

## EFECTO DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE ESTERILLAS NO TEJIDAS DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) SOBRE LA ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR

William H. Gazzola, Ryan L. Hammonds, Roberto S. Benson\*

Departamento de Ciencias e Ingeniería de Materiales, The Universidad de Tennessee, Knoxville, TN 37996. 404 Ferris Hall, Department of Materials Science and Engineering, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996–2100

Recibido: Marzo 2013; Aceptado: Febrero 2014

### RESUMEN

Una serie de muestras de esterillas no tejidas degradables de poli(ácido láctico) (PAL) fueron investigados para su posible uso como andamios para aplicaciones de regeneración de tejidos. Estas esterillas de PAL no tejidas se prepararon usando el proceso de soplado en fusión. La variación en las propiedades (tamaño de poro, la conectividad de los poros, y resistencia a la tracción) se obtuvo mediante el uso de matrices con orificios de dimensiones en nano y micrometros más los cambios en los parámetros de procesamiento, tales como el flujo de aire y la distancia entre la de matriz y colector. Las células sembradas en esterillas de PAL no tejidas con micro y nanofibras exhibieron diferencias sorprendentes en términos de adhesión y proliferación celular. Las esterillas de PAL no tejidas de nanofibras mostraron migración celular uniforme sobre su superficie. Propagación celular sobre esterillas de PAL no tejidas de microfibra era desigual e influenciada por la proximidad de las fibras, uniones fibra–fibra, y los puntos de cruce. Profundidad de penetración de la células en las esterillas de PAL no tejidas con microfibra es cualitativamente más profundo que en las muestras de PAL no tejidas con nanofibras.

**Palabras clave:** Poli(ácido láctico), derretir–soplado, no tejido, nano y micro fibra, las células del melanoma

### ABSTRACT

A series of degradable PLA nonwoven samples were investigated for potential use as scaffolds for tissue regeneration applications. These nonwoven samples were prepared using the meltblowing process. Variation in properties (pore size, pore connectivity, and tensile strength) was obtained by using nano and micro dies plus changes in the processing parameters, such as airflow and die to collector distance. Cells seeded on PLA micro and nanofiber nonwovens exhibited striking differences in terms of cell adhesion and proliferation. The PLA nanofiber nonwovens showed uniform cell migration over the surface. Cell spreading on PLA microfiber nonwovens was uneven and influenced by the proximity of the fibers, fiber–fiber junctions, and cross points. Cell penetration depth into PLA nonwoven microfiber samples is qualitatively deeper than into PLA nonwoven samples with nanofibers.

**Keywords:** Polylactic acid, melt–blowing, nonwoven, nano and microfiber, melanoma cells

### INTRODUCCIÓN

El uso de aloinjertos, xenoinjertos, autoinjertos o dispositivos biomédicos implantables son métodos comunes para reparar tejidos dañados. Estos métodos han resultado en éxito limitado debido al pequeño número de donantes, las preocupaciones con la posible transmisión de infecciones, la pobre integración del tejido, e incluso de rechazo por el huésped. Para combatir estos obstáculos, los investigadores se han embarcado en el uso de la ingeniería tisular. Este enfoque es la búsqueda de materiales nuevos con propiedades similares a los tejidos biológicos naturales del huésped que puedan recrear o imitar las funciones del tejido dañado [1]. Los pasos básicos en el uso del enfoque de la ingeniería tisular implica la creación de un soporte (andamio) poroso, el cultivo de

células in vitro, y la siembra de las células sobre el andamio para su crecimiento y la proliferación. El andamio con células se implanta en la zona dañada del huésped y paulatinamente se reabsorbe durante la fase de la proliferación celular así logrando la regeneración del tejido dañado. Así, los andamios sirven como un soporte, vehículo o la matriz para facilitar la migración de las células y compuestos bioactivos para promover la regeneración de los tejidos [2]. Para que un andamio tenga éxito, debe exhibir biocompatibilidad, bioresorbability, la porosidad adecuada con interconectividad de los poros, una rata de degradación apropiada, propiedades mecánicas similares al tejido biológico del huésped, una superficie que promueve la adhesión celular, el crecimiento, la proliferación y producción de sustancias extracelular.

En el presente estudio, las esterillas se fabricaron a partir del polí(ácido láctico) (PAL), un polímero biodegradable que se degrada en monómeros de ácido láctico normalmente presente en el músculo después de ejercicio vigoroso. Por lo tanto, los productos de degradación de un andamio de PAL implantado puede ser excretada de manera segura fuera del huésped por sus propios caminos metabólicos naturales.

Las esterillas de PAL se formaron mediante un proceso de soplado en fusión que permite la formación de materiales con fibras no tejidas. Soplado en fusión es un proceso de una etapa que convierte el polímero sólido directamente en fibras. El patrón no tejido de las fibras en la esterilla es el resultado de enmarañamiento de las fibras que se produce cerca de la salida de la matriz con la ayuda de dos corrientes de aire calientes que emanan desde arriba y por debajo de la cara de la matriz. Las fibras de polímero fundido son tomadas por el aire caliente forzado y depositados sobre un colector. Durante la travesia desde la matriz al colector, la fuerza de arrastre creada por el aire a alta velocidad atenúa rápidamente las fibras de polímero. Al salir de la matriz, las fibras se mueven hacia el colector en las tres direcciones x, y, z. Estos movimientos conducen a enredos de las fibra cerca de la salida de la matriz y facilitan la formación de la estructura no tejida adecuada para su uso como un andamio [3]. Las características estructurales (porosidad, la conectividad de los poros, diámetro de las fibras, y modulo de elasticidad) de esterillas con fibras no tejidas son críticos para el éxito entorno a la crianza de las células porque la colonización celular depende tanto de la química de superficie como las propiedades físicas de las esterillas. La porosidad del andamio afecta directamente el transporte de nutrientes a las células y la eliminación de productos de desecho. Además, la proliferación uniforme de las células en un andamio es controlada por el tamaño de los poros y la conectividad de las mismas [1]. La ventaja de utilizar esterillas no tejidas como andamiaje es la facilidad de la modificación de sus propiedades mediante la variación de los

parámetros de procesamiento.

El objetivo de este estudio es de establecer una relación entre los parámetros de procesamiento usados para generar las propiedades de esterillas no tejidas y la respuesta biológica en términos de adhesión y proliferación celular. Los parámetros de procesamiento como la presión del aire y la distancia entre la cara de la matriz y colector (DMC) se variaron en este estudio para producir cambios en la porosidad, diámetro de fibra, y el espesor de las esterillas de PAL. Los cambios en las propiedades físicas y mecánicas de las esterillas de PAL se correlacionarán con la adhesión y proliferación celular.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

**Materiales.** El polí(ácido láctico) (PAL) utilizado en este estudio fue *Inego<sup>TM</sup>* biopolímero 6252D, adquirido de *NatureWorks<sup>®</sup>* (Minnesota, USA.). El peso molecular promedio de PAL es aproximadamente  $35.485 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Antes del procesamiento, los gránulos de PAL se secaron a  $80^\circ\text{C}$  durante 4 horas a vacío, para eliminar la humedad.

**Proceso de soplado en estado fundido.** Soplado en fusión se llevó a cabo en una línea de 15,24 cm (6 pulgadas) y las esterillas fueron generados utilizando matrices con micro (*Exxon-Mobil, Texas, EE.UU.*) y nano (*Arthur G. Russell Co., Connecticut, EE.UU.*) dimensiones en el proceso. El proceso de soplado en fusión se llevó a cabo con PAL sin la ayuda de ningún tipo de aditivos o estabilizantes. La extrusión de la PAL se realizó usando una extrusora de doble tornillo (*Haake Inc. New Jersey, USA*) en atmósfera de nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) a fin de evitar degradación termo-oxidativa del polímero durante el procesamiento. Muestras de esterillas de PAL se recogieron en un tambor giratorio ( $4 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ ) con un peso base constante de  $20 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ . Las esterillas no tejidas fueron producidos mediante la variación de las tasas de flujo de aire entre  $1$  y  $35 \text{ m}^3\cdot\text{min}^{-1}$  y distancias de la matriz al colector (DMC) de  $0,10$ ,  $0,30$ , y  $0,50 \text{ m}$ .

**La siembra de la célula en esterillas de PAL no tejidas.** Cuatro muestras de esterillas de PAL no tejidas basado en el diámetro de las fibras, tamaño de poro, y módulo de tracción fueron seleccionados para la siembra utilizando células malignas (A375) de melanoma humana, generosamente proporcionado por el *Centro de Biotecnología Ambiental de la Universidad de Tennessee*. Antes de la siembra, las muestras se sumergieron en medio RPMI 1640 que contiene 1% de suero fetal bovino y 10% penicilina estreptomicina durante 48 horas para asegurar la saturación completa. Un hemocitómetro *Neubauer* fue utilizado para determinar la densidad de células para la siembra. Las células se tiñeron con azul de tripreno antes de obtener el recuento de células. Las

esterillas de PAL no tejidas se cortaron para encajar cómodamente en una placa de 24 pocillos antes de la siembra de las células para asegurar que las muestras no flotarían durante el periodo de incubación. Se sembró duplicados de cada muestra con 250.000 células. Las muestras se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Después que se completó el ciclo de incubación, las células para el análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) fueron fijadas con 4% de paraformaldehído durante 10–15 minutos cada uno y se lavó tres veces con una solución de salina tamponada con fosfato. Las esterillas de PAL no tejidas usadas para microscopía confocal no se trataron con paraformaldehído, pero en su lugar se tiñeron con 2 mL de calceína AM a una concentración de 0,5  $\mu$ L·mL<sup>-1</sup> durante 30 minutos. Después de la tinción, las esterillas no tejidas con células depositadas se transfirieron a portaobjetos de microscopio óptico y se fijaron con 3 gotas de *Prolong® Media* oro con el fin de eliminar las burbujas de aire residuales.

**Determinación del tamaño de poro.** Tamaños de los poros para cada esterilla de PAL no tejida se determinaron utilizando un porómetro de flujo capilar, modelo CFP-1100-AEX (*Materiales Porosos Inc.*). Se seleccionaron muestras de tres distintas áreas de la esterilla de PAL no tejida y se ensayaron para la porosidad. El tamaño medio de poro y distribución del tamaño de poro para cada muestra de esterilla se determinó mediante la combinación de los valores de todos los tamaños de poro medidos en las diferentes ubicaciones y se creó de un histograma usando el programa *JMP® Pro 10.0.0 (SAS Institute Inc.)*.

**Prueba de resistencia a la tracción.** La prueba para determinar la resistencia a la tracción de las esterillas de PAL se realizó de acuerdo con la norma ASTM D5035–06 para determinar los módulos de tracción en la dirección paralela y perpendicular a la máquina. Un máquina de tracción, *Modelo Unidos SSTM-1-E-PC* equipado con células de carga de 4,5 kg (10 lb) y precisión de  $\pm 1\%$ , se utilizó para realizar las pruebas a una velocidad de cruceta de 30,48 cm/min (12 pulgadas/min). La dimensión de cada muestra para la prueba fue de 12,7 cm·2,54 cm (5 pulgadas por 1 pulgada). La prueba total consistió en ocho muestras de la dirección perpendicular y cinco muestras en la dirección paralela a la máquina. Cada muestra se colocó en las mordazas de la máquina y el ensayo comenzó con una longitud de calibre de 7,6 cm (3 pulgadas) y terminó con la rotura.

**Microscopía electrónica de barrido (MEB).** Microscopía electrónica de barrido (MEB) se utilizó para determinar el diámetro de las fibras, la adhesión y la proliferación celular en las esterillas de PAL no tejidas. Un *MEB Leo1525*, equipado con programa *Zeiss SmartSEM*, se utilizó para adquirir micrografías de las esterillas de PAL no tejidas para luego determinar el diámetro de las fibras. Antes del análisis, las esterillas de PAL no tejidas fueron fijados a una estructura de

aluminio con cinta de carbono y recubierto con oro durante 20 segundos en un ambiente de argón, usando dos ráfagas de 10 segundos a 20 miliamperios. El MEB se operó entre 2–5 KeV y las micrografías se obtuvieron utilizando tanto el detector SE2 como el detector en-lente. Para la determinación del diámetro promedio de las fibras de las esterillas PAL se obtuvieron tomando aproximadamente 100 medidas de diámetros de distintas áreas de cada muestra. El programa ImageJ (versión 1.45s, *Wayne Rasband–Instituto Nacional de Salud, USA*) se utilizó para medir el diámetro de las fibras en las micrografías. El programa JMP se utilizó para crear histogramas de diámetros de las fibras con el fin de obtener valores promedios de las fibras. Los andamios sembrados con células fueron observados de manera similar, utilizando un voltaje bajo para adquirir la imagen después de la aplicación de un recubrimiento de oro por un total de 20 segundos a 20 miliamperios.

**Microscopía confocal.** Microscopía confocal se realizó para observar la profundidad de penetración celular en el interior de las esterillas de PAL no tejidas. Un microscopio confocal láser *Leica TCS SP2* (*Leica Microsystems*) equipado con programa *Confocal Leica* se utilizó para realizar el estudio. Las células fueron depositadas en la superficie de las esterillas y su nivel de penetración se cuantificó mediante observaciones a distintos planos dentro de las esterillas de PAL. La colección de datos de barridos confocales en función de la profundidad se descontinuo cuando no se podían detectar visualmente la fluorescencia.

## RESULTADOS

**PAL Nonwoven propiedades físicas.** Los tamaños promedios de los poros de las esterillas de PAL no tejidas compuestas por micro y nano fibras están representados en la Figura 1. El tamaño promedio de los poros disminuye para ambos grupos con un incremento del flujo de aire primario. Dentro de grupos específico, esterillas de PAL no tejidas con nano o microfibras, el tamaño promedio de los poros incrementa con aumentos en las tasas de flujo de aire y DMC. El tamaño promedio de poro para las esterillas de PAL no tejidas es mayor con microfibra que el determinado para esterillas de PAL no tejidas con nanofibras.

Si bien la magnitud de tamaño de poro depende del tipo de matriz, la tendencia es de reducir el tamaño de poro con mayor flujo de aire independiente a la matriz que se use. Además, cuando la distancia entre la matriz y el colector (DMC) se incrementó desde 0,10 hasta 0,50 m, se observó una reducción en el tamaño de poro para ambas matrices.

Cuatro esterillas de PAL fueron seleccionados para su uso en los estudios de adhesión y

proliferación celular. Las propiedades físicas y mecánicas de estas cuatro esterillas (Tabla 1) incluye diámetro de las fibras, tamaño de poro con sus valores promedio y la desviación estándar y los módulos de tracción para las direcciones paralelas y perpendicular a la máquina.

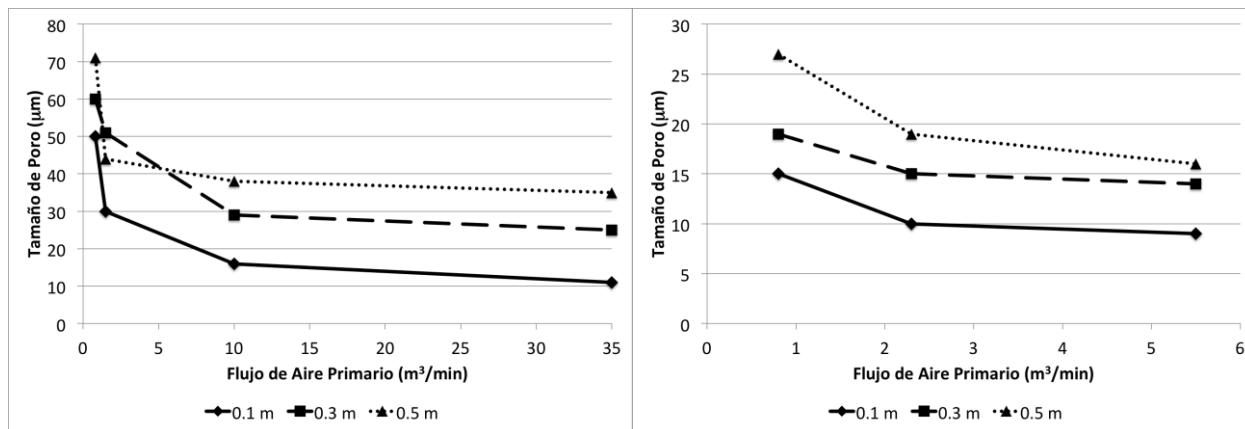


Figura 1. Tamaño de poro frente al flujo de aire Tasa. La variación del tamaño de los poros en esterillas de PAL con microfibra (Izquierda) y nanofibra (Derecha).

Tabla 1: Propiedades físicas de esterillas de PAL no tejidas. Esta tabla identifica las esterillas y sus propiedades utilizadas para estudios con células de melanoma.

Designación (Flujo de Aire, MDC)	Matriz	Diámetro de Fibra	Diámetro de Poro	Módulo de Tracción	
				Máquina (kPa)	Transverso (kPa)
1.5 m <sup>3</sup> /min, 0.3 m	Micrón	7.02±3.07 μm	51±13.3 μm	109	178
1.5 m <sup>3</sup> /min, 0.5 m	Micrón	6.72±2.53 μm	44±16.2 μm	41	99
0.8 m <sup>3</sup> /min, 0.3 m	Nano	818±492 nm	19±4.2 μm	157	141
0.8 m <sup>3</sup> /min, 0.5 m	Nano	518±277 nm	27±10.6 μm	99	84

**Observación de células individuales y láminas celulares.** La adhesión de las células a las esterillas de PAL no tejidas, después de 24 horas de cultivo celular, se presentan en la Figura 2. Las micrografías de MEB se obtuvieron para esterillas de PAL no tejidas con células sembradas para examinar interacciones entre las fibras y células individuales así como las interacciones de colonias celulares después de 24 horas de cultivo celular. Las Figuras 2A y 2B muestran el efecto del diámetro de las microfibra sobre la morfología y el desplazamiento de las células. Figuras 2C y 2F muestran la interacción de células individuales con nanofibras. El aislamiento de una célula en una nanofibra induce a la célula a asumir una morfología redondeada (Figura D), pero la presencia de fibras adyacentes induce a la célula a desplazarse hacia las fibras vecinas (Figura C), en ciertos casos el desplazamiento es a lo largo del eje de la fibra (Figura E), o la propagación con la ayuda de

fibras adyacentes (Figura F).

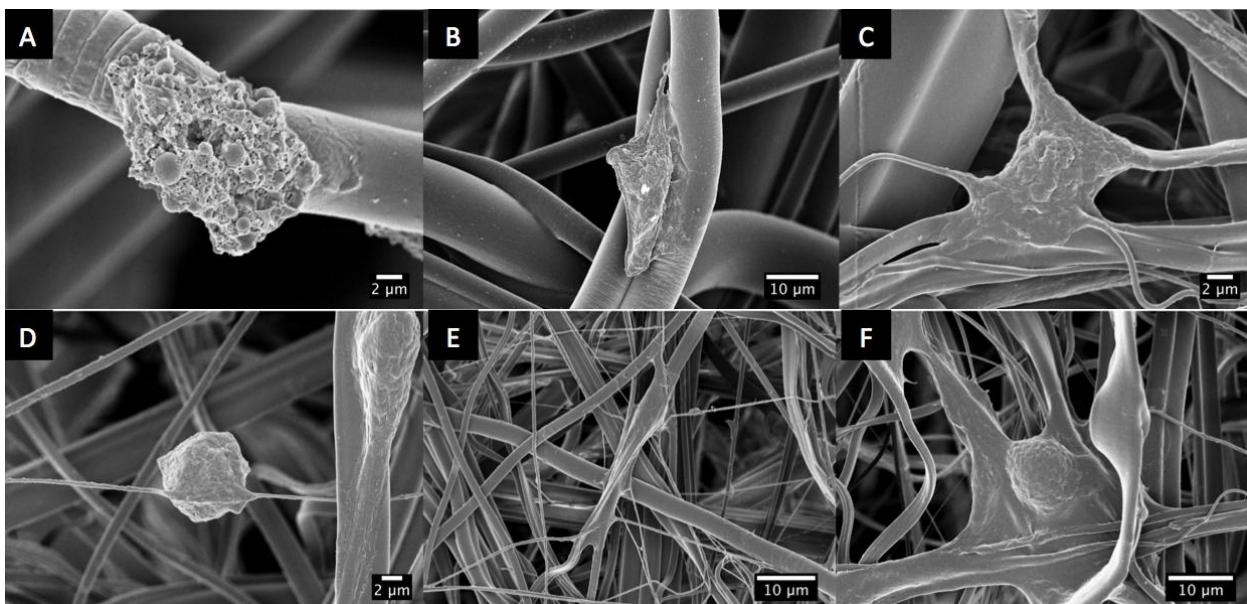


Figura 2. Se puede visualizar el efecto del diámetro de las microfibras sobre la morfología y desplazamiento de las células individuales. Células individuales en microfibras (A y B) y nanofibras (C y F).

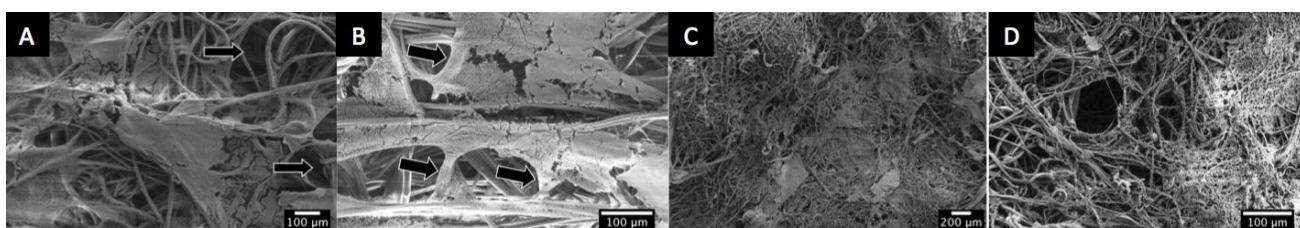


Figura 3. Las colonias celulares en esterillas de PAL no tejidas. Colonias de células sembradas en PAL no tejidas con microfibras (A y B) y PAL no tejidas con nanofibras (C y D). Las esterillas de PAL no tejidas con microfibras fueron procesados con una tasa de flujo de aire primario de  $1,5 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ , recogida en DMC de 0,50 m. Esterillas de PAL no tejidas con nanofibras fueron procesados con una tasa de flujo de aire primario de  $0,8 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ , recogidas en DMC de 0,50 m.

El efecto de la porosidad en la migración celular se muestra en la Figura 3 para esterillas de PAL no tejidas con microfibras en la Figura 3A y B y nanofibras en las Figuras 3C y 3D. La adhesión, proliferación y formación de láminas celulares en estas esterillas de PAL sucedió con sorprendente rapidez durante el periodo de incubación. La formación de láminas celulares completas sobre la superficie con poros grandes exhibió dificultades por la falta de puntos de apoyo para el desplazamiento celular. La flecha en la Figura 3A muestra estas áreas. Mientras que las células tienden a usar las fibras como guías direccionales, la Figura 3B muestra células usando fibras que cruzan como puentes a otras fibras para circunvalar los poros, indicadas por las flechas. La Figura 3C muestra la colonización celular densa en una esterilla de PAL no tejida de nanofibras.

Esta colonización se produce sin preferencia direccional y los datos para apoyar esta observación se presentarán más adelante. La Figura 3D muestra una línea límite para la migración celular en torno a un poro de aproximadamente 80 micras.

**Microscopía confocal de esterillas de PAL no tejidas con células sembradas.** La penetración de las células de melanoma sembradas al interior de las esterillas de PAL no tejidas se estudiaron mediante microscopía confocal. La inspección de las superficies planas a distintas profundidades dentro de las esterillas de PAL no tejidas y la formación de un mapa de distribución celular para cada nivel se realizó con un microscopio confocal. La colección de imágenes se iniciaron desde la superficie superior de la esterilla de PAL no tejidas. Las exploraciones consecutivas, obtenidas en incrementos de 5 micras, fueron recopiladas en un solo mapa-z. La distribución celular (mapa-z) basado en la microscopía confocal se obtuvo para las células en cada uno de las esterillas de PAL presentados en la Tabla 1 y se muestran en la Figura 4. Figuras 4A y 4B muestran las células en esterillas de PAL procesados usando la matriz micro a una velocidad de flujo de aire primario de  $1,5 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  y colectados a un DMC de 0,30 y 0,50 m, respectivamente. Las Figuras 4C y 4D muestran las células en esterillas de PAL procesados utilizando el matriz nano a una tasa de flujo de aire primario de  $0,8 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  y recogidas a DMC de 0,30 y 0,50 m, respectivamente.

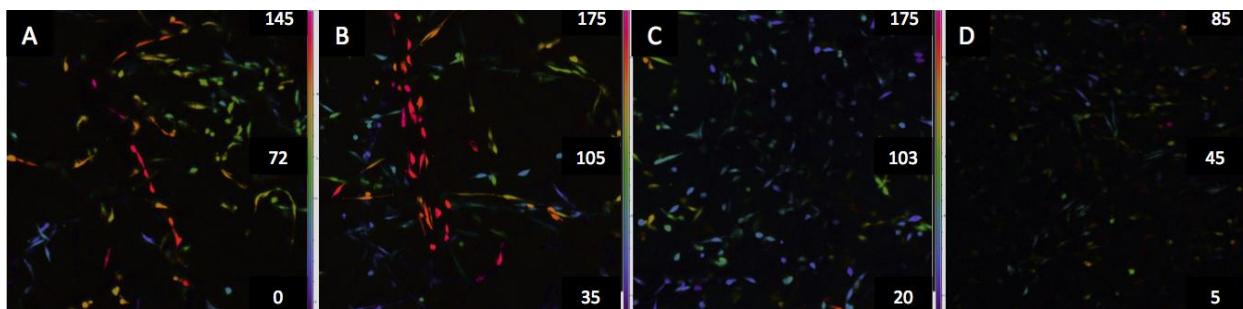


Figura 4. Perfil de profundidad confocal usando mapa z. Las imágenes son a partir de la superficie superior en la mayor parte de células sembradas en esterillas de PAL microfibra no tejidas producida usando una tasa de flujo de aire de  $1,5 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ , y recogidas a distancias de 0,30 m (A) y 0,50 m (B). Las esterillas de PAL nanofibras no tejidas producida usando una tasa de flujo de aire de  $0,8 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ , y recogidas a distancias de 0,30 m (C) y 0,50 m (D). Los valores penetración en las imágenes están en micras.

La penetración celular dentro de las esterillas de PAL no tejidas con microfibras se extiende hasta una profundidad de 145 micras por debajo de la superficie superior en la mayor parte de las esterillas. La mayoría de las células fueron visibles en o cerca de la superficie de las esterillas de PAL, pero en realidad las células se encuentran entre 45–140 micras (Figura 4A). Infiltración celular se incrementa cuando las esterillas se recogieron a 0,50 m. En esta esterillas, las células

fueron capaces de penetrar a aproximadamente 190 micras dentro de las esterillas con la mayoría de las células situadas entre 35–175 micras, Figura 4B.

Las esterillas de PAL no tejidas con nanofibras producida usando una tasa de flujo de aire primario de  $0,8 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  y recogidas a 0,30 m se presenta en la Figura 4C. La inspección de la imagen revela que la migración celular en estas muestras alcanzaron una profundidad de 180 micras, pero la mayoría de las células se encuentra entre las profundidades de 35–100 micras. Las células fueron capaces de penetrar a aproximadamente 90 micras en la mayor parte de la muestras cuando las esterillas se recogieron a 0,50 m. La mayor parte de las células para PAL no tejidas con nanofibras residen entre 30–80 micras vea Figura 4D.

Con el fin de ilustrar la presencia o ausencia de efectos de orientación celulares por las fibras de las esterillas de PAL, las Figuras 4A y 4D se complementaron con imágenes de fluorescencia y micrografías de transmisión de luz de la misma ubicación en la imagen de un mapa-z, que se muestra en la Figura 5. Posiciones celulares sobre las esterillas PAL no tejidas se muestra en las imágenes fluorescentes en las Figuras 5A y 5C. Imágenes ópticas de microscopía de luz de las mismas regiones se presentan en las figuras 5B y 5D. Una comparación de las imágenes de fluorescencia y ópticas indican la presencia de un efecto de orientación celular por las microfibras.

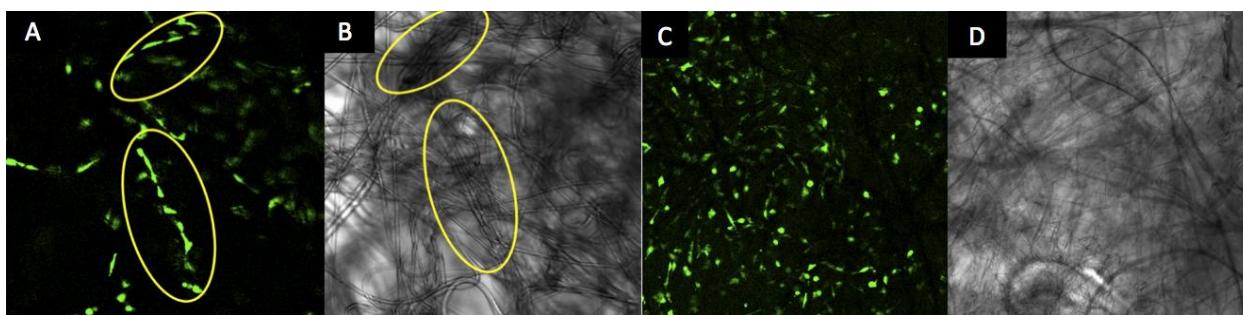


Figura 5. La microscopia de fluorescencia y óptica de las esterillas PAL no tejidas. Imágenes de fluorescencia (5A y 5C) e ópticas (B y D). Comparación de esterillas de PAL con microfibras (A y B) muestran alineación celular a lo largo de las fibras, mientras que las nanofibras (C y D) no presentan este efecto. Esterillas de PAL no tejidas con microfibras producidas usando una tasa de flujo de aire de  $1,5 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-1}$  y DMC de 0,30 m. Esterillas PAL no tejida con nanofibras producidas usando una tasa de flujo de aire de  $0,8 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-1}$ , y DMC de 0,50 m.

## DISCUSIÓN

Cuatro esterillas de PAL no tejidas fueron seleccionados para investigar su potencial para apoyar la adhesión, migración, y penetración celular. El grupo de esterillas de PAL no tejidas seleccionadas fueron escogidas en función del diámetro promedio de fibra, el tamaño promedio de los poros, y módulo de tracción. Durante la fabricación de las esterillas de PAL, el peso base se

mantuvo constante, mientras que la tasa de flujo de aire, DMC, y matriz fueron variadas. La Tabla 1 muestra que incremento de DMC y flujo de aire contribuyen a una reducción en el diámetro promedio de fibras de las esterillas de PAL no tejidas. Esta tendencia se espera por que cuando se aumenta la distancia de colección se le cede más tiempo a las cadenas poliméricas dentro de las fibras para que se efectue la orientación molecular. La posibilidad de la orientación molecular aumenta con el incremento de las tasas de flujo de aire. El diámetro de las fibras afecta la manera que las células sembradas se extendan sobre las esterillas de PAL no tejidas. Se seleccionaron esterillas de PAL no tejidas con microfibras de diámetro promedio de aproximadamente 7 micras, mientras para las esterillas de PAL no tejidas con nanofibras se seleccionaron muestras con diámetro de fibra promedio de aproximadamente 650 nm. La diferencia es significativa e ideal para comparar los efectos del diámetro de las fibras sobre la adhesión y propagación celular.

Cuando la DMC se aumentó de 0,30 a 0,50 m, el diámetro de las fibras y tamaño de los poros se asume a disminuir. El entendimiento común es que mientras se mantenga el peso de base constante, una disminución en el diámetro de las fibras es acompañada por un aumento en el número de fibras fijadas por unidad de superficie a fin de mantener un peso de base constante. Sin embargo, poros con diámetro grandes se observaron con el incremento DMC para las esterillas de PAL con microfibras. Esto se puede explicar por la producción de esterillas más gruesas con el incremento de DMC que resultan de un aumento en el número de fibras por unidad de área.

Andamios de PAL con nanofibras en estudios previos demostraron la capacidad para producir poros con tamaños dentro del intervalo de pocas decenas de micras de diámetro [4]. Otros investigadores han encontrado que la fijación de las células en estos tipos de andamios ocurre bien en la superficie, pero infiltración dentro del andamio está ausente [5]. Adicionalmente, se ha observado que la mayoría de las células no pueden cruzar las lagunas de poros mayores que 300 micras [6]. Usando estos últimos resultados, las esterillas de PAL se seleccionaron con tamaños promedio de poros mayores que aproximadamente 20 micras (el doble del tamaño medio de células de melanoma), pero no mayor a 60 micras, para que las células puedan adherirse a la superficie y utilizar las fibras interiores de los esterillas para atravesar los poros.

La migración de las células epiteliales, las células no cancerosas de melanoma, se ha estudiado tanto individualmente como en láminas de 10–20 células [7, 8]. Las células individuales tienen la capacidad de producir una fuerza de tracción  $30,8 \pm 0,1 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ , mientras que las láminas de células epiteliales pueden producir hasta  $12 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-2}$  en el borde proximal de la migración de clúster cuando se coloca sobre un sustrato con un módulo de al menos 150 kPa. Como este estudio

tiene el propósito elucidar aspectos de la migración celular sobre esterillas de PAL, especialmente la interacción de células epiteliales individuales y la formación de láminas de células epiteliales, el módulo de tracción del sustrato elegido es menor que 150 kPa.

La primera observación a partir del estudio de células es el efecto de las micro y nanofibras de las esterillas de PAL no tejidas sobre la morfología de células individuales. La Figura 2A muestra una célula asumiendo solamente dimensiones similares al diámetro de la fibra sobre la cual está adherido. La propagación de esta célula se efectúa a lo largo del eje de la fibra durante la etapa inicial de la proliferación. Por lo contrario, la Figura 2B muestran una célula adherida a dos fibras adyacentes. Esta célula se propaga a lo largo del eje largo de las fibras, así como a lo ancho de las dos fibras. Esto resulta en un diámetro de célula mayor que el diámetro celular observado en una fibra individual.

Esterillas de PAL no tejidas con nano fibras sembradas con células de melanoma individuales se presentan en la Figuras 2C–2F. La Figura 2C muestra una sola célula adherida a una nanofibra con otras fibras vecinas ubicadas a poca distancia. La célula tiene segmentos distribuidos en todas las direcciones para múltiples puntos de fijación. Sin embargo, la Figura 2D muestra cómo una célula individual se apelota en un fenotipo contráctil cuando las fibras vecinas no están a su alcance. Es decir, estas células apelotadas en nanofibras no pueden desplazarse porque carecen de las fibras vecinas a corta distancia y por lo tanto dificulta su propagación. La Figura 2E muestra una sola célula sembradas en la unión de varias nanofibras. La célula se propaga a lo largo del eje largo de las microfibras mientras que se aleja del punto inicial de la adhesión. La Figura 2F muestra la propagación de células en las esterillas de PAL ayudadas por nano como microfibras. En la presencia de micro y nanofibras dentro de un espacio, la célula se extiende para abarcar los espacios entre las fibras vecinas usando nanofibras como puentes. Los datos microscópicos obtenidas para las esterillas de PAL no tejidas con micro y nanofibras indica que la adhesión celular y la proliferación inicial está muy influenciada por el diámetro y la proximidad de las fibras.

La Figura 3 muestra que la migración de células en esterillas de PAL no tejidas con nanofibras es más uniforme que en esterillas de PAL no tejidas con microfibras. En las esterillas de PAL con microfibras las colonias celulares confrontan más dificultades para cruzar los poros grandes (Figura 3A). La Figura 3B ilustra un método usado por las células para la migración en las esterillas de PAL no tejidas con microfibras con poros que consiste en utilizar como puentes las fibras paralelas para facilitar locomoción celular. En el espacio inter fibrilar (microfibras paralelas) no se observan células. La colonización celular en esterillas de PAL con nanofibras es superior a la

colonización celular en esterillas de PAL con microfibras. La evidencia se basa en la presencia de láminas de células uniformes y la falta de grandes poros visibles en las esterillas de PAL (Figura 3C). Las células se extienden uniformemente a través de las esterillas de PAL no tejidas con nanofibras. Las células se extienden a través de los poros más pequeños entre las fibras sin la ayuda de puentes fibrilares. Sin embargo, incluso en las esterillas de PAL no tejidas con nanofibras, hubo ocasionalmente un poro grande que las células no pudieron llenar, como se muestra en la Figura 3D. A pesar de todo, hubo una mejor colonización de células en las esterillas de PAL con nanofibras comparado con esterillas de PAL con microfibras. Esta mejora en cuanto colonización celular efectuado en las esterillas de PAL con nanofibras se puede atribuir a la presencia de muchos puntos focales para la adhesión celular y la reducción en el número de poros grandes.

El tamaño de los poros y su distribución (Tabla 1) tienen un efecto notable sobre la penetración celular en esterillas de PAL no tejidas, pero no hay indicación clara de que estos fenómenos se puede mejorar mediante el uso de las fibras como una guía. El tamaño de la fibra juegan un papel importante en la orientación celular durante su adhesión y proliferación en las esterillas de PAL no tejidas (Figura 2). La estructura menos compacta y más porosa de esterillas de PAL no tejidas, es decir, de microfibras, ofrecen menos obstáculos a las células para que sigan una fibra (Figuras 2B y 2C). Por lo tanto, las esterillas de PAL no tejidas con microfibras recogidas a una distancia de 0,50 m con flujo de aire de  $1,5 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  proporcionan menos obstáculo para la migración de células como se observa por la penetración a una profundidad de aproximadamente 190 micras (Figura 4B). Las esterillas de PAL no tejidas más compactados producidos usando la matriz nano no muestran ninguna evidencia de la influencia por parte de las fibras sobre la orientación celular. Por lo tanto, la penetración celular en las esterillas de PAL no tejidas de nanofibras es estrictamente dependiente de tamaño de poro y la capacidad de contorsión celular. Aunque en algunos casos las células penetraron a mayores profundidades para esterillas PAL no tejidas con nanofibras, la mayoría de las células se encuentran a profundidades en el rango de 35 a 100 micras. La mayoría de las células alcanzan profundidades de penetración en esterillas PAL no tejidas con nanofibras debido a tamaños de los poros y no por orientación celular.

Muchos investigadores utilizando el proceso de electrohilado han encontrado dificultades en la producción de andamios poliméricos que permitan la proliferación celular [9]. Otros investigadores usando muestras de nano-electrohilado sembradas con células no tuvieron éxito en cuanto a la migración hacia el interior de la muestra [10]. En general, el problema con los nano-andamios preparados por electrohilado se atribuye a la presencia de poros de pequeñas dimensiones.

Muchas de las ideas novedosas se han propuesto para superar las dificultades de migración celular incluyendo la siembra celular en capas de múltiples de un material más delgado con fibras superpuestas y un tamaño promedio de poro más grande y entonces apilarlos uno encima del otro, electro-pulverizacion de capas delgadas de material con las células, o incluso electrohilado de andamios con células encapsuladas dentro de la solución de polímero-disolvente [9]. El presente estudio muestra que el proceso de soplado en fusión es capaz de producir materiales no tejidos con una amplia variedad de tamaños de poros que permiten la penetración celular sin la necesidad de post-procesamiento. Estudios previos han sugerido que la migración celular a través del un andamio requiere un tamaño de promedio de poro superior a 20 micras [11]. Los presentes resultados muestran que esterillas de PAL no tejidas con tamaño de poros de aproximadamente 19–51 micras pueden tener éxito en cuanto a la migración celular hacia en interior de las esterillas de PAL no tejidas con micro y nanofibras.

## CONCLUSIONES

Esterillas de PAL no tejidas libres de aditivo/compuestos estabilizadoras se preparó mediante el proceso de soplado en fusión. La adhesión y la proliferación de las células del melanoma A375 se produce en las esterillas de PAL no tejidas. La conformación de las células individuales en una sola fibra depende del diámetro de la fibra. La adhesión de las células individuales en una sola microfibra de PAL no tejidas asume la alineación a lo largo del eje largo de fibra mientras que la adhesión de células individuales en un solo nanofibras de PAL no tejidas asume conformación globular. La densidad de las esterillas de PAL no tejidas determina la uniformidad e integridad de la cobertura de la célula durante la migración. Esterillas de PAL no tejidas con nanofibras facilitan la formación de capas celulares más uniformes que las esterillas de PAL no tejidas con microfibras que presentan capas celulares irregulares debido a la presencia de poros grandes. La penetración celular en las esterillas de PAL no tejidas se observó tanto para muestras con micro y nanofibras. Por lo tanto las esterillas de PAL no tejidas con nano o microfibras tienen el potencial para ser utilizados como medios de andamiaje para ingeniería de tejidos.

## REFERENCIAS

- [1] Gualandi C “*Porous Polymeric Bioresorbable Scaffolds for Tissue Engineering*”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011
- [2] ASTM F2150-07 “*Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used In Tissue-Engineered Medical Products*”, Philadelphia (USA), American Society for Testing and Materials, 2012
- [3] Marla VT, Shambaugh RL, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **42** (26) (2003)

- [4] Grafarend D, Heffels KH, Beer MV, Gasteier P, Moller M, Boehm G, Dalton PD, Groll J., *Nature Mater.*, **10(1)**, (2011)
- [5] da Silva MLA, Martins A, Costa-Pinto AR, Costa P, Faria S, Gomes M, Reis RL, Neves NM, *Biomacromolecules*, **11 (12)**, (2010)
- [6] Hong JK, Madihally SV, *Tissue Eng. Pt. B-Rev.*, **17 (2)** (2011)
- [7] Saez A, Anon E, Ghibaudo M, du Roure O, Di Meglio JM, Hersen P, Silberzan P, Buguin A, Ladoux B, *J. Phys.: Condens. Matter.*, **22 (19)** (2010)
- [8] du Roure O, Saez A, Buguin A, Austin RH, Chavrier P, Silberzan P, Ladoux B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102 (39)** (2005)
- [9] Townsend-Nicholson A, Jayasinghe SN, *Biomacromolecules*, **7(12)** (2006)
- [10] Hong JK, Madihally SV, *Acta Biomater.*, **6(12)** (2010)
- [11] Shalumon KT, Chennazhi KP, Tamura H, Kawahara K, Nair SV, Jayakumar J, *IET Nanobiotechnology*, **6 (1)** (2012)