron una metodología para controlar L en tiempo real durante la impresión, partiendo del conocimiento de que existe una tensión mínima (U_c) por encima del cual se logra evitar la pulsación de fibra. Debido a esto, en la investigación se asume que la tensión también debería afectar la estabilidad del *jet lag*. Entre las conclusiones más relevantes, se demuestra que U_c varía dependiendo de los valores de velocidad del cabezal (v) y la presión aplicada (P). Específicamente, se comprueba que U_c debe ser mayor al aumentar v y P . Teniendo en cuenta esto, al variar estos tres parámetros, es posible balancear los caudales de entrada y salida en el cono de Taylor, manteniendo su volumen estable y obteniendo fibras de diámetro constante. Considerando lo expuesto en el artículo citado, se podría continuar con la optimización de nuestros parámetros de impresión, teniendo en cuenta no sólo las micrográficas ópticas sino también las obtenidas mediante SEM.

Adicionalmente, a partir de las imágenes SEM, se determinó el tamaño de poro y el diámetro de fibra promedio. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1 y coinciden con los valores esperados de acuerdo con la distancia entre fibras configurada en el software de la impresora.

Tabla 1. Tamaño de poro y diámetro de fibra promedio de las muestras MEW.

	Tamaño de poro (μm)	Diámetro de fibra (μm)
Muestra 1	324 ± 1.7	15.7 ± 0.6
Muestra 2	319 ± 7.0	19.8 ± 0.3
Total	322 ± 6.0	18.0 ± 2.0

La homogeneidad en el tamaño de poros en la ingeniería de tejidos, como los que se obtuvieron mediante MEW, es crucial debido a varias razones. Las estructuras de poros uniformes permiten una mayor tasa de difusión de macromoléculas, lo que facilita el transporte eficiente de nutrientes y señales bioquímicas esenciales para el desarrollo celular. Además, esta característica promueve una distribución más uniforme de las células, asegurando un crecimiento equilibrado del tejido. También se ha observado que los andamiajes con poros homogéneos favorecen un mayor grado de diferenciación celular, mejorando así la funcionalidad del tejido regenerado (Choi et al., 2010)

Capa electrohilada

Se utilizaron imágenes SEM para analizar la morfología de las nanofibras electrohiladas. Las micrografías a diferentes aumentos de las muestras 1 min PCL-GEL, 5 min PCL-GEL y 15 min PCL-GEL, se observan en las Figuras 13, 14 y 15. En todos los casos, se pueden observar fibras homogéneas, de superficie lisa y orientadas al azar. No se produjeron aglomeraciones esféricas (*beads*), un defecto típico en electrohilado que ocurre cuando los parámetros utilizados durante el proceso no son los adecuados o la solución no posee la concentración requerida para formar fibras uniformes (Pillay et al., 2013). Adicionalmente, se determinó el diámetro de fibra promedio de las nanofibras, que resultó de 190 ± 50 nm. Las mediciones realizadas para determinar este valor se resumen en los histogramas de las Figuras 13, 14 y 15.

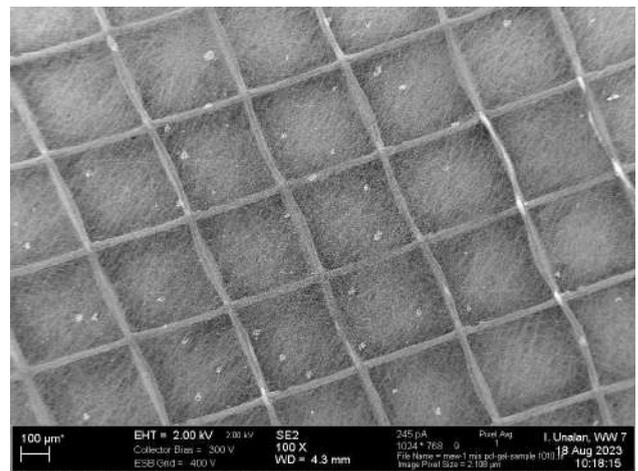
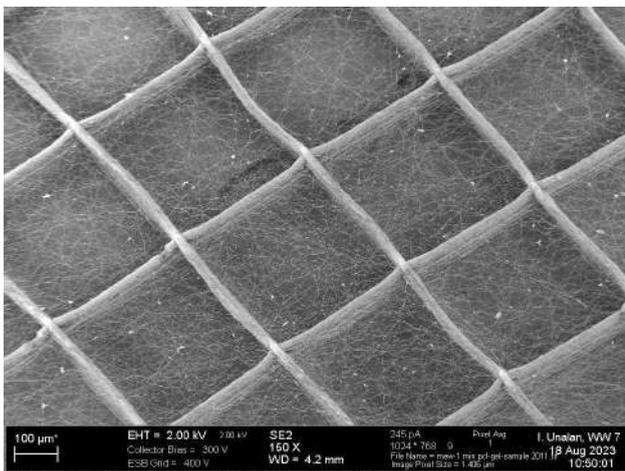
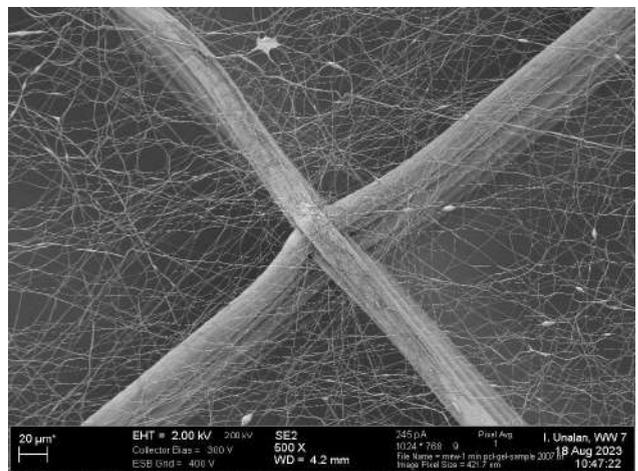
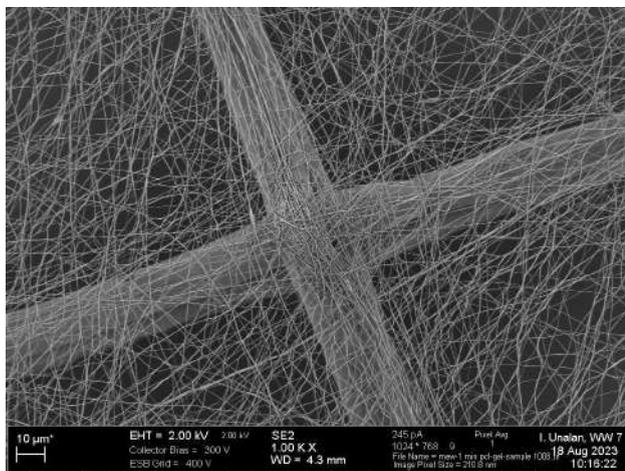
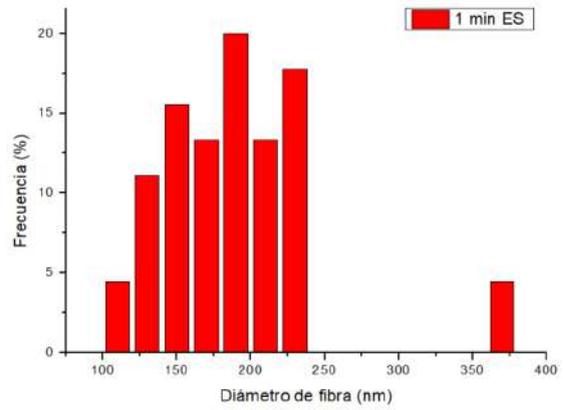
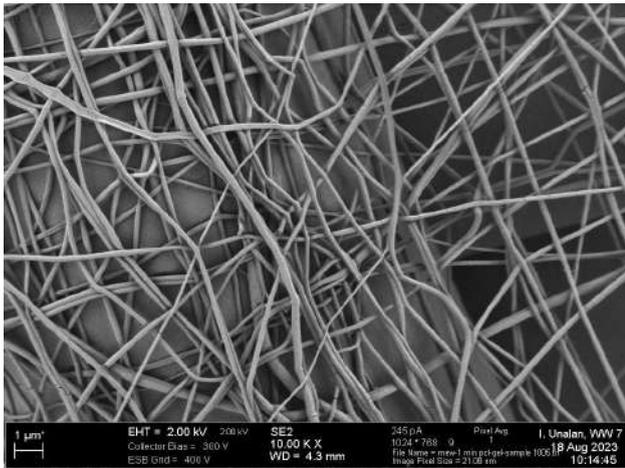


Figura 13. Micrografías SEM a diferentes aumentos e histograma de estructura 1 min PCL-GEL.

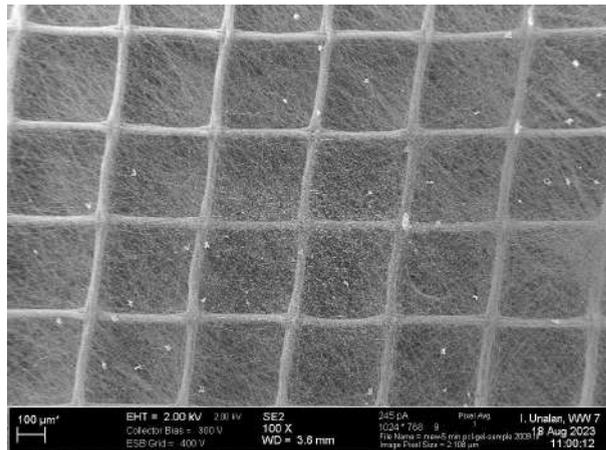
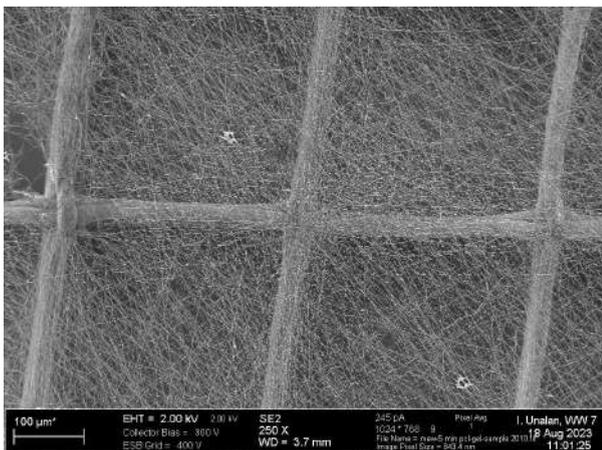
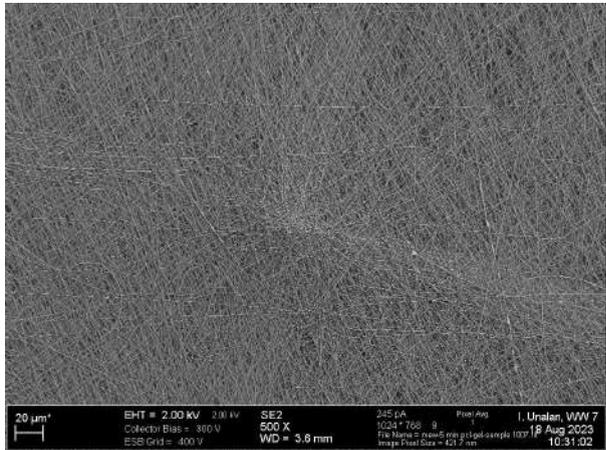
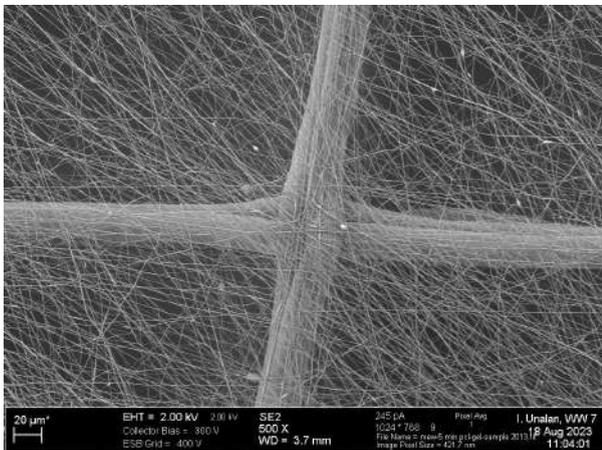
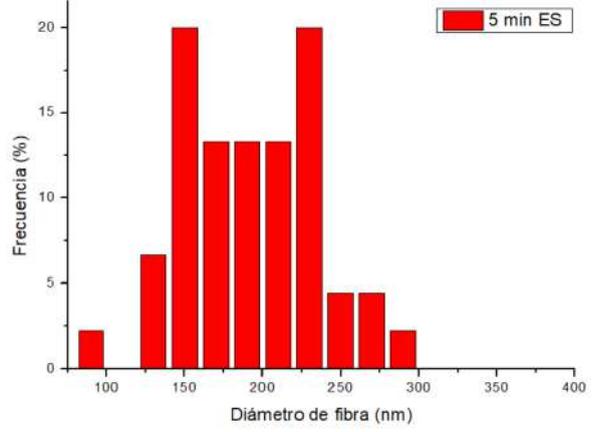
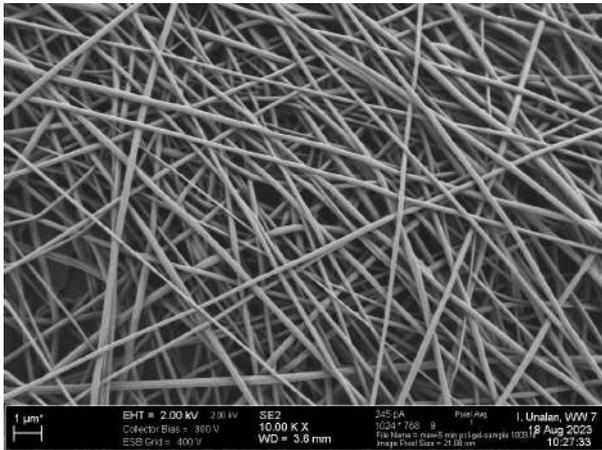


Figura 14. Micrografías SEM a diferentes aumentos e histograma de estructura 5 min PCL-GEL.

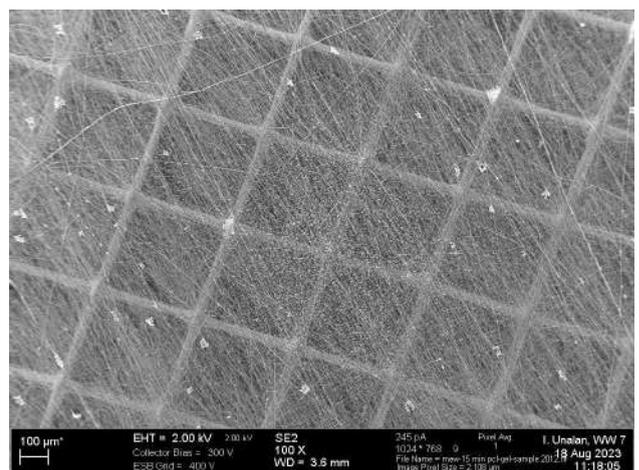
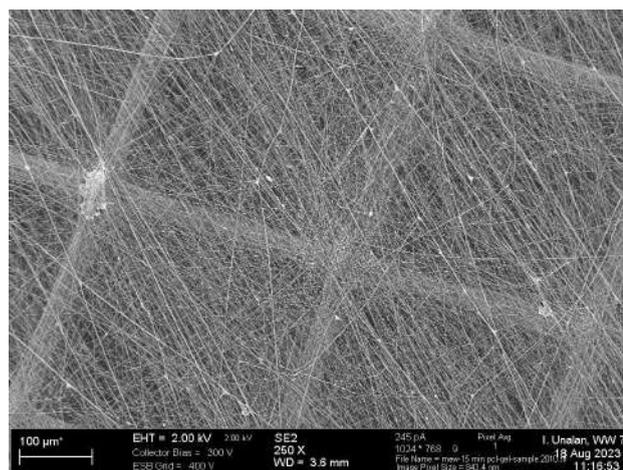
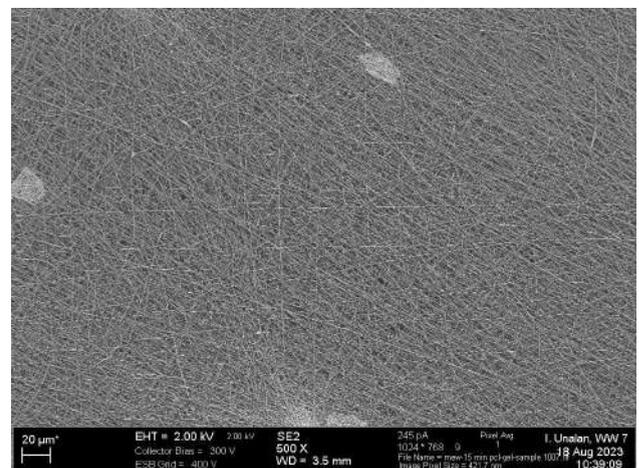
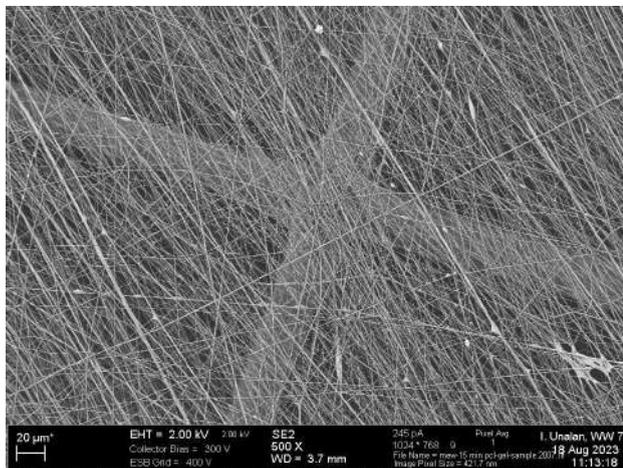
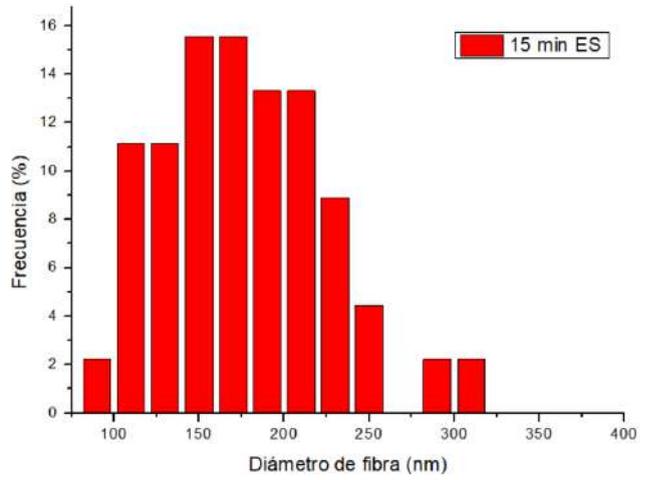
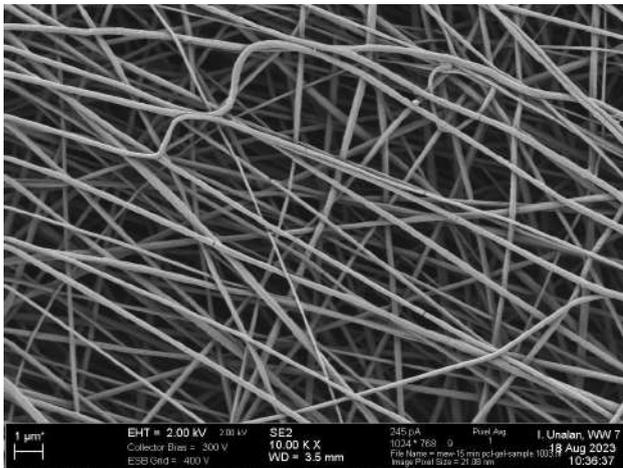


Figura 15. Micrografías SEM a diferentes aumentos e histograma de estructura 15 min PCL-GEL.

7.3.2 Espectroscopía infrarroja

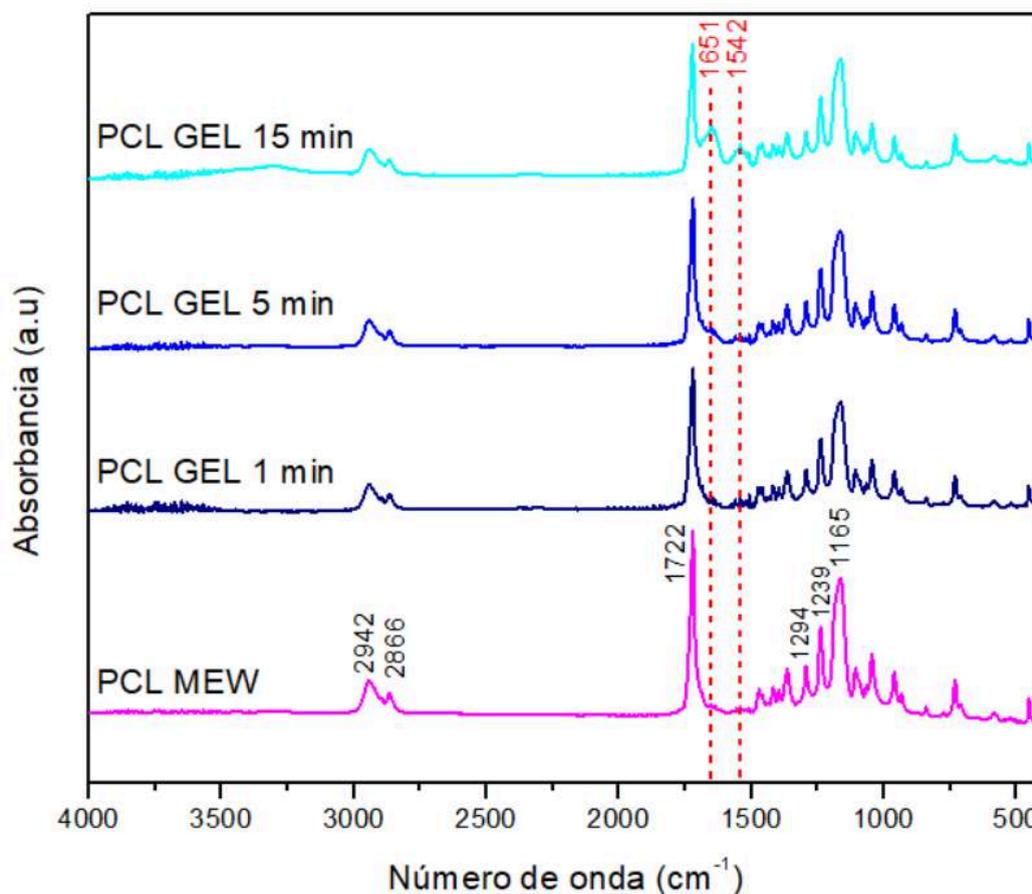


Figura 16. Espectros de FTIR de los andamios fabricados.

Los picos en el espectro IR de una muestra representan la excitación de modos vibracionales de las moléculas en la muestra y, por lo tanto, están asociados con los diversos enlaces químicos y grupos funcionales presentes en las moléculas (Ismail et al., 1997). Teniendo esto en cuenta, se realizaron análisis por FTIR para confirmar la composición química de las muestras luego del procesamiento. Todos los espectros, como era de esperar, mostraron las bandas de absorción características de la PCL (Figura 16). Se obtuvieron los picos debidos al estiramiento asimétrico y simétrico de los enlaces CH₂ en 2942 y 2866 cm⁻¹, respectivamente, los picos a 1722 cm⁻¹ y a 1294 cm⁻¹, asociados al estiramiento del grupo carbonilo y al estiramiento de los enlaces C–O y C–C, respectivamente, y los picos centrados alrededor de 1240 y 1165 cm⁻¹ relacionados con el estiramiento asimétrico y simétrico de los enlaces C–O–C, respectivamente (Liverani y Boccaccini, 2016).

Por otro lado, las bandas características de la gelatina se observaron únicamente después de 15 minutos de electrohilado. Esto es coherente al considerar que la cantidad de energía infrarroja absorbida por una sustancia es proporcional a su concentración (Ismail et al., 1997). En el resto de las muestras, es probable que el tiempo de electrohilado no haya sido suficiente para obtener una concentración de nanofibras de gelatina detectable por el espectrofotómetro. Los picos se registraron a 1651 cm^{-1} para la amida I (vibraciones de estiramiento del enlace C=O) y alrededor de 1542 cm^{-1} para el acoplamiento de la flexión del enlace N-H y el estiramiento de los enlaces C-N, correspondiente a la amida II (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2008).

7.3.3 Ángulo de contacto

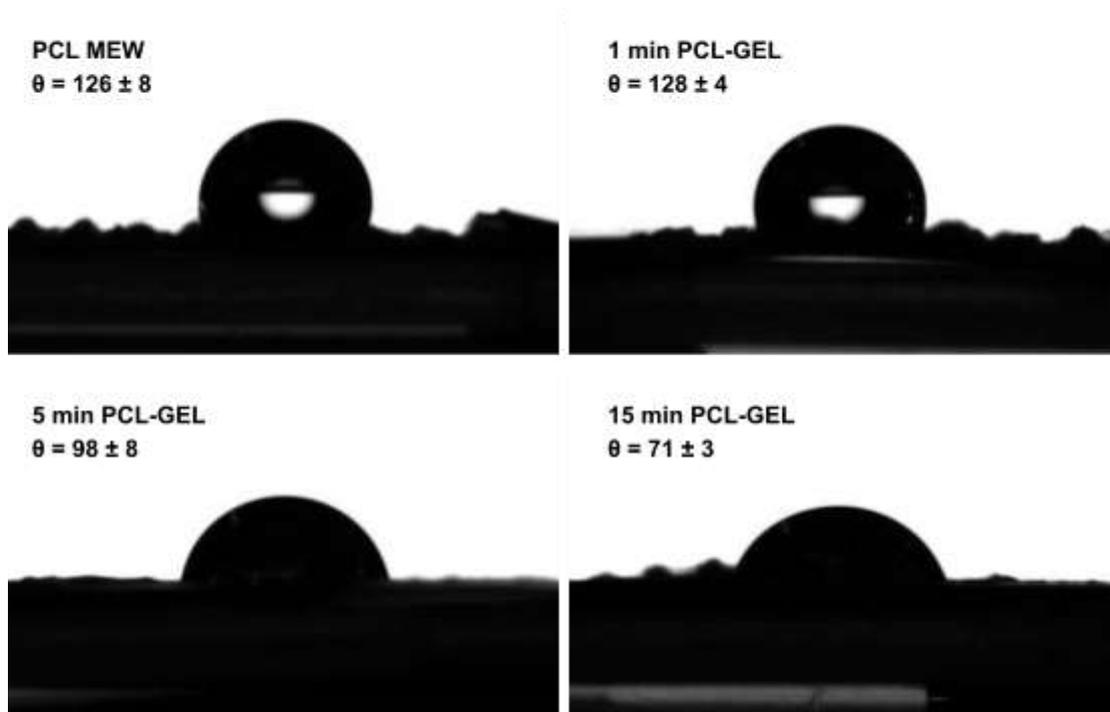


Figura 17. Perfil de gotas de agua sobre las superficies de las muestras.

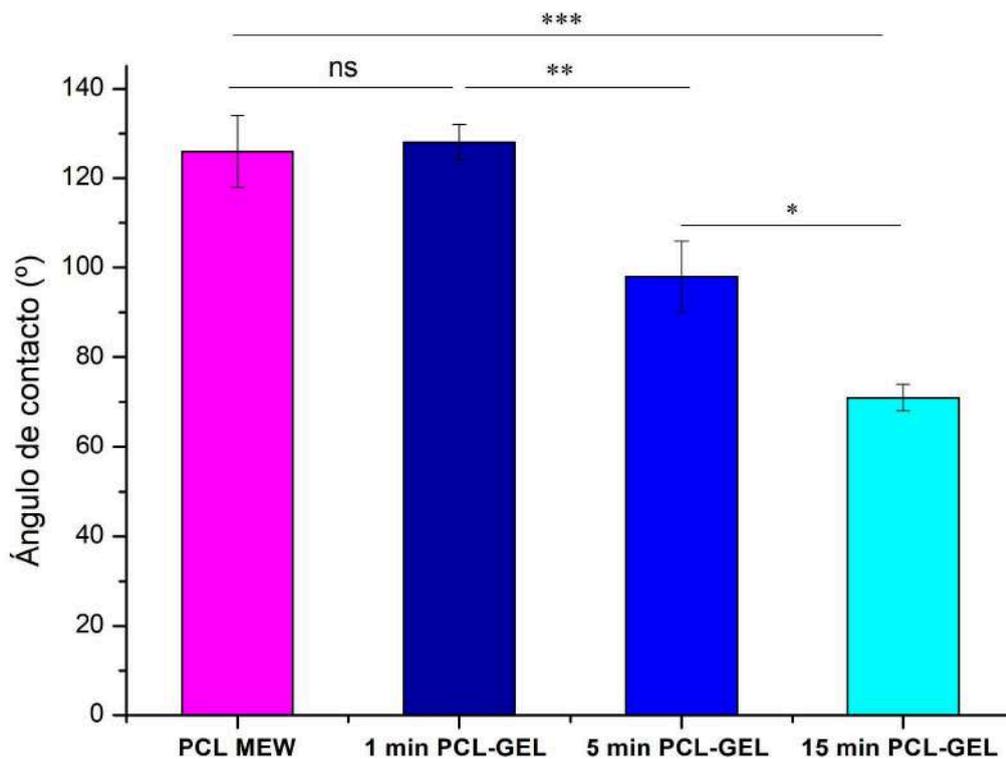


Figura 18. *Ángulos de contacto de las muestras. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con: ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (prueba HSD de Tukey)*

Los perfiles de las gotas de agua sobre las muestras y los ángulos de contacto obtenidos para cada condición pueden verse en la Figura 17. El ángulo de contacto de las muestras PCL MEW fue de $126 \pm 8^\circ$. Esto demuestra la hidrofobicidad de la PCL y coincide con un estudio realizado por Wang y colaboradores (2021), donde se fabricaron andamios jerárquicos al combinar estructuras MEW de PCL con nanofibras electrohiladas de gelatina y PCL. Allí, se obtuvieron ángulos de contacto de $121.2 \pm 0.7^\circ$, $115 \pm 6^\circ$ y $117 \pm 4^\circ$ para muestras de PCL con tamaños de poro de 100, 200 y 400 micrones, respectivamente.

En nuestros resultados (Figura 18) se observa que el incremento del tiempo de electrohilado y por lo tanto, de la densidad de nanofibras de gelatina, condujo a menores ángulos de contacto y superficies más hidrofílicas luego de 5 y 15 minutos de electrohilado ($p < 0.05$). Esto se debe a la naturaleza hidrofílica de las moléculas de gelatina (Dulnik et al., 2016; Ndlovu et al., 2021). En la investigación llevada a

cabo por Wang y colaboradores (2021), también se logró una reducción del ángulo de contacto al añadir nanofibras basadas en gelatina. Sin embargo, en nuestro caso, un minuto de electrohilado no permitió depositar nanofibras suficientes para modificar el ángulo de contacto de la estructura de PCL de forma significativa ($p > 0.05$). Esto también podría respaldarse con el espectro FTIR de la muestra 1 min PCL-GEL, donde las bandas de absorción características de la gelatina no fueron visibles. Resulta llamativo el valor observado luego de 1 minuto de electrohilado, ya que debería ser menor debido a la presencia del componente hidrofílico en la superficie.

El incremento del carácter hidrofílico obtenido es un resultado deseable en la fabricación de andamios porosos para ingeniería de tejidos. Las superficies hidrofóbicas que caracterizan a muchos de los polímeros sintéticos utilizados en aplicaciones biomédicas, conducen a una baja densidad de sembrado celular, una distribución heterogénea de las células en el andamio, y un crecimiento celular lento debido a una absorción insuficiente del medio celular de cultivo (Oh y Lee, 2013). Se ha reportado que superficies con hidrofiliencia moderada favorecen la adhesión, migración y crecimiento celular. Esto se ha atribuido a una mayor absorción de proteínas séricas del medio de cultivo celular, como la fibronectina y la vitronectina, que son conocidas por su capacidad de adhesión celular (Lee et al., 1998; Lee y Lee, 1993). En resumen, los andamios moderadamente hidrofílicos pueden permitir una siembra celular uniforme en la etapa inicial a través de la absorción homogénea del medio de cultivo que contiene células, proporcionar un entorno óptimo para la adhesión y proliferación celular, y mejorar el transporte de oxígeno/nutrientes y desechos metabólicos, lo cual es vital para la formación de tejidos (Oh y Lee, 2013).

7.3.4 Comportamiento mecánico

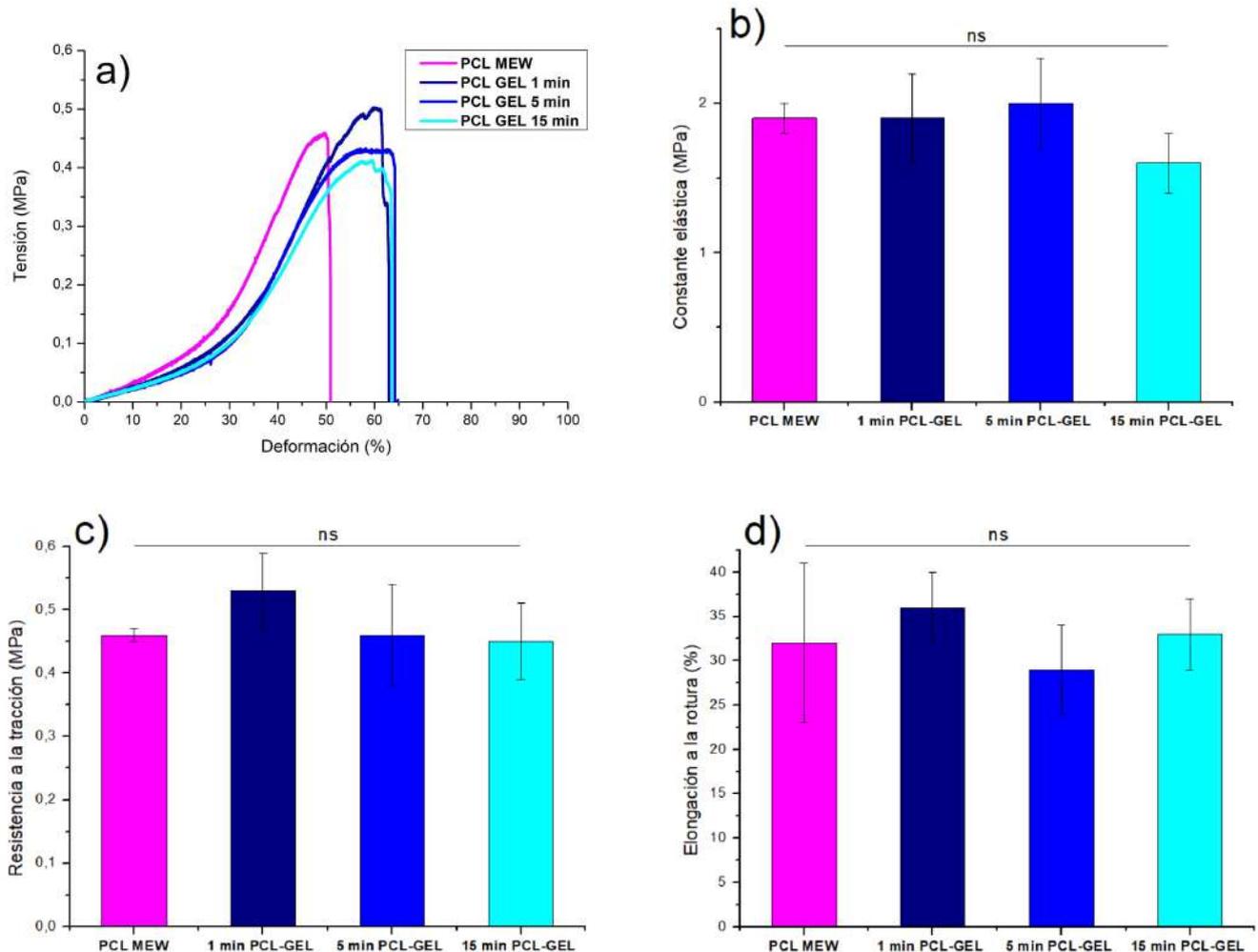


Figura 19. Resultados obtenidos del ensayo de tracción de las muestras. a) Curvas tensión-deformación. b) Constante elástica. c) Resistencia a la tracción. d) Elongación a la rotura. Las diferencias estadísticamente no significativas se indican con: ns $p > 0.05$ (prueba HSD de Tukey).

Las curvas de tensión-deformación obtenidas (Figura 19a) mostraron un comportamiento similar en todos los casos. La región inicial no representa una propiedad del material y se produce debido a la alineación o asentamiento de la muestra. Posteriormente se observó una zona lineal que obedece a la Ley de Hook, seguido de una región de deformación plástica que continúa hasta que se alcanza la fractura.

Los ensayos de tracción mostraron que las estructuras presentan propiedades mecánicas que podrían ser adecuadas para la cicatrización de heridas. Esto se infiere al tener en cuenta que la constante elástica en todos los andamios, que resultó cercana a 2 MPa (Figura 19b), está dentro del rango requerido al considerar que el módulo de Young de la piel varía de 10 kPa a 50 MPa. Además, se requiere flexibilidad suficiente para que las estructuras puedan adecuar su forma a diferentes tipos de heridas (Negut et al., 2020). Particularmente, alcanzar la rigidez del sitio anatómico que se desea reparar es importante ya que la deformación elástica del andamio regula respuestas celulares mediante transducción biomecánica. Por ejemplo, estudios han demostrado que la conformidad de la matriz influye en las capacidades migratorias de las células: las matrices tridimensionales de menor rigidez promueven una migración celular más rápida en comparación con las matrices más rígidas. Se cree que las células "detectan" su entorno, y un medio más flexible facilita su migración (Baker et al., 2015).

La incorporación de las nanofibras de PCL y gelatina y la modificación del tiempo de electrohilado no produjo cambios en las propiedades mecánicas, ya que la constante elástica, la resistencia a la tracción, y la elongación a la rotura no se modificaron de forma significativa ($p > 0.05$) (Figuras 19b, 19c y 19d). Esto es distinto a lo esperado de acuerdo con la bibliografía, ya que las nanofibras incorporadas en andamios fabricados mediante impresión 3D tienden a actuar como refuerzo debido a su gran área superficial y su pequeño diámetro (Ejiohuo, 2023). Sin embargo, en el estudio mencionado anteriormente, realizado por Wang y colaboradores (2021), sí se obtuvo una leve mejora en las propiedades mecánicas al incorporar las nanofibras. Esto puede deberse a que en estos andamios se apilaron 5 capas MEW y 5 capas electrohiladas de forma alternada, mientras que nuestras nanofibras sólo fueron incorporadas superficialmente. Además, concluyeron que al aumentar la distancia entre las fibras MEW adyacentes, el efecto de aumento en las propiedades mecánicas al incorporar las nanofibras se reducía. Así, por ejemplo, el aumento de la constante elástica y la resistencia a la tracción en andamios con tamaño de poro de 400 micrones fue despreciable (nuestro tamaño de poro fue 320 micrones). Esto se debe a que al reducir el tamaño de poro, la superficie tiene un mayor número de fibras capaces de soportar esfuerzo mecánico.

En otro estudio (H. He y Molnár, 2021) se fabricaron andamios de PLA mediante una combinación de impresión 3D y electrohilado. En este estudio también se obtuvo una mejora en las propiedades mecánicas al incorporar las nanofibras, aunque nuevamente varias capas electrohiladas fueron colocadas alternadamente entre las láminas impresas.

7.4 Proliferación celular *in vitro*

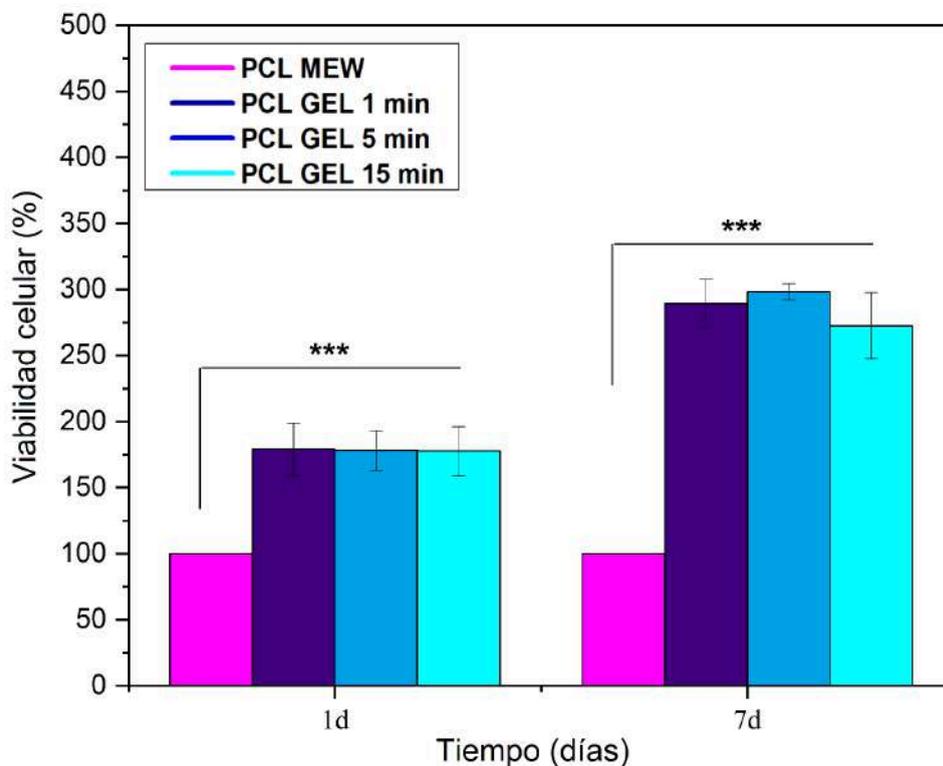


Figura 20. Viabilidad de los NHDF luego de la exposición a los andamios durante uno y siete días. El valor marcado con asteriscos (***) fue significativamente diferente a $p < 0.001$ (prueba HSD de Tukey).

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular se pueden visualizar en la Figura 20. En ningún caso se observaron efectos de citotoxicidad en los NHDF, por lo que se demostró la biocompatibilidad de las estructuras. Las muestras modificadas

superficialmente mediante electrohilado presentaron mayor viabilidad celular con respecto a las fabricadas mediante MEW. Para las muestras electrohiladas, la viabilidad celular fue de alrededor de 175% luego de 24 horas, y se incrementó hasta valores cercanos al 300% al cabo de 7 días.

El aumento significativo en la población de los NHDF con el transcurso de los días se debe a una marcada proliferación celular. Esto podría atribuirse a la presencia de las nanofibras de gelatina y PCL, que incrementan el área disponible para la adhesión y proliferación celular (Z. Wang et al., 2021). Este resultado también es consistente con otras investigaciones. En un estudio realizado por Zhang y colaboradores (2022), se utilizó impresión electrohidrodinámica para fabricar andamios híbridos con fibras nanométricas (527 ± 56 nm) y micrométricas (11.2 ± 2.3 μ m). Esto permitió mejorar la adhesión y proliferación de células de miocardio de rata, en comparación con los andamios fabricados en la microescala. Otro estudio (Jing et al., 2021), mediante la impresión de fibras micrométricas compuestas de PCL y gliadina, y la posterior lixiviación de la gliadina, permitió la construcción de estructuras con topografía nanométrica. Esta nanorugosidad mejoró la adhesión y proliferación celular de fibroblastos embrionarios de ratón. Otro factor a tener en cuenta es que la gelatina contiene dominios moleculares presentes en la MEC de la piel, que favorecen la adhesión y proliferación celular (Gaspar-Pintilieșcu et al., 2019).

Por otro lado, la viabilidad celular no cambió al modificar el tiempo de electrohilado. Esto puede atribuirse a que la superficie efectiva para la adhesión y proliferación celular tiende a ser la misma en todos los casos, si se tiene en cuenta que los poros formados por fibras nanométricas orientadas al azar son demasiado pequeños para que ocurra penetración celular hacia el interior de la lámina electrohilada (Mahjour et al., 2016).

La proliferación de los NHDF es un resultado deseable debido al rol que cumplen en la reparación cutánea. Al producirse la lesión, los fibroblastos migran hacia la herida luego de 24-48 horas (Bainbridge, 2013). Una vez allí, se adhieren y degradan el coágulo de sangre (debido a que no es necesario en la herida cicatrizada) mediante la producción de metaloproteinasas de matriz y otras proteinasas (B. Li y Wang,

2011). Al mismo tiempo, producen nueva MEC, que actúa como una barrera para los patógenos y para la pérdida de suero y fluidos, y es inicialmente rica en colágeno tipo III, fibronectina y ácido hialurónico (Trebault et al., 2007). El colágeno tipo III se produce rápidamente y, posteriormente, es degradado por proteasas y remodelado por los fibroblastos para ser reemplazado por colágeno tipo I, que tiene una resistencia a la tracción mucho mayor, pero tarda más en depositarse (Bainbridge, 2013). Además, la nueva MEC actúa como soporte y facilita la angiogénesis y la granulación (Rozario y DeSimone, 2010). Los fibroblastos, además de ser claves en la producción de nueva MEC, contribuyen a la contracción de la herida, ayudando a una cicatrización óptima (Bainbridge, 2013).

7.5 Morfología celular

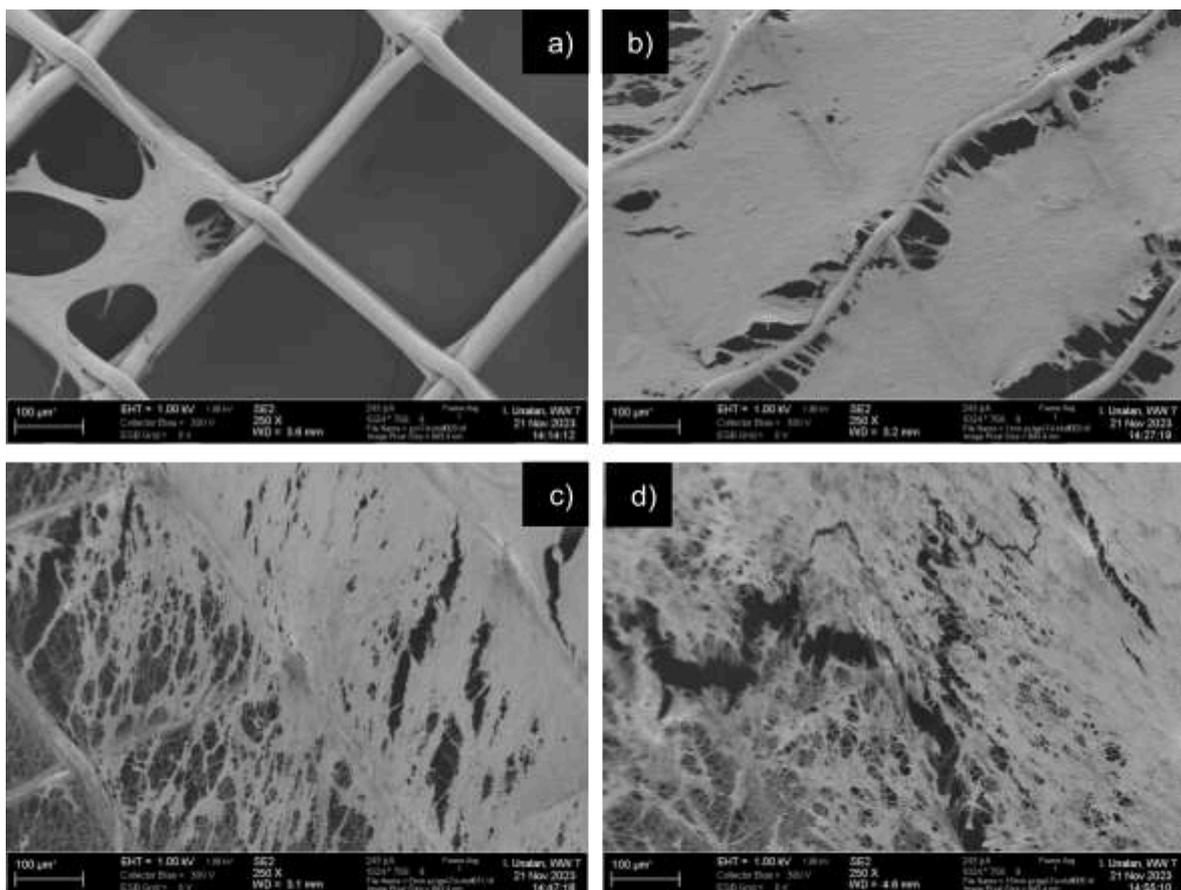


Figura 21. Morfología de los NHDF luego de 7 días de cultivo para los distintos andamios. a) PCL MEW b) 1 min PCL-GEL c) 5 min PCL-GEL d) 15 min PCL-GEL.

La morfología de los NHDF luego de 7 días de cultivo puede observarse en la Figura 21. Las matrices electrohiladas se encuentran casi completamente cubiertas por una capa de NHDF, a diferencia de las muestras PCL MEW. Esto es coherente con los resultados *de* viabilidad celular de la sección anterior; las muestras PCL GEL, gracias a la superficie extra electrohilada, promovieron una mayor adhesión y proliferación celular.

Por otro lado, de acuerdo con la micrografía SEM, se observa que las células son capaces de alinearse de acuerdo con la estructura MEW cuando el tiempo de electrohilado es de 1 minuto (Figura 21a). Otros autores (von Witzleben et al., 2024; C. Wang et al., 2021) ya han reportado crecimiento celular alineado gracias las microfibras producidas mediante MEW. En el campo de la cicatrización de heridas, se ha demostrado que la proliferación direccional de células puede promover la contracción y acelerar la curación de heridas de la piel (J. Li et al., 2023).

7.6 Estudios de biodegradación *in vitro*

Para estos estudios, como se mencionó en la sección 6.7, sólo se utilizaron las muestras PCL MEW y 15 min PCL-GEL. Esto permitió evaluar el efecto de la capa electrohilada en la absorción de agua y la pérdida de peso, reduciendo la cantidad de muestras necesarias. Se seleccionó la muestra electrohilada durante 15 minutos por su mayor contenido de gelatina, que podría influir de forma más significativa en los resultados en comparación con las estructuras impresas de PCL.

7.6.1 Absorción de agua

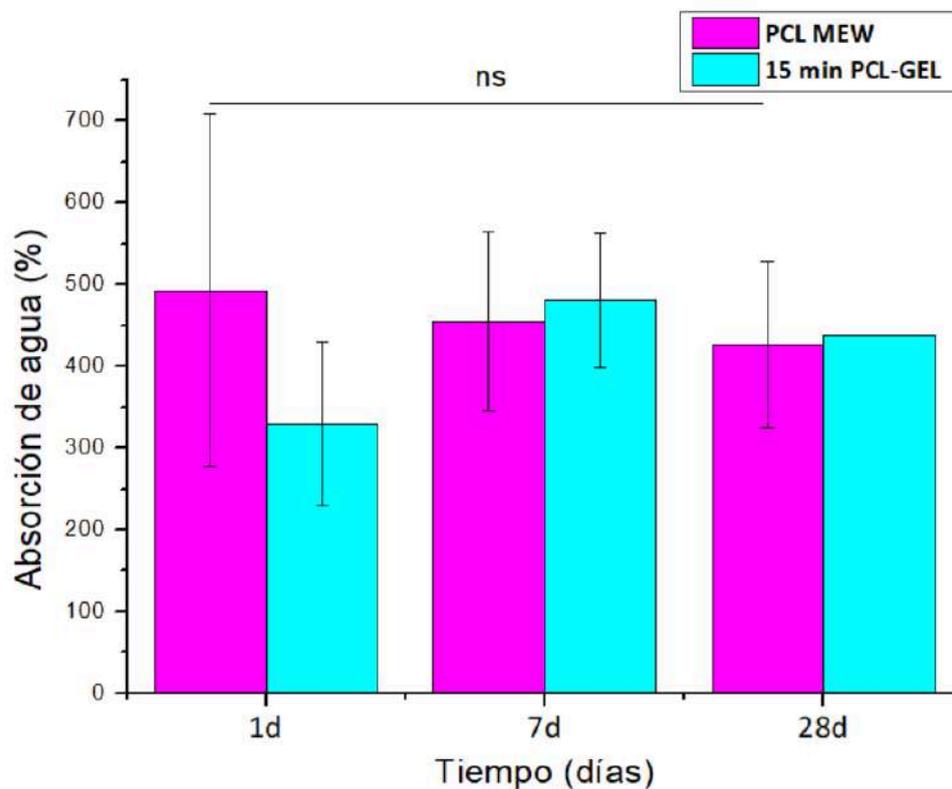


Figura 22. Absorción de agua de las muestras PCL MEW y 15 min PCL-GEL luego de 1, 7 y 28 días. Las diferencias estadísticamente no significativas se indican con: *ns* $p > 0.05$ (prueba HSD de Tukey).

Los resultados de la absorción de PBS de los andamios, antes de ser secados con papel, se presentan en la Figura 22. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la absorción al variar el tiempo de inmersión ni entre las muestras

fabricadas mediante MEW y las electrohiladas. Sorprendentemente, se registraron altos niveles de absorción de agua, a pesar de la hidrofobicidad de la PCL. Esto se podría atribuir a la alta porosidad de los andamios, ya que todas las matrices mostraron una notable absorción de PBS en los microporos formados por las fibras impresas. También, era esperable que la absorción de PBS sea mayor en las muestras que contienen las nanofibras, debido a la hidrofilicidad de la gelatina. Sin embargo, es posible que la gran absorción de agua en los microporos y sus variaciones no hayan permitido apreciar el efecto de la modificación superficial mediante electrohilado. En general, el agua que se retenga en los microporos en conjunto con la hidrofilicidad que aporta la gelatina, podría ser útil para absorber los exudados y mantener la herida húmeda durante la regeneración de la piel, un requerimiento esencial en andamios con aplicación en reparación cutánea (Negut et al., 2020).

Por otro lado, la absorción de agua calculada luego de pesar las muestras secas no arrojó resultados concluyentes, probablemente debido a la alta porosidad de los andamios que dificultó el secado homogéneo de las muestras.

7.6.2 Pérdida de peso

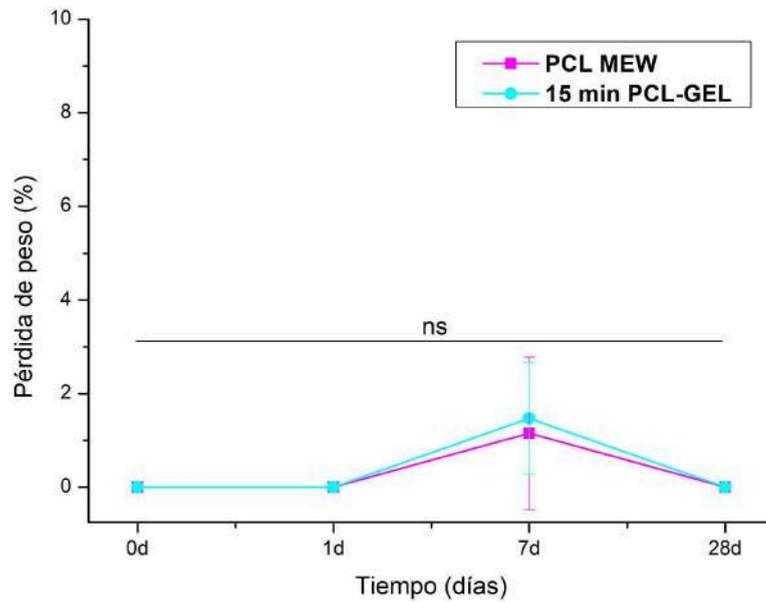


Figura 23. Gráfico de pérdida de peso de las muestras PCL MEW y 15 min PCL-GEL para 1, 7 y 28 días en PBS. Las diferencias estadísticamente no significativas se indican con: ns $p > 0.05$ (prueba HSD de Tukey).

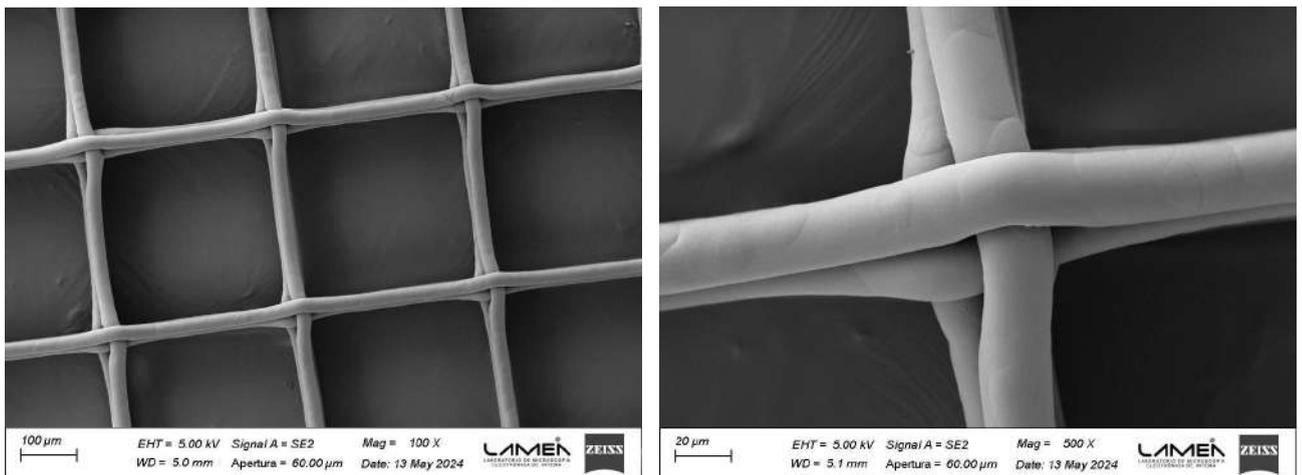


Figura 24. Micrografías SEM de muestra PCL MEW luego de 7 días en PBS.

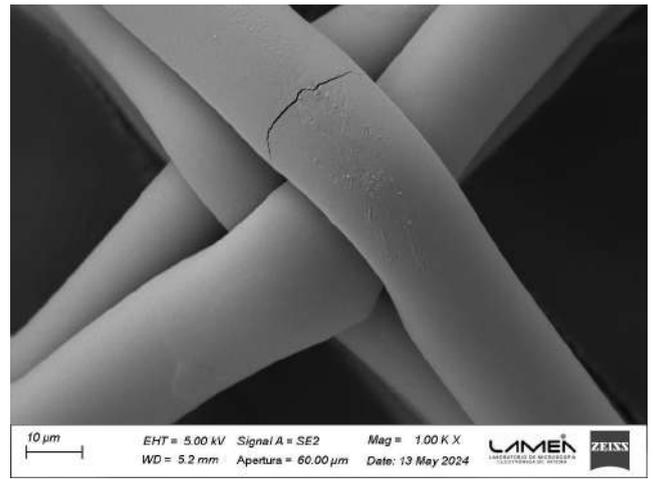
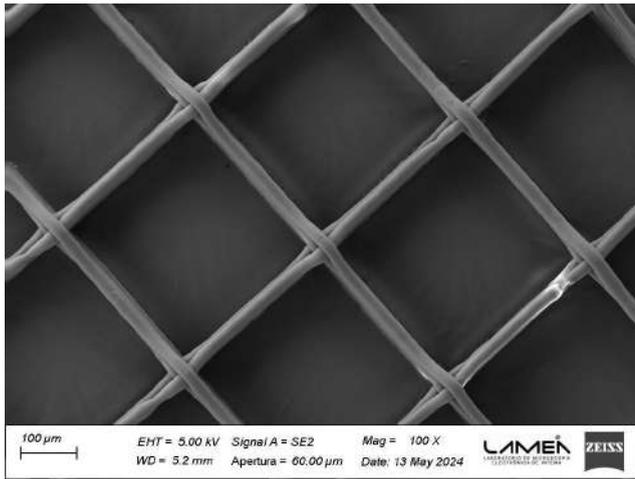


Figura 25. Micrografías SEM de muestra PCL MEW luego de 28 días en PBS.

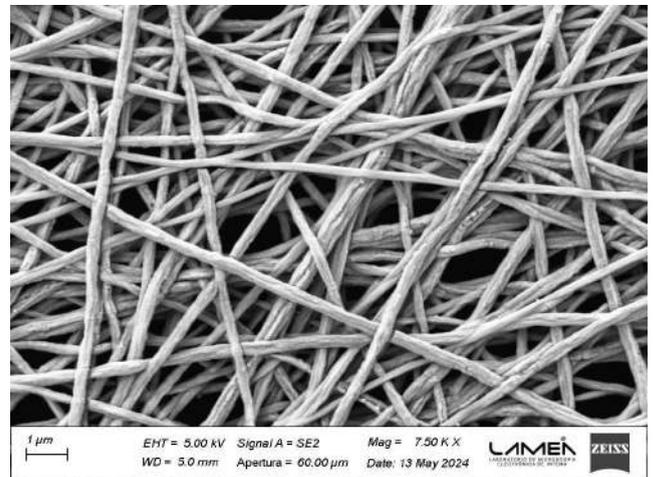
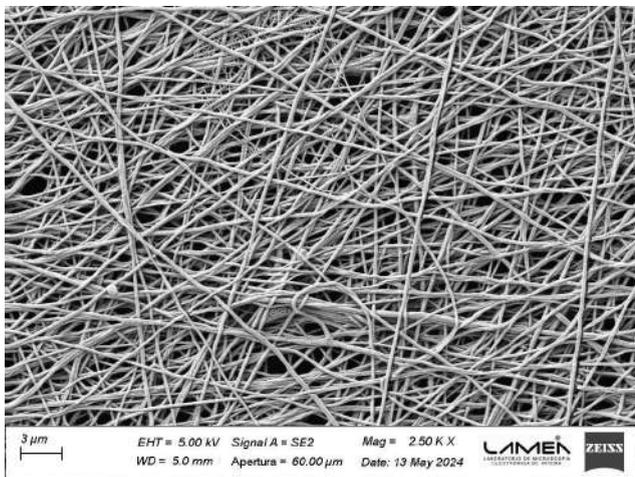


Figura 26. Micrografías SEM de muestra 15 min PCL-GEL luego de 7 días en PBS.

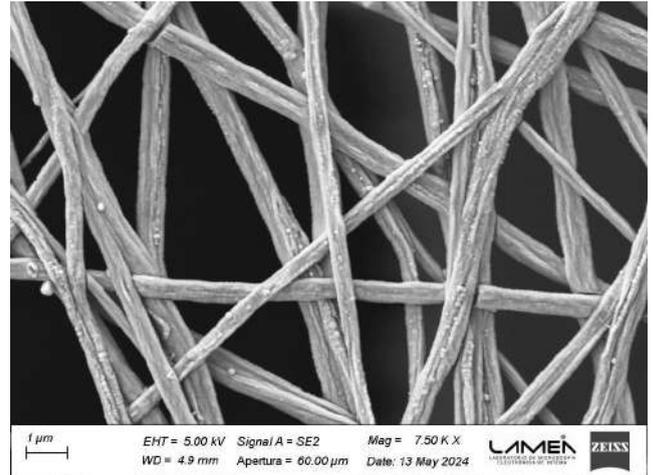
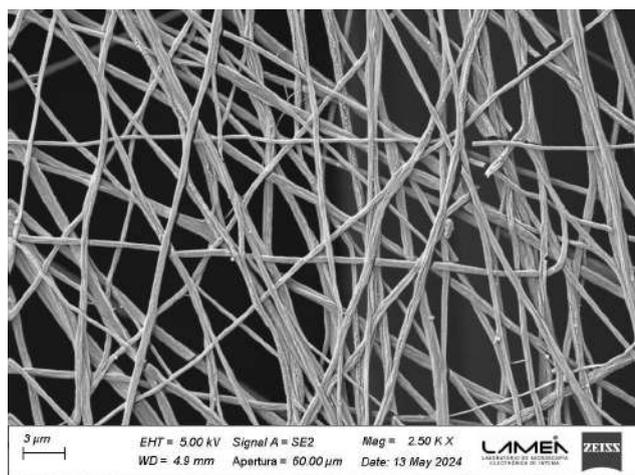


Figura 27. Micrografías SEM de muestra 15 min PCL-GEL luego de 28 días en PBS.

En el gráfico de pérdida de peso se observa que las muestras no disminuyeron su masa de forma significativa ($p > 0.05$) al ser sumergidas en PBS. Esto podría deberse a que la estructura MEW, que representa casi el total del peso del andamio, no mostró alteraciones luego de 28 días de ensayo. Esto coincide con estudios previos (Hewitt et al., 2019; Yoshida et al., 2021) donde andamios fabricados con PCL mediante MEW experimentaron una pérdida de peso despreciable luego de ser sumergidos 21 y 28 días en PBS, respectivamente. La degradación de la PCL ocurre a través de la ruptura hidrolítica de los grupos éster, lo que provoca escisiones aleatorias en las cadenas poliméricas. Aunque en la literatura se ha reportado que la PCL puede terminar de degradarse completamente entre 3 y 4 años, este tiempo depende de la geometría y porosidad. Entre los poliésteres, la PCL es la que se degrada más lentamente debido a las cinco unidades hidrofóbicas de CH_2 en sus unidades repetitivas, que le confieren mayor resistencia a la degradación hidrolítica (Guarino et al., 2017). Por este motivo, muchas veces la PCL se combina con otros polímeros, ya sea en la forma de mezcla o de copolímero, para acelerar la velocidad de degradación y ajustarla con el tejido a reparar (Joseph et al., 2019). Las micrografías SEM (Figuras 24 y 25) muestran la microestructura de las fibras impresas luego de la inmersión en PBS. Al comparar con las imágenes SEM previas al ensayo de biodegradación (sección 6.3.1), se concluye que la microestructura impresa de PCL apenas manifestó señales de biodegradación. En la Figura 25, correspondiente a 28 días, se observó una fisura rodeada de rugosidad superficial que podría ser producto de alguna tensión residual o bien del recubrimiento metálico de cromo que tiene la muestra para su observación en SEM.

En contraposición con esta explicación, las dos estructuras de PCL electrohiladas se degradaron completamente luego de 28 días. Es probable que en estos casos la PCL haya sufrido algún grado de degradación térmica previa dentro del cabezal de impresión, debido a la permanencia a altas temperaturas.

Por otro lado, se observó visualmente un incremento en la rugosidad superficial en las fibras electrohiladas luego de 7 y 28 días de inmersión (Figuras 26 y 27). La aparición de estas ranuras lineales ya ha sido reportada y puede atribuirse a la lixiviación de la gelatina, que se encuentra distribuida en forma de fases dentro de

las fibras (Dulnik et al., 2016). Sin embargo, al comparar el grado de rugosidad entre las Figuras 26 y 27, no se observan diferencias significativas a simple vista, lo cual puede deberse a que la disolución de la gelatina es muy rápida durante las primeras 24 horas de inmersión, seguido por una etapa de lixiviación del interior del material mucho más lenta (Dulnik et al., 2016).

8. Conclusión

Se lograron fabricar y caracterizar andamios con estructuras micro-nanométricas mediante la combinación de las técnicas de MEW y electrohilado. Las imágenes obtenidas por SEM revelaron que la estructura MEW presenta microfibras depositadas de forma recta, siguiendo la microarquitectura planificada y apiladas con precisión unas sobre otras, aunque se observaron discontinuidades que podrían estar relacionadas con el fenómeno de pulsación de fibra. La capa electrohilada, por su parte, mostró fibras de diámetro homogéneo, con una superficie lisa y sin aglomeraciones esféricas, depositadas de manera aleatoria.

El análisis de ángulo de contacto indicó una mejora en la hidrofiliidad de las superficies debido a la incorporación de gelatina en la capa electrohilada, cuya presencia fue confirmada mediante FTIR. La adición de nanofibras no alteró significativamente las propiedades mecánicas, probablemente porque se integraron de manera superficial. No obstante, la constante elástica, cercana a los 2 MPa, se mantuvo dentro del rango deseable para la cicatrización de heridas.

Un hallazgo relevante fue que la incorporación de nanofibras mejoró notablemente la proliferación de NHDF, confirmando la biocompatibilidad de las estructuras con este tipo celular. El ensayo de biodegradación mostró que la estructura micro y nanofibrosa de PCL no se afectó significativamente luego de la inmersión en PBS en los tiempos estudiados. La degradación de la PCL en estas condiciones podría ser un inconveniente para la aplicación de estos andamios en la cicatrización de heridas.

En resumen, la combinación de las técnicas de electrohilado y MEW permitió la creación de estructuras 3D con propiedades mecánicas, biológicas y químicas prometedoras para su uso en la cicatrización de heridas.

9. Trabajo a futuro

- Hidrofilizar la estructura impresa con el objetivo de mejorar la interacción con las células y una mayor velocidad de degradación. Esto se podría lograr, por ejemplo, a través de la copolimerización de otros polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA) o el poliglicólico (PGA) en la estructura del PCL. Otra alternativa podría ser la hidrofilización de la superficie mediante una inmersión en una solución básica. El tratamiento con una base fuerte, como hidróxido de sodio (NaOH), puede aumentar la hidrofilicidad del PCL y, al mismo tiempo, iniciar la hidrólisis superficial de los enlaces éster, facilitando la absorción de agua y acelerando la degradación.
- Imprimir estructuras MEW con poros de diferente tamaño y forma, con fibras intersectadas a 30°, 45° o 60°, con el objetivo de evaluar la influencia de la microarquitectura de poros en las propiedades mecánicas y biológicas.
- Evaluar la incorporación de agentes antimicrobianos en el andamio para prevenir infecciones durante el proceso de cicatrización mientras la herida permanece expuesta.
- Llevar a cabo ensayos *in vitro*, como el ensayo de scratch, para evaluar la capacidad regenerativa del andamio en la cicatrización de heridas.
- Realizar ensayos *in vivo* para evaluar la eficacia del andamio en la cicatrización de heridas, su funcionalidad a lo largo del tiempo, y su interacción con el medio biológico. Además, verificar que no se produzcan efectos adversos, como inflamación excesiva o infecciones.
- Imprimir capas impresas de forma alternada con las electrohiladas y evaluar el efecto en las propiedades mecánicas y biológicas.
- Evaluar la viabilidad de imprimir andamios de mayor espesor, considerando que el aumento en el número de capas incrementa la carga residual, lo que

podría causar una colocación incorrecta de las fibras debido a la repulsión electrostática.

10. Bibliografía

- Afghah, F., Dikyol, C., Altunbek, M., y Koc, B. (2019). Biomimicry in Bio-Manufacturing: Developments in Melt Electrospinning Writing Technology Towards Hybrid Biomanufacturing. *Applied Sciences*, 9(17), 3540.
<https://doi.org/10.3390/app9173540>
- Ashour, S., y Xu, H. (2022). Melt electrowriting: A study of jet diameters and jet speeds along the spinline. *Polymers for Advanced Technologies*, 33(9), 3013-3016.
<https://doi.org/10.1002/pat.5755>
- Bainbridge, P. (2013, agosto 1). *Wound healing and the role of fibroblasts*. | *Journal of Wound Care* | EBSCOhost. <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.8.407>
- Baker, B. M., Trappmann, B., Wang, W. Y., Sakar, M. S., Kim, I. L., Shenoy, V. B., Burdick, J. A., y Chen, C. S. (2015). Cell-mediated fibre recruitment drives extracellular matrix mechanosensing in engineered fibrillar microenvironments. *Nature Materials*, 14(12), 1262-1268. <https://doi.org/10.1038/nmat4444>
- Bakirci, E., Schaefer, N., Dahri, O., Hrynevich, A., Strissel, P., Strick, R., Dalton, P. D., y Villmann, C. (2020). Melt Electrowritten *In Vitro* Radial Device to Study Cell Growth and Migration. *Advanced Biosystems*, 4(10), 2000077.
<https://doi.org/10.1002/adbi.202000077>
- Bas, O., D'Angella, D., Baldwin, J. G., Castro, N. J., Wunner, F. M., Saidy, N. T., Kollmannsberger, S., Reali, A., Rank, E., De-Juan-Pardo, E. M., y Hutmacher, D. W. (2017). An Integrated Design, Material, and Fabrication Platform for Engineering Biomechanically and Biologically Functional Soft Tissues. *ACS Applied Materials y Interfaces*, 9(35), 29430-29437. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b08617>

- Blum, C., Schlegelmilch, K., Schilling, T., Shridhar, A., Rudert, M., Jakob, F., Dalton, P. D., Blunk, T., Flynn, L. E., y Groll, J. (2019). Extracellular Matrix-Modified Fiber Scaffolds as a Proadipogenic Mesenchymal Stromal Cell Delivery Platform. *ACS Biomaterials Science y Engineering*, 5(12), 6655-6666.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00894>
- Brennan, C. M., Eichholz, K. F., y Hoey, D. A. (2019). The effect of pore size within fibrous scaffolds fabricated using melt electrowriting on human bone marrow stem cell osteogenesis. *Biomedical Materials*, 14(6), 065016.
<https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab49f2>
- Cao, K., Zhang, F., Zaeri, A., Zgeib, R., y Chang, R. C. (2022). Advancing a real-time image-based jet lag tracking methodology for optimizing print parameters and assessing melt electrowritten fiber quality. *Additive Manufacturing*, 54, 102764.
<https://doi.org/10.1016/j.addma.2022.102764>
- Cao, K., Zhang, F., Zaeri, A., Zhang, Y., Zgeib, R., Calzolaio, M., y Chang, R. C. (2023). Advances in design and quality of melt electrowritten scaffolds. *Materials y Design*, 226, 111618. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.111618>
- Choi, S.-W., Zhang, Y., y Xia, Y. (2010). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering: The Importance of Uniformity in Pore Size and Structure. *Langmuir*, 26(24), 19001-19006. <https://doi.org/10.1021/la104206h>
- Chong, E., Phan, T., Lim, I., Zhang, Y., Bay, B., Ramakrishna, S., y Lim, C. (2007). Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution☆. *Acta Biomaterialia*, 3(3), 321-330.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.01.002>
- Collins, G., Federici, J., Imura, Y., y Catalani, L. H. (2012). Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications. *Journal of Applied Physics*, 111(4), 044701.
<https://doi.org/10.1063/1.3682464>

- Constante, G., Apsite, I., Alkhamis, H., Dulle, M., Schwarzer, M., Caspari, A., Synytska, A., Salehi, S., y Ionov, L. (2021). 4D Biofabrication Using a Combination of 3D Printing and Melt-Electrowriting of Shape-Morphing Polymers. *ACS Applied Materials y Interfaces*, 13(11), 12767-12776. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c18608>
- Dalton, P. D. (2017). Melt electrowriting with additive manufacturing principles. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.05.007>
- Dalton, P. D., Woodfield, T. B. F., Mironov, V., y Groll, J. (2020). Advances in Hybrid Fabrication toward Hierarchical Tissue Constructs. *Advanced Science*, 7(11), 1902953. <https://doi.org/10.1002/advs.201902953>
- Dulnik, J., Denis, P., Sajkiewicz, P., Kołbuk, D., y Choińska, E. (2016). Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system. *Polymer Degradation and Stability*, 130, 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.05.022>
- Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., y Langer, R. (2011). Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology*, 6(1), 13-22. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.246>
- Ejiohuo, O. (2023). A Perspective on the Synergistic Use of 3D Printing and Electrospinning to Improve Nanomaterials for Biomedical Applications. *Nano Trends*, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.nwnano.2023.100025>
- Gaspar-Pintilieșcu, A., Stanciuc, A.-M., y Craciunescu, O. (2019). Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 854-865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.155>
- Giannitelli, S. M., Mozetic, P., Trombetta, M., y Rainer, A. (2015). Combined additive manufacturing approaches in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 24, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.032>

- Guarino, V., Gentile, G., Sorrentino, L., y Ambrosio, L. (2017). Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications. En *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* (pp. 1-36). John Wiley y Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst658>
- Han, G., y Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy*, 34(3), 599-610.
<https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>
- He, F.-L., He, J., Deng, X., Li, D.-W., Ahmad, F., Liu, Y.-Y., Liu, Y.-L., Ye, Y.-J., Zhang, C.-Y., y Yin, D.-C. (2017). Investigation of the effects of melt electrospinning parameters on the direct-writing fiber size using orthogonal design. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 50(42), 425601. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa8901>
- He, H., y Molnár, K. (2021). Fabrication of 3D printed nanocomposites with electrospun nanofiber interleaves. *Additive Manufacturing*, 46, 102030.
<https://doi.org/10.1016/j.addma.2021.102030>
- He, J., Hao, G., Meng, Z., Cao, Y., y Li, D. (2022). Expanding Melt-Based Electrohydrodynamic Printing of Highly-Ordered Microfibrous Architectures to Cm-Height Via In Situ Charge Neutralization. *Advanced Materials Technologies*, 7(7), 2101197. <https://doi.org/10.1002/admt.202101197>
- Hench, L. L., y Thompson, I. (2010). Twenty-first century challenges for biomaterials. *Journal of the Royal Society, Interface*, 7 Suppl 4(Suppl 4), S379-391.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0151.focus>
- Hewitt, E., Mros, S., Mcconnell, M., Cabral, J., y Ali, A. (2019). Melt-electrowriting with novel milk protein/PCL biomaterials for skin regeneration. *Biomedical Materials*.
<https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab3344>
- Hrynevich, A., Elçi, B. Ş., Haigh, J. N., McMaster, R., Youssef, A., Blum, C., Blunk, T., Hochleitner, G., Groll, J., y Dalton, P. D. (2018). Dimension-Based Design of Melt Electrowritten Scaffolds. *Small*, 14(22), 1800232.
<https://doi.org/10.1002/smll.201800232>

- Ismail, A. A., van de Voort, F. R., y Sedman, J. (1997). Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications. En J. R. J. Paré y J. M. R. Bélanger (Eds.), *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* (Vol. 18, pp. 93-139). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80013-3](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80013-3)
- Jafari, M., Paknejad, Z., Rad, M. R., Motamedian, S. R., Eghbal, M. J., Nadjmi, N., y Khojasteh, A. (2017). Polymeric scaffolds in tissue engineering: A literature review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(2), 431-459. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33547>
- Jin, Y., Gao, Q., Xie, C., Li, G., Du, J., Fu, J., y He, Y. (2020). Fabrication of heterogeneous scaffolds using melt electrospinning writing: Design and optimization. *Materials y Design*, 185, 108274. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108274>
- Jing, L., Wang, X., Leng, B., Zhan, N., Liu, H., Wang, S., Lu, Y., Sun, J., y Huang, D. (2021). Engineered Nanotopography on the Microfibers of 3D-Printed PCL Scaffolds to Modulate Cellular Responses and Establish an In Vitro Tumor Model. *ACS Applied Bio Materials*, 4(2), 1381-1394. <https://doi.org/10.1021/acsbm.0c01243>
- Joseph, B., Augustine, R., Kalarikkal, N., Thomas, S., Seantier, B., y Grohens, Y. (2019). Recent advances in electrospun polycaprolactone based scaffolds for wound healing and skin bioengineering applications. *Materials Today Communications*, 19, 319-335. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.02.009>
- Jungst, T., Muerza-Cascante, M. L., Brown, T. D., Standfest, M., Hutmacher, D. W., Groll, J., y Dalton, P. D. (2015). Melt electrospinning onto cylinders: Effects of rotational velocity and collector diameter on morphology of tubular structures. *Polymer International*, 64(9), 1086-1095. <https://doi.org/10.1002/pi.4948>
- Kade, J. C., y Dalton, P. D. (2021). Polymers for Melt Electrowriting. *Advanced Healthcare Materials*, 10(1), 2001232. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001232>
- Kim, J., Bakirci, E., O'Neill, K. L., Hrynevich, A., y Dalton, P. D. (2021). Fiber Bridging during Melt Electrowriting of Poly(ϵ -Caprolactone) and the Influence of Fiber Diameter and

- Wall Height. *Macromolecular Materials and Engineering*, 306(3), 2000685.
<https://doi.org/10.1002/mame.202000685>
- Kishan, A. P., y Cosgriff-Hernandez, E. M. (2017). Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(10), 2892-2905. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36124>
- Lee, J. H., Khang, G., Lee, J. W., y Lee, H. B. (1998). Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient. *Journal of Colloid and Interface Science*, 205(2), 323-330. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5688>
- Lee, J. H., y Lee, H. B. (1993). A wettability gradient as a tool to study protein adsorption and cell adhesion on polymer surfaces. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 4(5), 467-481. <https://doi.org/10.1163/156856293x00131>
- Li, B., y Wang, J. H.-C. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. *Journal of Tissue Viability*, 20(4), 108-120.
<https://doi.org/10.1016/j.jtv.2009.11.004>
- Li, J., Liu, X., Tao, W., Li, Y., Du, Y., y Zhang, S. (2023). Micropatterned composite membrane guides oriented cell growth and vascularization for accelerating wound healing. *Regenerative Biomaterials*, 10, rbac108. <https://doi.org/10.1093/rb/rbac108>
- Liverani, L., y Boccaccini, A. (2016). Versatile Production of Poly(Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents. *Nanomaterials*, 6(4), 75.
<https://doi.org/10.3390/nano6040075>
- Mabrouk, M., Beherei, H. H., y Das, D. B. (2020). Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 110, 110716. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110716>
- Mahjour, S. B., Sefat, F., Polunin, Y., Wang, L., y Wang, H. (2016). Improved cell infiltration of electrospun nanofiber mats for layered tissue constructs. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(6), 1479-1488. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35676>
- McColl, E., Groll, J., Jungst, T., y Dalton, P. D. (2018). Design and fabrication of melt

- electrowritten tubes using intuitive software. *Materials y Design*, 155, 46-58.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.05.036>
- Nadernezhad, A., Ryma, M., Genç, H., Cicha, I., Jüngst, T., y Groll, J. (2021). Melt Electrowriting of Isomalt for High-Resolution Templating of Embedded Microchannels. *Advanced Materials Technologies*, 6(8), 2100221.
<https://doi.org/10.1002/admt.202100221>
- Ndlovu, S. P., Ngece, K., Alven, S., y Aderibigbe, B. A. (2021). Gelatin-Based Hybrid Scaffolds: Promising Wound Dressings. *Polymers*, 13(17), Article 17.
<https://doi.org/10.3390/polym13172959>
- Negut, I., Dorcioman, G., y Grumezescu, V. (2020). Scaffolds for Wound Healing Applications. *Polymers*, 12(9), 2010. <https://doi.org/10.3390/polym12092010>
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials y scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88-95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Oh, S. H., y Lee, J. H. (2013). Hydrophilization of synthetic biodegradable polymer scaffolds for improved cell/tissue compatibility. *Biomedical Materials*, 8(1), 014101.
<https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/1/014101>
- Ozdil, D., y Aydin, H. M. (2014). Polymers for medical and tissue engineering applications: Polymers for medical and tissue engineering applications. *Journal of Chemical Technology y Biotechnology*, 89(12), 1793-1810. <https://doi.org/10.1002/jctb.4505>
- Paxton, N. C., Ho, S. W. K., Tuten, B. T., Lipton-Duffin, J., y Woodruff, M. A. (2021). Degradation of Melt Electrowritten PCL Scaffolds Following Melt Processing and Plasma Surface Treatment. *Macromolecular Rapid Communications*, 42(23), 2100433. <https://doi.org/10.1002/marc.202100433>
- Pielichowski, K., Njuguna, J., y Majka, T. M. (2023). 2—Mechanisms of thermal degradation of polymers. En K. Pielichowski, J. Njuguna, y T. M. Majka (Eds.), *Thermal Degradation of Polymeric Materials (Second Edition)* (pp. 9-11). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823023-7.00001-0>

- Pillay, V., Dott, C., Choonara, Y. E., Tyagi, C., Tomar, L., Kumar, P., du Toit, L. C., y Ndesendo, V. M. K. (2013). A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2013(1), 789289. <https://doi.org/10.1155/2013/789289>
- Ristovski, N., Bock, N., Liao, S., Powell, S. K., Ren, J., Kirby, G. T. S., Blackwood, K. A., y Woodruff, M. A. (2015). Improved fabrication of melt electrospun tissue engineering scaffolds using direct writing and advanced electric field control. *Biointerphases*, 10(1), 011006. <https://doi.org/10.1116/1.4914380>
- Rodríguez Doblado, L., Martínez Ramos, C., y Pradas, M. (2021). Biomaterials for Neural Tissue Engineering. *Frontiers in Nanotechnology*, 3, 643507. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.643507>
- Ross, M. H., y Pawlina, W. (2015). *Ross. Histología: Texto y Atlas*. Lippincott Williams y Wilkins.
- Rozario, T., y DeSimone, D. W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Developmental Biology*, 341(1), 126-140. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>
- Sell, S. A., Wolfe, P. S., Garg, K., McCool, J. M., Rodriguez, I. A., y Bowlin, G. L. (2010). The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. *Polymers*, 2(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/polym2040522>
- Szymczyk-Ziółkowska, P., Łabowska, M. B., Detyna, J., Michalak, I., y Gruber, P. (2020). A review of fabrication polymer scaffolds for biomedical applications using additive manufacturing techniques. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 40(2), 624-638. <https://doi.org/10.1016/j.bbe.2020.01.015>
- Trebaul, A., Chan, E. K., y Midwood, K. S. (2007). Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 4), 695-697. <https://doi.org/10.1042/BST0350695>
- Unalan, I., Endlein, S. J., Slavik, B., Buettner, A., Goldmann, W. H., Detsch, R., y Boccaccini,

- A. R. (2019). Evaluation of Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone)/Gelatin Nanofiber Mats Containing Clove Essential Oil for Antibacterial Wound Dressing. *Pharmaceutics*, 11(11), 570. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110570>
- van Genderen, A. M., Jansen, K., Kristen, M., van Duijn, J., Li, Y., Schuurmans, C. C. L., Malda, J., Vermonden, T., Jansen, J., Masereeuw, R., y Castilho, M. (2021). Topographic Guidance in Melt-Electrowritten Tubular Scaffolds Enhances Engineered Kidney Tubule Performance. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.617364>
- von Witzleben, M., Hahn, J., Richter, R. F., de Freitas, B., Steyer, E., Schütz, K., Vater, C., Bernhardt, A., Elschner, C., y Gelinsky, M. (2024). Tailoring the pore design of embroidered structures by melt electrowriting to enhance the cell alignment in scaffold-based tendon reconstruction. *Biomaterials Advances*, 156, 213708. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213708>
- Wang, C., Xu, Y., Xia, J., Zhou, Z., Fang, Y., Zhang, L., y Sun, W. (2021). Multi-scale hierarchical scaffolds with aligned micro-fibers for promoting cell alignment. *Biomedical Materials*, 16(4), 045047. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac0a90>
- Wang, Z., Wang, H., Xiong, J., Li, J., Miao, X., Lan, X., Liu, X., Wang, W., Cai, N., y Tang, Y. (2021). Fabrication and in vitro evaluation of PCL/gelatin hierarchical scaffolds based on melt electrospinning writing and solution electrospinning for bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 128, 112287. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112287>
- Yoshida, M., Turner, P. R., Ali, M. A., y Cabral, J. D. (2021). Three-Dimensional Melt-Electrowritten Polycaprolactone/Chitosan Scaffolds Enhance Mesenchymal Stem Cell Behavior. *ACS Applied Bio Materials*, 4(2), 1319-1329. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01213>
- Zhang, B., Li, S., He, J., Lei, Q., Wu, C., Song, A., y Zhang, C. (2022). Electrohydrodynamic printing of submicron-microscale hybrid scaffolds with improved cellular adhesion and

proliferation behaviors. *Nanotechnology*, 34(10), 105102.

<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aca97f>