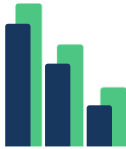




**Benemérita Universidad Autónoma
De Puebla**

Facultad De Medicina



“Interacción de fibroblastos humanos con bio-membranas de PLA/PVA obtenidas por electrohilado y extracto acuoso de *Quercus ilex*, con potencial aplicación en la cicatrización de heridas”

T E S I S

Para Obtener el grado de
Médico Cirujano y Partero

Presenta

Juan Plans Contreras

Directores

D.C. Maura Cárdenas García

D.C. Marco Antonio Morales Sánchez

Revisor de tesis

MASS. Irma Ortega Sánchez

Puebla, Pue. 2020



INDICE

1. ANTECEDENTES	3
1.1. ANTECEDENTES GENERALES.....	3
1.1.1. CICATRIZACIÓN.....	3
1.1.2. FIBROBLASTOS Y CICATRIZACIÓN	10
1.1.3. BIOMATERIALES	13
1.1.4. TÉCNICA POR ELECTROHILADO	16
1.2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS	17
1.2.1 BIOMATERIALES EMPLEADOS EN CICATRIZACIÓN DE HERIDAS QUIRÚRGICAS.....	17
1.2.3. MEMBRANAS POLIMÉRICAS OBTENIDAS POR ELECTROHILADO.....	21
1.2.4. <i>Quercus ilex</i>	22
1.2.5. EL USO DEL <i>Quercus ilex</i> EN LA REGENERACIÓN CUTÁNEA	23
2. JUSTIFICACION	25
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4. HIPOTESIS CIENTIFICA.....	26
5. OBJETIVOS	26
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	26
5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
6. MATERIAL Y METODOS.....	26
6.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE <i>Quercus ilex</i>	26
6.1.1. OBTENCIÓN DEL POLVO DE CORTEZA DEL ÁRBOL <i>Quercus ilex</i>	27
6.1.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Quercus ilex</i>	27
6.2. OBTENCIÓN DE LAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE PLA/PVA.....	27
6.2.1. DISOLUCIÓN DE POLÍMEROS.....	28
6.3. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD CON EL MÉTODO DE XTT	30
6.4. VIABILIDAD CELULAR CON EL KIT LIVE/DEAD DE THERMO FISHER... 31	
6.5 PROCEDIMIENTO:.....	32
7. RESULTADOS.....	36
7.1 MICROFOTOGRAFIA DE LAS MEMBRANAS DE PLA/PVA POR ELECTROHILADO.....	36
7.2. RESULTADOS DE LA VISTA MICROSCÓPICA DE <i>Quercus ilex</i> CON <i>S. aureus</i>	37

7.2. RESULTADOS DE LA VISTA MICROSCÓPICA DE <i>Quercus ilex</i> CON <i>E. coli</i>	38
7.3 RESULTADOS DE LA VISTA MICROSCÓPICA DE <i>Quercus ilex</i> CON <i>S. cerevisiae</i>	39
7.4. RESULTADOS DE <i>Quercus ilex</i> EN CULTIVO CON <i>S. aureus</i>	42
7.5. RESULTADOS DE <i>Quercus ilex</i> EN CULTIVO CON E. COLI	43
7.6 CITOTOXICIDAD CON XTT EN FIBROBLASTOS A LAS 24 HORAS	44
7.7. RESULTADOS DE LA CITOTOXICIDAD CON XTT EN FIBROBLASTOS A LAS 48 HORAS	46
7.8 RESULTADOS DE INMUNOCITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Quercus ilex</i>	47
7.9 RESULTADOS DE <i>Quercus ilex</i> CON INMUNOHISTOQUÍMICA A LAS 6 Y 12 HORAS.....	48
7.10. RESULTADOS DE <i>Quercus ilex</i> CON INMUNOHISTOQUÍMICA A LAS 24 HORAS	49
8. CONCLUSIONES.....	50
10. BIOETICA.....	54
11. ANEXO	56
12. BIBILIOGRAFIA.....	57

1. ANTECEDENTES

1.1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1. CICATRIZACIÓN

La cicatrización cutánea es un proceso fisiológico, dinámico e interactivo que realiza el organismo con la finalidad de regenerar los tejidos (dérmico y epidérmico) como respuesta a soluciones de continuidad, proceso que incluye una serie de eventos bioquímicos complejos que se superponen entre sí, en el cual participan mediadores solubles extracelulares, células sanguíneas, células de la matriz tisular, y del parénquima, para facilitar el estudio y comprensión del proceso de reparación de las heridas, se le ha dividido en 3 fases: hemostasia e inflamatoria, proliferativa, maduración y remodelación tisular (1) (2) (3).



Figura 1. Fisiología de la cicatrización.

FASE I - HEMOSTASIA

Una vez que ocurre la lesión se produce el daño en los vasos sanguíneos con la consiguiente pérdida de plasma, células y factores hacia el intersticio. La

hemostasia y coagulación se inicia con la activación de los elementos celulares de la sangre y lleva a la formación del coágulo o tapón hemostático, proceso en el cual interfiere la cascada de la coagulación y el fenómeno de agregación plaquetaria (figura 2).

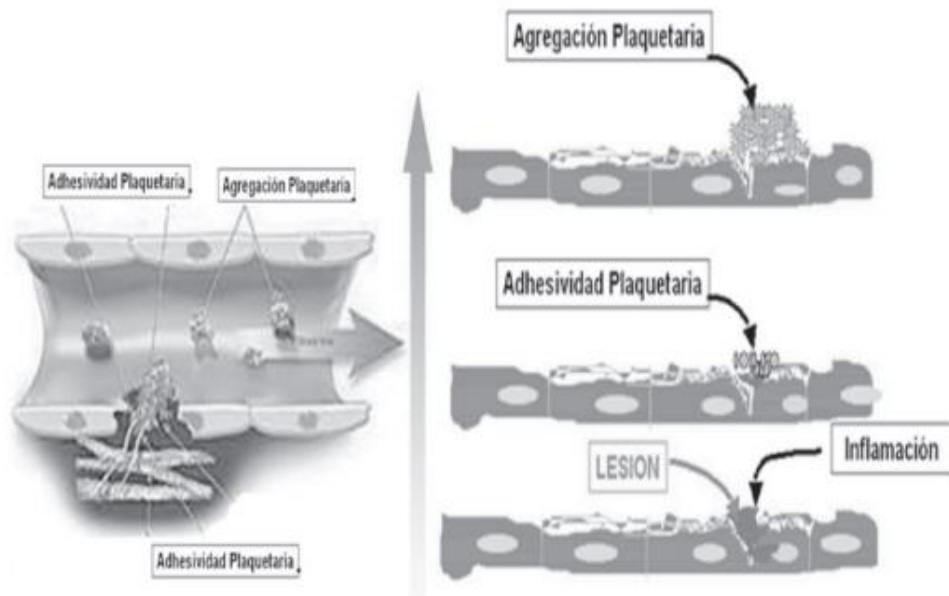


Figura 2. Fases de la hemostasia

Inicialmente se adhieren las plaquetas al intersticio, donde la trombina y el colágeno fibrilar expuesto las activa, como resultado de esta activación se produce su degranulación, liberando numerosos mediadores: entre ellos fibrinógeno, fibronectina y trombospondina que intervienen en la agregación plaquetaria, el factor VIII, de Von Willebrand que contribuye a la adhesión plaquetaria, actuando como puente de unión entre el colágeno subendotelial y el receptor plaquetario de integrina $\text{aIIb}\beta 3$ y el Adenosin difosfato y la trombina que atraen más plaquetas a la zona lesionada. Todo esto da lugar a la agregación plaquetaria y a la formación de un tapón hemostático. Las plaquetas también sintetizan factores de crecimiento: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformador-(TGF- β) con acción mitógena y quimiotáctica en los fibroblastos, el factor de crecimiento transformante- α (TGF- α) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimulan la epitelización.

La formación de un coágulo producida por la cascada de coagulación que inician los elementos de la sangre y llevan a la formación de trombina, enzima que transforma el fibrinógeno en fibrina que promueve la coagulación además de activar las plaquetas. El fibrinógeno y los receptores de superficie de las plaquetas se unen y se polimerizan para formar una matriz de fibrina, dando lugar a un trombo. El coágulo de fibrina y la fibronectina proveen una matriz inicial que favorece la migración de monocitos, fibroblastos y queratinocitos además de intervenir en la respuesta inflamatoria por medio de la bradiquinina y las fracciones C3a y C5a del complemento, los cuales aumentan la permeabilidad vascular y promueven la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos.

En forma simultánea el endotelio produce prostaciclina, que inhibe la agregación, lo cual limita el proceso, la antitrombina III, inhibe la formación de fibrina, la proteína C, inhibe al factor VIII y limita la adhesión y el activador del plasminógeno y la plasmina son relevantes en la lisis del coágulo. (3)

FASE II - INFLAMATORIA

Esta fase se caracteriza por la migración de neutrófilos a la herida, atraídos por factores quimiotácticos específicos, como el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), la calicreína y los fibrinopéptidos, que aumentan la expresión del complejo dimérico CD11/CD18, facilitando la marginación vascular y la posterior diapédesis. Una vez los neutrófilos migran al intersticio, se dan las interacciones "célula-célula" y "célula-matriz" favorecidas por las integrinas iniciando así la función de fagocitosis de bacterias y proteínas de la matriz por medio de liberación de enzimas específicas (hidrolasas, proteasas y lisozimas) y radicales libres de oxígeno. Finalmente, los neutrófilos agotados quedan atrapados en el coágulo y se disecan con él, y los que permanecen en tejido viable mueren por apoptosis y posteriormente son removidos por los macrófagos o fibroblastos.

Posteriormente, se produce el acúmulo de monocitos que reemplazan a los neutrófilos, estimulados por factores quimiotácticos, (fragmentos de colágeno, elastina, fibronectina, trombina enzimáticamente activa, TGF β 1, calicreína y

productos de degradación de la matriz). Los monocitos de los vasos, al migrar al tejido se transforman en macrófagos y se unen a proteínas de la matriz extracelular mediante receptores de integrina, promoviendo la fagocitosis. Así se produce la descontaminación del foco y el desbridamiento autolítico facilitado por la liberación de enzimas como las colagenasas.

Las endotoxinas bacterianas también activan la liberación de Interleucina 1 (IL-1) por parte de los macrófagos, que a su vez estimula la liberación de Interleucina (IL-8) que atraerá más neutrófilos, aumentando así la destrucción tisular.

Los macrófagos, una vez unidos a la matriz extracelular, sufren un cambio fenotípico, y pasan de comportarse como células inflamatorias a comportamiento de células reparadoras, que liberan citoquinas y factores de crecimiento (TGF α y P, PDGF, FGF y IGF-1) con un importante papel en la neoformación tisular; siendo los procesos descritos los que permiten la inducción de la angiogénesis y la formación de tejido de granulación, preparando el lecho de la lesión para la siguiente etapa fisiológica. (3)

FASE III - PROLIFERATIVA O DE GRANULACIÓN

Los fibroblastos constituyen las células más importantes en la producción de matriz dérmica, llegan a la herida desde músculo, tendón, fascia y una vez en el lecho de la lesión, migran con movimientos activos sobre una matriz laxa de fibronectina, para ello el PDGF hace que exprese receptores de integrina α 1 y α 5, posibilitando la migración e interacción con los demás factores de crecimiento. La hipoxia en el centro de la herida, favorece la liberación de factores de crecimiento estimulantes de la proliferación de fibroblastos (TGF p1, PDGF, FGF, EGF y VEGF). Para movilizarse a través de la matriz de fibrina, se requiere un sistema proteolítico que facilita el desplazamiento celular, compuesto por enzimas derivadas de fibroblastos, proteasas séricas (plasmina y plasminógeno del suero, activador del plasminógeno) y colagenasas (MMP-1 o metaloproteinasa de la matriz; MMP-2 o gelatinasa y MMP-3 o estromalisina). El PDGF estimula la liberación de estas proteínas del fibroblasto mientras que el TGF β induce la

secreción de inhibidores de las proteinasas, controlando así la degradación de la matriz.

Con la migración de fibroblastos estos depositan una neo-matriz provisional de fibronectina y ácido hialurónico estimulados por citoquinas y factores de crecimiento (TGF P, PDGF, TNF, FGF, IL1 e IL4) para comenzar a sintetizar la matriz de colágeno (tipos I, III y VI) y una vez que se depositó una suficiente cantidad, cesa la producción, debido a que el INF γ y la misma matriz inhiben la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno. La angiogénesis y la formación de tejido de granulación se inician simultáneamente con la fibroplasia. Los vasos sanguíneos adyacentes a la lesión emiten yemas capilares, en cuyo extremo se encuentran las células endoteliales, que sufren un cambio fenotípico que les permite proyectar pseudópodos a través de las membranas basales fragmentadas y migrar al espacio perivascular; en ésta proliferación endotelial tiene un papel especial el factor de crecimiento vascular-endotelial (REGF) y las angiopoyetinas (Ang). La Ang 2 interactúa con un receptor de las células endoteliales (Tie 2), haciéndolas más laxas y disminuyendo el contacto de éstas con la matriz para favorecer la acción del VEGF.

El TGF β estimula la síntesis de fibronectina y proteoglicanos para constituir la matriz provisional, y a su vez facilita la migración celular e induce el fenotipo de célula endotelial adecuado para la formación de tubos capilares.

La proteína ácida y rica en cisteína de la matriz celular (SPARC) liberada por los fibroblastos y macrófagos, junto a la trombospondina y la tenascina son consideradas proteínas antiadhesivas ya que desestabilizan las interacciones célula-matriz, favoreciendo la angiogénesis. Al mismo tiempo la disminución de la tensión de O_2 , estimula a los macrófagos para que produzcan y secreten factores angiogénicos, ayudado también por la migración de las células endoteliales los cuales forman brotes capilares que se dividen en sus extremos y luego se unen formando asas y dan origen a los plexos capilares.

Después del cese de los estímulos angiogénicos, los capilares sufren una regresión por múltiples factores, entre los cuales se encuentran la tumefacción mitocondrial en las células endoteliales de los extremos distales de los capilares,

la adherencia plaquetaria a las células endoteliales y la ingestión de los capilares necrosados por los macrófagos.

Por último, se produce el reclutamiento de las células periendoteliales (pericitos y células de músculo liso) que van a estabilizar los vasos recién formados. Este proceso se realiza por la unión de la Ang1 al receptor Tie 2, aumentando el contacto de éstas con la matriz. Otros receptores celulares que intervienen son los de integrina, en especial el $\alpha v\beta 3$, esencial para la formación y mantenimiento de los nuevos vasos. (3)

FASE IV - EPITELIZACIÓN

Para que se lleve a cabo la epitelización de la herida, los queratinocitos deben migrar desde los bordes de la herida o desde los anexos remanentes con el fin de restablecer la barrera cutánea, dicha migración se produce gracias a cambios en su fenotipo con la pérdida de adhesión gracias a la retracción de los tonofilamentos y disolución de los desmosomas; adquisición de movilidad por el desarrollo de filamentos de actina y la proyección de lamelopodios hacia la herida; y la expresión de citoqueratina 6 y 16, que son marcadores del estado activo; durante estos procesos se da la pérdida de unión de las células epidérmicas entre sí, a la membrana basal y a la dermis subyacente, lo que permite su migración.

Este ciclo de activación del queratinocito comienza con la IL-1, que da inicio a su transformación en una célula hiperproliferativa y migratoria, dicha actividad la realiza sobre una matriz rica en fibronectina y mediada por receptores de superficie integrínicos ($\alpha 5\beta 1$) y TGF β . Luego la migración será sobre la matriz definitiva rica en colágeno, mediada por receptores de superficie colagénicos ($\alpha 2\beta 1$) y la liberación de TGF α / EGF; para que se realice este proceso, en la membrana basal desaparecen la laminina y el colágeno de tipo IV. La proliferación ocurre en forma superpuesta a la migración, mientras las células epiteliales migran a través de la herida, las células proximales proliferan por el estímulo de mediadores solubles (EGF/TGF α , PDGF/ FGF, etc.) y al "efecto borde" (ausencia de células vecinas en aposición que dispararía el estímulo proliferativo en los márgenes de la herida).

Para que el queratinocito finalice su proceso de migración y proliferación existen varias señales: el INF γ producido por las células inflamatorias lo estimula a expresar citoqueratina 17, que le permite contraerse y facilita la reorganización de la matriz de la membrana basal provisoria y el TGF β estimula la producción de queratinas K5 y K14 que le permiten ser una célula basal para iniciar nuevamente la diferenciación y la reparación de la membrana basal con el nuevo depósito de laminina, también es una señal que le indica que la herida ya está reparada y no hay necesidad de migrar.

De igual forma es importante aclarar que en la piel sana, los queratinocitos no están en contacto con los colágenos de la membrana basal (IV y VII) o de la dermis (I, III y V) que son activadores de la migración y sí lo están con la laminina de la lámina lúcida, la cual inhibe la migración de éstos (3).

FASE V - REMODELACIÓN O DE CONTRACCIÓN

Es la última etapa, comienza al mismo tiempo que la fibroplasia y continúa por meses. La célula principal es el fibroblasto que produce fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno durante la fase de reparación, los cuales sirven como base para la migración celular y soporte tisular. Con el tiempo la fibronectina y el ácido hialurónico desaparecen por acción de proteasas y hialuronidasas respectivamente.

Posteriormente, el colágeno tipo III es reemplazado por el de tipo I, siendo éste más estable y similar al original. La degradación del primer colágeno se debe a la acción de las metalo-proteinasas de la matriz (colagenasas, gelatinasas y estromalinasas), cuya actividad depende de los iones de zinc y la estimulación por factores de crecimiento y la matriz extracelular.

Como se ha descrito, los fibroblastos sufren una transición mesenquimal-epitelial. Primero adoptan un fenotipo migratorio, luego un fenotipo profibrótico (mientras producen colágeno I, III y VI) y posteriormente, adoptan el fenotipo de miofibroblasto, rico en microfilamentos de actina en el lado citoplasmático de la membrana y establece uniones adherentes célula-célula y uniones con la matriz extracelular a través de receptores integrínicos, este colágeno neoformado se une

a través de enlaces covalentes cruzados con haces del borde de la herida y con haces de la dermis adyacente, estas uniones crean una red a través de la herida y así la tracción que realizan los fibroblastos a la matriz pericelular se puede transmitir dando como resultado una contracción coordinada, estimulada por el TGF, la angiotensina, las prostaglandinas, la bradiquinina y la endotelina. En el último día de la cicatrización los fibroblastos inician su proceso de apoptosis, estableciéndose una transición de una cicatriz rica en fibroblastos y tejido de granulación, a una cicatriz acelular.

Al final del proceso la actividad celular va disminuye y el tejido conjuntivo cicatrizal se torna rico en colágeno, pobre en células y vasos, sin folículos pilosos y sin glándulas sudoríparas ni sebáceas. La dermis recupera la composición previa a la lesión y alcanza una resistencia máxima del 70% comparada con el tejido previo y la reparación de la herida se considera finalizada; en una herida de espesor completo hay reducción del tamaño en un 40% respecto del tamaño original (3).

1.1.2. FIBROBLASTOS Y CICATRIZACIÓN

Los fibroblastos son los elementos celulares presentes en mayor cantidad en la dermis, con predominio en la dermis papilar, su morfología fusiforme (huso), su crecimiento adhesivo en plásticos de cultivo de tejidos, la expresión de marcadores mesenquimales que incluyen vimentina y colágena I, y la falta de expresión de marcadores relacionados con otros linajes celulares específicos, son de sus principales características que le confieren su relevancia. (4) (5)

Inmediatamente después de la herida, el proceso de cicatrización comienza, dando lugar a la restauración (parcial) del tejido lesionado. La cicatrización de la herida procede en tres fases dinámicas interrelacionadas que temporalmente se superponen. Estas fases se definen como la fase inflamatoria, la fase proliferativa (el desarrollo del tejido de granulación) y la fase de regeneración, incluyendo la maduración, la formación de cicatrices y la reepitelización (Figura 3)

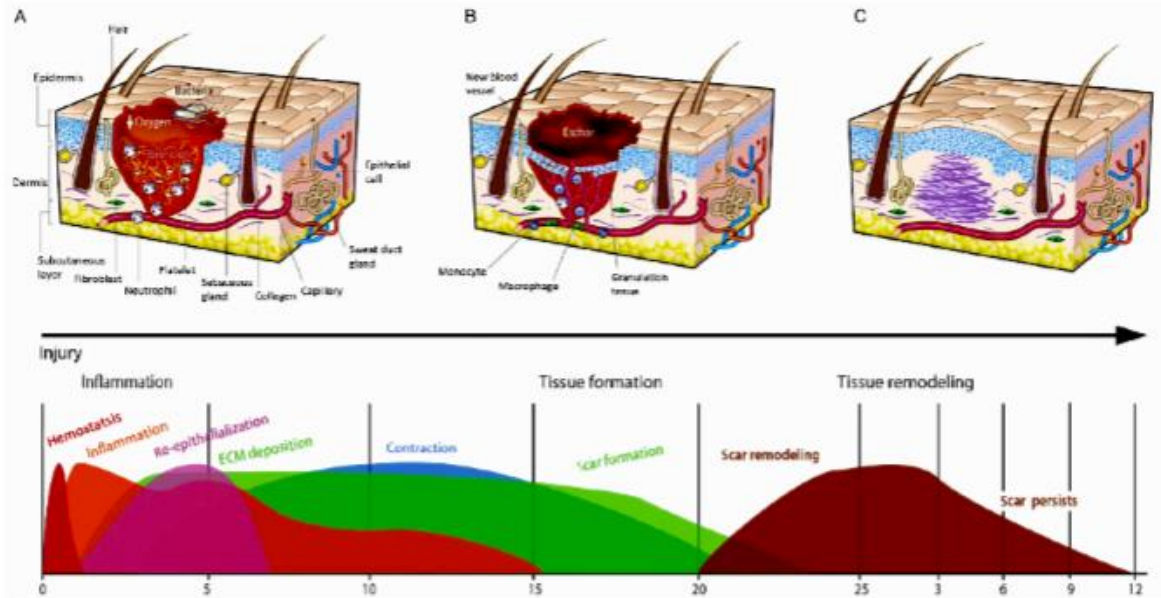


Figura 3. Fases de la cicatrización de heridas. (A) Hemostasia e inflamación, 0-48 h después de la lesión. Inmediatamente después de la herida durante la inflamación, se forma un coágulo de fibrina que contiene plaquetas degranuladas, células inflamatorias y muchos factores de crecimiento. (B) Reepitelización, 2-6 días después de la lesión, y nueva formación de tejido, 2-21 días después de la lesión. Los nuevos vasos sanguíneos se infiltran en el tejido de granulación fibroso del sitio de la herida. (C) Remodelación del tejido, hasta 1 año. Una región de colágena desorganizada, en su mayoría colágena I, es establecida por fibroblastos. Esta red densa de colágena formará la cicatriz. (4)

La fase inflamatoria comienza con el daño de los capilares, provocando la formación de un coágulo de sangre que consiste de fibrina y fibronectina. Esta matriz provisional colma la lesión y permite que una variedad de células migren hacia la lesión. Las plaquetas presentes en el coágulo liberan múltiples citocinas (TGF- β y PDGF), que participan en el reclutamiento de células inflamatorias, neutrófilos y macrófagos, pero también promueven el reclutamiento de fibroblastos y células endoteliales. La segunda etapa de cicatrización de heridas es la fase proliferativa, se caracteriza por angiogénesis, depósito de colágena, formación de tejido de granulación, epitelización y contracción de la herida. (4)

La angiogénesis es crítica para el proceso de cicatrización, permite a los nuevos capilares suministrar nutrientes a la herida y contribuye a la proliferación de

fibroblastos. Inicialmente la herida es hipóxica debido a la pérdida de perfusión vascular, pero con el desarrollo de una nueva red capilar, se restablece la perfusión vascular. La regulación de angiogénesis en la herida representa un medio para mejorar la cicatrización en algunos casos, particularmente cuando la angiogénesis retardada o defectuosa está implicada en el deterioro de la cicatrización. En el tejido de granulación, los fibroblastos son activados y adquieren la expresión de α -sma y se convierten en miofibroblastos. Estas células miofibroblásticas sintetizan y depositan los componentes ECM que eventualmente sustituyen a la matriz provisional. Estas células exhiben propiedades contráctiles, debido a la expresión de α -sma en haces de microfilamentos o fibras de estrés, desempeñando un papel importante en la contracción y maduración del tejido de granulación (Figura 4). Actualmente, se acepta que la modulación miofibroblástica de las células fibroblásticas comienza con la aparición del protomiofibroblasto, cuyas fibras de estrés sólo contienen actinas citoplasmáticas de tipo γ y β . Los protomiofibroblastos generalmente evolucionan en miofibroblastos diferenciados, con fibras de estrés que contienen α -sma. La presencia de α -sma representa el marcador más fiable del fenotipo miofibroblástico. (4)

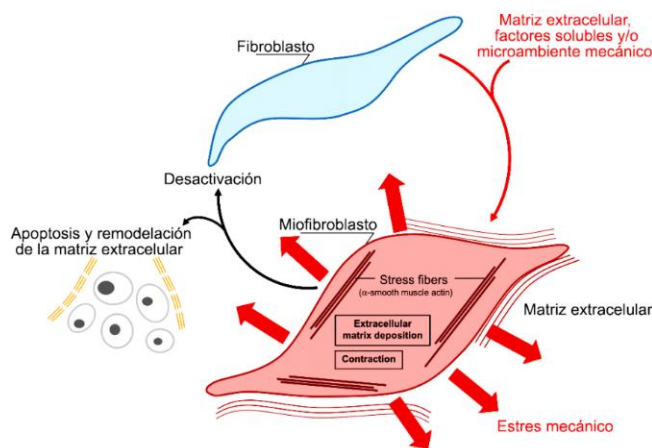


Figura 4. Evolución del fenotipo de los miofibroblastos. [Modificada de 36] (4)

La tercera fase de cicatrización, la formación de cicatrices, implica una remodelación progresiva del tejido de granulación. Las enzimas proteolíticas,

esencialmente las metaloproteinasas de la matriz (MMP's) y sus inhibidores (inhibidores tisulares de metaloproteinasas [TIMPs]) juegan un papel importante.

La síntesis de ECM no se detiene totalmente, solo se reduce considerablemente, y los componentes sintetizados se modifican a medida que se remodela la matriz. Progresivamente, la colágena tipo III, el principal componente del tejido de granulación, es reemplazado por la colágena tipo I, que es el principal componente estructural de la dermis. Por último, la elastina, que contribuye a la elasticidad de la piel y está ausente en el tejido de granulación, también reaparece.

En la fase de resolución de la cicatrización, el número de células se reduce drásticamente por la apoptosis tanto de las células vasculares como de los miofibroblastos. (4)

1.1.3. BIOMATERIALES

El desarrollo de matrices celulares es hoy en día un tema de gran interés debido a la necesidad de reemplazar tejidos y órganos del cuerpo humano. Los soportes celulares podrían permitir la adhesión y proliferación celular, además de proporcionar el intercambio químico indispensable para que se forme un nuevo órgano. Esto se puede conseguir mediante un diseño que garantice biocompatibilidad, porosidad, interconectividad entre poros, estabilidad mecánica y estructural del soporte. Implementar el uso de matrices celulares puede mejorar la calidad de vida de los seres humanos, ya que se reducen los problemas de inmunocompatibilidad y de transmisión de enfermedades asociados al trasplante de órganos. (6)

La búsqueda de nuevos materiales que nos brinden distintas y mejores alternativas de tratamientos a los diferentes padecimientos ha encontrado como gran aliado a las fuentes renovables, es así como se ha desarrollado la creación de materiales bioplásticos, a partir de recursos vegetales o de origen bacteriano. Estos polímeros deben cumplir con especificaciones como características fundamentales para poder ser utilizados en el ámbito médico:

- Biocompatibilidad. No provoquen respuesta inflamatoria al introducirlos en el organismo.
- Degradación. Tiempo de degradación adecuado a la función objetivo.
- Propiedades mecánicas del polímero adecuados a la función objetivo
- Que los productos obtenidos en su degradación sean excretables y no tóxicos para el organismo receptor.
- Esterilizables.

1.1.3.1. PLA

Dentro de los cuales destaca el PLA, que, dentro de los polímeros sintéticos, es uno de los de mayor relevancia, obtenido a partir de ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) proveniente del almidón, y que dadas su versátiles propiedades, ha continuado su uso y estudio desde 1932 cuando fue descubierto (7). Tales como resistencia y capacidad de degradación han sido de sus más grandes características que lo han posicionado entre los principales polímeros sintéticos.

1.1.3.2. PVA

El PVA es un polímero sintético destacado por su buena resistencia química, propiedades físicas, biodegradación y biocompatibilidad. El Alcohol de Polivinilo es un ingrediente sintético que se obtiene a través de la polimerización del acetato de vinilo, seguido de una hidrólisis parcial del éster en la presencia de un catalizador alcalino. Las características físicas del producto dependen del grado de polimerización y de hidrólisis al que sea sometido (8). El PVA es un material atáctico pero muestra cristalinidad debido a que los grupos hidroxilo son suficientemente pequeños para ajustarse dentro de la red sin interrumpirla. Las mezclas de PVA tienen utilidad práctica significativa debido a su bajo precio, fácil disponibilidad, excelente fuerza mecánica, bio-compatibilidad y no toxicidad. Las principales aplicaciones del PVA se hallan en papel, textiles, películas resistentes al oxígeno, adhesivos, envoltorios de comida, membranas en desalación y pervaporación, cosmética, farmacia y la industria electrónica (9). En estudios

toxicológicos se ha encontrado que es mínimo el grado de absorción de esta sustancia por el organismo por lo que su consumo oral se encuentra aprobado.

Las propiedades físicas y mecánicas del polímero se afectan fuertemente por la presencia de otro componente en la mezcla. Algunas nuevas propiedades físicas y fisicoquímicas que no se espera en materiales convencionales, se ha mostrado en las mezclas de polímeros. Las mezclas de polímeros comerciales y naturales han abierto una amplia gama de aplicaciones, y el aumento del potencial tecnológico de estos materiales. La mezcla es un enfoque prometedor que posibilita mediante la combinación, una clase de materiales con propiedades mecánicas, eléctricas y biocompatibilidad mejores que las de los componentes individuales.

El objetivo principal de estas mezclas polímero-plastificantes obtener películas con una alta fracción de fase amorfa, la cual muestra una conductividad mucho más grande que la fase cristalina. Se ha reportado también que la adición de rellenos cerámicos en la matriz polimérica permite a la vez reducir la temperatura de transición vítrea (T_g) y la cristalización del polímero, permitiendo consecuentemente el incremento de las fases amorfas en la matriz polimérica, entonces incrementando la conductividad iónica. La razón del incremento de la conductividad iónica del electrolito polimérico compuesto se explica por el hecho de que las partículas de relleno cerámicas en la matriz polimérica pueden crear algunos defectos y volumen libre en la interfaz entre las partículas cerámicas y la cadena de polímero (9).

1.1.3.3. PLA/PVA

Se basa en la mimetización del PLA como un similar de la MEC en procesos de reparación tisular, y el PVA actúa como un medio nutritivo que facilita el crecimiento, proliferación para distintos grupos celulares.

Este polímero al ser inyectado de forma coaxial se distribuye como un recubrimiento de las fibras de PLA y al mismo tiempo se localiza entre el mismo tipo de fibras. Esto permite modular el tamaño de poro y su distribución espacial. Se hizo un análisis de la distribución del tamaño del poro, misma que se explica en la siguiente sección.

El uso de estos polímeros permitió obtener fibras manométricas con características basadas en las técnicas descritas en el trabajo “Diseño y fabricación de un equipo de electrohilado: elaboración de fibras nano-Métricas y micrométricas de materiales poliméricos y compósitos” (10) donde el fundamento principal fue basado en su conductividad, viscosidad, tensión superficial, volatilidad del disolvente y gradiente de potencia.

1.1.4. TÉCNICA POR ELECTROHILADO

El electrohilado es una técnica que utiliza fuerzas electroestáticas para producir fibras poliméricas, con un diámetro que van desde nanómetros (nm) hasta varios micrómetros (μm). La simplicidad del proceso y las propiedades de las fibras han sido de gran interés para diversos campos de investigación tales como: nanocatálisis, biomedicina, biotecnología, cuidado del medio ambiente, electrónica, defensa, sensores, generación de energía, etc. El empleo de fibras para el área de la investigación conlleva a la fabricación de nuevos diseños de inyectores lo cual facilito la obtención de fibras dentro de fibras. (11)

Al emplear esta técnica, las fibras obtenidas son de mayor área superficial con respecto a su volumen, elevada porosidad, maleabilidad y al mismo tiempo nos permite controlar la composición de las mismas. Esta técnica permite que se usen con aplicaciones industriales como: materiales hidrofóbicos, súper absorbentes, cosméticos, empaquetamientos antibacteriales, formación de andamios en ingeniería de tejidos. (11)

El uso de estas fibras ha cobrado valor en el uso de la biomedicina ya que se emplean en la regeneración de órganos y tejidos. Por lo cual es se investigan nuevas formas de producirlas de manera más rápida y de mejor calidad. Siendo así el proceso de electrohilado permite desarrollar estructuras bidimensionales y tridimensionales de materiales poliméricos biocompatibles. Estas estructuras actúan como matrices extracelulares que permiten comunicar, transportar, y estimular el crecimiento celular en sitios específicos del organismo, permitiendo mayor iteración entre las células y como consecuencia el crecimiento de tejido Nuevo. (12)

La producción de nanofibras de polímeros naturales y sintéticos es importante en la biomedicina para formar tejido como nuevos vasos sanguíneos, regeneración de nervios, reconstrucción de venas y arterias, regeneración de piel, musculo y cartílago, entre otros. Por ello se realizó un estudio de materiales biodegradables y biocompatibles que permitiesen realizar estos procesos, entre los cuales se destacaron materiales como: Poly (caprolactona), colágeno, gelatina, fibrinógeno, Poli (etileno-co-vinil alcohol), Poli (ácido glicólico), quitina y poliácido láctico (PLA). (12)

La producción de nanofibras genera estructuras porosas con gran utilidad para la formación de andamios para moléculas, células o bacterias, por lo que el electrohilado se considera una técnica fácil y eficaz para la producción y el desarrollo de sustitutos permanentes o parciales de tejidos orgánicos. (12)

1.2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

1.2.1 BIOMATERIALES EMPLEADOS EN CICATRIZACIÓN DE HERIDAS QUIRÚRGICAS.

En la actualidad, el constante avance científico nos abre un abanico de posibilidades a explorar y utilizar nuevos materiales y complementarlos con otros que ya se han utilizado con anterioridad, con el fin de brindar nuevas y mejores alternativas de tratamiento y obtener resultados clínicos benéficos. En particular nuestro grupo de investigación, ha trabajado en el cuidado de las heridas, obteniendo resultados óptimos, al mejorar las técnicas, la calidad y el tiempo de recuperación, así mismo reduciendo costos de tratamiento, tiempo de recuperación y disminuyendo efectos secundarios adversos.

Una de las especialidades que más le han dado impulso a estos avances ha sido la bioingeniería o ingeniería de sistemas biológicos aplicando procesos ingenieriles con fin médico, como la implementación de membranas obtenidas por técnicas de electrohilado, que cumplen la función de mimetizar matrices para la reconstrucción de tejidos biológicos (10)

En nuestro grupo de investigación anteriormente se realizó un trabajo (13) donde se observó el efecto de membranas PLA/PVA obtenidas mediante técnicas de electrohilado con extracto acuoso de *Quercus ilex* para el tratamiento de cicatrización de heridas quirúrgicas. En ese estudio se emplearon como biomodelos ratas de la cepa Wistar, a las cuales se les realizaron heridas cutáneas que cicatrizarían por segunda intención, comparando el comportamiento de este con la utilización de membranas PLA/PVA con y sin extracto acuoso de *Quercus ilex* respectivamente.

Durante este trabajo se tuvieron como objetivos determinar la biocompatibilidad de las membranas poliméricas simples y en combinación con extracto de *Quercus ilex*, así como evaluar la velocidad de cicatrización en presencia y ausencia de estos elementos. Durante este proceso se lograron observar diversos comportamientos celulares en respuesta al estímulo traumático, y como el proceso de cicatrización es modificado con la utilización de algunos elementos que nos podrían servir de facilitadores o potenciadores de dicho proceso, en este caso utilizándose membranas de PLA/PVA.

Para el desarrollo del proyecto se seleccionaron 8 ratas de la cepa Wistar sanas (4 machos y 4 hembras) con pesos promedio de 160- 200 gr. A las que se les realizaron heridas abarcando dermis y epidermis que cicatrizarían por segunda intención y colocando los elementos estudiados, así como 2 ratas control sin elementos que favorecieran la cicatrización.

El seguimiento evolutivo se realizó con estudio clínico del cierre de las heridas, así como con estudio histomorfológico de biopsias de la zona de las heridas realizadas en cada uno de los biomodelos a los 5, 10 y 15 días posteriores a la herida.

Para el estudio clínico del cierre de las heridas se realizaron micrografías por microscopia de manera periódica cada 24 horas, para poder apreciar los cambios propios de la cicatrización, así como la influencia de facilitadores, en este caso la membrana de PLA/PVA y el extracto acuoso, en comparación con el control se observaron cambios significativos desde las primeras 24 horas, logrando apreciar heridas limpias, sin datos de infección, con proceso inflamatorio agudo escaso,

permitiendo concluir que el uso de los facilitadores estudiados favorecieron al proceso inflamatorio influyendo en los mediadores de dicho proceso, y fungir como andamiaje para la formación de un coagulo, favoreciendo la formación de una barrera natural para agentes patógenos y acortamiento de la fase inflamatoria aguda con lo que el daño tisular disminuye y propicia una mayor proliferación celular y por consiguiente remodelación tisular en un menor tiempo.



Figura 5. Imagen que muestra micrografías por microscopía óptica, de la evolución cronológica de la herida realizada en el lomo de la rata control, y su cicatrización por segunda intención donde a) día 0, b) día 1, c) día 3, d) día, 5, e) día 7, f) día 9, g) día 11, h) día 13 i) día 15. (13)

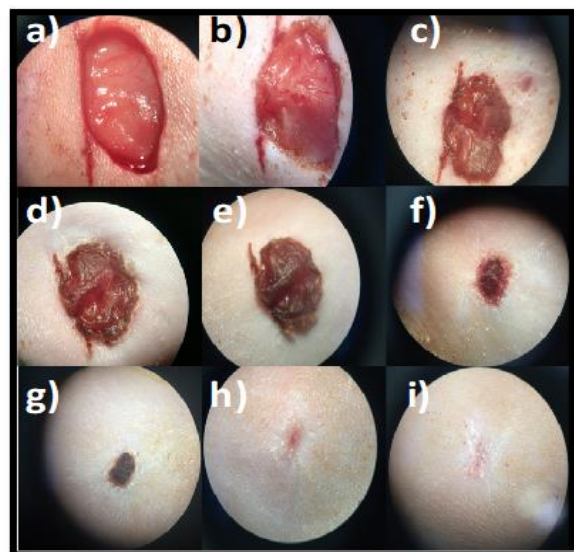


Figura 6. Imagen que muestra la evolución de una herida posterior a la cirugía realizada en el lomo de una rata con el uso de una membrana de PLA/PVA y la aplicación del extracto acuoso de *Quercus ilex*. La imagen muestra de forma cronológica el proceso de cicatrización durante 15 días. a) día 0, b) día 1, c) día 3, d) día 5, e) día 7, f) día 9, g) día 11, h) día 13, i) día 15. (13)

Los resultados de microfotografías por microscopía óptica se respaldaron con el procesamiento de estas en el programa MotiCam Plus donde se evaluaron de acuerdo a diversos parámetros, como: longitud transversal, longitud vertical, área de la herida y perímetro de la herida, posteriormente se graficaron estas mediciones y se observó la curva de cierre de cada herida y en cada uno de los casos, para tener un parámetro comparativo, con dichos valores se permitió graficar para así poder obtener gráficas comparativas del proceso en los diferentes biomodelos.

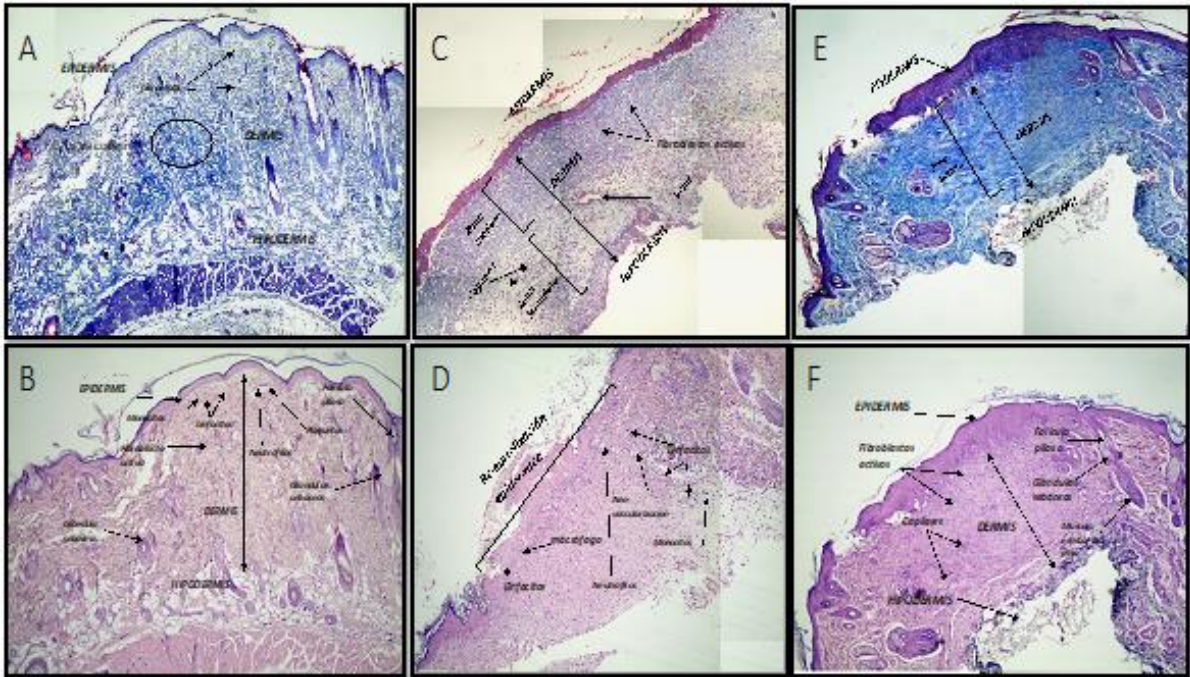


Figura 7. Micrografías que muestran los cortes histológicos de las biopsias tomadas los días 5; A y B, 10; C y D 15; E y F de las heridas del lomo de la rata control en las tinciones H. & E. y T.M. (13)

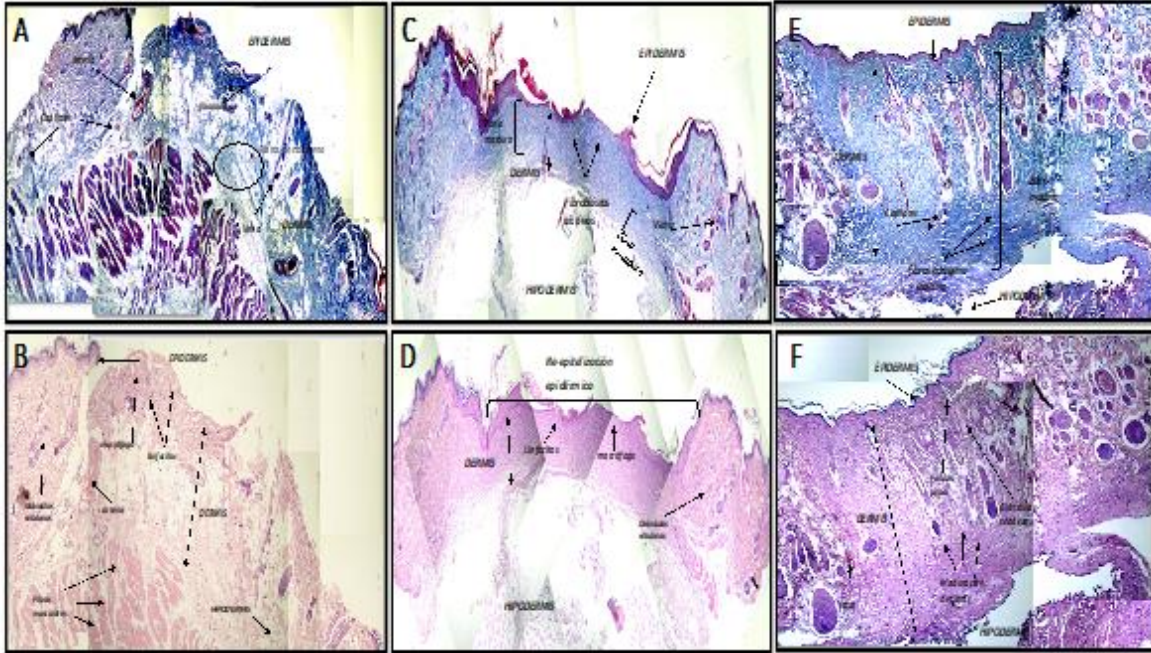


Figura 8. Micrografías que muestran los cortes histológicos de las biopsias tomadas los días 5; A y B, 10; C y D 15; E y F de las heridas del lomo de la rata con la aplicación del extracto acuoso de *Quercus ilex* + el injerto de la membrana PLA/PVA en las tinciones H. & E. y T.M. (13)

1.2.3. MEMBRANAS POLIMÉRICAS OBTENIDAS POR ELECTROHILADO

Hablando específicamente del proceso de electrohilado podemos decir que es un proceso donde se obtienen estructuras con morfología y propiedades de distintos materiales que cumplen con características específicas dependiendo de su aplicación, teniendo en cuenta su estructura, espesor, diámetro, tamaño, porosidad, tipo de material y aplicación. (11)

Estructurales: Deposición de fibras en forma aleatoria, la modificación de los parámetros y del colector, permite obtener estructuras bidimensionales o tridimensionales con o sin control de la orientación de fibras. (14) (15)

Espesor: el espesor de las membranas depende del tiempo de recolección y la presencia de las cargas parasitas en el colector. Para considerarlo adecuado partimos de 0.1 m a 70 μm . (14) (15)

Diámetro de la fibra: El diámetro depende principalmente de la viscosidad y conductividad de la solución, algunos investigadores han logrado un diámetro de fibras menores de 100 nm. (15) (16)

Tamaño del poro: Se desea la fabricación de membranas con un tamaño inferior a la micra, lo que proporciona gran área superficial para diversas aplicaciones, especialmente en la biomedicina. 100 nm a 12 μm . (15, 16)

Porosidad: La porosidad depende principalmente de la baja volatilidad del disolvente, presencia de humedad, retención de cargas, 20% al 90%. (17)

Material: se usas soluciones con suficiente viscosidad y conductividad como lo son polímeros médicos, membranas sintéticas, injertos vasculares, regeneración de tejido orgánico. (18)

Aplicaciones potenciales: Su importancia recae en aplicaciones biomédicas debido a la facilidad de construir sistemas porosos con la capacidad de imitar estructuras tales como piel, hueso musculo). Los implantes médicos, membranas sintéticas, injertos vasculares, la regeneración de tejidos orgánicos son un ejemplo de sus aplicaciones. (18)

1.2.4. *Quercus ilex*

Es una planta del género *Quercus* pertenece a la familia de las Fagáceas. Se localiza en casi todos los bosques templados del hemisferio norte, y algunas regiones tropicales o subtropicales del mismo, abarcando desde África hasta Asia, en América desde Canadá hasta Colombia, y en la región Mediterránea se puede localizar desde Portugal hasta Siria y desde Marruecos hasta Francia (19). El género *Quercus* son árboles de gran porte poseen hojas que nacen a ambos lados

del tallo (hojas alternas) y pueden ser de follaje perenes, caducifolios y marcescentes. La forma de sus hojas es muy variable, incluso dentro del mismo árbol según el sitio donde estén las hojas o dependiendo de la edad. Este género se caracteriza por ser monoico, es decir, tienen flores masculinas y femeninas separadas (unisexuales) pero presentes en cada árbol. Las flores masculinas están agrupadas en amentos o inflorescencias complejas colgantes, donde habitualmente cada flor posee entre cuatro y diez estambres (siendo lo más a menudo seis) de largos filamentos. Las flores femeninas están aisladas u organizadas en espigas o cabezuelas y presentan tres estigmas, así como óvulos anátropos, y están rodeadas por una estructura de escamas empizarradas que al madurar se convertirá en la cúpula. Lo más característico de este género es la fruta, llamada bellota, con su típico gorro o capuchón semiesférico en el base llamado cúpula. La bellota es un fruto solitario y de origen axil (de brote), con cotiledones planos. La corteza suele ser lisa en los ejemplares jóvenes, pero se va agrietando en los ejemplares maduros con la edad. Suelen medir de 1 a 5 m de longitud. Estos árboles se reproducen a través de la semilla, pero son de crecimiento lento (19). La encina (*Quercus ilex*) es un árbol monoico, alógamo y anemófilo incluido en el subgénero *sclerophyllodrys*, especie *ilex*, la cual presenta dos subespecies *ilex* y *bellota*. La encina se encuentra ampliamente distribuida en la región basal del Mediterráneo, donde se distribuye desde Portugal hasta Siria y desde Marruecos hasta Francia. No es exigente en cuanto al suelo, pudiéndose encontrar tanto en sustratos calizos como silíceos, prefiriendo los suelos sueltos, ligeros y permeables, en los que adquiere el máximo desarrollo. Se adapta a suelos pedregosos, aunque tolera mal los terrenos encharcados y los margosos o arcillosos excesivamente compactos (19).

1.2.5. EL USO DEL *Quercus ilex* EN LA REGENERACIÓN CUTÁNEA

En la antigüedad se usaban empíricamente el extracto de *Quercus ilex* en procesos relacionados con afecciones inflamatorias de boca, encías y garganta (llagas, aftas, faringitis), dérmicas (granos, eczema), en procesos inflamatorios del

intestino (colitis, hemorroides, diarreas), también en hemorragias y en el cuidado de heridas cutáneas como agente cicatrizante. Debido al uso tradicional en un trabajo previo, se puso a prueba el extracto acuoso de *Quercus ilex*, esta investigación se realizó en el laboratorio, donde se observó de forma cronológica la evolución de heridas de tipo quirúrgicas en piel de rata cepa Wistar, heridas que se realizaron en el lomo de las ratas, posteriormente se le aplicó extracto acuoso de *Quercus ilex*, durante su proceso de recuperación y se comparó con un producto de venta comercial (Dermatix®) y una rata control, los resultados de este estudio demostraron que el *Quercus ilex* favorecía el proceso de cicatrización en un 40% en comparación a la rata control y 20% a la rata con el producto comercial (Dermatix®). Sin embargo el estudio no concluyó que componentes del extracto son responsables de la que la herida cicatrice en menor tiempo (20)

2. JUSTIFICACION

De acuerdo al INEGI, la primera causa de muerte a nivel nacional son los accidentes automovilísticos, producto de los cuales se presentan heridas lesiones cutáneas, quemaduras, los tratamientos empleados actualmente para el cuidado de heridas son costosos y no siempre son favorables para el paciente, en este trabajo se pondrá a prueba la respuesta de fibroblastos epiteliales humanos frente a las membranas de PLA/PVA obtenidas mediante técnicas de electrohilado en combinación con extracto acuoso de *Quercus ilex*, y evaluar la citotoxicidad *in vitro*, este trabajo forma parte de un protocolo en el que previamente se demostró en un estudio piloto la efectividad de la biomembrana y el extracto en un modelo *in vivo* a corto plazo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente los tratamientos empleados en el cuidado de heridas resultan ser muy costosos, con resultados no muy favorables para los pacientes y de larga duración. Siendo esta una problemática para las instituciones y para el paciente, este trabajo forma parte de un protocolo que tiene como finalidad poner al alcance un tratamiento que sea óptimo, de bajo costo y con resultados favorables a corto plazo, en particular, comprobar la seguridad pre-clínica de las membranas de PLA/PVA obtenidas por electrohilado y extracto acuoso de *Quercus ilex* en el tratamiento de heridas, ya que en una etapa previa se estudió la efectividad de las mismas para el tratamiento de cicatrización de heridas empleando como biomodelos ratas de la cepa Wistar, donde se obtuvieron resultados favorables, en este trabajo se propuso determinar la respuesta de fibroblastos epiteliales humanos frente a las membranas de PLA/PVA obtenidas mediante técnicas de electrohilado en combinación con extracto acuoso de *Quercus ilex*, para evaluar la citotoxicidad *in vitro*. Por lo que durante el desarrollo de este trabajo se determinará la interacción de fibroblastos epiteliales humanos con bio-membranas de PLA/PVA obtenidas por electrohilado y extracto acuoso de *Quercus ilex*, con potencial aplicación en la cicatrización de heridas.

4. HIPOTESIS CIENTIFICA

¿Las membranas poliméricas a base de PLA/PVA en combinación con extracto acuoso de *Quercus ilex* actuarán como un andamio bacterio-estático que mimetiza la matriz extracelular lo cual favorecerán la adhesión y proliferación celular de fibroblastos epiteliales humanos, para su potencial aplicación en la cicatrización de heridas?

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la interacción de fibroblastos epiteliales humanos con bio-membranas de PLA/PVA obtenidas por electrohilado y extracto acuoso de *Quercus ilex*, con potencial aplicación en la cicatrización de heridas.

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar citotoxicidad de los fibroblastos epiteliales humanos de la membrana a base de PLA/PVA en combinación *Quercus ilex*.
2. Evaluar adhesión de los fibroblastos epiteliales humanos de la membrana a base de PLA/PVA.
3. Evaluar proliferación de los fibroblastos epiteliales humanos en la membrana a base de PLA/PVA en combinación *Quercus ilex*.
4. Evaluar la morfología de los fibroblastos epiteliales humanos en contacto con la membrana a base de PLA/PVA en combinación *Quercus ilex*
5. Evaluar la morfología de la membrana a base de PLA/PVA por interacción con los fibroblastos epiteliales humanos.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *Quercus ilex*

Esta metodología hace referencia al trabajo realizado por la D.C. Maura Cárdenas en el 2014 (Wound Healing Effect of Aqueous Extracts of *Quercus ilex* (20)), estudio que investigo las aplicaciones médicas de la corteza del árbol *Quercus*

ilex en el Valle de Texmelucan, Puebla, el estudio también busco conocer los mediadores y las vías que favorecen la cicatrización (20)

6.1.1. OBTENCIÓN DEL POLVO DE CORTEZA DEL ÁRBOL *Quercus ilex*

Para la obtención del polvo que se empleó en la elaboración del extracto acuoso, se utilizaron 500 gr de corteza de árbol de *Quercus ilex* elegido al azar, misma que fue lavada con agua y jabón de forma exhaustiva, y posteriormente se esterilizó con luz UV homogéneamente durante 15 minutos, para esterilizarla.

6.1.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Quercus ilex*

Para la preparación del extracto acuoso de *Quercus ilex* se mezcló en un tubo para centrifugar estéril de 15 ml con 10ml de agua desionizada estéril a una temperatura de (75-95 °C). Posteriormente se agregaron 4g del polvo de corteza del árbol de *Quercus ilex* y se agitó a máxima velocidad en un Vortex durante 5 minutos. Inmediatamente después, se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 minutos el sobrenadante se recuperó y se centrifugo nuevamente, hasta obtener una solución transparente. La solución se esterilizó por filtración a través de un filtro de acetato de celulosa con un poro de 0.22 μm y se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta su uso.

6.2. OBTENCIÓN DE LAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE PLA/PVA

Para la obtención de las membranas porosas de PLA/PVA se siguió la metodología descrita por Pichón (2017) (10). Los parámetros experimentales empleados en la técnica de electrohilado son:

- Voltaje de la fuente de alimentación de 15kV.
- Distancia entre aguja de inyección de los polímeros y recolector de 10 cm.
- Colector tipo cilíndrico con recubrimiento de papel encerado como material de soporte.
- Velocidad de inyección manual.
- Tiempo de hilado: 20 minutos.
- Velocidad angular de recolección: 2, 000rpm.

La variación en estos parámetros, implica un cambio en la morfología en la membrana polimérica.

6.2.1. DISOLUCIÓN DE POLÍMEROS

La disolución de polímeros (PLA y PVA) se realizó en una relación peso/peso de 1/3.

Teniendo como resultado para 10 ml de disolución de PLA al 8% en (p/v) y PVA al 24% en (p/v) basados en la siguiente formula: Fórmula para p/v

$$\frac{(\text{Peso deseado}) (\text{Cantidad disolución})}{100 (\text{ml})} = \text{g}$$
$$\text{PLA} = 8\% \text{ p/v} = \frac{(8) (10 \text{ ml})}{100 \text{ml}} = 0.8 \text{g}$$
$$\text{PVA} = 24\% \text{ p/v} = \frac{(24) (10 \text{ml})}{100 \text{ ml}} = 2.4 \text{g}$$

Para hacer la disolución se calentaron los polímeros teniendo en cuenta el principio de disolución, viscosidad y homogeneidad necesarios para el sistema de inyección del equipo de electro hilado. (10)

Disolución de PLA para el uso en el sistema de inyección del equipo de electrohilado

1.- Se pesaron 0.8g de PLA y se cortó en pequeños fragmentos que se colocaron en un vaso precipitado.

2.- En un matraz Erlenmeyer se colocaron:

- 10ml de cloroformo al 99.8%
- 0.8g de PLA
- 1 agitador magnético

3.- Para evitar la evaporación del cloroformo el matraz se tapó con papel aluminio.

4.- El matraz con el PLA, agitador magnético y cloroformo se colocó en una parrilla con agitación a una temperatura de 75°C y una agitación de 10rpm, durante 20 minutos.

Disolución de PVA para el uso en el sistema de inyección del equipo de electrohilado

1.- Se pesaron 2.4g de PVA y se cortó en pequeños fragmentos que se colocaron en un vaso precipitado.

2.- En un matraz Erlenmeyer se colocaron:

- 10ml de Etanol al 50 %
- 2.4g de PVA
- 1 agitador magnético

3.- Para evitar la evaporación del etanol el matraz se tapó con papel aluminio.

4.- El matraz con el PVA, imán y etanol se colocó se colocó en una parrilla con agitación a una temperatura de 75°C y una agitación de 10rpm, durante 20 minutos.

6.2.2 OBTENCIÓN DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE PLA/PVA EN UN EQUIPO DE ELECTROHILADO

Para la elaboración de membranas poliméricas nos basamos en el principio de electrohilado, mismo que se basa en el estiramiento de un fluido, ocasionado por un gradiente de potencial, entre el fluido (carga positiva) y un colector (carga negativa).

Este proceso inicia cuando se rompe la tensión superficial del fluido por la carga eléctrica, lo que da como resultado la formación del cono de Taylor, lo que indujo a la formación de fibras y su depósito en el colector.

Al iniciar el proceso de electrohilado y observar la formación del cono de Taylor, se procedió a la estabilización de la formación y deposición de las fibras de los polímeros, teniendo en cuenta el voltaje aplicado, la velocidad de inyección, y la velocidad de recolección. La transformación estructural de las fibras se ve afectada por la evzporación del disolvente, lo que genera en consecuencia que se forme una fibra suave por el estiramiento del polímero lo que facilita la creación de las membranas.

Teniendo en cuenta lo anterior se manejaron los siguientes parámetros para la obtención de las membranas poliméricas:

1.- Voltaje: 20-25kV

- 2.- Distancia entre aguja y colector: 8-10cm
- 3.- Velocidad de inyección: Manual
- 4.-Tiempo de hilado: 20 minutos
- 5.- Polímeros: PLA al 8%, PVA al 24%

Al término del electrohilado, se procedió a colocar la membrana obtenida en una caja Petri, para posteriormente esterilizarla con luz UV durante 15 minutos, como se muestra en la figura:

6.3. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD CON EL MÉTODO DE XTT

En una placa de 96 pozos se colocaron las muestras de acuerdo al siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Control negativo: Solo suspensión celular

Control positivo: Suspensión celular, y cobre

Membrana 1: Suspensión celular, y membrana coaxial de PVA/PLA sintetizada en base en la metodología anteriormente descrita, sometida a radiación UV para garantizar esterilidad.

Membrana 2: se utilizó porción de membrana coaxial de PVA/PLA sintetizada en base en la metodología anteriormente descrita, sometida a radiación UV para garantizar esterilidad.

Membrana 3 se utilizó porción de membrana coaxial de PVA/PLA sintetizada en base en la metodología anteriormente descrita, sometida a radiación UV para garantizar esterilidad.

PROCEDIMIENTO:

Se colocaron 5,000 cel/mL (200µL/pozo) fibroblastos de epitelio humano por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron a una temperatura de 37°C con una atmosfera de CO₂ al 5% durante 12 hrs. Se realizó la activación de XTT con el reactivo de electroacoplamiento (20 µL/mL), y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. La mezcla de XTT se descongeló 30 min antes de su uso. Se removió el medio y se adicionaron 100 µL de medio fresco por pozo y 50 µL de la preparación mezcla de XTT, se resuspendió y se incubó a 37° C en una atmosfera de CO₂ al 5%, por 4 horas y finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm en un microlector (Filter Max Pro).

6.4. VIABILIDAD CELULAR CON EL KIT LIVE/DEAD DE THERMO FISHER

En un portaobjetos con ocho pozos se colocaron las muestras de acuerdo al siguiente esquema:



Se empleó el siguiente Kit para colocar los controles que se utilizaron, para valorar los controles y las membranas, mediante un portaobjetos con 8 divisiones.

- Control negativo: Solo suspensión celular.

- Control positivo: Suspensión celular, y cobre.
- Membrana 1: Suspensión celular, y membrana coaxial de PVA/PLA sintetizada en base en la metodología anteriormente descrita, sometida a radiación UV para garantizar esterilidad.
- Membrana 2: Se utilizó porción de membrana coaxial de PVA/PLA sintetizada en base en la metodología anteriormente descrita, sometida a radiación UV para garantizar esterilidad.
- Membrana 3 Se utilizó porción de membrana coaxial de PVA/PLA sintetizada en base en la metodología anteriormente descrita, sometida a radiación UV para garantizar esterilidad.

6.5 PROCEDIMIENTO:

Se colocaron 5,000 fibroblastos epiteliales humanos en cada pozo se incubaron a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%, las observaciones y mediciones en el microscopio de fluorescencia se realizaron a las 6, 12 y 24 horas posteriores a la siembra de las células. Se realizó la preparación de los reactivos de acuerdo a la recomendación del fabricante 2 mM de EthD-1 con PBS [2 µL/mL], se agitó en vortex y luego se adicionaron 0.5 µL de 4 mM de calceina AM. Se removió el medio y lavó dos veces con 200 µL de PBS y luego se agregaron 100 µL de la solución preparada de EthD-1 y calceina AM. Se incubó durante 45 min a temperatura ambiente. Después se procedió a realizar la captura de las imágenes en fluorescencia con el software Moticam OSX a las 6, 12 y 24 horas.

El extracto acuoso de *Quercus ilex*, permitió valorar la formación de biomembranas, es por ello, que se realizó la elaboración de polímeros a base de los polímeros sintéticos como es del ácido láctico, para ser empleados como membranas que forma parte de la estructura celular, mientras el polímero ácido poli vinil alcohol permite formar la membrana con capacidad para soportar la humedad y la administración de sustancias químicas.

En la preparación del extracto acuoso se empleó la metodología descrita en el trabajo Wound Healing Effect of Aquercus Extracts of *Quercus ilex* (20) que consistió en la obtención, preparación y procesamiento de la corteza de árbol, mediante la disolución de PLA para el uso en el sistema de inyección del equipo de electrohilado, se realizó el corte de pequeños fragmentos que se colocaron en un vaso precipitado, mediante la obtención de un polvo fino de 0.75micras a partir de la corteza del árbol. Posteriormente en el matraz con PLA más cloroformo se agregó en una plancha de calentamiento con agitador magnético (temperatura de 75°C) y un STIR de 10, durante 20 minutos, además, se realizó por la colocación por pipeta el extracto en un recolector de aproximadamente 10 cm, en varias celdas.

En el cuarto oscuro se realizó la visualización con microscopio en campo oscuro una luz muy intensa en forma de un cono hueco concentrado sobre el espécimen, esto permite que el campo de visión del objetivo se encuentra en la zona hueca del cono de luz y sólo recoge la luz que se refleja en el objeto, las porciones claras del espécimen aparecen como un fondo oscuro y los objetos minúsculos que se están analizando aparecen como una luz brillante sobre el fondo, esta forma de iluminación se utilizó para analizar elementos biológicos transparentes y sin manchas, invisibles con iluminación normal.

Mediante microscopía se aplicó fluorescencia con fluoróforo para detectar las moléculas tisulares según el espectro de absorción, gracias a la emisión de fluoróforos, sin embargo, se puede presentar solapamiento, con extracto de *Quercus ilex*.

Con el empleo de la inmunocitoquímica se permitió valorar por medio del fluoróforo Texas-Red la absorción de la celularia del extracto de *Quercus ilex*, este tejido se denomina fluorescente debido a que es capaz de captar radiación electromagnética con una longitud de onda determinada y emitir otra radiación

electromagnética con otra longitud de onda diferente, normalmente dentro del espectro de la luz visible que se realizó en un campo oscuro.

En el análisis de la porosidad de la membrana de PLA/PVA obtenida por electrohilado, se visualizó por microscopia directa la ramificación estructural del tejido con una escala de 100 μ m y con 100x aumentos, los espacios formados entre la ramificación pueden ser medibles, pero estas estructuras son el sistema fibrilar de andamiaje, proteínas de tipo estructural compuesta de glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas, estas tienen múltiples compuestos, entre los que destaca el colágeno tipo I y III, ácido hialurónico y elastina, componentes que refuerzan la estructura, pero mediante la microfotografía, la visualización se puede realizar con mayor precisión, como es la segunda imagen que tiene una escala de 50 μ m y 500x aumentos mostrando la estructura descrita anteriormente para tener la capacidad de reforzar y brindar una estructura firme y entrelazada que brinda mayor firmeza. En la última microfotografía realizada con una escala de 100 μ m con 200x aumentos, se visualiza la membrana desde una perspectiva más alejada, pero que se observa entrelazada y con porosidad.

6.6 MEDICIÓN DE TOXICIDAD EN MICRORGANISMOS

Como parte de una evaluación integral del comportamiento y eficacia en la utilización de las membranas bio-membranas de PLA/PVA obtenidas por electrohilado en combinación con extracto acuoso de *Quercus ilex*, en el tratamiento de cicatrización de heridas, se realizaron pruebas de su utilización en ambientes donde exista la posibilidad de encontrar microorganismos que pudieran afectar tanto el comportamiento como la eficacia de los auxiliares en estudio.

Dichas pruebas tuvieron como objetivo evaluar los elementos estudiados combinados y en solitario, colocándolos en ambientes no estériles, donde estuvieron en contacto con diferentes tipos de microorganismos, que fueron

elegidos al ser algunos de los que más se encuentran en la flora cutánea o que han sido aislados en heridas cutáneas.

En cajas Petri con agar LB (Luria-Bertani) se realizaron cultivos independientes de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, en las cuales se colocaron porciones de membrana coaxial obtenida por electrohilado de PLA/PVA. Cada 2 horas fueron retirados 2 fragmentos los cuales fueron observados con apoyo de micrografías por microscopía óptica y conservados en congelación para su posterior análisis a través de microscopía de barrido, repitiendo dicho proceso hasta completar 2 días.

Por otra parte se repitió el procedimiento, con la utilización de porciones de membrana coaxial obtenida por electrohilado de PLA/PVA, en este caso en combinación con 15 µl. de extracto acuoso de *Quercus ilex*, y realizando el procedimiento de observación tal como en la prueba comparativa.

Por último, y con el objetivo de analizar cada uno de los auxiliares estudiados de forma independiente, se realizó una prueba al extracto de *Quercus ilex*, en la cual se realizaron cultivos independientes con los microorganismos antes mencionados a los cuales se le colocaron porciones de papel filtro que contenían diferentes concentraciones de extracto acuoso de *Quercus ilex*, los cuales fueron observados con apoyo de micrografías por microscopía óptica cada 2 horas, tanto de las superficies de los fragmentos como de las periferias a estos, hasta completar 1 día.

7. RESULTADOS

7.1 MICROFOTOGRAFIA DE LAS MEMBRANAS DE PLA/PVA POR ELECTROHILADO

La porosidad de la membrana de PLA/PVA obtenido por electrohilado, se visualizó por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) directa encontrando la ramificación estructural del tejido con una escala de 100 μ m y con 100x aumentos [ver Figura 9 a)]. Los espacios formados entre la ramificación pueden ser medibles, pero estas estructuras son el sistema fibrilar de andamiaje, las cuales biomimetizan la morfología de proteínas de tipo estructural compuesta de glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas. Estas tienen múltiples compuestos, entre los que destaca el colágeno tipo I y III, ácido hialurónico y elastina, componentes que refuerzan la estructura. La visualización de esto se puede realizar con mayor precisión mediante la microfotografía, como es la segunda imagen [ver Figura 9b)] que tiene una escala de 50 μ m y 500x aumentos mostrando la estructura descrita anteriormente para tener la capacidad de reforzar y brindar una estructura firme y entrelazada que brinda mayor firmeza. En la última microfotografía realizada con una escala de 100 μ m con 200x aumentos, se visualiza la membrana después de ponerla en contacto con el extracto acuoso *Quercus ilex* desde una perspectiva más alejada, pero que se observa entrelazada y con porosidad. [Figura 9c)]

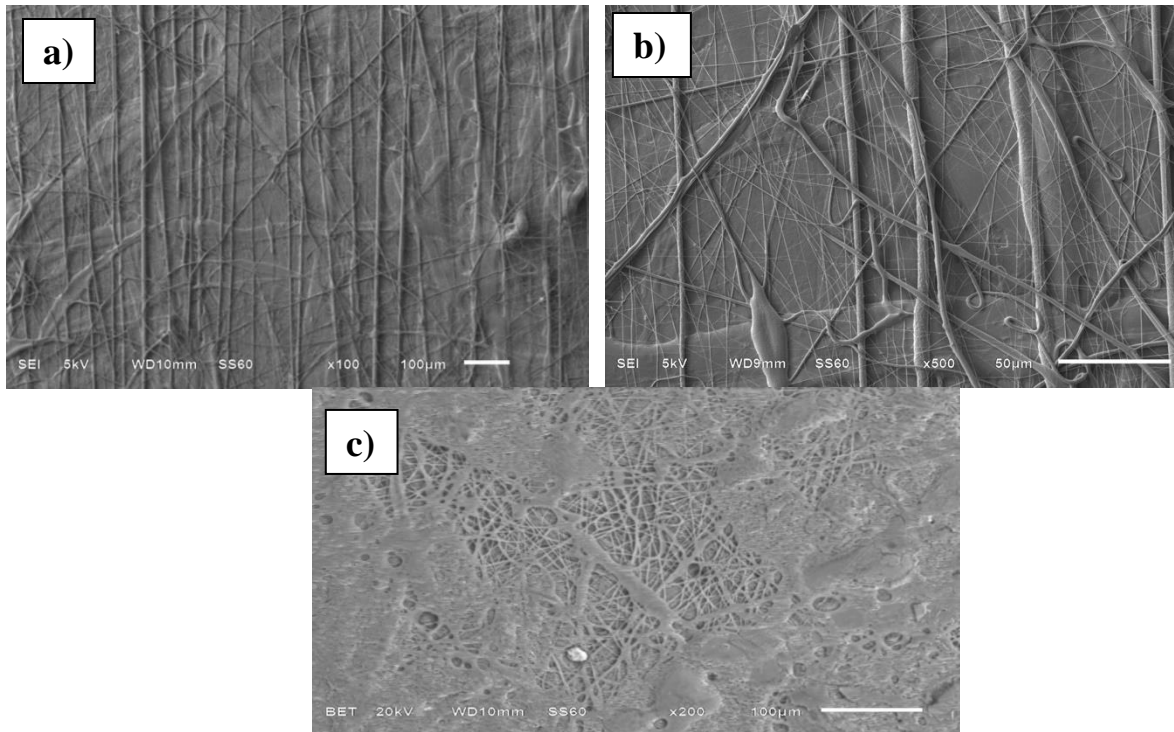


Figura 9. a) Tejido y porosidad de la membrana a 100 X a una escala de 100 micras, b) aumento de la micrografía a) a una escala de 50 micras, C) *Quercus ilex* empleada en el estudio.

7.2. RESULTADOS DE LA VISTA MICROSCÓPICA DE *Quercus ilex* CON *S. aureus*

Toxicidad de la membrana a base de PLA/PVA y los extractos acuosos de *Quercus ilex*, frente a tres microorganismos *E. coli*, *S. aureus* y *S. cerevisiae*.

En la siguiente figura se valora por microscópica del extracto de *Quercus ilex* con una escala de 20µm se analizaron los cambios estructurales a las 2, 6, 12, 24 y 48 horas, en cada intervalo de tiempo se tuvieron modificaciones características. En las primeras 2 horas se observó la presencia de *S. aureus* sobre la membrana, estructura porosa, con fibras de PLA/PVA, a las 6 horas se identificó la mezcla de *S. aureus* en los polímeros, estructura que favorece la migración de los componentes, como es la humedad y la retención de cargas a la hora del hilado, a

las 12 horas se identificó el esparcimiento de la bacteria, a las 24 horas se identifica una distribución heterogénea, a las 48 horas se observó crecimiento de las bacterias, es por ello, que en este estudio se pudo valorar la necesidad de aplicar antibióticos en el extracto, así como visualizar la capacidad antimicrobiana que tiene la membrana, principalmente a bacterias. (Figura 10)

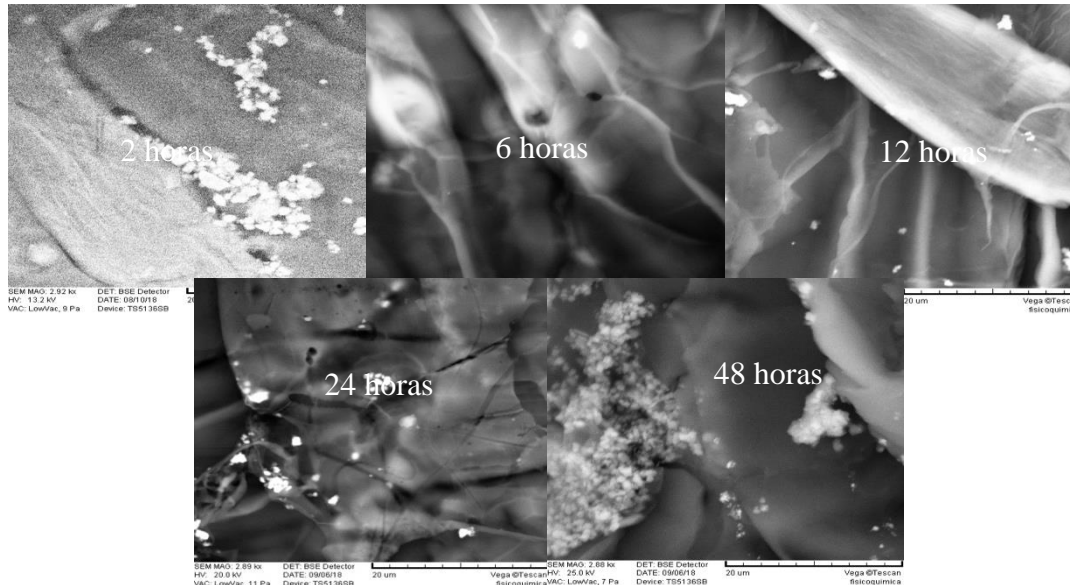


Figura 10. Vista microscópica de *Quercus ilex* con *S. aureus* a una escala de 10 micras.

7.2. RESULTADOS DE LA VISTA MICROSCÓPICA DE *Quercus ilex* CON *E. coli*

En la siguiente figura visualización microscópica del extracto de *Quercus ilex* con una escala de 20µm se analizaron los cambios estructurales a las 2, 6, 12, 24 y 48 horas sometido a un agente bacteriano como es E. Coli con una escala de 10µm, a las 2 horas se visualizó que este agente comenzó con cambios microscópicos, característica típica al ser capaz de infectar múltiples tejidos humanos, principalmente aquellos con mucosas y alta humedad, a las 6 horas se visualizó el esparcimiento de la bacteria, a las 12 horas hubo mayor desplazamiento, a las 24 horas la distribución de la bacteria sobre la membrana fue basta, pero a las 48 horas se mantuvieron las bacterias en el mismo sitio, a pesar que pueden transitar

entre los polímeros, la membrana con el extracto favorece la migración de los componentes, es por ello, que se recalca que el efecto antibacterial del extracto va a depender de la concentración de antibióticos (Figura 11).

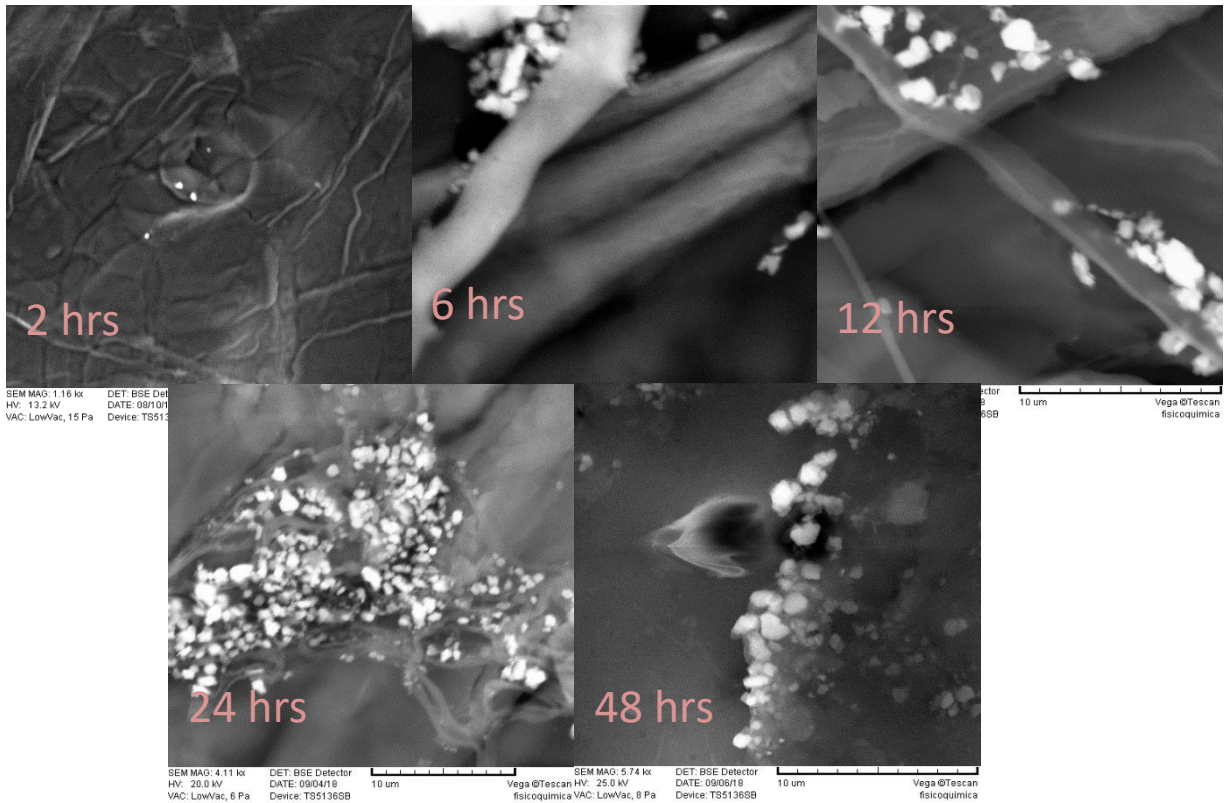


Figura 11. Microfotografías de *E. Coli* con *Quercus ilex* a una escala de 10 micras.

7.3 RESULTADOS DE LA VISTA MICROSCÓPICA DE *Quercus ilex* CON *S. cerevisiae*

En la siguiente figura se visualiza el extracto de *Quercus ilex* con *S. cerevisiae* a una escala de 20μm y 10μm se hizo el análisis de los cambios estructurales a las 2, 6, 12, 24 y 48 horas, en cada intervalo de tiempo se visualizaron amplias modificaciones, en las primeras 2 horas se observó la presencia de *S. cerevisiae* sobre la membrana, teniendo un desplazamiento constante y con distribución heterogénea por las fibras de PLA/PVA, a las 6 horas la migración de los componentes del agente fue mayor, a las 12 horas se observa el andamio de la membrana que está con residuos de la levadura, a las 24 horas la distribución fue

muy amplia debido a la porosidad de la membrana disminuyendo el conteo clular y a las 48 horas se observó que este crecimiento de bacterias descansaban sobre la membrana. (Figura 12)

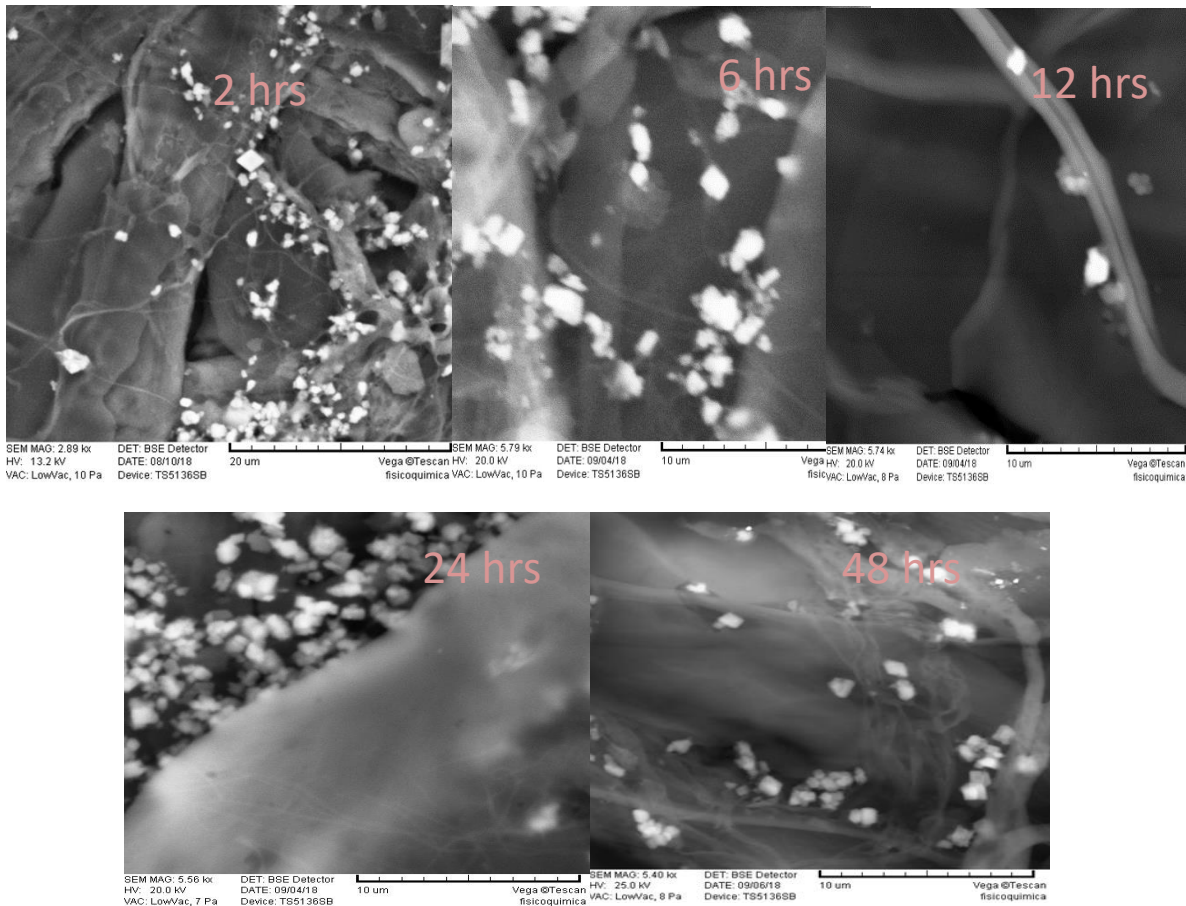


Figura 12. Microfotografía de *S. cerevisiae* con *Quercus ilex* a una escala de 10 micras.

A partir de las imágenes de las Figuras 10 a 12, se estima la rapidez de adherencia de los diferentes microorganismos sobre las membranas de PLA/PVA. Para realizar esta medición fue empleado el software: IMAGE J, el cual mediante escala de grises permite calcular el área de las diferentes colonias de microorganismos ocupadas en la micrográficas obtenidas por Microscópio Electrónico de Barrido (SEM). El resultado del conteo de áreas por cada tipo de colonias de microorganismos, se muestra en el histograma de la siguiente figura.

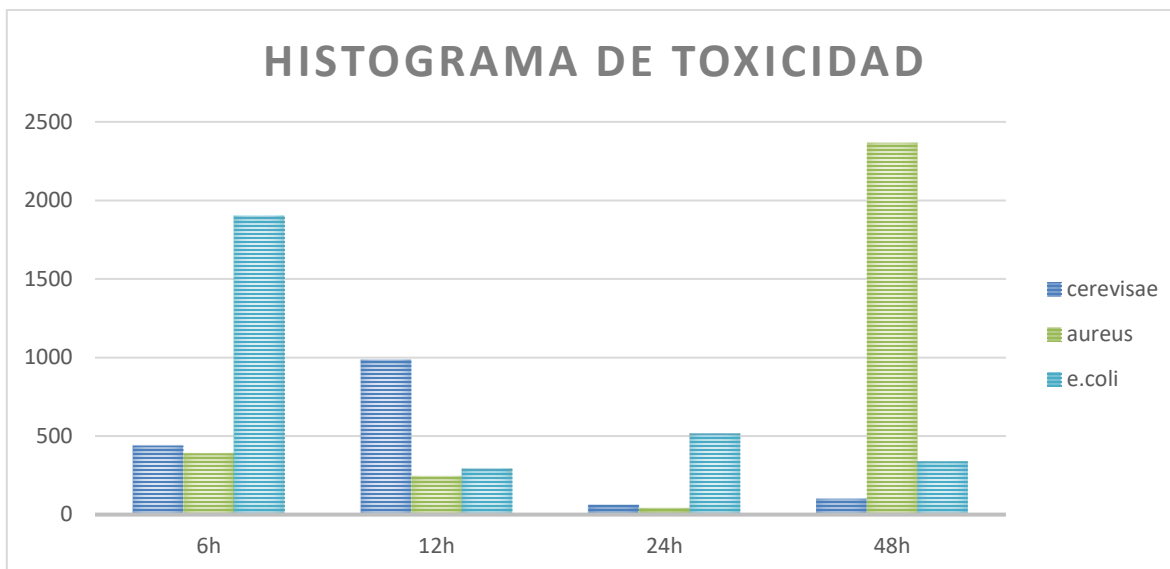


Figura 13. Conteo de colonias de microorganismos por unidad de área mediada en micras (eje y) respecto al tiempo en unidades de horas. Los colores distinguen los diferentes tipos de microorganismos.

La figura 13, muestra la dinámica de adhesión de los microorganismos empleados en presencia del extracto acuoso *Quercus illex*, la cual es cualitativamente distinta a horas de la inoculación de cada tipo diferente que a días. Una posible explicación de este comportamiento puede ser debido a que las colonias de *cerevisae* y *aureus* se adaptan con dificultad a la membrana a 6 horas, mientras que las colonias de *e. coli* tienen su mayor crecimiento durante este lapso de tiempo. A 12 horas se observa que el tipo de microorganismo con mayor adherencia es *cerevisae*. Después del primer día de inoculación (a las 24 hrs), el extracto de *Quercus illex* inhibe nuevamente el crecimiento de las colonias de *cerevisae* y *aureus*. En cambio, cuando el lapso de tiempo es a 2 días las colonias de *aureus* son aquellas que tiene mayor adherencia a la membrana polimérica. Por lo tanto, la mayor inhibición ejercida del *Quercus illex* sobre los microorganismos *cerevisae* y *e. coli*, mientras que el efecto bacteriostático de este extracto desaparece sobre las colonias de *aureus* entre el primer y segundo día.

7.4. RESULTADOS DE *Quercus ilex* EN CULTIVO CON *S. aureus*

En la siguiente figura se observa el cultivo del extracto de *Quercus ilex* que fue valorado a las 6, 12 y 24 horas, en una caja de petri con agar LB, medio ideal para valorar el crecimiento de la bacteria *S. aureus*, esta tiene la capacidad de permanecer en tejidos con baja o alta humedad, este agente en el ser humano llega a ser el responsable de casos severos de infección y alta morbimortalidad, pero para llegar a su identificación, se debe realizar un cultivo de la zona afectada, herramienta diagnóstica fidedigna, por ello, en la evaluación en el cultivo a las 6 horas se observó claramente limitación del crecimiento bacteriano en la zona donde fue alpicado el extracto acuoso de *Quercus ilex* teniendo un aspecto macroscópico ovalado, con bordes regulares, a las 12 horas la zona con presencia de extracto inicia cambios a una tonalidad rojiza, en su vista microscópica la zona se torna oscura con aglomeración de componentes del extracto y a las 24 horas los cambios macroscópicos y microscópicos no son tan diferentes. (Figura 14)

Figura 14. *S. aureus*/ *Quercus ilex* 6 hrs



Figura 14. *S. aureus*/ *Quercus ilex* 12 hrs

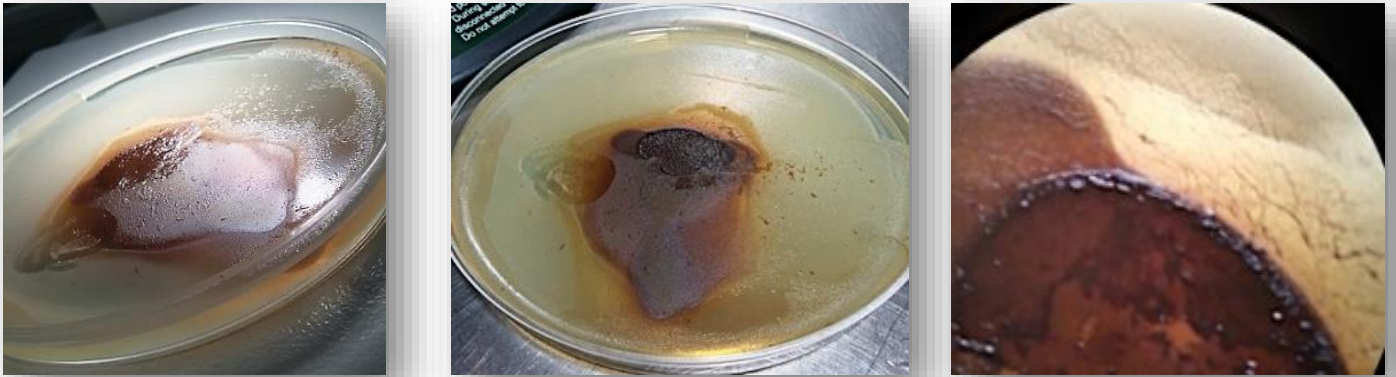
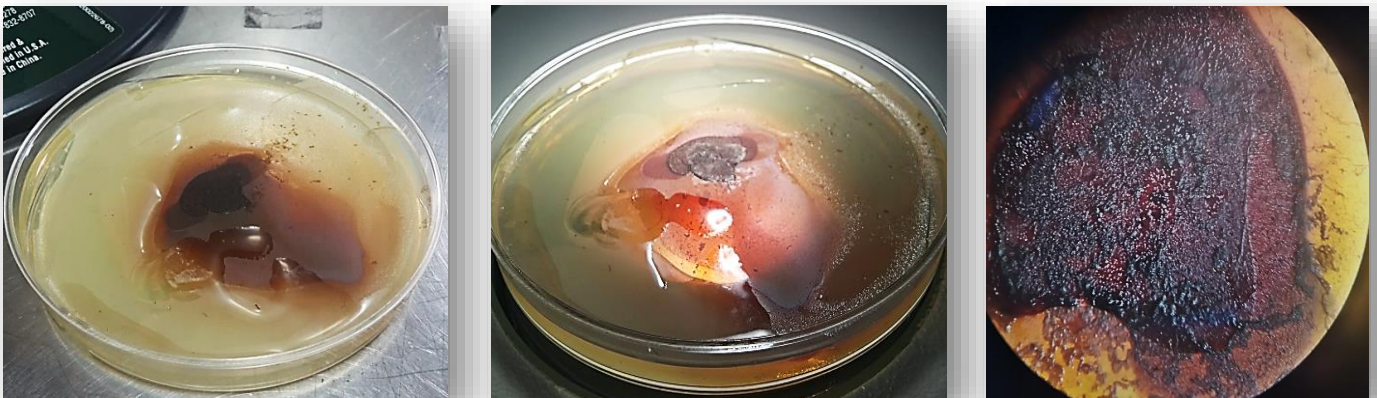


Figura 14. *S. aureus*/ *Quercus ilex* 24 hrs

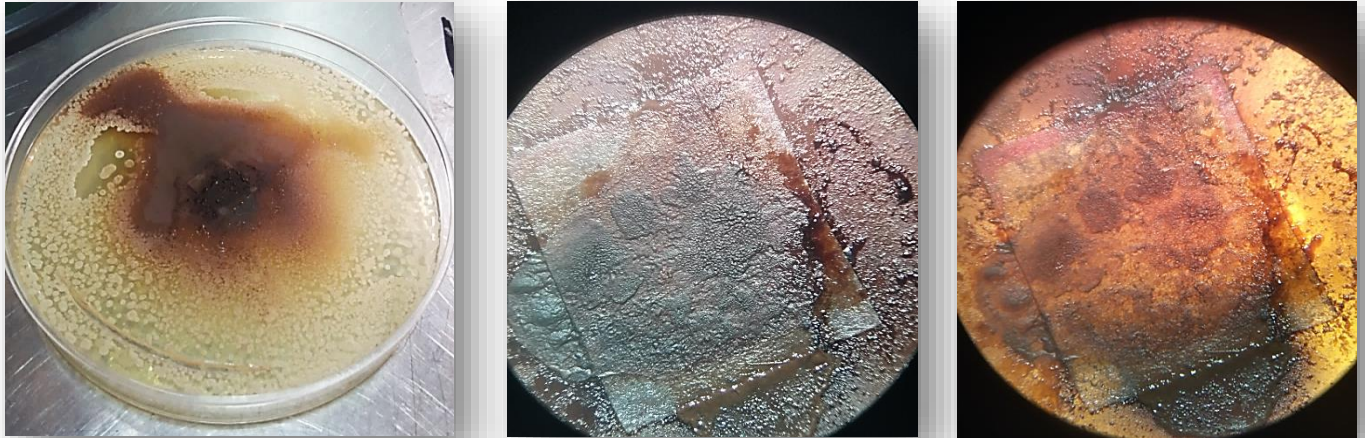


7.5. RESULTADOS DE *Quercus ilex* EN CULTIVO CON *E. COLI*

En la siguiente figura el cultivo del extracto de *Quercus ilex* con *E. Coli* fue analizado a las 24 horas, para poder observar un crecimiento, en una caja de petri con su respectivo agar, se identificó crecimiento de la bacteria, al tener una distribución hacia el centro de la caja, esta valorada miscrópicamente se observa una membrana con combinación del agente y el agar, pero se distribuye de manera heterogénea, con bordes irregulares, con tonalidad café, en su vista

microscópica la zona se torna rojiza, húmeda y con cambios en la coloración de la membrana. (Figura 15)

Figura 15. E. coli con *Quercus ilex* en cultivo a las 24 hrs.



7.6 CITOTOXICIDAD CON XTT EN FIBROBLASTOS A LAS 24 HORAS

En la figura 15, se observa la citotoxicidad en fibroblastos epiteliales humanos en tres membranas a base de PLA/PVA con diferentes morfologías de su microestructura (ver Figura A del Anexo), etiquetadas con las siglas M1, M2 y M3. Se realizó la administración de una suspensión celular de 25,000 cel/mL en varias muestras, para valorar el nivel de que se llega a tener de citotoxicidad, en el control negativo fue de 0.900, en el control positivo de 0.700, en la muestra número 1 fue de 0.800, en la muestra número 2 de 0.850 y en la muestra número 3 fue de 0.700 a las 24 horas de haber sometido a las células un cultivo y haber escaneado mediante espectrofotometría (método de ELISA). Este estudio se obtiene mediante la valoración de la absorción directa de sales de tetrazolium (XTT), producto del sistema reductasa succinato-tetrazolium a nivel celular, pero estas deben estar metabólicamente intactas. (Figura 16)

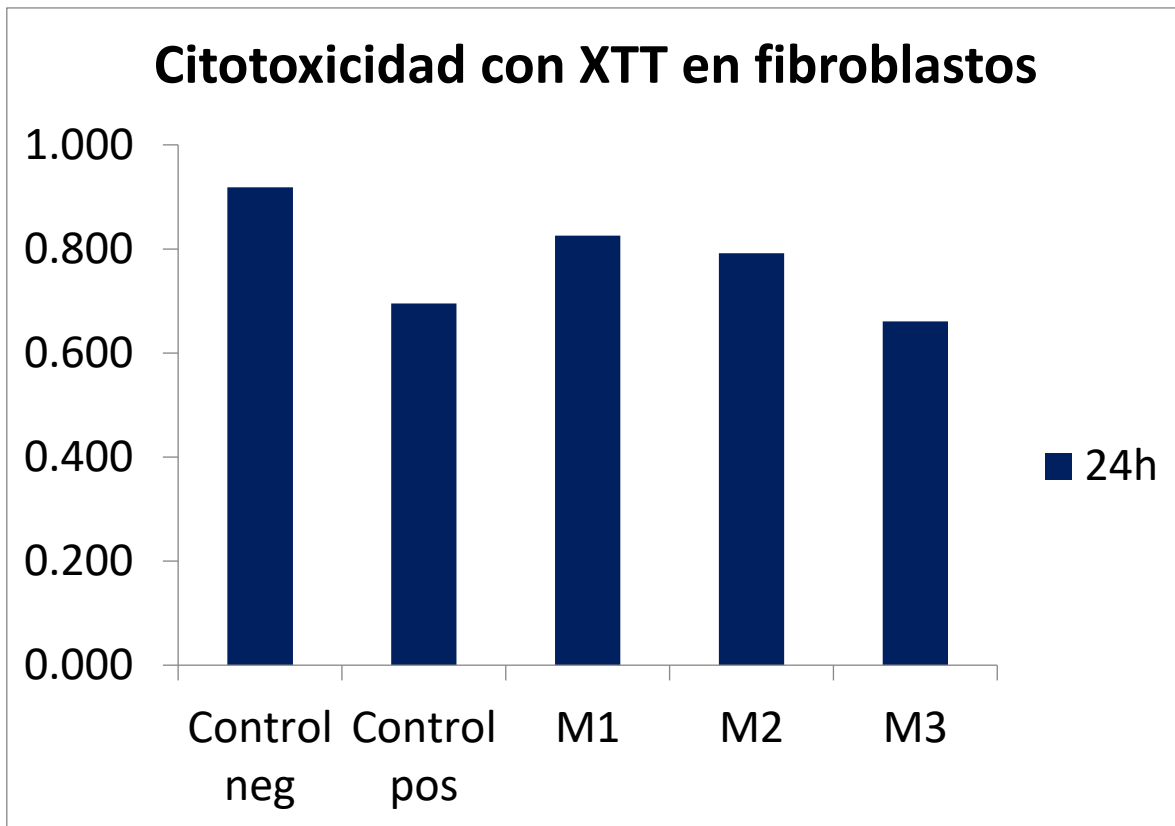


Figura 16. Medición de citotoxicidad con XTT, por metodo de ELISA a las 24 horas

7.7. RESULTADOS DE LA CITOTOXICIDAD CON XTT EN FIBROBLASTOS A LAS 48 HORAS

En la valoración de la citotoxicidad con XTT en fibroblastos de piel humana normal (FPiHN), se realizó la administración de una suspensión celular de 25,000 cel/mL en varias muestras, para valorar el nivel de que se llega a tener de citotoxicidad a las 48 horas, en el control negativo fue de 0.900, en el control positivo de 0.700, en la muestra número 1 fue de 0.900, en la muestra número 2 de 0.800 y en la muestra número 3 fue de 0.100 identificando que la celularidad es cada vez menor conforme pasa el tiempo, por ello, el número de células vivas en el cultivo mueres, posteriormente al ser escaneados mediante espectrofotometria (método de ELISA), este estudio obtiene mediante la valoración de la absorción directa de las células de sales de tetrazolium (XTT), producto del sistema reductasa succionato-tetrazolium a nivel celular, pero estas deben estar metabólicamente intactas. (Figura 17)

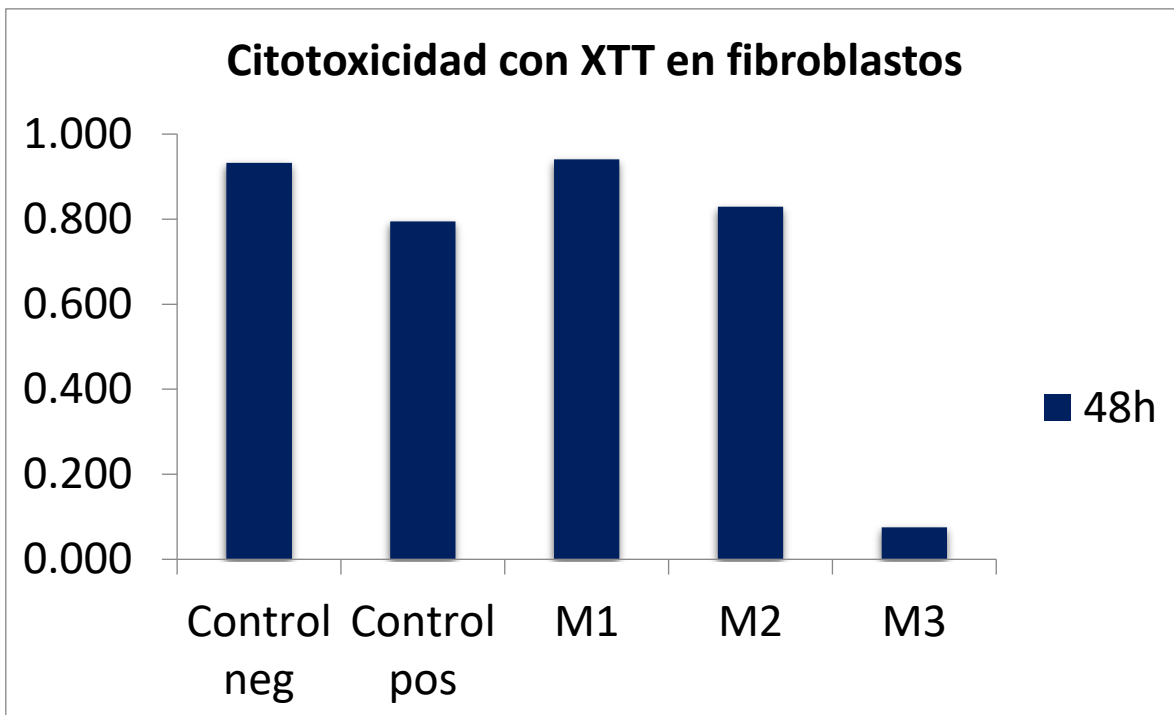


Figura 17. Medición de citotoxicidad con XTT, por metodo de ELISA a las 48 horas

7.8 RESULTADOS DE INMUNOCITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Quercus ilex*

En la siguiente figura se realiza la valoración por microscopía con fluorescencia emplear fluoróforo para detectar las moléculas tisulares según el espectro de absorción, observándose la Adhesión de los fibroblastos epiteliales humanos en la membrana a base de PLA/PVA, se puede presentar solapamiento, compuesta por extracto de *Quercus ilex*. (Figura 18)

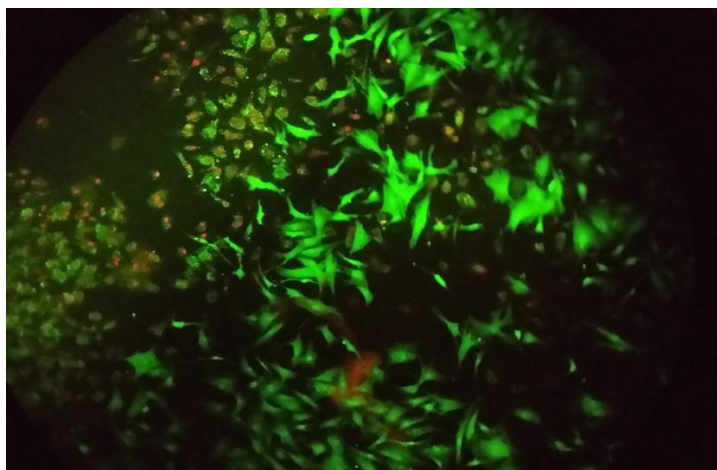


Figura 18. Visualización microscópica del extracto de *Quercus ilex*.

Con el empleo de la inmunocitoquímica se permitió valorar por medio del fluoróforo Texas-Red la absorción de la celularia del extracto de *Quercus ilex*, este tejido se denomina fluorescente debido a que es capaz de captar radiación electromagnética con una longitud de onda determinada y emitir otra radiación electromagnética con otra longitud de onda diferente, normalmente dentro del espectro de la luz visible que se realizó en un campo oscuro, además, se tuvo proliferación de los fibroblastos epiteliales humanos en la membrana a base de PLA/PVA en combinación *Quercus ilex*. (Figura 19)

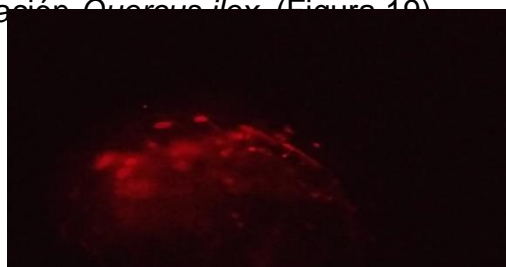


Figura 19. Visualización microscópica del extracto de *Quercus ilex*

7.9 RESULTADOS DE *Quercus ilex* CON INMUNOHISTOQUÍMICA A LAS 6 Y 12 HORAS

Al comparar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica a las 6, 12 y 24 horas, se identificó que desde la primera valoración hubo adecuada absorción por del tejido que representa la membrana, esta permitió ser comparada con la membrana 3, la cual mostró mayor respuesta a la inmunohistoquímica, mostradas de color verde, los cambios observados a las 12 horas nos indican la disminución de la celularidad viva, debido al estrés del medio, además, de que el color verde es respuesta a la excitación del núcleo de la célula de forma natural a la luz de onda corta, en este periodo de tiempo los cambios fueron drásticos pero a las 24 horas de la realización del experimento, se mostró elevación de la celularidad muerta, comportamiento celular progresivo que se vio afectado conforme avanzó el tiempo. Este análisis indica que la actividad celular con *Quercus* más la membrana se mantiene activa en un periodo de tiempo inferior a las 12 horas. (Figura 20)

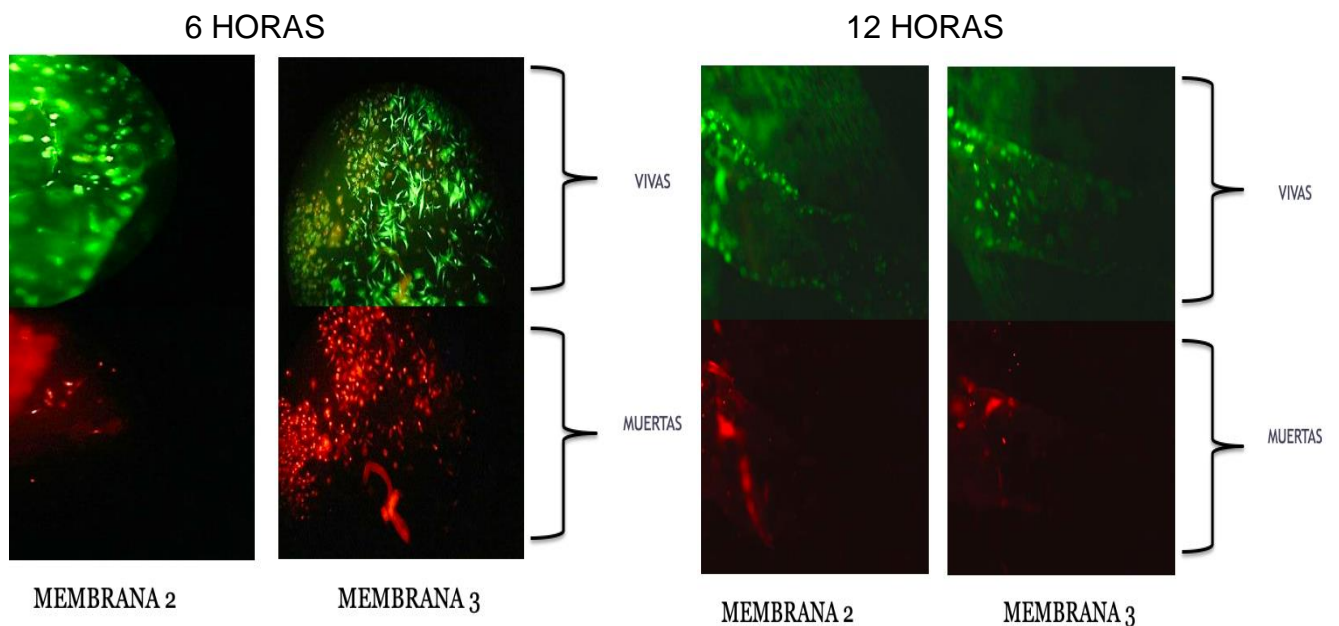


Figura 20. Inmunohistoquímica de las membranas a diferentes intervalos de tiempo.

7.10. RESULTADOS DE *Quercus ilex* CON INMUNOHISTOQUÍMICA A LAS 24 HORAS

Al comparar los resultados con el control, se tuvo cambios favorables con las membranas de *Quercus ilex*, la morfología de la membrana a base de PLA/PVA por interacción con los fibroblastos epiteliales humanos, se tuvieron cambios importantes a comparación de las 12 horas en el que se tiene celularidad viva, que mediante estudios de inmunohistoquímica puede valorarse y valorar los cambios de manera microscópica. (Figura 21)

24 HORAS

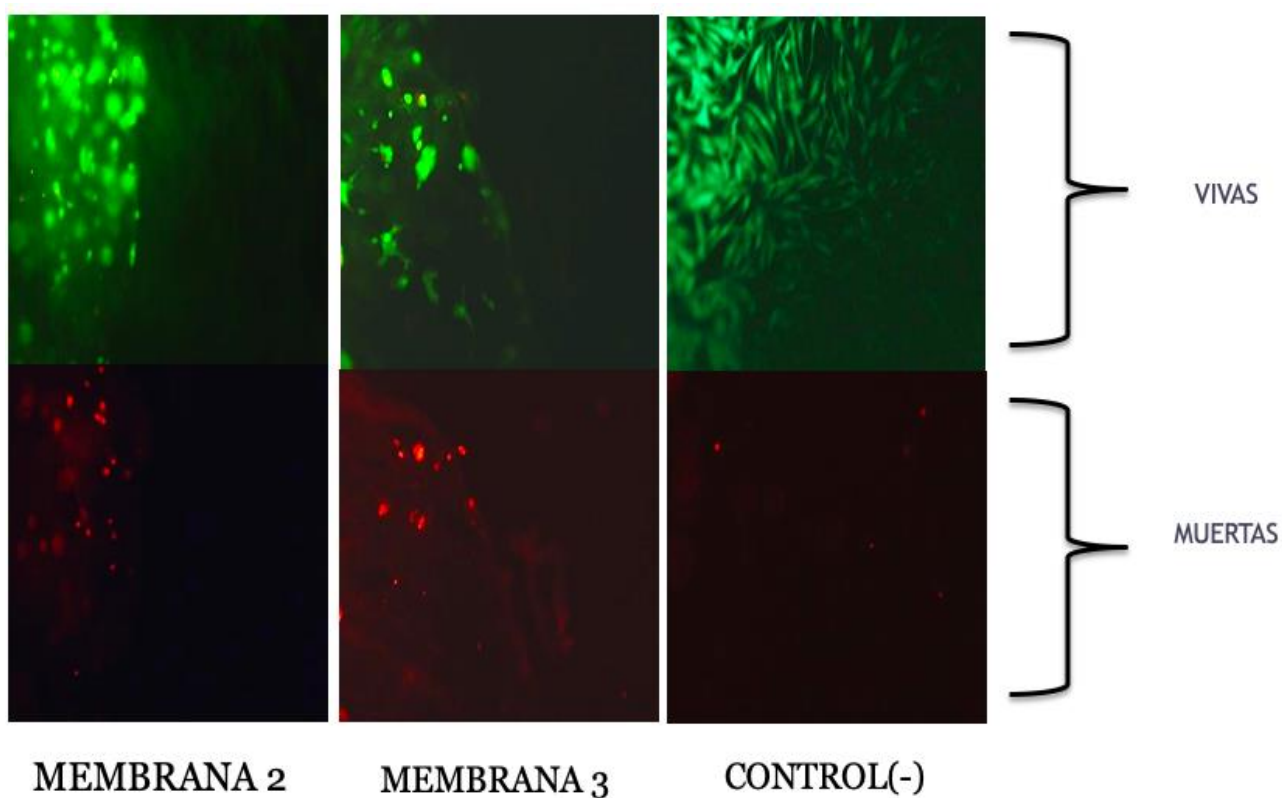


Figura 21. Inmunohistoquímica de las membranas 2,3 y control.

8. CONCLUSIONES

La biocompatibilidad de las membranas combinadas con el extracto acuoso de *Quercus ilex* con fibroblastos epiteliales humanos son adecuados para su aplicación en estudios *in vivo*. No se tuvo citotoxicidad celular en los fibroblastos epiteliales de la membrana a base de PLA/PVA en combinación *Quercus ilex*. La adhesión celular de fibroblastos epiteliales de la membrana a base de PLA/PVA fueron viables cuando la microestructura tiene una morfología ramificada (ver micrografía de la membrana 2 de la Figura A del Anexo). Así mismo, en el caso de los experimentos con bacterias *E. Coli*, *S. cerevisiae* y *S. aureus*, se encontró que el extracto acuoso de *Quercus ilex* tiene un efecto bacterio-estático tal que inhibe el crecimiento de colonias de bacterias de *E. Coli*, *S.* y *cerevisiae*; mientras que en el caso de *S. aureus* después de 24 hrs este tipo de comportamiento del extracto desaparece, permitiendo la adhesión y crecimiento de las colonias de este tipo de bacteria.

La proliferación celular de fibroblastos epiteliales en la membrana a base de PLA/PVA en combinación *Quercus ilex* resultó ser suficiente para los cultivos y para cumplir con los objetivos *in vitro*. La morfología celular de fibroblastos epiteliales de la membrana a base de PLA/PVA en combinación *Quercus ilex* fueron fusiformes y respondieron adecuadamente a los polímeros. La morfología de la membrana a base de PLA/PVA por efecto de los fibroblastos epiteliales humanos fue creciendo en el cultivo y respondieron favorablemente con el extracto acuoso de *Quercus ilex*. (1)

En el proceso inflamatorio agudo desencadenado por una herida en piel, se desencadena la liberación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, por células mononucleares y polimorfonucleares. Este proceso culmina con la restauración del tejido lesionado, por medio de las tres fases de la cicatrización, sin embargo, con el empleo de biomateriales, como las bio-membranas de

PLA/PVA obtenidas por electrohilado han permitido ser empleadas para la curación de heridas en piel. (1)

La capacidad de los biomateriales ha permitido valorar la reconstitución de tejido en piel, hueso, tejido neural, tejido cardiovascular, etc., debido a la alta frecuencia de incidentes domésticos, industriales o laborales, derrame de líquidos calientes, o llama directa, estas heridas cursaran con el proceso de cicatrización normal, pero la falta de tejido de granulación, entre otras anomalías, puede ocasionar alteración en la restauración del tejido. Por ello, la creación de materiales sintéticos, como los polímeros ácido poliglicólico (PGA), ácido poli L-láctico (PLLA), ácido poliláctico (PLA) y alcohol polivinílico (PVA), permiten ser reabsorbidos o degradados por el cuerpo, algunos de tipo hidrofóbicos o hidrofílicos, que soportan las presiones mecánicas y permiten la degradación, pero es necesaria la construcción de andamios, por la arquitectura porosa interna que permite el crecimiento celular, de hecho, la adición de un grupo metilo, permite al PLA ser más hidrofóbico y se degrada más lentamente que el PGA, resultados que se esperan obtener al finalizar la investigación *in vitro*. (21)

La técnica de electrohilado permite la fabricación de andamios de numerosos polímeros biodegradables, como poli (ϵ -caprolactona), PLA, ácido poliglicólico, y poliuretano, por ello, en esta investigación se empleo para la creación de las membranas de PLA y PVA. (22)

Se ha observado que el empleo de los polímeros de PLA y PVA son más estables, teniendo menor grado de inflamación *in vivo* que otras nanofibras, independientemente de su morfología microscópica, la cristalinidad y el peso molecular, tienen la capacidad de generar reacción desinflamatoria que estimula y acelera la regeneración de algunos tipos de tejidos epiteliales, pero en el caso de que la curación requiere tiempos prolongados. La respuesta inflamatoria crónica no se ve favorecida y su capacidad de ser bioreabsorbible, permite la curación de heridas de manera eficiente. Por ello, al emplear este polímero en la investigación,

aunado a PVA en combinación con extracto acuoso de *Quercus ilex* ha demostrado ser adecuada en los experimentos. (23)

En la investigación de Hajialyani M. (24) han descrito el uso de componentes de plantas para la creación de biomembranas, como alternativa para el proceso de curación de heridas, en función de la variedad de sus componentes activos (flavonoides, aceites esenciales, alcaloides, compuestos fenólicos, terpenoides o ácidos grasos, etc.), enfatizando su bajo costo y la limitación en los efectos adversos y adecuada biodisponibilidad, es por ello, que en esta investigación se empleo el extracto acuoso de *Quercus ilex*.

Con el empleo de plantas medicinales, se deben someter a un proceso de nanoescalamiento o incorporarlas a las nanoestructuras, para valorar el estrés antioxidante, la actividad antiinflamatoria, la angiogénesis, la neovascularización y la reepitelización, en medios de cultivo, métodos que difieren del estudio realizado, al emplear el cultivo primario de fibroblastos epiteliales humano con membranas poliméricas de PLA/PVA con extracto de acuoso de *Quercus ilex* durante 24 horas, teniendo adecuada proliferación celular. (24)

El empleo de plantas como la especie *Quercus infectoria* ha demostrado tener eficacia en la cicatrización de heridas en modelos de escisión, incisión y herida en el espacio muerto con mejora de la resistencia a la tracción, porcentaje de cierre de la herida, epitelización completa y tamaño de la cicatriz, al tener deposición de colágeno y actividad antioxidante, sus frutas mostraron actividad antibacteriana valorados *in vitro*. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos en esta investigación *in vitro* con el extracto de *Quercus ilex*, en los cuales se obtuvo proliferación celular de fibroblastos, sin toxicidad, adecuada adhesión celular y posteriormente será realizada la investigación *in vivo*. (25)

Los polímeros sintéticos permiten la epitelización, con o sin injerto epidérmico, al colocar la membranas con componentes naturales, tienen la capacidad de la

regeneración celular, de hecho, el poliuretano ha sido ampliamente estudiado como material para el vendaje de las heridas, sin embargo, en los apósitos para heridas son impermeables a las bacterias y agua, pero está cumpliendo con la características de biocompatibilidad, la degradación, las propiedades mecánicas, la esterilidad y su capacidad de ser excretable y no ser tóxica, similares a los polímeros de PLA y PVA, que se han empleado con fibroblastos humanos para el tratamiento del pie diabético, la malla que se utiliza permite la distribución celular homogénea y soportar la fuerza contráctil, es hidrófoba y tiene adhesión celular limitada. (26)

10. BIOETICA

El avance científico en la época actual se desarrolla a un ritmo vertiginoso gracias a incremento de apoyo económico, humano, y tecnológico, siendo siempre motivado por el afán incansable de proponer nuevos recursos para mejorar las condiciones de vida de las personas. Ramas como biomedicina, farmacéutica, fisiología han impulsado nuevas estrategias que al ámbito médico han favorecido de sobremanera.

Dada la velocidad a la que se desarrollan nuevos proyectos es de suma importancia identificar las herramientas que utilizan los grupos investigadores a lo largo de los últimos años, determinando la importancia de la ética y la inmersión de la responsabilidad social de forma inherente en la misión corporativa como pilar de desarrollo y avance en la mente de los pacientes; Además destacar como los pacientes son beneficiados y perjudicados por estas acciones desarrolladas en aras de aumentar la participación y aumentar las acciones de grandes multinacionales investigadoras a nivel mundial. (27)

La bioética juega un papel crucial en el desarrollo de nuevas tecnologías ya que se debe anteponer el beneficio que éstas traerán a las personas a los beneficios económicos o personales de grupos minoristas, teniendo como base el principio de beneficencia.

Este principio va dirigido al deber de contribuir al bienestar del paciente y se basa en:

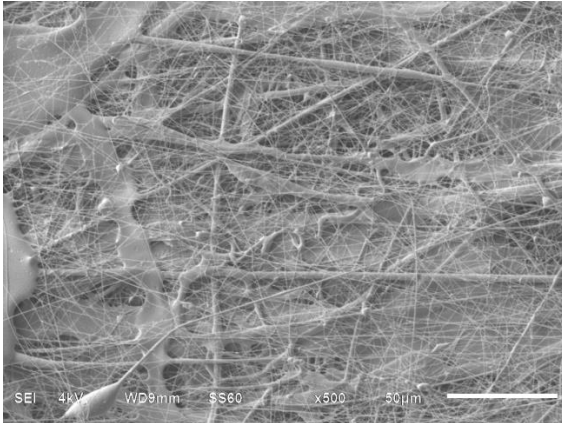
- Prevenir el mal o el daño (maleficencia).
- Contrarrestar el daño.
- Hacer o fomentar el bien.

Se fundamenta en la confianza mutua entre médicos y pacientes de que la actuación a desarrollar vaya dirigida en pro de los mejores intereses mutuos y a no

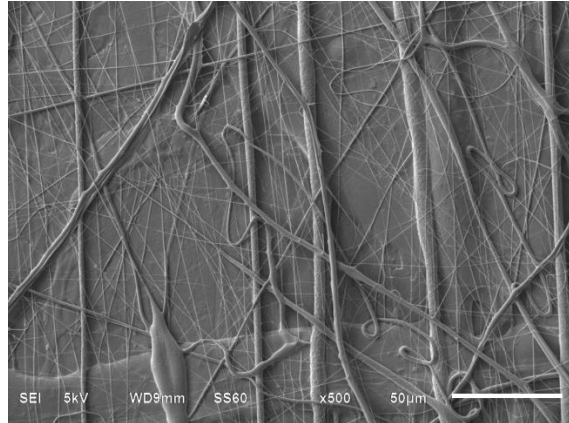
hacer daño, a menos que el mismo esté intrínsecamente relacionado con el beneficio por alcanzar en el paciente. (28).

11. ANEXO

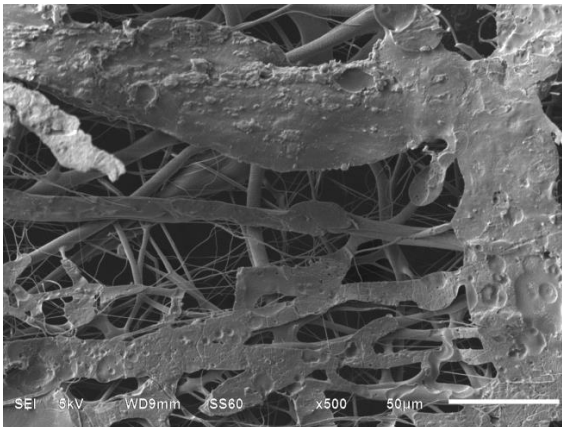
Membrana 1



Membrana 2



Membrana 3



Grosor de la membrana 1 y 2

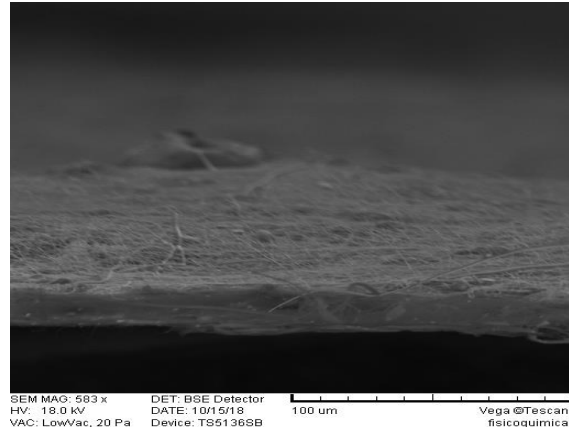


Figura A. Tres tipos de morfologías diferentes de la microestructura de las membranas de PLA/PVA y cuyo grosor se encuentra en un rango de 300 micras a 400 micras, las cuales fueron empleadas en el experimento *in vitro* para evaluar su citotoxicidad.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Emilio Decinti Wiess. (2008) "*Bases de la Medicina Clínica*", de Universidad de Chile Facultad de Medicina, Sitio Web: http://www.basesmedicina.cl/cirugia/16_1_heridas/16_1_heridas.pdf
2. F. Charles Brunicardi, Dana k. Andersen, Timothy R. Billiar, David L. Dunn, John G. Hunter, Raphael E. Pollock. (2011). "*Tema 8 Cicatrización de Heridas*". Schwartz Principios de Cirugía. México, D. F.: Mc Graw-Hill.
3. Ramírez Hernández G. Fisiología de la cicatrización cutánea. RFS [Internet]. 22may2015 69-8. Available from: <https://www.journalusco.edu.co/index.php/rfs/article/view/57>
4. Gonzalez Mendoza Oswaldo. (2017) "Comparación de dos poblaciones defibroblastos *in vitro* y sobre un andamio a base de amnios humano radioesterilizado mediante técnicas de ingeniería de tejidos". Licenciatura. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
5. José Martínez Fraga. (2011) *Tema 4: Anatomía y Fisiología de la Piel*.
6. A. M. Almonacid, M. E. Londoño, C. Gartner and C. E. Echeverri, "*Obtención y caracterización de soportes de alcohol polivinílico y quitosano para cultivo celular*", Revista Colombiana de Materiales, no. 5, pp. 1-7, 2014.
7. Labeaga Viteri, Aitziber. (2018). "*Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones*" Master Thesis, Universidad Nacional de Educación a Distancia (España). Facultad de Ciencias. Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química.
8. FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives
9. Romero, S. Juan, D. (2014). "*Síntesis y estudio óptico, estructural y térmico de membranas de polyvinyl alcohol (PVA) dopadas con dióxido de titanio (TiO₂)*". 2018, de Universidad Nacional de Colombia. Sitio web: <http://bdigital.unal.edu.co/48016/1/1053798143.2014.pdf>
10. Pichón, S. (2017) "*Diseño y fabricación de un equipo de electrohilado: elaboración de fibras nano-métricas y micrométricas de materiales*

poliméricos y compósitos". Colegio de Ingeniería en Materiales. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

11. Nandana Bhardwaj, Subhas C. Kundu. (2010) "*Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*". Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Site web: https://ac.elscdn.com/S0734975010000066/1-s2.0-S0734975010000066main.pdf?tid=5ab3983c-05e2-11e8-b23600000aacb362&acdnat=1517333226_dcea425ee53dc631be51b8cb65400c10
12. Buchko C J, Chen L C, Shen Y, Martin D C. (1999) "*Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films*". Polymer.
13. ROMERO SANCHEZ, H. (2018). "*Efecto de membranas de PLA/PVA obtenidas por electrohilado y extracto acuoso de Quercus ilex en el tratamiento de heridas pos-quirúrgicas en piel de rata de la cepa Wistar*". Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
14. Frey M W, Li L. (2007) "*Electrospinning and Porosity Measurements of Nylon-6/Poly (ethylene oxide) Blended Nonwovens*". Journal of Engineered Fibers and Fabrics (2: 31).
15. Ge J, Raza A, Fen F, Si Y, Li Y, Yu J, Ding B. (2012) "*Mechanically Robust Polyurethane Microfibrous Membranes Exhibiting High Air Permeability*". Journal of Fiber Bioengineering & Informatics (5: 411).
16. Meng Z X, Zheng W, Li L, Zheng Y F. (2010). Fabrication and characterization of threedimensional nanofiber membrane of PCL-MWCNTs by electrospinning. Materials Science and Engineering C.
17. Noorpoor A R, Sadighzadeh A, Anvari A. (2014) "*Effect of Nylon-6 Concentration on Morphology and Efficiency of Nanofibrous Media*". Int J Environ Res (8: 421).
18. Zhang L, Liu L G, Pan F L, Wang D F, Pan Z J. (2012). "*Effects of Heat Treatment on the Morphology and Performance of PSU Electrospun Nanofibrous Membrane*". Journal of Engineered Fibers and Fabrics.

19. Aguilar A., Camacho J.R., Chino S., Jacquez P, y López M.E. 1994^a. *“Herbolario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social: Información Etnobotánica”*. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.
20. Cárdenas García M, Perea González GP, Pardo Ruiz P, Rodríguez García JE, Toxqui Merchant LE, Niño Flores AA, Estrada Esquivel B (2014) *“Wound healing effect of aqueous extract of Quercus ilex”*, Ind. J. Appl. Res. 4 (4) 474-475
21. Colorado AC, Agudelo CA, Moncada ME. (2013) *Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión*. Revista Ingeniería Biomédica, 7(14):11-23.
22. Sánchez Cepeda AP, Vera Graziano R, Muñoz-Prieto EJ, Gómez Pachón EY, Bernad Bernade MJ, Maciel Cerda A. (2016). *Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina*. Ciencia en Desarrollo, 7(2):133-151.
23. Ishii D, Hui Ying T, Yamaoka T, Iwata T. (2009). *Characterization and Biocompatibility of Biopolyester Nanofibers*. Materials, 2(1):1520-1546.
24. Hajjalyani M, Tewari D, Sobarzo Sánchez E, Nabavi SM, Hosein Farzaei M, Abdollahi M. (2018) *Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes: therapeutic targets and drug delivery systems*. International Journal of Nanomedicine, 13 5023–5043
25. Hosein Farzaei M, Abbasabadi Z, Shams Ardekani MR, Abdollahi M, Rahimi R. (2014) *A Comprehensive Review of Plants and Their Active Constituents With Wound Healing Activity in Traditional Iranian Medicine*. WOUNDS, 26(7):197-206
26. Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT. (2010). *Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal construction*. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2(1):510-525.
27. AGUDELO, Y. (2017). *“La ética ligada a la responsabilidad social dentro del sector de la industria farmacéutica”*. Universidad Militar Nueva Granada
Sitio web: <https://hdl.handle.net/10654/16828>

28. Salas Perea, Ramón S. (1996). *“Principios y enfoque bioéticos en la Educación Médica Cubana”*. Educación Médica Superior, 10(1), 7-8. Recuperado en 23 de mayo de 2018
29. Abel Archundia García (2011). *“Tema 4: Proceso de curación de heridas.”* Cirugía 1: Educación quirúrgica (39-57). México, D.F. Mc Graw Hill interamericana.
30. Allan Gerald Arthur Coombes, Eric Frank Adams, Niann- Tzzy DAI, Tsung-Hsun Liu, Ming-Kung Yeh (2006) National Defense Medical Center Patentes US8097274B2.
31. Baiguera S, Gaudio CD, Lucatelli E, Kuevda E, Boieri M, Mazzanti B, Bianco A, Macchiarini P. (2014) *“Electrospun gelatina andamios que incorporan rata descelularizada matriz extracelular del cerebro para la ingeniería del tejido neural”*. Biomateriales; (35: 1205).
32. Ballarin., Florencia Montini, Tornello., Cortez P., Abraham, A. (2015) *“Biomateriales aplicados en desenvolvimiento de sistemas terapéuticos avanzados”*, Universidad de Coimbra.
33. CASSIO LUISELLI FERNANDEZ, ERNESTO ENRIQUEZ RUBIO. (1999). NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. 1993, de Comité Consultivo Nacional de Normalización, de Regulación y Fomento Sanitario Sitio web: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>.
34. Cesar Eduardo Montalvo Arenas, Francisco Pasos Nájera, Ricardo Hernández Trujillo (2010) *“Sistema Tegumentario: Piel Anexos (Faneras)”*, Universidad Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y Tisular. Sitio web: http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apunt es/Sistema-tegumentario.pdf
35. Davide Bellini, Albignasego, Lanfranco Callegaro, Marie Astier, Fabio Giusti, La Briglia-Vaiano (2011) *“BIOMATERIALS, THEIR PREPARATION BY ELECTROSPINNING AND THEIR USE IN THE BIOMEDICAL AND*

SURGICAL FIELD”, de ANIKA Therapeutics S. r. l. Sitio web: https://www.researchgate.net/publication/302790791_Biomaterials_their_preparation_by_electrospinning_and_their_use_in_the_biomedical_and_surgical_field/fulltext/57b3175208ae030fe246c2c3/302790791_Biomaterials_their_preparation_by_electrospinning_and_their_use_in_the_biomedical_and_surgical_field.pdf?origin=publication_detail.

36. Don W. Fawcett. M. D., Ronald P. Jensch, Ph. D. (1995) *“Tema 14 Piel”*. Compendio de Histología Bloom-Fawcett (175-186). Madrid: Graw-Hill Interamericana.
37. Ebrahimi Akram, Khayami Masoud., Nejati Vahid (2012) *“Evaluation of the antibacterial and wound healing activity of Quercus pérsica”*. Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran., Journal of Basic & Applied Sciences, 118-123 Fitzpatrick TB, Freedberg A. *Dermatology in General Medicine*. New York: McGraw-Hill Medical Publications, 2003. 2594 p.
38. Gibson M, Beachley V, Coburn J, Bandinelli PA, Mao HQ, Elisseeff J. (2014) *“Tejido matriz extracelular Presentación de nanopartículas en nanofibras electrospun”*. BioMed Research International; (69120). Acceso abierto.
39. González Escobar, Raimara. (2002). *“Modelos experimentales para la evaluación de la acción cicatrizante de medicamentos”*. Revista Cubana de Farmacia, 36(3), 189-196.
40. Goyal R, Vega ME, Pastino AK, Singh S, Guvendiren M, Kohn J, Murthy NS, Schwarzbauer J E. *“Desarrollo de andamios híbridos con matriz extracelular natural depositada en fibras sintéticas poliméricas”*. Revista de Investigación de Materiales Biomédicos Parte A 2017.
41. IMAGE J (Schneider, CA; Rasband, Ws y Eliceri. Kw 2012 NIH Image to IMAGE J: 25 años de análisis de imágenes Nature methods a (7) CG71.675 PMIN.
42. Julio Sepúlveda Saavedra; *Texto de Histología, biología celular y tisular*, 2e www.accessmedica.com McGraw-Hill. Education.

43. Martínez Dubois. Salvador 2013 “*Cirugía; Bases del conocimiento quirúrgico y apoyo en trauma*”. Editorial, McGraw-Hill. 5ta. Edición.
44. Muñoz Rodríguez Ana., Ballesteros Ubeda María., Escanciano Pérez Inmaculada. (2011) “Manual de protocolos y procedimientos en el cuidado de las heridas”. Hospital Universitario de Móstoles. Madrid.
45. Paul Hartmann A/S Productos, Tratamiento y Cuidado de heridas (2018) sitio Web: www.hartmann.info/es-ES/our-products/Tratamiento-de-heridas.
46. Perea-González GP, Cárdenas-García M, Campos-Méndez M, Estrada-Esquivel B, Vega-Galina J and Quítil-Reyes L (2013) “ *Quercus ilex* mouthwash effect on pH, flow and salivary proteins of geriatric patients”. J. App. Res.
47. PEREZ LABRADA, Marianela y COBOS, Yaremis. Queloides. Rev. Act. Clin. Med [online]. 2012, vol.16 [citado 2018-04-26], pp. 751-754. Disponible en:
<http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S230437682012000100001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2304-3768.
48. Rafael Botella Estrada, Onofre Sanmartín Jiménez. Manual Janssen (1996) Enfermedades de la piel. Carlos Guillén Barona, Masson S.A, pág. 278-279.
49. Ramírez Herrera, Rocío. Soto Ruiz, Norma (2017) Estudios Pre-clínicos y clínico, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios/ Gobierno Federal México. Extraído el 04-05-2018 sitio web: <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/ESTRUCTURA%20DE%20EXPEDIENTES/11%20ESTUDIOS%20PRE%20Y%20CLINICOS.pdf>
50. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Última reforma publicada DOF 02-04-2014)
51. Roa G, Ricardo, Las Heras F, Rocío, Piñeros B, José L, Correa S, Gerardo, Norambuena B, Hernán, & Marré N, Diego. (2011). “*Contractura axilar por quemadura tratada con Integra®*”. Revista chilena de cirugía, 63(3), 276-279. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-40262011000300007>.

52. Robles, M., Rodríguez, F., Maques E., Barrera, A., Aguilar, J., Del Toro, C. (2014) *“Aplicaciones biomédicas, textiles y alimentarias de nanoestructuras elaboradas por electrohilado”*. Departamento de Ciencias Médicas y de la Vida, Departamento de Ciencias Tecnológicas, Departamento de Ciencias Básicas, Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara. Ocotlán, Jalisco, México. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora, Sonora, México (Vol. XVI Num.2).
53. Ron Sostek (2013) Synthetic Scaffolds, Harvard Apparatus Regenerative Technology Patents W02014110300A1.
54. Seung Jin Lee, Sol Han, In Kyong Shim (2005) *“Fibrous 3-dimensional scaffold via electrospinning for tissue regeneration and method for preparing the same”*. Ewha University-Industry Collaboration Foundation. Patentes EP1917048A1.
55. Seyed Babak Mahjour, Hungjun. Wonag (2011) *“Creation of hair follicles in tissueengineered skin grafts”*. Stevens Institute of Technology. Patents US20120276.
56. Uceró, C. T.; Acosta, Y.; Montero, M. (2014) *“Fibroblasto: célula fundamental en la salud y en la enfermedad periodontal”*. *Acta odontológica venezolana*.