

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

GENERACIÓN Y BIOEVALUACIÓN DE ANDAMIOS DE POLI-3- HIDROXIBUTIRATO (P3HB) CON POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA LA:

IBQ. SANDRA GARCÍA CERNA

CODIRECTORES DE TESIS:

DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA

DR. CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA

ASESOR TÉCNICO:

L.F. URIEL ABDALLAH SÁNCHEZ PACHECO



IBQ. SANDRA GARCÍA CERNA
ESTUDUANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que en la sesión Ordinaria de Consejo Interno de Posgrado celebrada el miércoles 17 de febrero de 2021, se analizó su solicitud asignación de jurado revisor para el escrito de tesis titulado “**Generación y bioevaluación de andamios de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) con potencial aplicación en ingeniería tisular**”, después de analizar su propuesta el Consejo designó el siguiente jurado:

- | | |
|---|-------------------|
| 1. Dr. Jesús Rivera Islas | Presidente |
| 2. Dra. Angélica Ortega García | Secretaria |
| 3. Dr. Bernardo Campillo Illanes | Vocal 1 |
| 4. Dr. Daniel Genaro Segura González | Vocal 2 |
| 5. Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza | Vocal 3 |

Se le solicita entregar la tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. SERGIO ALCALÁ ALCALÁ
Jefe de Posgrado de la Facultad de Farmacia

Ccp: Archivo

Dr. Jesús Rivera Islas, Dra. Angélica Ortega García, Dr. Bernardo Campillo Illanes, Dr. Daniel Genaro Segura González, Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2021-02-22 08:56:50 | Firmante

VGHQlyY2gJ+sAxi2WDkp5JELHFtH6KODEdtD4QPrOzvBUsdCl3L1C/egyfqbvE9fwDmw1VSmerhan7GrXq9EUTvVYayXc7m65s13swXUuP3VuuTqpz4s8pez2Jmk1o4YwyRUST8al76VR1/XkiVoF6VjBDjpHFogLS6QVj6paeDynDzcY6sb5l/CGx0q9vpyly/zAxpSqkWDT82lCjZroTuoYsxl8zno/t464M88StOx5Y09Q2nd80UcjYub61ad52dBFR/obt7xMg1UfL6eJmiT9ZP+0hqSue00kCo+Itt6emt49oDICqbBcVGQQK3PZYi090NUojg38laz1309w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[CKDSfe](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wrltvX9QWs6YCP9mVrYwqgUdhVaWPeXT>



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Sandra García Cerna

Título de la tesis: “Generación y bioevaluación de andamios de poli-3-hidroxi-butarato (P3HB) con potencial aplicación en ingeniería tisular”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jesús Rivera Islas

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr. Jesús Rivera Islas

15 de mayo de 2021

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS RIVERA ISLAS | Fecha:2021-05-15 21:36:03 | Firmante

m2tqdvH9u1gFervZAxY0jx7qjYhquju9Oemf+aVIMBmP4YkZkiWtXxQX/mbwmHHiX/YNwVK7OKbau/N62MUCBmuG4j5FfvU1sp9NLQS+aY0Zs2LuTbB0Kgiyr4pv9zlh7Anc2Sqy
uBXnkoPiM/rFfnhZy1RgeWf7F35+sAX110cq3YhqGUFcr+8iyAu6A3CO3bCYQSuI97WILscmhyMKHS/0IAkrYimKnaAjeaJlyBFXJjliCTUDxIGXd8Meg9vEgJ6mK4GH0I/A9Hf8KN
79f6+qk5lftfZKQ7UHmP1ncSXM01kM4aNeWdkp6f0z57sxe4ARAR1TPTQm4+wap/QaA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



UqXyep

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DewJh9mfjicGHu43CbfX4DMmDfgw7cbf>



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Sandra García Cerna

Título de la tesis: “Generación y bioevaluación de andamios de poli-3-hidroxi-butarato (P3HB) con potencial aplicación en ingeniería tisular”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: M. C. Angélica Ortega García

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

M. C. Angélica Ortega García

17 de mayo del 2021

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANGELICA ORTEGA GARCIA | Fecha:2021-05-17 12:57:19 | Firmante

LZXp4/GL1dij9ws3rshJfdyylyRik9Sj0buJilOszQ7rhBznMXChoQkxOrgoN7/vDto5OQ3loD+2BSvKxfTqsSWQNf9NQH4kCi9dCymSSx8x8/msuyefwHwnEykk5vbLytSb7yOia7txuv
VGFfhqjCetYkQ6kaDO5W8sYGqW4vMzQ0yhr4mg6SPCD5eQ1EdppwtlzHTN9zCORnciqzlo4VQwJ7r5lgsL6JdWBvg0YZMJUYLts8icEYX/146EER3+uiUdgaP9qvPH04WUxvzF
WBrXqRf5HgChq4pk4TJfJIs9pAwDBMO9TJApAftFDarQopQQzPSBEw9gXxn6Q1QA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



5oqMzF

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/fll5tg8FbSAnAn6GeBb6J55rhs7ob14E>



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Sandra García Cerna

Título de la tesis: “Generación y bioevaluación de andamios de poli-3-hidroxi-butarato (P3HB) con potencial aplicación en ingeniería tisular”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Bernardo Campillo Illanes

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Dr. Bernardo Campillo Illanes

18/05/21

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

BERNARDO FABIAN CAMPILLO ILLANES | Fecha:2021-05-18 18:48:02 | Firmante

dONUAHSLcZJ2h4H7fhgBqvCallLMyaxv7ls73PYYxKtj5R5Byk2ubF3Smg4hrx8PRx+Qw6DVM4QJbd7QOPINep9BXuPwdybh9S/+4VibNBqvjnZym7RI+EriSIJNoNSb0j2QNUpv4vi4YhC8P6RuRafHZJFi1gYzIqGOZqc4wKvRx/D+/G4WB3oqpJ5tyilDTEBYmmYqJ67v1ZZw29bMNnWhgsELaABp8/vz3CKsGGNUPS1uRBenXCScK/IEDgUvRnN+INLsx3bTcjlXlkqV5/fjTXX1YmyINzVokWep2CM4aBMxV+BlcBzGcelrIK+IX5BPun0Yvwkz9b5PAPVYqw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[20ksnl](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HxBaPSOEo29AUrqwIOFaWiaWR3kPLYim>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Sandra García Cerna

Título de la tesis: "Generación y bioevaluación de andamios de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) con potencial aplicación en ingeniería tisular"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Daniel Genaro Segura González

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Dr. Daniel Genaro Segura González

17 de mayo del 2021

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ | Fecha:2021-05-17 11:54:35 | Firmante

VcFiuItA5/6N+8VQBMQT90ZIE/zB5J2vN6Ev+/LW1O7ngbcC+UfEYYZHnarKnPCszKjwvpEGqZdArQ+hsyn6YB/mlb+llpYCa+3HUcOwhRwHUqVwP3JPz/9t1J+F86vrV8F3fVKzK Pp0sPpR8Xuj47JfGRhab9IXTmyUJuVlbLgdbyMrg7HZJG7FpJB6wCMKwPWSFFwoowvUkfjZxwNydV2FRPrSwRwFj4Zpwg4QTKh12pz/Q1fgjBfjMAFWCY+I6OpzRa9Ni5/BgdN4i bc/E8npzou5lo3nzYnVoyV8gjejC6sa7EuMoY2rjC9ulpqESbXQLk/IUbK/A+tLxpZTfQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



RrMDjN

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/L5pDzBHqZ0weHMnlW4yCKAIEsvbbT7D4>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Sandra García Cerna

Título de la tesis: “Generación y bioevaluación de andamios de poli-3-hidroxi-butarato (P3HB) con potencial aplicación en ingeniería tisular”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

14 mayo 2021

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESSICA NAYELLI SANCHEZ CARRANZA | Fecha:2021-05-16 23:27:45 | Firmante

fbw97A2FbTSE/CSkToqwUSfDiBH4AMQD6kNkg/XsZaGkWpD67kP6Rb0+JiJlr0VuUJozzmdStrNL4xi+uVccq3G5aOwQSB6gvikDtA11+zxwqZbnaleC+1mCckDaKFaxfSulvNnzFehY9QqdAnRXAGiNZ+bZJ45wWbx9kceX/6Wlbt4oCkhnbe3TLyvg64YepLBNRiD/d1NlrA+pMilleQ7XbhF9iJe7u7v1AjW7uELYT081L3SWqSOdnruAydQHPlyQumrlaq+37mZdREhhBzif0fblX+S3VLOmAhYF5tBkqLEOA9YYgmduyyPGNupDtZUwg92UOSELj/JT50lu5Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



iYniWu

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/aExNm504wHk43biJ7y5KOauJKk3DKnhs>



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica (Laboratorio 7) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el laboratorio 10 del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la codirección de la Dra. Angélica Meneses Acosta y del Dr. Carlos Felipe Peña Malacara. El financiamiento para el desarrollo de este se obtuvo gracias a los recursos autogenerados FF-UAEM 2020, INFRA-2014 por medio del proyecto 226271 y al proyecto PAPIIT IG200219. Agradezco al CONACyT por la beca otorgada No. 966686.

DEDICATORIA

*A mi **Dios** por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida, por haberme brindado la oportunidad de concluir una etapa de mi preparación profesional, por darme una maravillosa familia que me motiva día a día y por darme la mejor pareja del mundo.*

*A mis padres **Esteban García Orihuela y María Elena Cerna Viveros**, por haber confiado siempre en mí, por apoyarme en mis decisiones y por enseñarme los valores que tengo. Ustedes son mi orgullo y una de las razones más importantes por la que quiero ser alguien en la vida. Son sin duda dos elementos extraordinarios que dieron como resultado un compuesto muy especial. Los amo con todo mi ser y nunca me cansaré de decírselos.*

*A mis dos amores, mi esposo **Martín Quiroz Cardoso** y mi futuro bebé, por su cariño, comprensión, paciencia, amor y por motivarme durante mi crecimiento profesional. Tú y nuestro bebé son mi razón de vivir y mis ganas de triunfar en la vida. Ustedes son el regalo más grande que Dios y la vida me han dado.*

*A mis hermanitos **Emmanuel García Cerna y María Elena García Cerna**, quienes han estado a mi lado desde siempre, con quienes he compartido muchas locuras desde niños y hasta la fecha, han sabido ser mi gran apoyo y mi fuente de motivación para ser un buen ejemplo en sus vidas.*

*A mis abuelos **Rosa Orihuela y Máximo García, Samuel Orihuela** y en especial a **Catalina Viveros**, quien dejó una huella muy especial en mi vida desde que fui una niña, pero ahora se convirtió en un angelito que me cuida y me bendice desde el cielo.*

*A mis **amigos y Doctores** del grupo AMA y Galindo, quienes me enseñaron el valor de la amistad y siempre me hicieron sentir especial en sus vidas, en especial a **Abda, Mirna, Mario, Mich, Cony, Carlitos, Holjes, Johana, Dra. Celia, Dr. Galindo, Ing. Mario** y a todos los que me faltan por mencionar y que son importantes en mi vida.*

*A mis codirectores **Dra. Angélica Meneses y Dr. Carlos Peña**, quienes admiro en gran manera y que me dieron la oportunidad de pertenecer a sus grupos de investigación, además de que han puesto en mí su granito de arena en mi formación profesional.*

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a los Doctores Angélica Meneses y Carlos Peña por permitirme formar parte de su grupo de investigación, dejando en mí un grato recuerdo y una experiencia extraordinaria. Gracias por ser unos excelentes codirectores.

Al Dr. Sergio Álcala y al Dr. Bernardo Campillo por sus valiosas aportaciones a mi proyecto en cada uno de los tutorales que realizamos y por su apoyo en el área experimental.

Al Dr. José Manuel Rojas y su grupo de trabajo del CIATEQ-Lerma por su apoyo en el desarrollo de los andamios, así como la caracterización del P3HB.

Al Ing. Mario Caro por el apoyo técnico que me brindó en la planta piloto del IBT-UNAM, por los consejos y el ánimo que siempre me daba.

A los miembros del grupo AMA, por sus comentarios en los seminarios y por su acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo. En especial a L.F. Abdallah Sánchez, M.B. Mario Téllez, M.F. Mirna y M.F. Carlos Tavera por sus asesorías técnicas y por ayudarme en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del grupo Galindo, por sus comentarios en los seminarios y por su acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo. En especial a la Dra. Celia Flores Ocampo, Dr. Enrique Galindo, Dr. Leobardo Serrano, Ing. Mario Caro y al Dr. Holjes.

Al comité sinodal por sus aportaciones y comentarios para la mejora del presente trabajo:

Dr. Jesús Rivera Islas

Dra. Angélica Ortega García

Dr. Bernardo Campillo Illanes

Dr. Daniel Genaro Segura González

Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1 Ingeniería tisular	18
1.2 La piel humana	20
1.2.1 Generalidades de la piel humana	20
1.2.2 Estructura de la piel humana	20
1.2.3 Propiedades y funciones de la piel humana	23
1.2.4 Patologías de la piel humana	25
1.3 Diseño de andamios para la aplicación en la ingeniería tisular	25
1.3.1 Biomateriales para la generación de andamios para cultivos celulares en Ingeniería tisular	25
1.3.2 Polihidroxicanoatos y sus propiedades	27
1.3.2.1 Poli-3-hidroxi-butilato P3HB y sus propiedades	27
1.3.2.2 Importancia del peso molecular del P3HB en el área biomédica	28
1.3.3 Diseño de andamios de P3HB	29
2. ANTECEDENTES	31
2.1 Andamios de P3HB por electrohilado en cultivos de queratinocitos	31

3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo general	34
5.2 Objetivos específicos	34
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS	36
7.1 Extracción del Poli-3-hidroxibutirato P3HB	36
7.1.1 Método 1: Ruptura y extracción con Etanol-acetona	37
7.1.2 Método 2: Ruptura y extracción con Hipoclorito-cloroformo	38
7.1.3 Método 3: Ruptura y extracción con secado por aspersion-SDS	39
7.2 Técnicas para la caracterización del biomaterial	40
7.2.1 Determinación de la pureza del P3HB	40
7.2.2 Determinación del peso molecular del P3HB	41
7.2.3 Rendimiento del P3HB recuperado por los métodos de extracción	42
7.2.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	42
7.2.5 Elaboración de probetas de P3HB y análisis de módulo de Young	42
7.3 Elaboración del filamento de P3HB para la impresión 3D	43

7.3.1 Pretratamiento del P3HB y generación del filamento	43
7.3.2 Generación de andamios por impresión 3D.....	44
7.3.3 Generación de andamios por moldeo en placa	45
7.3.4 Determinación del ángulo de contacto de los andamios generados	45
7.3.5 Caracterización superficial de los andamios	46
7.4 Línea celular, mantenimiento y preservación de celular	46
7.4.1 Línea celular HaCaT	46
7.4.2 Medio de cultivo para mantenimiento	46
7.4.2.1 Medio de cultivo DMEM-F12 con 10 % (V/V) de SFB	46
7.4.2.2 Medio de cultivo Keratinocyte SFM (1X) con CaCl₂.....	47
7.4.3 Mantenimiento y preservación de la línea celular HaCaT	48
7.4.3.1 Descongelación de la línea celular	48
7.4.3.2 Mantenimiento de la línea celular	48
7.4.3.3 Subcultivo de la línea celular	49
7.4.3.4 Criopreservación de la línea celular	50
7.4.4 Cinéticas de crecimiento	52
7.4.4.1 Cinética de crecimiento en medio DMEM-F12 con 10 % (V/V) de SFB	

7.4.4.2	Cinéticas de crecimiento en medio Keratinocyte SFM (1X)	52
7.4.5	Biocompatibilidad de los andamios con las células HaCaT	53
7.4.6	Comprobación de la diferenciación celular de HaCaT	54
7.4.6.1	Extracción de ARN.....	54
7.4.6.2	Remoción del ADN genómico.....	56
7.4.6.3	Síntesis de la primera cadena de cADN.....	56
7.4.6.4	Amplificación del segmento de interés por PCR	57
8.	RESULTADOS	60
8.1	Caracterización del P3HB obtenido de los distintos métodos de extracción.....	60
8.1.1	Pureza y rendimiento de los métodos de extracción.....	60
8.1.2	Análisis del peso molecular del P3HB	62
8.1.3	Análisis de las propiedades fisicoquímicas del P3HB	63
8.1.3.1	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR)	63
8.1.3.2	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	66
8.1.3.3	Determinación del módulo de Young	68
8.2	Generación del filamento y andamios de P3HB	68
8.2.1	Determinación del ángulo de contacto	70

8.2.2 Caracterización superficial de los andamios	71
8.3 Cultivo y biocompatibilidad de las células HaCaT en andamios de P3HB	74
8.3.1 Cinéticas de crecimiento para la caracterización de la línea celular de queratinocitos HaCaT	74
8.3.2 Biocompatibilidad de las células HaCaT con los andamios de P3HB ..	76
8.4 Comprobación de la diferenciación de la línea celular HaCaT	78
9. DISCUSIÓN	81
9.1 Caracterización del P3HB recuperado	81
9.1.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	83
9.1.2 Determinación del módulo de Young	85
9.1.3 Determinación del ángulo de contacto	85
9.1.4 Caracterización superficial de los andamios por SEM	86
9.2 Cultivo y biocompatibilidad de las células HaCaT en andamio de P3HB	87
9.2.1 Cinéticas de crecimiento para la caracterización de la línea celular HaCaT	87
9.2.2 Biocompatibilidad de las células HaCaT con los andamios	88
9.2.3 Diferenciación de la línea celular HaCaT en condiciones <i>in vitro</i>	89

10 CONCLUSIONES	91
11 PERSPECTIVAS	92
12 BIBLIOGRAFÍA	93
10. ANEXOS	102
10.1 CONGRESOS Y PREMIOS	102
10.2 13° Encuentro de Estudiantes de posgrado de la Facultad de Farmacia	102
10.3 14° Encuentro de Estudiantes de posgrado de la Facultad de Farmacia	103
10.4 Primer congreso virtual de Ciencias Farmacéuticas	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de los tres pilares fundamentales de la ingeniería tisular de la piel. (Ikada, 2006).	19
Figura 2 Estructura de la piel. En la epidermis se representan sus diferentes estratos (basal, espinoso, granuloso y córneo). Modificada de Pasparakis et. al., (2014).....	20
Figura 3 Morfología de los queratinocitos que conforman los distintos estratos de la epidermis (Pasparakis et. al., 2014).....	22
Figura 4 Estructura química del monómero 3-hidroxibutirato (Peña et. al., 2014).	28
Figura 5 Micrografías de cultivo de queratinocitos a las 192 h sobre andamios de P3HB generados por electrohilado (Mondragón-Guillén, 2020).	31
Figura 6 Estrategia experimental.	35
Figura 7 Sistema de extracción diseñado por Sánchez-Álvarez, (2019). A) Frasco de alimentación continua de la suspensión celular con etanol. B) Matraz bola de tres bocas para la reacción. C) Columna de recirculación y condensación para la recuperación del solvente. D) Frasco de almacenamiento de la extracción de P3HB.	38
Figura 8 Curva patrón para la cuantificación de P3HB.	41
Figura 9 Material de apoyo para la determinación del módulo de Young. A) Molde de aluminio para la obtención de probetas. B) Probeta de P3HB.....	43
Figura 10 Extrusor marca FILABOT adaptado con ventiladores para enfriamiento del filamento.	44
Figura 11 Impresora 3D reconstruida y diseñada por M.C. Eduardo Sánchez-Álvarez. ...	45
Figura 12 Montaje de la técnica de gota sésil para determinar el ángulo de contacto.	46

Figura 13 P3HB obtenido mediante cada uno de los métodos de extracción A) Ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo, B) Ruptura y extracción con etanol-acetona y C) Ruptura y extracción por secado por aspersion-SDS.	60
Figura 14 Pureza y rendimiento de recuperación de P3HB por los diferentes métodos de extracción.	61
Figura 15 Espectros de FTIR-ATR del P3HB obtenido mediante cada uno de los métodos de ruptura y extracción. A) Con hipoclorito-cloroformo, B) Secado por aspersion-SDS, C) Con etanol-acetona.....	64
Figura 16 Termogramas de DSC del P3HB obtenido de cada uno de los métodos de ruptura y extracción. A) Con hipoclorito-cloroformo, B) Por secado por aspersion-SDS, C) Con etanol-acetona.	67
Figura 17 Filamento de P3HB generado en el FILABOT a partir de los métodos de extracción y ruptura. A) Con etanol-acetona), B) Secado por aspersion-SDS.....	69
Figura 18 Primeros andamios diseñados de P3HB por impresión 3D. A) Con poros, B) Sin poros.....	69
Figura 19 Andamios generados por la técnica de impresión 3D y moldeado en placa.	70
Figura 20 Microscopía Electrónica de Barrido de superficies de andamios de P3HB por los métodos de ruptura y extracción: secado por aspersion-SDS: A) Moldeado en placa, B) Impresión 3D; etanol-acetona: C) Moldeado en placa, D) Impresión 3D; hipoclorito-cloroformo: E) Electrohilado.	73
Figura 21 Cinéticas de crecimiento de la línea celular HaCaT en medio DMEM-F12 y en medio específico KTC libre de suero a baja y alta concentración de CaCl ₂	74
Figura 22 Microscopía de campo claro de las cinéticas de crecimiento tomadas cada 48 h. A) DMEM-F12, 10% SFB, B) KTC 0.03 mM CaCl ₂ y C) KTC 2.4 mM CaCl ₂	76

Figura 23 Andamio de P3HB para el análisis de biocompatibilidad. A) Control, electrohilado, B) Impresión 3D sin poros, C) Impresión 3D con poros.....	77
Figura 24 Biocompatibilidad de las células HaCaT con los andamio; A) Control (electrohilado), B) Impresión 3D sin poros y C) Impresión 3D con poros.	78
Figura 25 Identificación de la expresión de los genes que codifican para GAPDH (control +), K1, K10 e involucrina por electroforesis de una reacción de RT-PCR.	79
Figura 26 Cuantificación de la expresión de los genes K1, K10 e involucrina en células HaCaT.....	80
Figura 27 Espectro de FTIR de P3HB estándar comercial (Bhagoeti et. al., 2015).	83
Figura 28 Análisis de Western y comparación de marcadores de diferenciación K1, K10 y expresión de involucrina; (-) bajo calcio, (+) alto calcio, tomada de Micallef et. al., (2009).	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de polímeros naturales con aplicaciones en ingeniería tisular.....	27
Tabla 2. Aplicaciones biomédicas del P3HB (Adaptada de Peña et. al., 2014).....	29
Tabla 3. Composición del medio de cultivo y condiciones operacionales.	36
Tabla 4 Diseño experimental empleado para la selección de las condiciones de extracción de P3HB.	39
Tabla 5 Condiciones de secado para los materiales obtenidos de los métodos de extracción propuestos.....	44
Tabla 6. Condiciones experimentales para la reacción de la enzima DNaseI, RNase-free.	56
Tabla 7. Componentes para la reacción de síntesis de cDNA	57
Tabla 8. Expresión de marcadores de diferenciación terminal a nivel de ARNm en células HaCaT (Micallef et. al., 2009).	58
Tabla 9. Componentes para la reacción de PCR para un fragmento de la región de interés	58
Tabla 10. Ciclos de temperatura empleados en el programa de PCR	58
Tabla 11 Caracterización del P3HB recuperado por cada uno de los método de extracción.	63
Tabla 12 Identificación de picos presentes en las muestras de P3HB recuperado por los métodos de ruptura y extracción.....	65
Tabla 13 Módulo de Young del P3HB recuperado por los distintos métodos de extracción.	68
Tabla 14 Ángulo de contacto de los andamios de P3HB generados.....	71
Tabla 15 Resumen de los parámetros cinéticos de la línea celular HaCaT.	75

ABREVIATURAS

P3HB	Poli-3-hidroxi-butirato
3D	Tridimensional
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
cDNA	ADN complementario
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
FITC	Fluorescein IsoTioCyanate
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IP	Índice de polidispersión
KTC	<i>Keratinocyte SFM (1X)</i>
M	Molaridad
Mw	Peso molecular
PBS	Buffer fosfato salino
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SFB	Suero fetal bovino
Tf	Temperatura de fusión
Tg	Temperatura de transición vítrea
TRITCI	Tetrametil rodamina isotiocianato
vvm	Volumen de aire por volumen de líquido por minuto

SIMBOLOS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
μ	Velocidad específica de crecimiento
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
Cel/mL	Células por mililitro
g	Gramo
h	Hora
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramo
kV	Kilo volts
L	Litro
mg	Miligramo
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng/L	Nanogramos por litro
nm	Nanómetros
P/V	Concentración peso volumen
s	Segundos
V/V	Concentración volumen volumen

RESUMEN

En la actualidad la medicina regenerativa e ingeniería tisular han tenido avances que han permitido construir órganos y tejidos con el uso de biomateriales y células. La ingeniería de tejidos se basa en tres pilares principales: i) la generación de una biomatriz empleando biomateriales, ii) la aplicación de células y iii) el uso de moléculas bioactivas.

El objetivo del presente trabajo es generar andamios de P3HB por impresión 3D y moldeado en placa, a partir del biopolímero recuperado por los métodos de ruptura y extracción con etanol-acetona y por secado por aspersion-SDS, para evaluar su biocompatibilidad con células epidérmicas HaCaT, como modelo potencial que permita la formación de un tejido funcional. Los andamios fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido (SEM) y se determinaron sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas previo a los ensayos de biocompatibilidad.

Los resultados mostraron que, independientemente del método de recuperación del P3HB y de la morfología superficial de los andamios, tanto los andamios generados por impresión 3D como los generados por moldeado en placa tuvieron superficies hidrofílicas (ángulos de contacto menor a 90°). En cuanto al ensayo de biocompatibilidad, solo fue posible realizarlo para el andamio generado por impresión 3D sin y con poros, a partir de P3HB recuperado por el método de ruptura y extracción con etanol-acetona. No obstante lo anterior, se obtuvieron resultados satisfactorios para estos ensayos, lográndose una mayor proliferación celular y con apariencia homogénea sobre el andamio de P3HB sin poros.

Debido a la emergencia sanitaria ocasionada por SARS-CoV2, misma que limitó el desarrollo de la presente investigación a partir del 16 de marzo de 2020, solo se logró realizar satisfactoriamente los ensayos de diferenciación celular en un medio específico que emula las condiciones fisiológicas de la piel para la formación de sus diferentes estratos, previo a estos mismos ensayos, pero de células cultivadas sobre los andamios de P3HB.

Con base a lo anterior, los andamios de P3HB mostraron propiedades fisicoquímicas adecuadas para ser biocompatibles y lograr la funcionalidad de sustituto de piel, lo cual sugiere una potencial aplicación en el campo clínico.

ABSTRACT

Currently regenerative medicine and tissue engineering have made advances that have allowed possible build organs and tissues with the use of biomaterials and cells. Tissue engineering is based on three main pillars: i) the generation of a biomatrix using biomaterials, ii) the application of cells and iii) the use of bioactive molecules.

The aim of the present work is to generate P3HB scaffolds by 3D printing and plate molding, from the biopolymer recovered by breaking and extraction methods with ethanol-acetone and by spray drying-SDS to evaluate its biocompatibility with HaCaT epidermal cells, as a potential model that allows the formation of a functional tissue. The scaffolds were characterized using scanning electron microscopy (SEM) and their physicochemical and mechanical properties were determined before to the biocompatibility assays.

The results showed that, regardless of the P3HB recovery method and the surface morphology of the scaffolds, both the scaffolds generated by 3D printing and those generated by plate molding had hydrophilic surfaces (contact angles less than 90°). As for the biocompatibility assay, it was only possible to perform it for the scaffold generated by 3D printing without and with pores, from P3HB recovered by the method of rupture and extraction with ethanol-acetone. Nevertheless, satisfactory results were obtained for these assays, achieving a higher cell proliferation and homogeneous appearance on the P3HB scaffold without pores.

Due to the sanitary emergency caused by SARS-CoV2, which limited the development of the present research from March 16, 2020, we were only able to perform satisfactorily the cell differentiation assays in a specific medium that emulates the physiological conditions of the skin for the formation of its different layers, before to these same assays, but of cells cultured on the P3HB scaffolds.

Based on the above, the P3HB scaffolds showed adequate physicochemical properties to be biocompatible and achieve skin substitute functionality, suggesting a potential application in the clinical field.

1. INTRODUCCIÓN

La piel es un órgano vital que proporciona al organismo una barrera protectora, desafortunadamente debido a diversas causas, principalmente quemaduras, accidentes y enfermedades crónicas, las pérdidas de piel representan un problema importante. Constituyen uno de los problemas de salud más frecuentes, devastadores y costosos a nivel de salud pública (Falke y Atala, 2000; Kim *et. al.*, 2015).

Las lesiones de la piel donde son afectadas capas dérmicas profundas, esta no es capaz de regenerarse por sí misma por lo que se hace necesario el uso de injertos. Los injertos autólogos son los más utilizados y están basados en la extracción de la piel sana del mismo paciente, sin embargo, este aumenta el nivel de dolor inducido en el mismo. Además, en las pérdidas de carácter masivo, no existe suficiente piel sana para subsanar las zonas dañadas, por lo que otras alternativas son los xenoinjertos (injertos provenientes de otra especie) y los homoinjertos (misma especie, pero diferente individuo), sin embargo, ambas presentan la desventaja de presentar una posible respuesta desfavorable por parte del sistema inmunológico del huésped o la posible transmisión de enfermedades (Flake Atala, 2000; Huyan *et. al.*, 2020).

El surgimiento de la ingeniería de tejidos se ha logrado tener una alternativa más viable a los injertos. La ingeniería tisular se basa principalmente en tres componentes: el uso de células, el diseño de andamios y los factores de crecimiento (Ikada, 2006). El diseño de los andamios representa un pilar importante en la ingeniería tisular cuyo estudio es de creciente interés para el área de biomateriales, en especial en el área de los biopolímeros. Estos se pueden generar a partir de diversos biomateriales, los cuales van desde materiales sintéticos, hasta materiales de origen biológico como, por ejemplo, el poli-3-hidroxi-butilato (P3HB), los cuales son biomateriales biocompatibles, por lo que no le causa toxicidad a la célula epidérmica.

1.1 Ingeniería tisular

La ingeniería tisular tiene por objeto el desarrollo de estructuras biológicas funcionales que sustituyan, reparen y regeneren órganos o tejidos dañados, utilizando métodos de

recolección y expansión de tejidos *in vitro*, la caracterización de biomateriales y diseño de andamios con la finalidad de proporcionar un soporte estructural a las células (Figura 1) (Falke y Atala, 2000; Ikada, 2006; Nolan *et. al.*, 2008; Colorado *et al.*, 2013; Yan *et. al.*, 2018).



Figura 1 Diagrama de los tres pilares fundamentales de la ingeniería tisular de la piel. (Ikada, 2006).

La pérdida de estructura o función de tejidos y órganos, desde el punto de vista médico, se ha convertido en un problema de salud pública que se intenta solventar mediante trasplantes; sin embargo, en la actualidad la creciente demanda de órganos aunado a que existen cada vez menos donadores ha llevado a buscar nuevas estrategias para la reconstrucción/sustitución de órganos y tejidos, empleando injertos, prótesis y regeneración tisular (Falke y Atala, 2000; Nolan *et. al.*, 2008). Estas alternativas forman parte de la Ingeniería de tejidos, la cual es una ciencia multidisciplinaria basada en disciplinas de la ingeniería y ciencias de la vida como, por ejemplo, ingeniería mecánica, ciencias de los materiales, genética y medicina clínica (O'Brien, 2011).

Dentro de los estudios que se han realizado en ingeniería de tejidos, uno de los más estudiados hasta el momento es el tejido dérmico (la piel) (Falke y Atala, 2000; Colorado *et al.*, 2013; Yan *et. al.*, 2018).

1.2 La piel humana

1.2.1 Generalidades de la piel humana

La piel humana es el mayor órgano del cuerpo humano, representa el 15 % del peso corporal (4-5 kg), tiene una extensión aproximadamente de 1.7-2.0 m² en un adulto y un grosor promedio de 100 µm, el cual varía dependiendo del área del cuerpo (1.5 mm en palmas de las manos y plantas de los pies hasta 50 µm en párpados) (Priya *et. al.*, 2008; Summerfield *et. al.*, 2015).

1.2.2 Estructura de la piel humana

Histológicamente, la piel está formada por tres capas (Figura. 2), denominadas tejido celular subcutáneo o hipodermis, dermis y epidermis (Priya *et. al.*, 2008; Yan *et. al.*, 2018, Huyen *et. al.*, 2020).

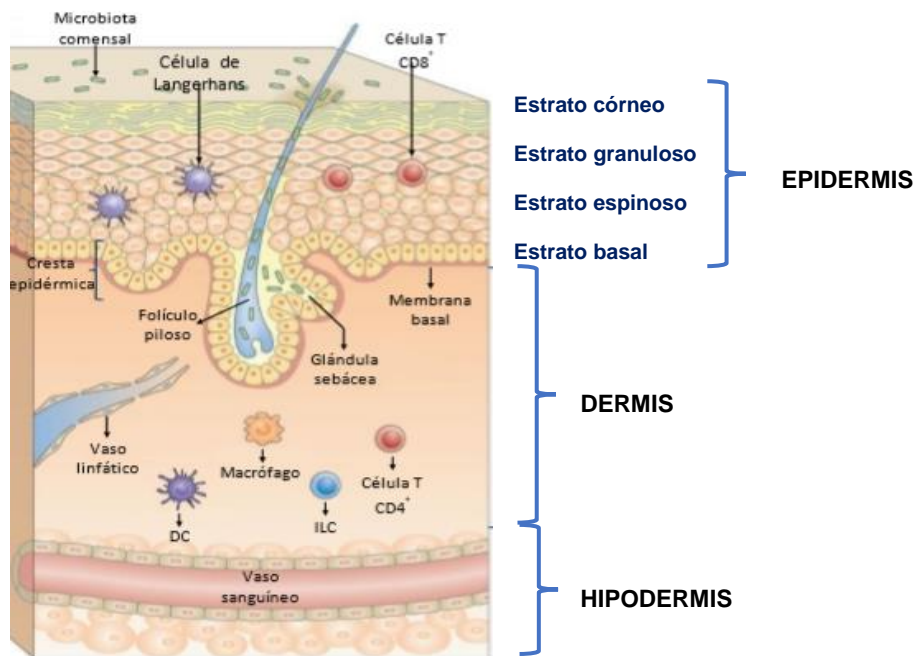


Figura 2 Estructura de la piel. En la epidermis se representan sus diferentes estratos (basal, espinoso, granuloso y córneo). Modificada de Pasparakis *et. al.*, (2014).

- **Hipodermis;** Es la capa más profunda de la piel y está compuesta por lóbulos de adipocitos, separados por tabiques fibrosos de colágeno y vasos sanguíneos pertenecientes al *plexo subcutáneo*, los cuales provienen de la fascia profunda y ascienden a través de la grasa subcutánea (Kierszenbaum y Tres, 2002). Recientemente, se ha descubierto que este tejido es muy rico en células madre adultas multipotentes, que se han empleado en protocolos de ingeniería tisular.

- **Dermis:** En su mayoría está conformada por fibroblastos, debido a que la función principal de estas células es brindar un soporte y adherencia a los queratinocitos, además se encargan de la producción y organización de la matriz extracelular (MEC). La actividad autocrina incluye factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) que induce la síntesis de tejido conectivo y secreción de factores de crecimiento que promueven la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno (Colorado *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2018). Por otro lado, los fibroblastos juegan un papel importante en las interacciones epiteliales-mesenquimales mediante su actividad paracrina, que afecta el crecimiento y diferenciación de los queratinocitos (Lee *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2007). Esta capa tiene un grosor entre 0.6-3 mm que varía considerablemente con la localización anatómica (Summerfield *et al.*, 2015).

- **Epidermis:** Desde el punto de vista histológico es un epitelio plano estratificado queratinizado y está conformada principalmente por queratinocitos (90 % del total de células que conforman la epidermis), capaces de sintetizar queratina, melanocitos (se localizan en la epidermis en contacto con el estrato basal y en los folículos pilosos donde inician la producción de melanina), células dendríticas de Langerhans, células de Merkel y linfocitos. Esta capa, de entre 60-100 μm , es la piel más superficial. Puede clasificarse en gruesa o fina según el espesor y está conformada por cuatro estratos, descritos a continuación (Figura. 2) (Haake *et al.*, 2001; Summerfield *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2018):
 - **Estrato basal:** Está formado por una única capa de queratinocitos cúbicos o cilíndricos con capacidad proliferativa. Las células de este estrato poseen un núcleo grande, redondo y ovalado. Existen vacuolas unidas a la membrana celular que contienen melanosomas pigmentados originarios de los melanocitos.

- **Estrato espinoso:** Se compone de entre 5 y 15 capas de queratinocitos que normalmente ya no se dividen, aunque cabe mencionar que no han perdido por completo su capacidad de proliferación. Dependiendo del grosor de la epidermis, el estrato está integrado por más de 4-6 capas de células (piel gruesa) y de 2-3 capas (piel fina).
- **Estrato granuloso:** Está conformado por 2-3 capas de células ligeramente aplanadas con núcleos alargados que contiene cromatina condensada. Esta capa se caracteriza por la acumulación de los componentes necesarios para el proceso de muerte celular programada y formación de una barrera impermeable superficial.
- **Estrato córneo:** Es el estrato más superficial que se subdivide en dos capas: la primera es profunda y compacta, la segunda es superficial y suelta. Si la piel es delgada presenta 3-4 capas de células, en cambio, la piel gruesa puede contener 40-50 capas. Este estrato está constituido por un conjunto de células aplanadas sin núcleo ni orgánulos (solamente contienen filamentos de queratina), suspendidos en una matriz lipídica, constituyendo una estructura impermeable e insoluble responsable de la función protectora de la epidermis. Las capas superficiales queratinizadas del estrato córneo se descaman a la misma velocidad con que la que son reemplazadas por la actividad mitótica de los estratos basal y espinoso.

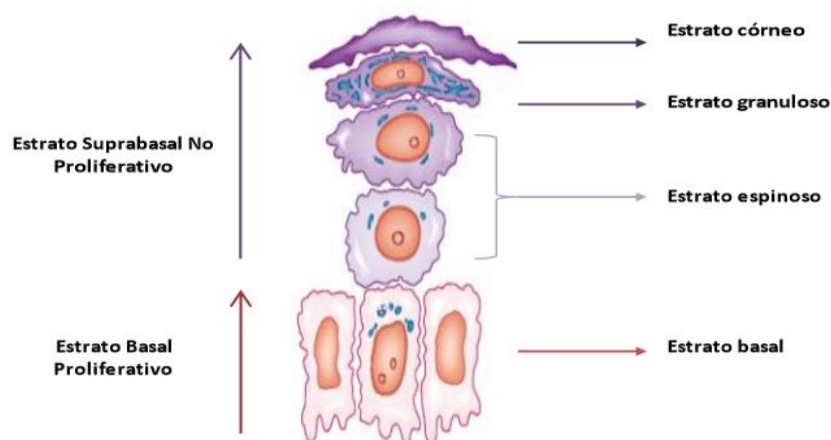


Figura 3 Morfología de los queratinocitos que conforman los distintos estratos de la epidermis (Pasparakis *et. al.*, 2014).

La formación de los diferentes estratos de la epidermis se da por el cambio de crecimiento y diferenciación de las células queratinocitos, estrechamente regulado por varios mecanismos asociados con una disminución de la proliferación, detención del ciclo celular en la fase G0/G1 y la expresión de marcadores de diferenciación epidérmica (Micallef *et. al.*, 2009).

La diferenciación celular *in vitro* se desarrolla en condiciones de cultivo en un medio específico para el crecimiento de los queratinocitos y se induce aumentando la concentración de calcio extracelular de 0.09 (cultivo selectivo de las células basales epidérmicas) a 1.2 mM (inducción de la diferenciación terminal de las células epidérmicas), la cual promueve la formación de uniones adherentes y desmosomas (estructuras celulares que mantienen adheridas a células vecinas), dando como resultado un epitelio escamoso altamente especializado, organizado y estratificado (Lewis *et. al.*, 1994, Kimura *et. al.*, 2007).

Los cambios estructurales se combinan con la expresión de marcadores bioquímicos de diferenciación queratina 1 (K1) y queratina 10 (K10), considerados como los primeros marcadores de diferenciación terminal y localizados en las primeras capas de células espinosas suprabasales (Woodcock-Mitchell *et. al.*, 1982; Yuspa *et. al.*, 1994). Otro de los marcadores bioquímicos es la expresión de involucrina, la cual se localiza en las últimas capas de células espinosas y en la capa granular, además de que es la encargada de formar la envolturas cornificadas por confluencia celular (Eckert y Green, 1989).

1.2.3 Propiedades y funciones de la piel humana

La piel posee funciones de vital importancia para la supervivencia, la capa más importante de la piel es la epidermis gracias a la queratina, debido a que representa una barrera física de protección frente a la entrada de agentes nocivos, como bacterias y toxinas; además impide la evaporación de agua en exceso.

De acuerdo con Niyonsaba y Ogawa (2005), en la piel existe la presencia de agentes antimicrobianos que constituyen el escudo protector natural, tales como β -defensinas

humanas (hBDs), catelicidina LL-37, lisozima, RNasa 7, elafina, psoriasina, dermicina, adrenomedulina, inhibidor de la proteasa secretora de leucocitos y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos. Muchos de estos agentes antimicrobianos se intercalan para matar microorganismos patógenos invasores, como bacterias gram positivas y gram negativas, hongos, así como virus y en presencia de infecciones o lesiones las concentraciones de estas moléculas aumentan para proteger la piel (Niyonsaba y Ogawa, 2005; Chen *et. al.*, 2005).

Las principales propiedades de la piel son:

- **Viscoelasticidad de la piel:** Capacidad de estiramiento temporal y la capacidad de recuperarse después de un estiramiento máximo.
- **Propiedades tensoras de la piel:** Esta se da cuando la tensión cutánea es más rápida que su capacidad de estiramiento, por lo que se rompen las fibras colágenas y se originan estrías cutáneas.
- **Extensibilidad de la piel:** Con la edad se pierde elasticidad y se reemplaza por la laxitud de la piel.
- **Reparación-Regeneración de la piel:** Permite soportar agresiones continuas (daños por radiación, cambios de temperaturas, accidentes por quemaduras o sustancias químicas, etc.).

En cuanto a las funciones de la piel se describen a continuación (Niyonsaba y Ogawa, 2005; Lee *et. al.*, 2013):

- **Protección:** Actúa como barrera física contra la invasión de microorganismos y brinda la protección de los rayos UV gracias a la melanina, que además aporta coloración a la epidermis.
- **Sensación:** La piel cuenta con diversos receptores que captan sensaciones de tacto, calor, frío, presión y dolor.
- **Termorregulación:** Permite regular la temperatura y mantener el equilibrio hídrico.
- **Metabolismo:** La piel sintetiza vitamina D por acción de la radiación ultravioleta.

1.2.4 Patologías de la piel humana

El color de la piel normal depende de la cantidad y tipo de melanina presente en los melanocitos y queratinocitos. Las enfermedades causadas por cambios de color, se denominan discromías las cuales a su vez se clasifican en:

- **Hiperpigmentación.** Se presenta como un aumento de tonalidad circunscrita o generalizada de la piel, debido a un aumento del número de melanocitos o a alteraciones de la localización y distribución de la melanina.
- **Hipopigmentación.** Se presenta por la disminución del tono de color de la piel debido a una disminución o mala distribución de la melanina en los queratinocitos.

La hipopigmentación se da como consecuencia de un defecto en la enzima tirosinasa con una alteración en la síntesis o almacenamiento de la melanina en los melanosomas. En la actualidad existen diversas terapias estéticas para tratar esta enfermedad dermatológica; entre ellas la más reciente es la ingeniería de tejidos, la cual busca realizar la regeneración *in vivo* del tejido dañado por medio de un andamio o biomatrices a base de biomateriales que sean biodegradables y biocompatibles con las células dérmicas para después ser implantadas en la zona dañada (Pérez-González, 2010; O'Brien, 2011; Colorado *et al.*, 2013).

1.3 Diseño de andamios para la aplicación en la ingeniería tisular

1.3.1 Biomateriales para la generación de andamios para cultivos celulares en Ingeniería tisular

En la actualidad, la ingeniería tisular "*in vivo*" abarca la regeneración y reconstrucción de tejidos y órganos; esto se lleva a cabo por medio de la aplicación de una biomatriz biodegradable o andamio biológico con la finalidad de usarlos como estructuras sustitutivas en la zona del cuerpo dañada (Morales-Navarro, 2014).

Las biomatrices o andamios son estructuras diseñadas para ser implantadas dentro de un sistema vivo para promover la regeneración de un tejido dañado con el mismo tipo de células. Asimismo, estas estructuras deben ser diseñadas para soportar la adhesión,

proliferación y diferenciación celular (Smith *et. al.*, 2009; Gomes *et. al.*, 2013; Morales-Navarro, 2014).

En la generación de andamios se utilizan diversos biomateriales, los cuales deben cubrir algunos prerrequisitos como son:

- Biocompatibilidad
- Biodegradabilidad controlada
- No tóxico
- No producir respuesta inmunológica
- Permitir la adherencia de las células
- Propiedades termomecánicas

Dentro de los diversos biomateriales empleados para aplicaciones de ingeniería de tejidos se han utilizado con frecuencia materiales naturales (Tabla 1) los cuales son derivados de fuentes renovables tales como plantas, animales y microorganismos. Además, son de gran interés por sus aplicaciones médicas y farmacéuticas, siendo utilizados como sistemas de liberación de fármacos, sensores de diagnóstico y sustitutos de piel; debido a que permiten la formación de una interfaz con el sistema biológico gracias a su biocompatibilidad (Sachlos y Czemuszkza, 2003; Gomes *et. al.*, 2013; Jafari *et. al.*, 2015).

Los polímeros naturales son compuestos moleculares a base de carbono, hidrogeno y oxígeno, formados cadenas de unidades simples llamadas monómeros unidas entre sí mediante enlaces covalentes. Hoy en día la biotecnología moderna ha hecho posible manipular estos polímeros naturales para adaptarlos a las necesidades humanas, entre los diversos polímeros biodegradables estudiados esta la clase de los polihidroxialcanoatos los cuales al ser extraídos de las células exhiben propiedades termoplásticas y elastoméricas, son materiales naturales y pueden degradarse fácilmente a dióxido de carbono y agua (Philip *et. al.*, 2007).

Tabla 1 Clasificación de polímeros naturales con aplicaciones en ingeniería tisular.

Polímeros naturales	
Polisacáridos	<ul style="list-style-type: none">• Alginato y dextran• Quitosano• Celulosa• Almidón
Proteínas	<ul style="list-style-type: none">• Colágeno• Elastina• Haba de soya• Fibroína de seda
Poliésteres	<ul style="list-style-type: none">• P3HB• P3HB-HX

1.3.2 Polihidroxialcanoatos y sus propiedades

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos biodegradables y biocompatibles que en la actualidad se pueden producir por medio de cultivo de bacterias silvestres, microorganismos recombinantes y por vía enzimática (Lemos y Mina, 2015, González-García *et. al.*, 2013).

Estos biopolímeros ofrecen la ventaja de ser producidos a partir de recursos renovables y presentan propiedades que van desde materiales quebradizos y rígidos, hasta semejantes al hule (Sudesh *et. al.*, 2000). Estructuralmente, se pueden clasificar en PHA's de cadena corta y cadena media, con base en el número de átomos de carbono en la cadena ramificada de los biopolímeros.

1.3.2.1 Poli-3-hidroxi-butirato P3HB y sus propiedades.

El primer homopolímero descubierto de la familia de los PHA's fue el poli-3-hidroxi-butirato (P3HB). Este homopolímero está conformado por monómeros de cadena corta (Figura 4), el cual es producido por diversas bacterias y arqueas en forma de gránulos, que son acumulados en su interior como material de reserva de carbono y energía para su uso

cuando el aporte de nutrientes no está balanceado (Kessler y Witholt, 2001; Salehizadeh y Loosdrecht, 2004; Suriyamongkol *et. al.*, 2007; González-García *et. al.*, 2013; Lemos y Mina, 2015).

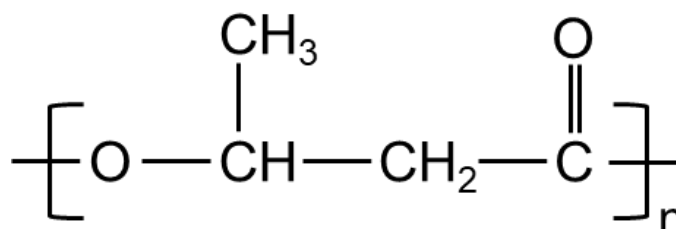


Figura 4 Estructura química del monómero 3-hidroxibutirato (Peña *et. al.*, 2014).

El P3HB cuenta con características termomécánicas similares a los plásticos derivados del petróleo (como el polipropileno y polietileno); sin embargo, tiene la ventaja de ser totalmente biodegradable (lo pueden asimilar microorganismos del suelo, de mares, de lagos o aguas residuales) y biocompatible, es decir, que no es tóxico para organismos superiores. Las propiedades termomécánicas, las características químicas y la pureza del producto son de gran importancia ya que de éstas dependerá su aplicación (Peña *et al.*, 2014; Peña *et. al.*, 2015).

1.3.2.2 Importancia del peso molecular del P3HB en el área biomédica.

El peso molecular es una característica que determina las propiedades termomécánicas y fisicoquímicas de cualquier biopolímero. Respecto al P3HB, el peso molecular determina el grado de cristalinidad, el comportamiento elástico del material, la resistencia mecánica y por consecuencia, la aplicación final del material (Kabe *et. al.*, 2012; Peña *et al.*, 2014; Domínguez-Díaz *et. al.*, 2015).

Cuando el P3HB presenta valores de pesos moleculares menores a los 1000 kDa es considerado como un material rígido y quebradizo por su alto grado de cristalinidad (lo normal es 55 a 80 %), mientras que su degradación térmica es más rápida en comparación con el P3HB de alto peso molecular (>1 x 10³ kDa), el cual presenta mejores propiedades

elásticas, por lo que se recomienda usar este tipo de biopolímeros en el área biomédica (Tabla 2) (Hong *et. al.*, 2013; Peña *et. al.*, 2014).

Tabla 2. Aplicaciones biomédicas del P3HB (Adaptada de Peña *et. al.*, 2014).

Aplicación	M _w P3HB (kDa)	Referencia
Andamios de PHB y PHB/ nHA para ingeniería de tejidos (hueso)	144	Ramier <i>et. al.</i> , 2014
Andamios de P(3HB/4HB) para el cultivo de osteoblastos	220	Shishatskaya <i>et. al.</i> , 2016
Andamio PHB para el crecimiento de Células embrionarias de riñón (HEK293)	230	Domínguez-Díaz <i>et. al.</i> , 2015
Andamio de PHB+quitosano para ingeniería de tejidos (cultivo de fibroblastos)	890	Cao <i>et. al.</i> , 2005
Andamios de PHB y PHB-b-DEG para el crecimiento de células nerviosas	1,143	Chan <i>et. al.</i> , 2014

El P3HB de alto peso molecular es un biopolímero idóneo para su uso en el área farmacéutica y biomédica. En la actualidad, es empleado para la generación de material de sutura, hisopos, vendajes, sistemas de encapsulamiento de fármacos, fabricación de soportes para el cultivo de células de tejido cardiovascular, nervioso y dérmico (O'Brien, 2011; Chen y Wang, 2013; Vijayavenkataraman *et. al.*, 2016).

1.3.3 Diseño de andamios de P3HB

Los andamios son estructuras o matrices celulares artificiales que tienen la capacidad de albergar células y estimular sus funciones como la adhesión, migración, crecimiento y diferenciación, están diseñados para sustituir o regenerar diversos tejidos (Yan *et. al.*, 2018). Los andamios utilizados en ingeniería tisular se fabrican a partir de biopolímeros, proteínas, péptidos y materiales inorgánicos, además de la influencia del material utilizado, las características y propiedades finales de estos son determinadas por la técnica de

fabricación utilizada, como el control de la topografía y rugosidad de la superficie, porosidad, forma y tamaño de poro (Sabino *et. al.*, 2017).

Hoy en día existen diversas técnicas para el diseño de andamios con múltiples formas, texturas y biomateriales, los cuales van a depender de su aplicación. Estas técnicas van desde las convencionales, como la disolución por solventes-lixiviación de partículas, secado en frío, separación de fases inducidas térmicamente, solución-gel y espuma de gas que tienen la desventaja de usar solventes orgánicos para la formación de los andamios (Nakamura *et. al.*, 2010; Roseti *et. al.*, 2017), hasta las técnicas por estereolitografía, modelado por deposición fundida, láser selectivo y por electrohilado, las cuales presentan el inconveniente de no conferirle a los andamios un tamaño de poro homogéneo, lo que provoca que las células presenten una proliferación heterogénea (Domínguez-Díaz *et. al.*, 2015; Roseti *et. al.*, 2017; Yan *et. al.*, 2018).

Asimismo, existe la impresión 3D, tecnología que, desde que fue inventada la primera impresora en 1987, ha ganado relevancia debido a las múltiples ventajas que ofrece sobre los métodos mencionados en el párrafo inmediato anterior, entre otras: permite la generación andamios versátiles con formas complejas que permiten una distribución celular homogénea, personalización de productos en función del sistema biológico a desarrollar o de la aplicación biomédica, así como andamios de uno o dos componentes (por ejemplo, P3HB-Quitosano, P3HB-Colágeno, Colágeno-PLA, etc.) con tamaños de poro homogéneo y alta interconexión para la migración celular y transferencia del medio de cultivo hacia las células cultivadas sobre ellos (An *et. al.*, 2015, Do *et. al.*, 2015 y Chiulan *et. al.*, 2017,). Por otro lado, existen reportes en la literatura en donde utilizan impresoras en las que las células van incluidas con el biomaterial (Nakamura *et. al.*, 2010; Roseti *et. al.*, 2017; Yan *et. al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES

2.1 Andamios de P3HB por electrohilado en cultivos de queratinocitos

En estudios recientes en el laboratorio 7 de Biotecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UAEM, se diseñaron andamios de P3HB con peso molecular de 230 kDa empleando la técnica de electrohilado, comprobando que el P3HB es un polímero biocompatible, ya que permitió la proliferación y adherencia celular (Queratinocitos Humanos Neonatales, Osteoblastos Normales Humanos y HEK 293) (Domínguez-Díaz, 2015; Mondragón-Guillén, 2020).

Mondragón-Guillén (2020) observó que los andamios que generó por electrohilado no produjeron citotoxicidad en el sistema “*in vivo*” donde se probó (tejido subcutáneo de ratas Wistar), dado que la incisión realizada para el implante del andamio cicatrizó satisfactoriamente, sin afectar la formación del tejido, observándose la biodegradación de éste a los 15 días. Sin embargo, en condiciones “*in vitro*” a las 192 h de cultivo observó que los queratinocitos proliferaron de manera heterogénea sobre los andamios de P3HB (Figura 5), ya que, mediante observaciones en el microscopio de epifluorescencia usando el filtro FITC (Fluorescein IsoTioCyanate) se evidenciaron zonas donde hubo aglomeraciones de células viables (verde intenso), zonas con menor o nula densidad celular.

Así también, se detectaron células muertas que fluorescen de color rojo bajo el filtro TRITC (Tetramethylrhodamine), por lo que se realizó la superposición de imágenes para evidenciar la viabilidad celular sobre el andamio.



Figura 5 Micrografías de cultivo de queratinocitos a las 192 h sobre andamios de P3HB generados por electrohilado (Mondragón-Guillén, 2020).

El crecimiento heterogéneo sobre el andamio posiblemente se debió a lo siguiente:

- Variabilidad en el tamaño de poro de la biomatriz: esta característica impactó negativamente en la adherencia celular, se puede explicar de manera hipotética que en las zonas donde existían tamaños de poro mayores al tamaño de los queratinocitos el crecimiento celular fue nulo o muy bajo en comparación con las zonas donde la técnica empleada generó tamaños de poro menores, lo que aumentó la disponibilidad de área de contacto para las células.
- Hidrofobicidad del andamio: la medición del ángulo de contacto (99°) realizada en el centro del andamio de P3HB empleado para la fabricación de la biomatriz evidenció su hidrofobicidad superficial, característica que debió haber limitado la adherencia celular y por ende la proliferación de los queratinocitos.

Dado a las desventajas que se han presentado con la técnica de electrohilado se buscan nuevas alternativas de técnicas para la obtención de andamios que dado a sus características morfológicas superficiales permitan una mayor proliferación y adherencia celular homogénea.

3. JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio 7 de Biotecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UAEM, Mondragón-Guillén (2020) diseñó andamios de P3HB empleando la técnica de electrohilado. Como resultado del diseño de los andamios por dicha técnica, la biomatriz presentó una forma irregular, en cuanto al tamaño de poros, condición que no favoreció la formación homogénea de la monocapa celular, la cual es primordial en el proceso de estratificación celular para el desarrollo de sustitutos de piel.

Sin embargo, la generación de andamios a través de la técnica antes mencionada, así como por *salt leaching* y evaporación de solventes en membranas, implican el uso de solventes orgánicos para su fabricación, representando una desventaja por la posibilidad de que trazas de solventes puedan permanecer en los andamios, disminuyendo su confiabilidad para su uso en el área biomédica.

Por lo anterior, en este proyecto se generaron andamios de P3HB por las técnicas impresión 3D y moldeado en placa, las cuales no necesitan el uso de solventes para su generación y tener mayor control en la definición de tamaños y formas, características necesarias para la formación de una monocapa homogénea que permita la formación de un tejido funcional.

4. HIPÓTESIS

Los andamios de P3HB generados por impresión 3D y moldeado en placa favorecen el crecimiento y la adhesión celular de manera homogénea en comparación con los andamios control generados por electrohilado.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Desarrollar andamios de P3HB por impresión 3D y moldeado en placa para evaluar su biocompatibilidad con células epidérmicas HaCaT, como modelo potencial que permita la formación de un tejido funcional.

5.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar diferentes métodos de extracción de P3HB con la finalidad de obtener biopolímeros de mayor peso molecular y pureza para la generación de andamios.
- ✓ Caracterizar propiedades fisicoquímicas y termomecánicas del P3HB obtenido mediante los diversos métodos de extracción.
- ✓ Desarrollar andamios por las técnicas de impresión 3D y moldeado en placa para ser caracterizados por microscopía y comparados con el andamio control (electrohilado).
- ✓ Evaluar la biocompatibilidad de los andamios con las células epidérmicas HaCaT para generar un tejido funcional.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la Figura. 6 se muestra un diagrama de la estrategia experimental que se llevó a cabo durante el desarrollo del presente trabajo.

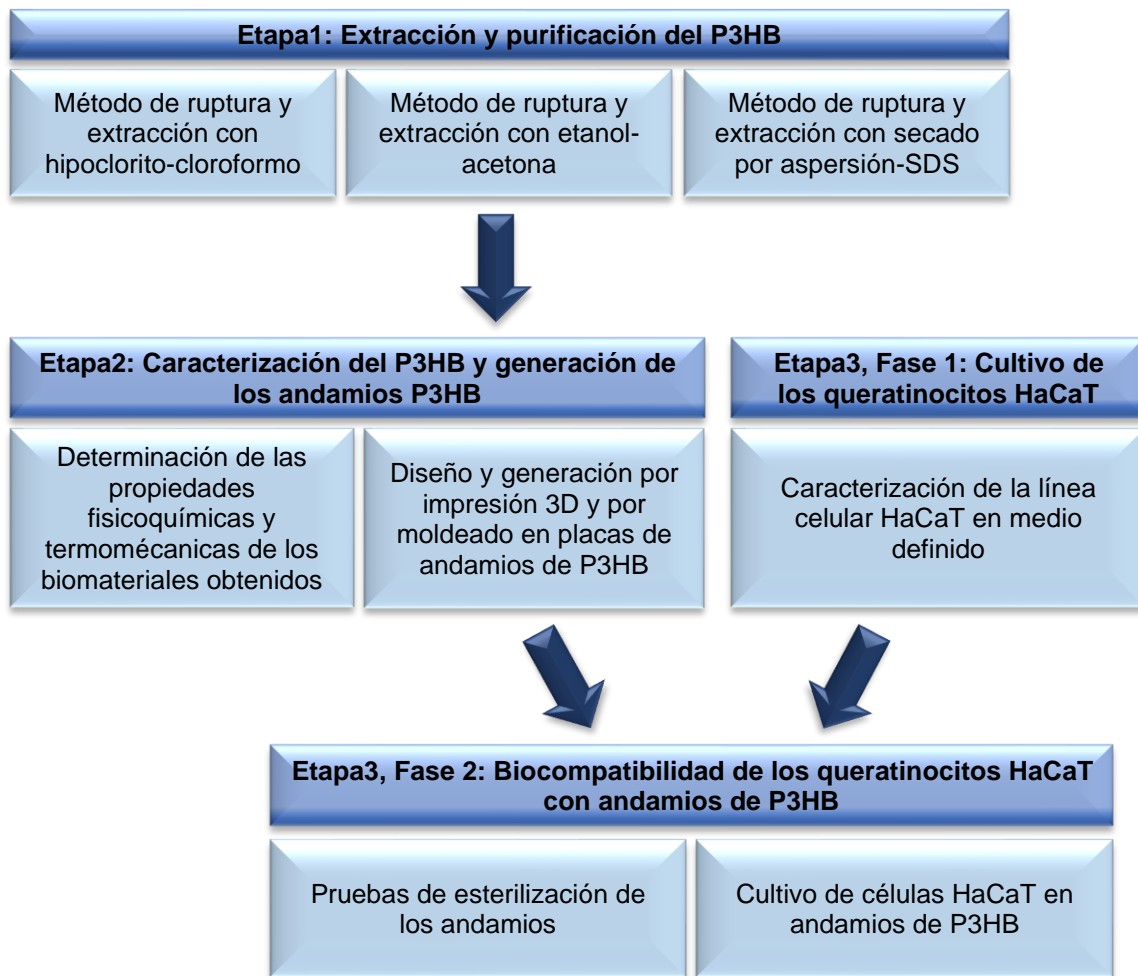


Figura 6 Estrategia experimental.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Extracción del Poli-3-hidroxi-butirato P3HB

El P3HB proviene de la biomasa de la cepa mutante OPNA de la bacteria *Azotobacter vinelandii*, la cual se cultivó durante 56 h en un biorreactor en lote de 350 L. Las condiciones operacionales y composición del medio se muestran en la Tabla 3 (Sánchez- Álvarez, 2019).

Tabla 3. Composición del medio de cultivo y condiciones operacionales.

Composición del medio (SEL) C/N=14	Condiciones operacionales	
	Primer pulso	Segundo pulso
Extracto de levadura (15 g/L) Sacarosa (30 g/L)	+25 L de solución extracto-sacarosa (162.4 g/L y 325 g/L, respectivamente)	+25 L de solución extracto-sacarosa (175 g/L y 350.36 g/L, respectivamente)
Kanamicina (1 mg/L)	Temperatura: 30 °C, pH: 7.2	
Espectinomicina (8.3 mg/L)	50 rpm	75 rpm
	0.6 vvm	0.75 vvm

De la fermentación de 350 L se alcanzó 35 g de biomasa/L y 30 g de P3HB/L, la biomasa obtenida de la fermentación se centrifugó (15,000 rpm) empleando una centrifuga Sharples AS-16 (Pennwalt), con objeto de retirar el medio de cultivo. Se recuperaron 12 kg de biomasa húmeda de la fermentación, misma que fue resuspendida en 60 L de agua corriente y para volverse a centrifugar. Esta actividad se llevó a cabo por duplicado para retirar residuos del medio de cultivo.

Una vez centrifugada la biomasa de la cepa OPNA de *A. vinelandii* se resuspendieron 7 kg de biomasa húmeda (de los 9 kg de biomasa recuperados previamente) en 35 L de agua destilada para llevar a cabo el proceso de secado por aspersión (secador por aspersión de disco atomizador de GEA PROCESS ENGINEERING DE MÉXICO, modelo Niro Bowen), empleando las siguientes condiciones operacionales: flujo de alimentación de 132 mL/min, 130 ± 3 °C de temperatura de inicio y 60 ± 3 °C de temperatura a la salida de la tolva. La fermentación, la centrifugación y el secado por aspersión antes mencionados se llevaron a cabo en la unidad de escalamiento del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Después del proceso de secado por aspersión de la biomasa, se realizó la extracción del P3HB utilizando tres métodos diferentes bajo un diseño experimental para la mejora del biopolímero, dos de ellos se realizaron con biomasa húmeda y un tercero con la biomasa que se obtuvo después del secado por aspersión, los cuales se describen a continuación.

7.1.1 Método 1: Ruptura y extracción con Etanol-acetona

Este método fue reportado por Castro (2018), adaptándolo para llevarse a cabo en un proceso continuo. Se preparó una solución con biomasa húmeda a una concentración de 30 g biomasa húmeda/L de etanol (grado industrial de 99.9 % V/V), mezclándola por 30 min con un agitador magnético a temperatura ambiente hasta obtener una mezcla homogénea.

Posteriormente, se montó un sistema de extracción en continuo propuesto por Sánchez-Álvarez (2019) (Figura 7), el cual consistió en calentar la suspensión celular en etanol contenida en un matraz bola de tres bocas hasta su punto de ebullición (77 ± 1 °C) durante 60 ± 2 min. Transcurrido del tiempo de reacción y con la ayuda de una bomba peristáltica, la solución se recolectó en un recipiente de almacenamiento. Al finalizar la extracción la suspensión celular se centrifugó a 7,000 rpm por 10 min sin control de temperatura en frascos para centrifuga de 500 mL. El sobrenadante se decantó y la pasta resultante (P3HB) pasó a la etapa de lavados.

Con objeto de incrementar la pureza del material se incluyó una etapa de lavado con agua destilada y dos lavados con etanol-acetona (75 g de sólidos/L, relación 1:1). Las mezclas se agitaron por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas, descartando el sobrenadante para recuperar la pasta resultante y secarla en un horno a 60 °C por 6 h.

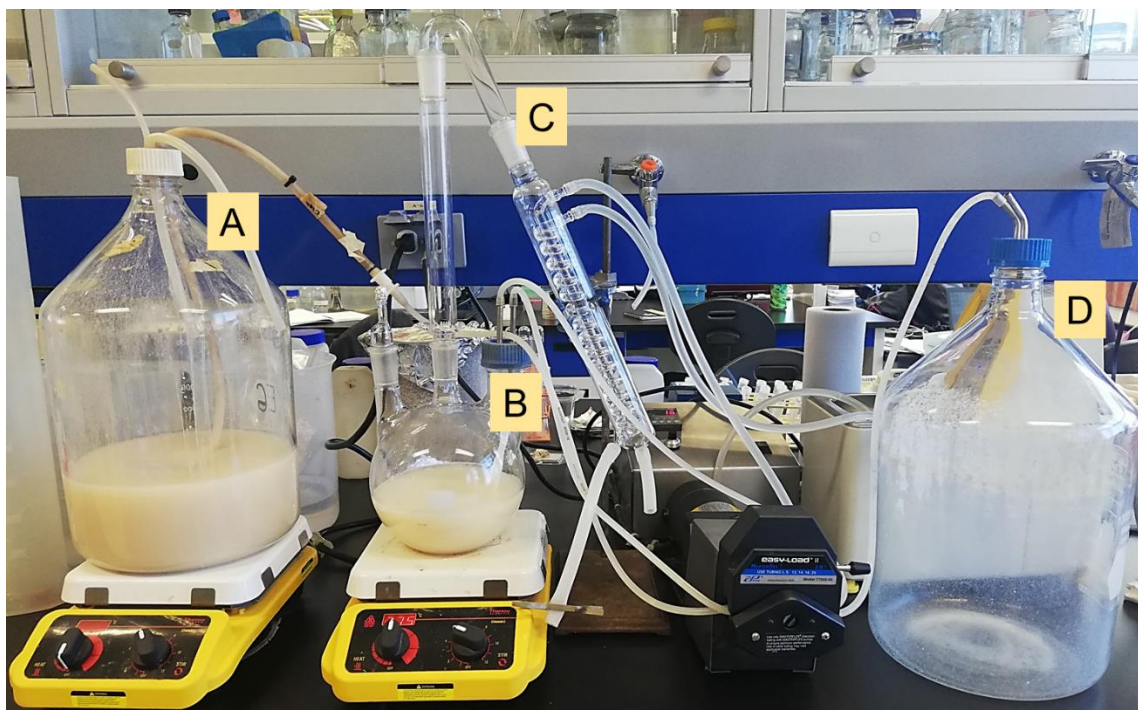


Figura 7 Sistema de extracción diseñado por Sánchez-Álvarez, (2019). A) Frasco de alimentación continua de la suspensión celular con etanol. B) Matraz bola de tres bocas para la reacción. C) Columna de recirculación y condensación para la recuperación del solvente. D) Frasco de almacenamiento de la extracción de P3HB.

7.1.2 Método 2: Ruptura y extracción con Hipoclorito-cloroformo

Para este método se preparó una solución relación 1:1 de hipoclorito de sodio (marca Cloralex al 30 % V/V) con cloroformo (marca Fermont al 99.9 % V/V) a una concentración de 40 g de biomasa húmeda/L, la cual se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión fue centrifugada a 6,000 rpm por 20 min sin control de temperatura, obteniéndose tres fases visiblemente separadas: la superior correspondiente al hipoclorito de sodio, la intermedia acumuló restos celulares y en el fondo el cloroformo con el P3HB.

Finalmente, se dejó evaporar el cloroformo en una campana de extracción por 12 h y el secado del material se realizó en un horno a 60 °C por 4 h.

7.1.3 Método 3: Ruptura y extracción con secado por aspersión-SDS

Este método de extracción se planteó con objeto de obtener P3HB libre de solventes orgánicos o halogenados, así como con mayor pureza en comparación con los métodos de extracción antes descritos.

De acuerdo con lo reportado por Casas y colaboradores en 1992, el uso de secado por aspersión generó daños a la membrana celular (rompimiento) de la levadura *Kluyveromyces fragilis*, por lo que se asumió que con esta operación unitaria se lograría también el rompimiento celular de la biomasa de *A. vinelandii* para la recuperación del P3HB, mismo que al tratarlo con dodecilsulfato de sodio (SDS) (técnica de extracción modificada de la patente N°. US9, 683, 076 B2) se podría mejorar la pureza del biopolímero.

Por lo anterior, se desarrolló un diseño experimental en el cual se probaron distintas condiciones operacionales (Tabla 4).

Tabla 4 Diseño experimental empleado para la selección de las condiciones de extracción de P3HB.

Tiempo de mezclado (min)	Concentración SDS (g/L)	
	1 lavado	2 lavados
10	4	4
	8	8
30	4	4
	8	8

Se resuspendieron 150 g de biomasa seca en 1 L de agua destilada y se ajustó el pH a 10 con NaOH (1 M), para favorecer la ruptura de la membrana celular, previo a la adición de la cantidad de SDS indicada en la Tabla 4. Posteriormente, se realizó una dilución 1:4 con agua destilada, la cual se mezcló con ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente y de acuerdo con los tiempos indicados en la Tabla 4.

Al finalizar el tiempo de mezclado, la suspensión fue recuperada en frascos de 500 mL y centrifugada a 7,000 rpm durante 10 min, sin control de la temperatura. Finalmente se desechó el sobrenadante para recuperar la pasta de P3HB, misma que se dejó secar en un horno a 60 °C por 6 h.

Es importante mencionar que el procedimiento antes descrito se llevó a cabo para los dos tiempos de mezclado (10 y 30 min) y para uno y dos lavados, modificando las concentraciones de SDS (4 y 8 g/L) para cada condición (Tabla 4).

7.2 Técnicas para la caracterización del biomaterial

7.2.1 Determinación de la pureza del P3HB

La concentración de P3HB se determinó mediante su conversión a ácido crotónico por una reacción con H_2SO_4 concentrado (Castillo, 2013). Para llevar a cabo esta reacción se depositaron entre 2 y 3 mg del producto obtenido de cada uno de los métodos de extracción, en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se adicionó 1 mL de H_2SO_4 concentrado. Las muestras se incubaron a 90 °C y 700 rpm durante 1 h en un termoblock (Thermomixer R marca Eppendorf).

Las muestras se dejaron enfriar y se realizó una dilución de cada una en viales para HPLC (por lo general se utiliza la dilución 1/40 con agua Milli-Q), inyectándose 20 μ L al HPLC (Waters Alliance 2695) con una columna Aminex HPX-87H (Biorad). La fase móvil utilizada fue H_2SO_4 5 mM, a un flujo de 0.65 mL/min y 50 °C de temperatura para los análisis. El detector utilizado fue de arreglo de diodos (Waters 2996).

El área bajo la curva del cromatograma se cuantificó a 220 nm y se utilizó la ecuación indicada en la Figura 8, correspondiente a la curva patrón de soluciones de P3HB comercial (Sigma-Aldrich, # cat. 363502), a concentraciones conocidas entre 0.01-0.1 mg/mL (Castillo, 2013).

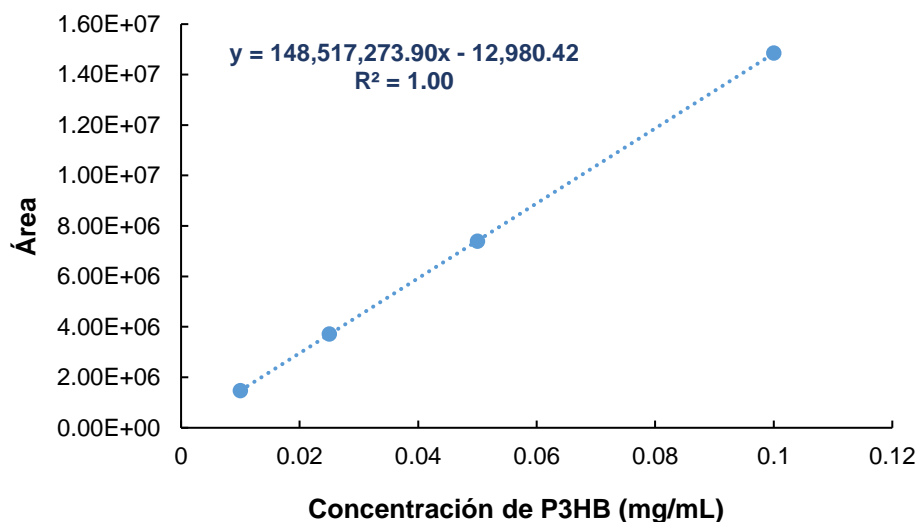


Figura 8 Curva patrón para la cuantificación de P3HB.

Para conocer el porcentaje de P3HB en las muestras de cada uno de los métodos de extracción empleados se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 1

$$P3HB (\%) = \left[\frac{\frac{\text{Área bajo la curva} - 12,273.90}{148,517,273.90}}{P3HB \text{ total}} * \text{Dilución} \right] * 100\%$$

7.2.2 Determinación del peso molecular del P3HB

La distribución de pesos moleculares se determinó por cromatografía de permeación en gel (GPC), utilizando la columna SHODEX GPC-806M (Millán *et al.*, 2016). Dicha columna permite analizar muestras de P3HB con pesos moleculares desde 1 hasta 20,000 kDa. Para esta técnica se utilizó un equipo de HPLC (Waters Alliance 2695), con un detector de índice de refracción (Waters, 2414). Las condiciones de operación fueron las siguientes: 30 °C, velocidad de flujo de 0.7 mL/min de cloroformo (filtrado), como fase móvil 50 µL de volumen de inyección y 18 min de tiempo de corrida.

Se utilizaron estándares de poliestireno para la curva de calibración con pesos moleculares entre 2.9 – 5.97 x10³ kDa. Se pesaron 15 mg de P3HB obtenido de los diferentes métodos de extracción evaluados y se disolvieron en 1 mL de cloroformo durante

2 o 3 h a 55 °C y 700 rpm en un termoblock (Thermomixer R marca Eppendorf). Cada muestra se filtró con membranas de *nylon* de 0.45 µm y se colocaron en viales para HPLC. Se utilizó el software *Empower* para el procesamiento y cuantificación de las muestras.

7.2.3 Rendimiento del P3HB recuperado por los métodos de extracción

Para analizar el rendimiento de P3HB obtenido al aplicar cada método de extracción, se determinó la cantidad teórica contenido en la biomasa a procesar. Para ello se calculó la humedad para poder expresar la biomasa en base seca y posteriormente multiplicarla por la cantidad máxima teórica total de P3HB por célula. El rendimiento de P3HB en porcentaje, fue calculado de acuerdo con la Ecuación 2.

Ecuación 2

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad de P3HB}_{\text{Recuperado}}}{\text{Cantidad de P3HB}_{\text{Teórico}}} \times 100\%$$

7.2.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Este análisis se realizó para determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) y temperatura de fusión (T_m) de las muestras de P3HB obtenidas de cada uno de los métodos de extracción (Venegas-Vásconez, 2017).

El DSC se realizó en un calorímetro Metter Toledo, propiedad del Laboratorio de Ciencias Químicas de la UNAM. La cantidad de las muestras utilizadas fue de 4 mg (previamente secas en un horno a 60 °C) y se reportaron los datos del segundo calentamiento, así como del primer enfriamiento. Las muestras se sometieron a un barrido de temperatura de 0 a 300 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

7.2.5 Elaboración de probetas de P3HB y análisis de módulo de Young

Para la generación de probetas se pesaron 3 g de P3HB obtenido de cada uno de los métodos de extracción y se colocaron en tubos de 15 mL para adicionarles 2 mL de cloroformo, dejándolos en reposo por 24 h hasta que el P3HB se disolvió por completo.

La fabricación de las probetas se llevó a cabo en una campana de extracción, adicionando lentamente el P3HB disuelto en cloroformo en los moldes de aluminio diseñados en el Instituto de Ciencias Físicas de la UNAM (Figura 9).

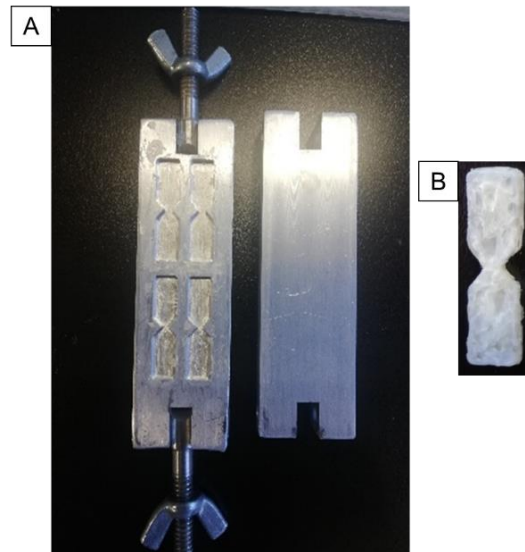


Figura 9 Material de apoyo para la determinación del módulo de Young. A) Molde de aluminio para la obtención de probetas. B) Probeta de P3HB.

Las pruebas de tracción se llevaron a cabo en una mini-tensora marca Linkam TST-360, propiedad del Instituto de Química de la UNAM. Esta prueba se realizó bajo una deformación uniaxial, a temperatura ambiente y una velocidad de 5 mm/min. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada material.

7.3 Elaboración del filamento de P3HB para la impresión 3D

7.3.1 Pretratamiento del P3HB y generación del filamento

El pretratamiento realizado al P3HB obtenido por los diferentes métodos de extracción se muestra en la Tabla 5, con objeto de tener un biomaterial con el menor contenido de humedad posible que facilitara su pulverizado previo a la etapa de extrusión.

Tabla 5 Condiciones de secado para los materiales obtenidos de los métodos de extracción propuestos.

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Equipo
Ruptura y extracción con Hipoclorito/Cloroformo	80	3	Horno de vacío CIATEQ
Ruptura y extracción con Etanol/Acetona	60	4	Horno IBT
Ruptura y extracción por Secado por aspersión/SDS	60	4	Horno IBT

La generación del filamento se realizó empleando un extrusor (FILABOT, FOV1) (Figura 10), las condiciones de temperatura fueron de 170 a 180 °C a una velocidad constante del husillo de 35 rpm, en el Centro de Tecnología Avanzada (CIATEQ-Lerma, Edo. Méx.).

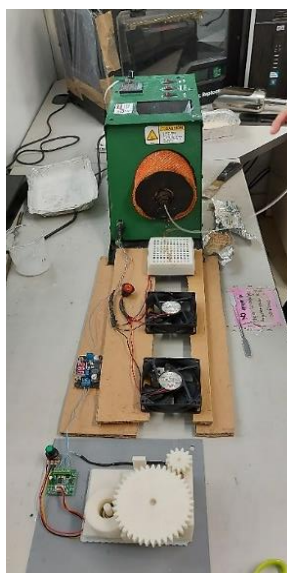


Figura 10 Extrusor marca FILABOT adaptado con ventiladores para enfriamiento del filamento.

7.3.2 Generación de andamios por impresión 3D

Se realizó el diseño de los andamios de P3HB con dimensiones de 1x1 cm y un grosor de 100 μm con ayuda de un *software* de diseño asistido por computadora (AutoCAD). Para la generación de los andamios se empleó la impresora 3D (Tev0 Tarantula v1.0) reconstruida

por el M. en C. Eduardo Sánchez-Álvarez (Figura 11) con las siguientes condiciones operacionales: velocidad de impresión 40 mm/s, temperatura de impresión de 185 °C y temperatura de la cama de impresión de 60 °C.

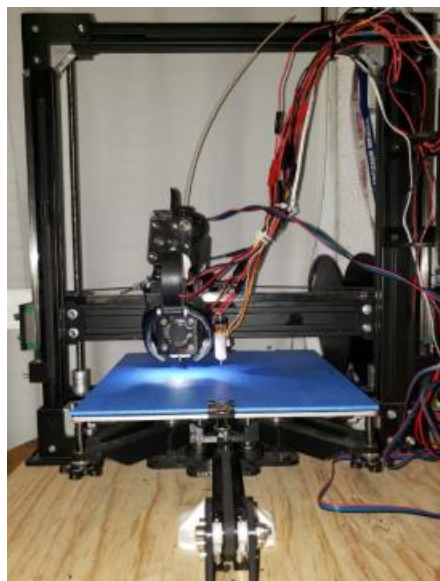


Figura 11 Impresora 3D reconstruida y diseñada por M.C. Eduardo Sánchez-Álvarez.

7.3.3 Generación de andamios por moldeado en placa

La generación de andamios por este método se realizó en el Centro de Tecnología Avanzada (CIATEQ-Lerma, Edo. Méx.), empleando una prensa hidráulica (prensa CARVER automática de banco, modelo AUTO-FOUR) a 180 °C y 10 Ton de presión durante 5 min. Posteriormente, las placas se dejaron enfriar para la recuperación de la membrana de P3HB, la cual se recortó para la obtención de andamios circulares de 1 y 2 cm² de área.

7.3.4 Determinación del ángulo de contacto de los andamios generados

Este análisis se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Físicas de la UNAM empleando la técnica de gota sésil (Arkles y Pan, 2006) a temperatura ambiente (25 °C). La adquisición de imágenes se realizó con ayuda de un microscopio óptico a 25X (Figura 12), las cuales fueron procesadas con un software de análisis de imágenes para calcular el ángulo entre la gota de agua y la superficie.



Figura 12 Montaje de la técnica de gota sésil para determinar el ángulo de contacto.

7.3.5 Caracterización superficial de los andamios

Se realizó a través de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) en la Facultad de Química de la UNAM de cada uno de los andamios que se generaron por impresión 3D y moldeado en placa. Las imágenes se tomaron a 15 kV a las ampliaciones de 300X, 1000X y 4000X.

7.4 Línea celular, mantenimiento y preservación de celular

7.4.1 Línea celular HaCaT

Se utilizó la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT obtenida de la piel de un hombre Caucásico de 62 años, de la marca Creative Biorray (No. Cat. CSC-C8977H). Estas células crecen en monocapa y son adherentes, mismas que se utilizaron en los análisis de biocompatibilidad y de diferenciación.

7.4.2 Medio de cultivo para mantenimiento

7.4.2.1 Medio de cultivo DMEM-F12 con 10 % (V/V) de SFB

Para la línea celular HaCaT se utilizó como medio de mantenimiento el Medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12). Este medio de cultivo contiene

aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y otros compuestos orgánicos, y es suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (debido a que no contiene proteínas, lípidos ni factores de crecimiento). Es un medio basal ampliamente utilizado para promover el crecimiento de células animales.

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron 880 mL de agua tipo 1 (agua Milli-Q) en un vaso de precipitados y se vertió lentamente el contenido del sobre con el medio de cultivo (número de catálogo: 12500-039, Gibco) para ser mezclado con ayuda de un agitador magnético hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, se ajustó el pH a 7.4 con HCl o NaOH (1 N) y se ajustó el volumen a 900 mL para ser esterilizado por filtración.

Dicha operación se realizó utilizando una unidad de filtración (estéril) con una membrana de 0.2 μm dentro de una campana de flujo laminar. Por último, el medio de cultivo se suplementó con 10% (V/V) de SFB (900 mL de medio de cultivo y 100 mL de SFB) y fue dosificado en frascos de 250 mL para su almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C.

7.4.2.2 Medio de cultivo Keratinocyte SFM (1X) con CaCl_2

Para la línea celular HaCaT adaptada en medio específico libre de suero suplementado con el Kit de Keratinocyte (KTC) SFM (1X), marca Gibco (500 mL, No. Catálogo 17005042) como medio de mantenimiento, el cual se suplementó con 1.4 mL de factor de crecimiento Extracto de Pituitaria Bovina (BPE a una concentración de 17 mg/mL) y 79 μL del factor de crecimiento Epidérmico Recombinante Humano (EGF a una concentración de 0.032 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) bajo condiciones estériles (campana de flujo laminar) para dosificarlo en tubos Falcon de 50 mL (recubiertos de papel aluminio para protegerlos de la luz) para su uso.

Previo al uso del medio de cultivo KTC antes descrito, se suplementó con 0.03 o 2.4 mM de CaCl_2 , dependiendo del experimento a realizar, el cual provenían de un stock de CaCl_2 (Sigma-Aldrich No. C5670-100G) 100 mM (esterilizado por filtración).

7.4.3 Mantenimiento y preservación de la línea celular HaCaT

7.4.3.1 Descongelación de la línea celular

Al momento de descongelar una línea celular, se identificó la ubicación del criovial, verificando el nombre de la línea celular y número de vial. Una vez identificado se recuperó el criovial del ultracongelador o del nitrógeno líquido (verificar que la etiqueta sea correcta) y se colocó de inmediato en hielo con la finalidad de aumentar gradualmente la temperatura. Una vez logrado esto, el criovial se colocó en baño maría a 37 °C (evitar que la tapa del criovial tenga contacto con el agua, ya que eso aumenta el riesgo de contaminación). Otra forma de descongelar el criovial es frotándolo cuidadosamente con las yemas de los dedos.

Una vez descongelado el criovial, se limpió con etanol al 70% (V/V) y posteriormente se colocó en una gradilla dentro de la campana de flujo laminar. En un tubo para centrifuga de 15 mL se adicionan 2 mL de medio de cultivo a usar (el doble del volumen del criovial), con una pipeta de 1 mL se transfirió el contenido del criovial al tubo de 15 mL y se resuspendió cuidadosamente. Posteriormente se cerró perfectamente el tubo de 15 mL para centrifugarlo por 5 min a 900 rpm. Realizada esta operación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio fresco.

En tanto se realiza lo anterior, en una caja de cultivo T-25 se adicionaron 4 mL de medio de cultivo (a temperatura ambiente) y se colocó la caja de cultivo en la incubadora, entre 15-20 min a condiciones estándar (37°C y 5 % CO₂). Transcurrido este tiempo, se tomó la caja de cultivo y se transfirió 1 mL de medio de cultivo con células que se recuperaron del criovial, las cuales fueron resuspendidas lentamente e incubadas por 24 h a las condiciones estándar antes mencionadas. Cumplido el tiempo de incubación, se comprobó, con ayuda de un microscopio invertido, el porcentaje de células adheridas a la caja (formación de la monocapa celular). Durante el cultivo de las células, se recomienda hacer recambio de medio fresco cada 48 h aproximadamente, tal como se describe a continuación.

7.4.3.2 Mantenimiento de la línea celular

El cultivo celular se observó en el microscopio invertido para determinar la confluencia celular; si la confluencia es del 50% aproximadamente se procede a retirar el medio de

cultivo gastado con una pipeta estéril sin tocar la monocapa celular. Con el objeto de retirar residuos de medio gastado se realizó cuidadosamente un lavado celular con 2 mL de PBS (previamente acondicionado a 37 °C). Posteriormente se retiró el PBS con la ayuda de una pipeta estéril y se adicionaron 5 mL de medio fresco para una caja T-25, la cual se colocó nuevamente en la incubadora para continuar con cultivo de las células por 24-48 h adicionales.

En caso de que se tenga menos del 50% de confluencia, solo se retira y reemplaza la mitad del volumen del medio de cultivo con medio fresco.

Transcurridas las 24 o 48 h de crecimiento posteriores al reemplazó de medio de cultivo, se observa nuevamente la caja al microscopio y se determina la confluencia celular, si el valor es menor al 80% se repiten los pasos anteriores y cuando las células alcanzan una confluencia mayor a este valor, se subcultivan las células tal como se describe a continuación.

7.4.3.3 Subcultivo de la línea celular

Se retiró el medio de cultivo de la caja T-25 con una pipeta estéril y se realizó un lavado celular con 2 mL de PBS (o 4 mL de PBS para cajas T-75), previamente acondicionada a una temperatura de 37 °C. Una vez desechado el PBS se adicionaron 1.5 mL de tripsina (a 37 °C) y se incubaron las muestras por 7 min a 37°C y 5% de CO₂. Una vez disgregada la monocapa celular se adicionaron 1.5 mL de medio de cultivo para inactivar a la tripsina.

Posteriormente el contenido de la caja T-25 se transfirió a un tubo estéril de 15 mL con ayuda de una pipeta estéril y se centrifugó a 900 rpm durante 5 min. Concluida esta operación se decantó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 3 mL de medio fresco. A continuación, se realizó el conteo celular y se ajustó el número de células deseado para una caja T-25 con 5 mL de medio de cultivo (10 mL para una T-75). Por último, se colocaron las cajas con las células recién subcultivadas en una incubadora a 37 °C y 5% CO₂ por un periodo de 24 a 48 h antes de volver a ser subcultivadas para su uso experimental o bien para su preservación por congelación, tal como se describe a continuación.

7.4.3.4 Criopreservación de la línea celular

En la criopreservación se utilizan bajas temperaturas para preservar las estructuras intactas de las células vivas por largos periodos, para reducir pérdidas por contaminación, minimizar cambios genéticos en líneas continuas y evitar la transformación en líneas finitas.

Una criopreservación exitosa de células requiere seguir protocolos estandarizados y reproducibles, aunque cada protocolo puede requerir modificaciones según el tipo celular o línea a usar para lograr la máxima viabilidad después del descongelamiento. Las células animales criopreservadas incluyen líneas celulares inmortalizadas, células primarias aisladas a partir de tejidos y células madre. Las células animales se congelan comúnmente con un criopreservante; DMSO o glicerol, y se disminuye la temperatura a una velocidad de 1 °C/min para evitar la formación de cristales de hielo de agua al interior de las células (Woods *et. al.*, 2004).

Es importante asegurarse de que las células a criopreservar cumplan con los siguientes criterios:

- Morfología característica de la línea celular
- Encontrarse en fase de crecimiento exponencial
- Libre de contaminación

Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, se retira el medio de cultivo de la caja T-25 y se realiza el lavado celular con PBS (2 mL) por triplicado para retirar residuos del medio de cultivo. Posteriormente se adicionaron 1.5 mL de tripsina (acondicionada previamente a 37 °C) y se incubó la caja durante 7 min a 37 °C y 5% CO₂. A continuación, se añadieron 2 mL de medio de cultivo (acondicionada previamente a 37 °C) para inactivar la tripsina y con la ayuda de la pipeta se resuspendieron las células para disgregarlas por completo.

Se recolectan las células con el medio de cultivo usando una pipeta estéril y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL para centrifugarse a 900 rpm por 5 min. El sobrenadante se desecha por decantación y el pellet celular se resuspende con 3 mL de

medio fresco para contabilizar las células utilizando muestras de 50 μL , a las cuales se les añadieron un volumen igual de azul de tripano. La mezcla celular se resuspendió y se tomaron 10 μL para su conteo en la cámara de Neubauer. El tamaño de la población a criopreservarse (1×10^6 cel/mL) se ajustó usando la siguiente ecuación:

Ecuación 3

$$\frac{CV}{mL} = \left(\frac{\text{Número de células viables}}{\text{Numero de cuadrantes}} 1 \times 10^4 \right) * FD$$

A la par de la actividad anterior, se realizaron las siguientes dos actividades:

- I. Preparación de crioviales: los crioviales a utilizar se tomaron del refrigerador de -20 °C y a partir de ese momento permanecieron en hielo para tratar de mantener esa temperatura. Posteriormente se rotularon con el nombre del linaje celular, el No. de pase, el No. de células/criovial, la fecha de preparación y las iniciales de la persona que realiza el almacenamiento de las células que conforman el banco de trabajo.
- II. Preparación del medio criopreservación: se prepararon 10 mL de medio con una concentración de 10% (V/V) de DMSO estéril y 90% (V/V) de DMEM-F12 suplementado con 20% (V/V) de SFB con el tamaño de inóculo de células que se desea congelar (1×10^6 cel/mL).

Se llenaron los crioviales enfriados hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad total y fueron cerrados herméticamente (este paso se realiza rápidamente) para colocarse en un recipiente especial, el cual facilitó su traslado y permanencia en el congelador a -20 °C durante 2 h. Posteriormente se trasladó el recipiente especial con los crioviales al Revco (-80 °C) en donde estos últimos se depositaron en una caja para su almacenamiento, hasta por 4 meses (después de ese tiempo se recomienda almacenar los crioviales en nitrógeno líquido -196 °C en donde se pueden mantener por años) para su uso.

7.4.4 Cinéticas de crecimiento

El manejo y subcultivo de las células se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar y el material de vidrio, plástico, soluciones de PBS (+), tripsina y medios de cultivo fueron previamente esterilizados.

7.4.4.1 Cinética de crecimiento en medio DMEM-F12 con 10 % (V/V) de SFB

La línea celular HaCaT, proveniente del banco celular antes descrito, se cultivó en medio DMEM/F12–GIBCO®, suplementado con 10 % (V/V) de SFB (GIBCO®). Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad constante en una incubadora (Eppendorf modelo New Brunswick S41i).

Se realizó una cinética de crecimiento celular en la cual se obtuvieron las células provenientes de una caja T-75 a una confluencia del 100 %. Posteriormente, se prepararon 62 mL de medio DMEM-12 suplementado con 10 % (V/V) de SFB y con 2.43 mL del concentrado de células como inóculo. La cinética se realizó en dos cajas de 24 pozos por triplicado con una concentración celular inicial de 4×10^4 células/mL durante 15 días. Cada 24 h se cosecharon 3 pozos para realizar el conteo de las células en la cámara de Neubauer por la técnica de exclusión por azul de tripano.

Una vez realizado el conteo celular, se utilizó la Ecuación 3 para determinar el número de células viables por mL y se determinó la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación utilizando la Ecuación 4.

Ecuación 4

$$t_d = \left(\frac{\ln(2)}{\mu} \right)$$

7.4.4.2 Cinéticas de crecimiento en medio Keratinocyte SFM (1X)

Debido a que la línea celular HaCaT adquirida de origen venía en medio DMEM-F12 con 10 % (V/V) de SFB, el personal técnico del Laboratorio 7 de la Facultad de Farmacia realizó

su adaptación a medio Keratinocyte SFM suplementado con 0.03 mM CaCl_2 y realizó un banco celular para su preservación, empleando el medio Synth-a-Freeze™ Cryopreservation Medium marca Gibco (No. Cat. A1254201), del cual un criovial fue donado para el desarrollo de los experimentos claves del presente trabajo.

Las células contenidas en el criovial antes mencionado se descongelaron y se cultivaron en una caja T-75 a 37 °C, 5 % de CO_2 y humedad constante hasta obtener una confluencia del 90 % (aproximadamente dentro de las 96 h), se disgregó la monocapa celular utilizando la metodología descrita en la sección 7.4.3.3 se recuperó el pellet por centrifugación y se resuspendió en 5 mL de medio fresco para realizar el conteo celular con azul de tripano.

Posteriormente, se prepararon 98 mL de medio KTC suplementado con 0.03 mM CaCl_2 y con 3.26 mL del concentrado de células como inóculo. Las cinéticas se realizaron en cuatro placas de 24 pozos por triplicado, con una concentración celular inicial de 4×10^4 cel/mL durante 15 días.

Después de 24 h de cultivo, se tomaron 2 de las cajas inoculadas previamente para cambiarles el medio de cultivo por medio KTC con 2.4 mM de CaCl_2 y llevar a cabo dos cinéticas con diferentes concentraciones de CaCl_2 (bajo calcio 0.03 mM y alto calcio 2.4 mM). Cada 24 h se cosecharon 3 pozos de ambas cinéticas para realizar el conteo celular en la cámara de Neubauer por la técnica de azul de tripano.

Se utilizó la Ecuación 3 para determinar células viables por mL y se determinó la velocidad específica de crecimiento, así como el tiempo de duplicación con ayuda de la Ecuación 4.

7.4.5 Biocompatibilidad de los andamios con las células HaCaT

Antes de comenzar con dicho experimento los andamios fueron esterilizados con óxido de etileno en el Centro Médico Nacional 20 de noviembre ISSSTE (Dai *et. al.*, 2016). Posterior a ello se realizaron lavados de los andamios en soluciones de PBS estériles con Antibiótico-Antimicótico 100X (GIBCO, No. Cat. 15240062) en concentraciones seriadas 1-5 % (V/V) (comenzando de mayor a menor concentración) durante 5 min en cada una de las

soluciones y, por último, se almacenaron en un tubo Falcon de 50 mL con PBS estéril hasta su uso.

Los andamios fueron colocados cuidadosamente en los pozos de una placa de cultivo de 24 pozos y se adicionaron 600 μ L de medio de cultivo, así como 400 μ L del inóculo (5×10^5 cel/mL, previamente cultivadas a una confluencia de 90 %) para ser incubados a 37 °C y 5 % de CO₂ por 5 días.

Al término de la incubación se tomaron imágenes de campo claro con ayuda de un microscopio para verificar la adherencia de las células a los andamios. Enseguida se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos para realizar un doble lavado de los andamios con 1 mL de PBS y se tiñeron con colorante Hoesch (tiñe núcleos de células vivas que fluorescen en azul), naranja de acridina (tiñe la membrana celular de color rojo de células muertas) y yoduro de propidio (tiñe la membrana celular de color verde de células vivas) para confirmar la adherencia celular a través del análisis de imágenes de microscopía de epifluorescencia.

7.4.6 Comprobación de la diferenciación celular de HaCaT

Con objeto de confirmar si las células se encontraban en estado basal y diferenciadas, se realizó la extracción de ARNm y de los genes que codifican para las proteínas queratina 1 (KRT1), queratina 10 (KRT10) e involucrina (IVL) durante el cultivo en las cinéticas previamente descritas (Micallef *et. al.*, 2009).

7.4.6.1 Extracción de ARN

Para la extracción del ARNm se utilizó el reactivo TRI Reagent® (ZYMO RESEARCH No. Cat. R2050-1-50). Se trata de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidinio que simultáneamente solubiliza el material biológico, inhibe RNAsas y desnaturaliza las proteínas. Después de la solubilización, la adición de cloroformo provoca la separación de fases, donde las proteínas se extraen hacia la fase orgánica, el ADN se disuelve en la interfase y el ARN permanece en la fase acuosa. Para lograr dicho objetivo se aplicó la siguiente metodología.

En una campana de flujo laminar se realizaron todos los pasos siguientes, el pellet celular (equivalente a 1×10^6 células) recuperado de 3 pozos de cada una de las cinéticas correspondiente a las 96 h se lavaron dos veces con 200 μ L de PBS 1X frío (4 °C), se centrifugaron por 2 min a 1,200 rpm y se desechó el sobrenadante por decantación.

Posteriormente se agregaron 500 μ L de TRI Reagent® (ZYMO RESEARCH No. Cat. R2050-1-50) a cada uno de los viales (1.5 mL), se homogenizaron en un vortex a velocidad media por 30 s y se incubaron a 4 °C por 5 min en un recipiente refrigerante, pasando este tiempo, se añadieron 100 μ L de cloroformo (IBI SCIENTIFIC No. Cat. IB05040) y se repitieron los pasos anteriores (homogenizar e incubar), una vez que se realizaron los pasos anteriores se centrifugaron las muestras a 4 °C por 20 min a 12,000 rpm (Centrifuga Eppendorf 5415 R).

Después de centrifugar se formaron 3 fases en los viales. Se tomaron y rotularon 3 nuevos viales libres de RNAsas y con ayuda de una micropipeta con punta estéril (la punta de la micropipeta apenas y debe tocar el menisco de la fase superior) se recuperó la fase superior cuidadosamente con la finalidad de evitar tomar residuos de la fase intermedia. Una vez recuperada la fase superior se adicionó isopropanol en una relación 1:1 (~ 400 μ L), se resuspendió suavemente (las muestras se pueden almacenar a -20 °C toda la noche o por 15 min a -20 °C y continuar con el procedimiento de extracción) y se centrifugó a 4 °C por 15 min a 12,000 rpm, se observó la formación del pellet de ARN y se retiró el sobrenadante por decantación.

Se añadieron 500 μ L de etanol al 75 % al pellet de ARN contenido en el tubo Eppendorf (1.5 mL), éste se resuspendió, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se repitió la operación por duplicado. Posteriormente se secó el pellet en un termoblock previamente calentado a 56 °C, una vez secado se resuspendió con 30 μ L de agua DEPC.

La concentración de ARN total extraído se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC, 2000) a una longitud de onda de 260 nm. Además, se determinó la relación de la absorbancia a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}) para proporcionar una estimación de la pureza del ARN. Las preparaciones puras de ARN tienen una relación A_{260}/A_{280} de

entre 1,8 y 2,0. Si hay contaminación con proteínas o fenol, la proporción A260/A280 será mucho menor, dificultando la cuantificación exacta de ARN (Chomczynski & Sacchi, 2006). El software empleado es NanoDrop2000. Como siguiente paso, se procedió a correr las muestras en un gel de agarosa para verificar la calidad del ARN (libre de contaminación y que no estuviera desnaturalizado) extraído de las muestras.

7.4.6.2 Remoción del ADN genómico

La siguiente etapa se realizó con el objeto de eliminar el ADN remanente después de la extracción de ARN y así evitar interferencias en la detección y amplificación del gen de interés. Para ello, se utilizó la enzima DNaseI, RNase-free (Thermo SCIENTIFIC, No. Cat. EN0521). El volumen de muestra se ajustó para tener 1 µg de ARN total y en la Tabla 6 se presentan las condiciones empleadas para la reacción.

Tabla 6. Condiciones experimentales para la reacción de la enzima DNaseI, RNase-free.

Reactivo	[Final]	Volumen requerido
ARN	1 µg	Aprox.* 2 µL
10X Buffer de reacción con MgCl ₂	1µL	1 µL
Enzima DNase I, RNase-free	1 U	1 µL
Agua tratada – DEPC	Completar volumen a 10 µL	

*El volumen de muestra se ajusta a 1 µg total de ARN, lo cual dependerá de la concentración obtenida al final de la extracción.

La reacción se realizó en un tubo eppendorf libre de RNAsas y se incubó en un thermoblock por 30 min a 37 °C (se acondicionó antes de colocar las muestras), transcurrido el tiempo se añadió 1 µL de EDTA 50 mM, se resuspendió suavemente y se incubó nuevamente por 10 min a 65 °C. Posteriormente el RNA se empleó inmediatamente para la siguiente etapa (síntesis de cDNA o en su caso preservar a -80 °C para su uso posterior) y se midió nuevamente la concentración de RNA en el NanoDrop.

7.4.6.3 Síntesis de la primera cadena de cADN

Para transcribir la secuencia de ARN a cDNA, se empleó el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo SCIENTIFIC, No. Cat. K1631), el cual tiene la enzima TR RevertAid H Minus M-Mul V. Siguiendo el protocolo del kit, se trabajó en hielo y con tubos

estériles libres de nucleasas. Se partió de un MIX multiplicando el número de muestras por los reactivos indicados en la Tabla 7 sin incluir el templado de ARN.

Tabla 7. Componentes para la reacción de síntesis de cDNA

REACTIVO	[Final]	Volumen requerido
Templado de ARN	Aprox. 1 µg	10 µL
Oligo(dT) ₁₈ Primer 100 µM	5 µM	1 µL
Buffer de reacción 5X	1X	4 µL
Inhibidor de RNAsa RiboLock(20 U/µL)	1U	1 µL
dNTP Mix 10 Mm	1 mM	2 µL
Transcriptasa Reversa RevertAid H Minus M-MuLV (200U/µL)	10 U	1 µL
Agua libre de nucleasas		1 µL
Volumen total		20 µL

Se repartieron 10 µL del MIX en cada tubo, añadiendo el templado de ARN correspondiente para cada muestra. Posteriormente, se incubó la reacción a 42 °C por 1 h y finalmente a 70 °C por 5 min. Los productos obtenidos se emplearon directamente para el PCR y el restante se almacenó a -20 °C.

Para verificar que la reacción de síntesis de cDNA se realizó correctamente, el kit provee como control positivo GAPDH ARN. Para lo cual, al momento de preparar el MIX, se incluyó un tubo extra y se añadieron 2 µL de ARN control GAPDH (50 ng/L), procesando la reacción bajo las mismas condiciones de las muestras.

7.4.6.4 Amplificación del segmento de interés por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: polymerase chain reaction) es una reacción enzimática *in vitro* de una ADN polimerasa termoestable que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos incorporando nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores. Para lograr la amplificación de los fragmentos de interés se emplearon los oligonucleótidos seleccionados para cada transgén. Antes de comenzar con la reacción de PCR, se prepararon los primer's (K1, K10 e involucrina) Tabla 8 que se secuenciaron en el Instituto de Biotecnología (con sus respectivas indicaciones).

Tabla 8. Expresión de marcadores de diferenciación terminal a nivel de ARNm en células HaCaT (Micallef *et. al.*, 2009).

Marcador	Par de cebadores	No. Acceso Genbank
K1	FP: 5'-ATTTCTGAGCTGAATCGTGTGATC-3'	BC063697
	RP: 5'-CTTGGCATCCTTGAGGGCATT-3'	
K10	FP: 5'-TGATGTGAATGTGGAAATGAATGC-3'	NM_000421
	RP: 5'-GTAGTCAGTTCCTTGCTCTTTTCA-3'	
Involucrina	FP: 5'-GGGTGGTTATTTATGTTTGGGTGG-3'	BC046391
	RP: 5'-GCCAGGTCCAAGACATTCAAC-3'	

Se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo, en un tubo eppendorf de 0.2 mL se adicionaron los reactivos de la Tabla 9.

Tabla 9. Componentes para la reacción de PCR para un fragmento de la región de interés

Reactivo	Muestra (cDNA)	Control GAPDH
	Volumen requerido	Volumen requerido
DreamTaq Master Mix 2X	5 µL	5 µL
Primer 5´Forward (5 µM)	0.3 µL	0.3 µL
Primer 3´Reverse (5 µM)	0.3 µL	0.3 µL
Agua libre de nucleasas	3.4 µL	3.4 µL
cDNA	1 µL	1 µL (Dilución 1:1000)
Volumen total	10 µL	10 µL

Se mezcló suavemente con ayuda de una micropipeta de 10 µL y se colocaron en un termociclador (PIKOREAL 24 Thermo SCIENTIFIC, el programa empleado fue PikoReal Software 2.2), empleando los ciclos de temperatura según se indica en la Tabla 10.

Tabla 10. Ciclos de temperatura empleados en el programa de PCR

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	35
Alineamiento	60	30 s	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1

En el caso de la amplificación del gen de referencia (control GAPDH); está diseñado para generar un producto de 496 pb por RT-PCR empleando los siguientes oligos:

- Oligo FWD (5´- CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3´).
- Oligo RVS (5´-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3´).

Una vez amplificados los fragmentos en estudio, se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (P/V).

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización del P3HB obtenido de los distintos métodos de extracción

En la literatura existen varios métodos de ruptura celular basados en solventes halogenados y no halogenados que son usados para la extracción de P3HB de la biomasa. Sin embargo, solo se han utilizado para la recuperación de pequeñas cantidades (Aramvash *et al.*, 2016).

Se utilizaron tres métodos de ruptura celular y extracción (dos métodos probados previamente por Millán (2017) y Castro-Vásquez (2018) y un tercero que consistió en un método de ruptura y extracción por secado por aspersión-SDS), los cuales permitieron la recuperación de P3HB a partir de biomasa. En la presente sección se muestran los resultados obtenidos de la primera etapa de la estrategia experimental sobre la pureza, rendimientos y el peso molecular del P3HB obtenido.

8.1.1 Pureza y rendimiento de los métodos de extracción

El P3HB obtenido por el método convencional de hipoclorito-cloroformo (Figura 13 A), su apariencia fue plástica y rígida con aroma a residuos de solventes no obstante de haberse realizado un secado a 80 °C por 6 h; en tanto que el P3HB recuperado por los métodos de etanol-acetona y secado por aspersión-SDS tuvo una textura blanda, con tamaños de partícula de 0.074 a 5 mm e inoloro (Figura 13 B y C, respectivamente).

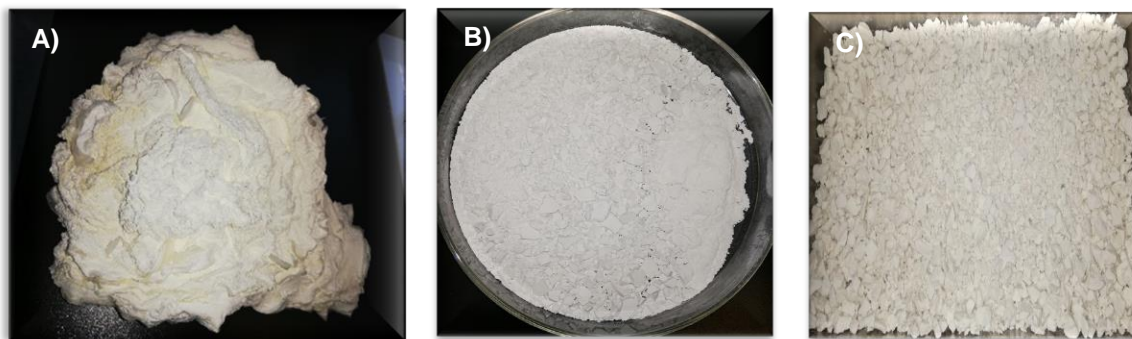


Figura 13 P3HB obtenido mediante cada uno de los métodos de extracción A) Ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo, B) Ruptura y extracción con etanol-acetona y C) Ruptura y extracción por secado por aspersión-SDS.

Se utilizó la Ecuación 5 para calcular el rendimiento de extracción de P3HB por cada uno de los métodos usados. Con el método de ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo, fue del 30 %, con el método de ruptura y extracción con etanol-acetona fue del 79 %, en tanto que con el método de ruptura y extracción por secado por aspersion-SDS fue del 68 % (Figura 14).

Ecuación 5

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{\text{Cantidad total de P3HB después de la recuperación (g)}}{\text{Cantidad total de P3HB en las células (g)}} \right) * 100$$

Se analizó el P3HB por HPLC para determinar la pureza de cada uno de los polímeros obtenidos por los métodos de extracción. Con el método de ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo se obtuvo una pureza del 99 %, con el método de ruptura y extracción con etanol-acetona una pureza del 93 %, en tanto que con el método de ruptura y extracción por secado por aspersion-SDS se logró una pureza del 99 % (Figura 14).

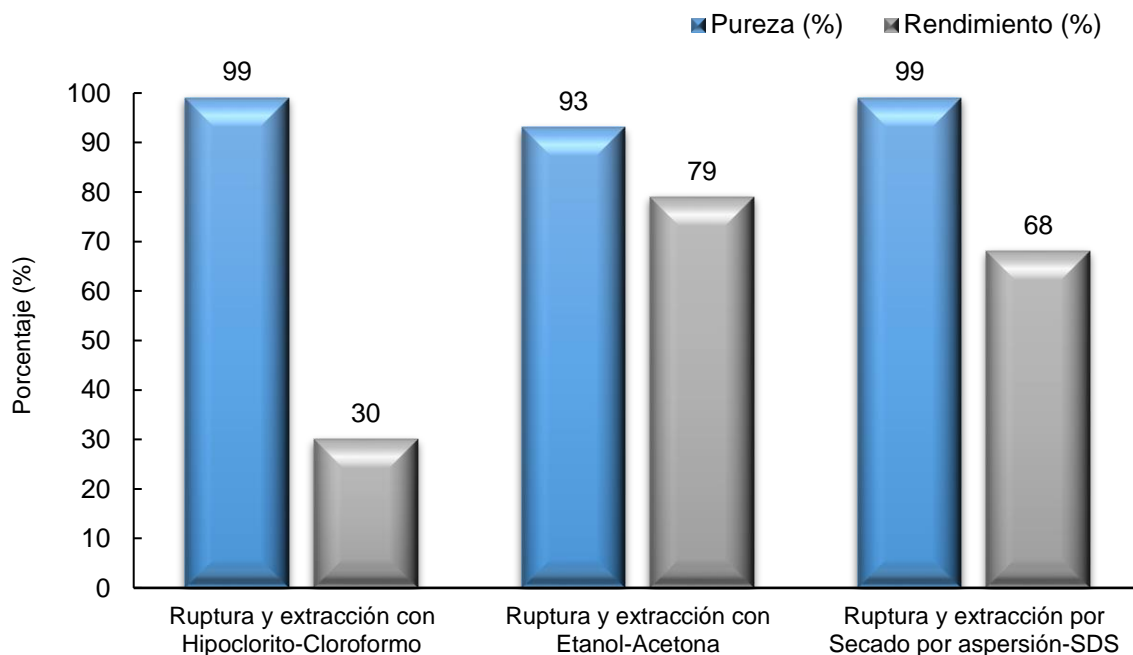


Figura 14 Pureza y rendimiento de recuperación de P3HB por los diferentes métodos de extracción.

8.1.2 Análisis del peso molecular del P3HB

El peso molecular representa un parámetro que determina las características de los biopolímeros para aplicaciones específicas; sin embargo, independientemente de la aplicación final, el peso molecular del P3HB debe ser suficientemente alto ($>1 \times 10^3$ kDa) para satisfacer los requerimientos solicitados para aplicaciones biomédicas.

Con el uso del método convencional de hipoclorito-cloroformo se obtuvieron pesos moleculares de 416 ± 68 kDa, a diferencia del P3HB recuperado por el método de ruptura y extracción con etanol-acetona, con el cual se obtuvieron pesos moleculares de hasta $1,750 \pm 98$ kDa (Tabla 11).

Por otro lado, los resultados obtenidos del diseño experimental en el cual se empleó la técnica de extracción modificada de la patente N°. US9, 683, 076 B2, mostraron que, la combinación de 8 g de SDS/L, tiempo de mezclado de 8 min y el doble lavado con agua destilada, se obtuvo P3HB con un peso molecular de $1,440 \pm 84$ kDa (Tabla 11), resaltando la importancia de este método donde se evitó el uso de solventes durante la extracción y logrando pesos moleculares mayores a 1×10^3 kDa.

En cuanto al Índice de polidispersión (IP), este parámetro nos indica el grado de variación en los pesos moleculares de las cadenas que conforman al polímero, las cuales pueden romperse en diferentes tamaños debido a las condiciones de extracción. El P3HB obtenido por secado por aspersion-SDS tuvo un IP mayor en comparación con el P3HB obtenido por los métodos de ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo y con etanol-acetona (Tabla 11).

Tabla 11 Caracterización del P3HB recuperado por cada uno de los métodos de extracción.

Método de extracción	Peso molecular (kDa)	Contenido de P3HB (%)	IP
Ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo	416 ± 68	99 ± 0.3	2.9
Ruptura y extracción con etanol-acetona	1,750 ± 98	93 ± 1.0	5.6
Ruptura y extracción por secado por aspersión-SDS	1,440 ± 84	99 ± 0.2	8.1

8.1.3 Análisis de las propiedades fisicoquímicas del P3HB

8.1.3.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Es una técnica usada para determinar cualitativa y cuantitativamente las moléculas de muestras orgánicas, inorgánicas, ya sean sólidas, líquidas o gases y se basa en la excitación vibratoria de enlaces moleculares por la absorción de energía de luz infrarroja.

Este estudio se realizó en las instalaciones de CIATEQ (Lerma, Edo. México), comprobándose que el producto recuperado por los distintos métodos de ruptura y extracción fue P3HB. Además, este análisis permitió evidenciar la presencia de impurezas en el P3HB (Figura 15).

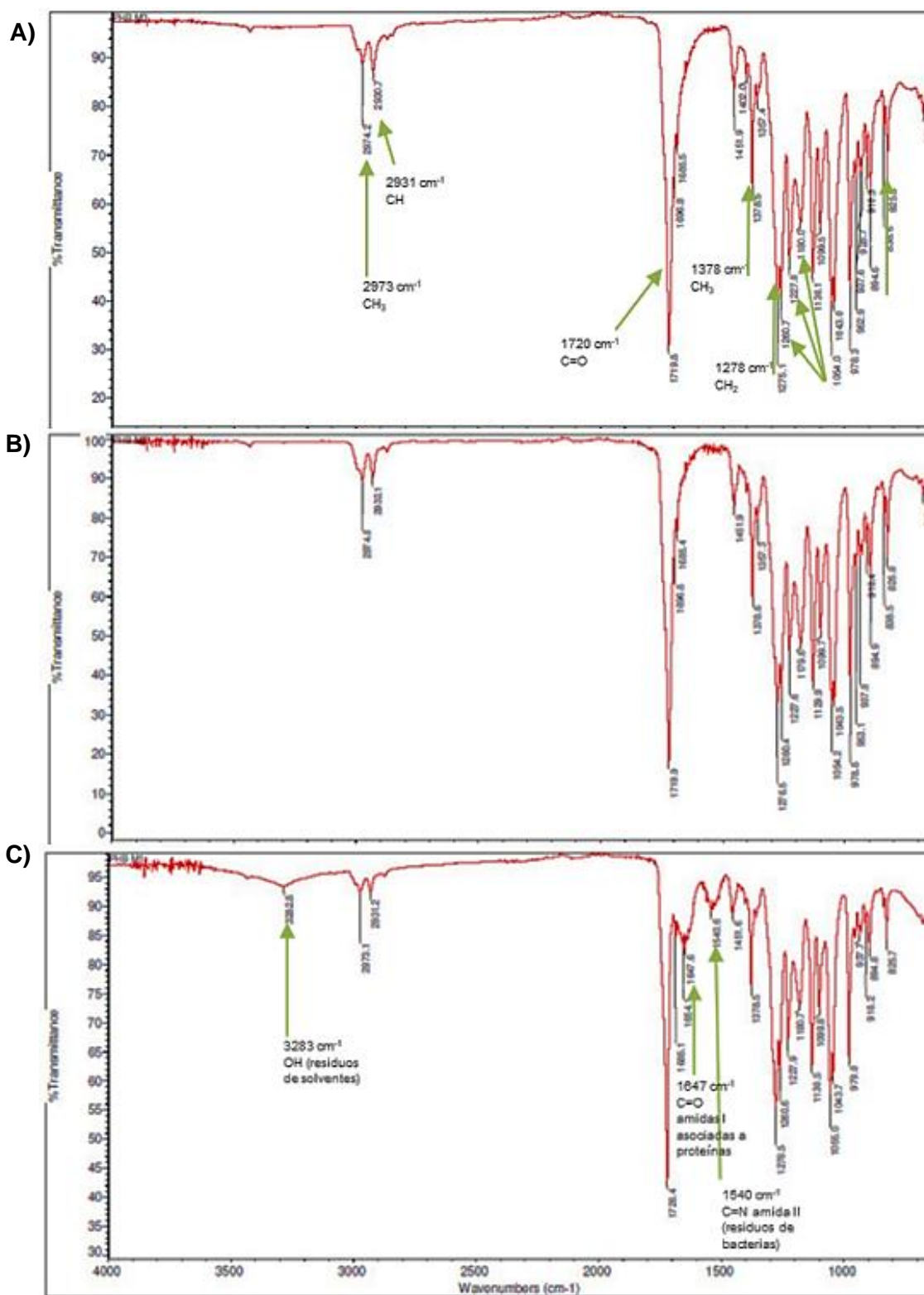


Figura 15 Espectros de FTIR-ATR del P3HB obtenido mediante cada uno de los métodos de ruptura y extracción. A) Con hipoclorito-cloroformo, B) Secado por aspersión-SDS, C) Con etanol-acetona.

Al analizar los espectros de FTIR del P3HB recuperado por los distintos métodos de extracción, se encontraron los picos característicos de la estructura química del polihidroxibutirato (Tabla 12). A los 2,974 cm^{-1} se observó el pico correspondiente al grupo CH_3 , a los 2,930 cm^{-1} se observó el pico correspondiente al enlace C-H, a los 1,720 cm^{-1} se observó el pico correspondiente al grupo C=O y a los 1,277 cm^{-1} se observó el pico correspondiente a los enlaces H-C-H. Sin embargo, en el caso específico del P3HB obtenido por el método de ruptura y extracción con etanol-acetona se observaron picos correspondientes a los grupos OH (3,283 cm^{-1}), amidas I (1,647 cm^{-1}) y amidas II (1,540 cm^{-1}), evidenciando la presencia de impurezas en el material debido a restos celulares.

Tabla 12 Identificación de picos presentes en las muestras de P3HB recuperado por los métodos de ruptura y extracción.

Asignación	Etanol-acetona (cm^{-1})	Secado por aspersión-SDS (cm^{-1})	Hipoclorito-cloroformo (cm^{-1})
Grupo OH perteneciente a los solventes residuales	3,282.8	N.A.	N.A.
Estiramiento asimétrico CH_3 cristalino	2,973.1	2,974.8	2,974.2
Estiramiento CH	2,931.2	2,932.1	2,930.7
Estiramiento éster carbonilo ν (C = O) cristalino	1,720.4	1,719.9	1,719.8
Grupo amida I con C = O de amidas asociadas a proteínas, que puede contener contribuciones C = C de tramos de compuestos olefínicos y aromáticos (residuos de bacterias)	1,647.6	N.A.	N.A.
Grupo amida II con NOH asociada a proteínas y puede contener contribuciones C=N (residuos de bacterias)	1,540.6	N.A.	N.A.
Deformación simétrica CH_3 (estructura helicoidal)	1,378.5	1,378.6	1,378.5
CH_2 wagging cristalino (denota estructura helicoidal)	1,278.5	1,276.5	1,275.1

C-O-C cristalino (estructura helicoidal)	1,260.6	1,260.4	1,260.7
C-O-C cristalino (estructura helicoidal)	1,227.9	1,227.6	1,227.0
Estiramiento C-O-C de la columna vertebral (cristalino y amorfo)	1,180.7	1,179.6	1,180
Estiramiento C-C de la columna vertebral	825.7	825.8	825.6

N.A.= No aplica

8.1.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

A través de este análisis se logró determinar las temperaturas de transición vítrea (T_g), cristalización (T_c) y fusión (T_m) de los materiales obtenidos por los tres métodos de extracción probados (Figura 16), siendo esta última la que permitió establecer una temperatura de referencia para el procesamiento del material durante la fabricación del filamento con el cual se alimentó la impresora 3D, así como para establecer la temperatura de impresión y del moldeado en placa de los andamios sin degradar el P3HB.

Para el P3HB recuperado por el método con hipoclorito-cloroformo, el termograma evidenció las tres temperaturas (Figura 16 A): a $-8.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observó la T_g , correspondiente al incremento de la capacidad calorífica del P3HB ($0.87\text{ }^{\circ}\text{C}$); a los $57.78\text{ }^{\circ}\text{C}$ la T_c y a los $163.88\text{ }^{\circ}\text{C}$ la T_m del polímero.

En tanto que para el P3HB recuperado por el método de aspersion-SDS solamente se observaron la T_c y la T_m a los $105.10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $164.85\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Finalmente, al igual que en el termograma correspondiente al método previamente mencionado, para el P3HB obtenido a través del método etanol-acetona se observó la T_c a los $108.46\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la T_m a los $162.63\text{ }^{\circ}\text{C}$.

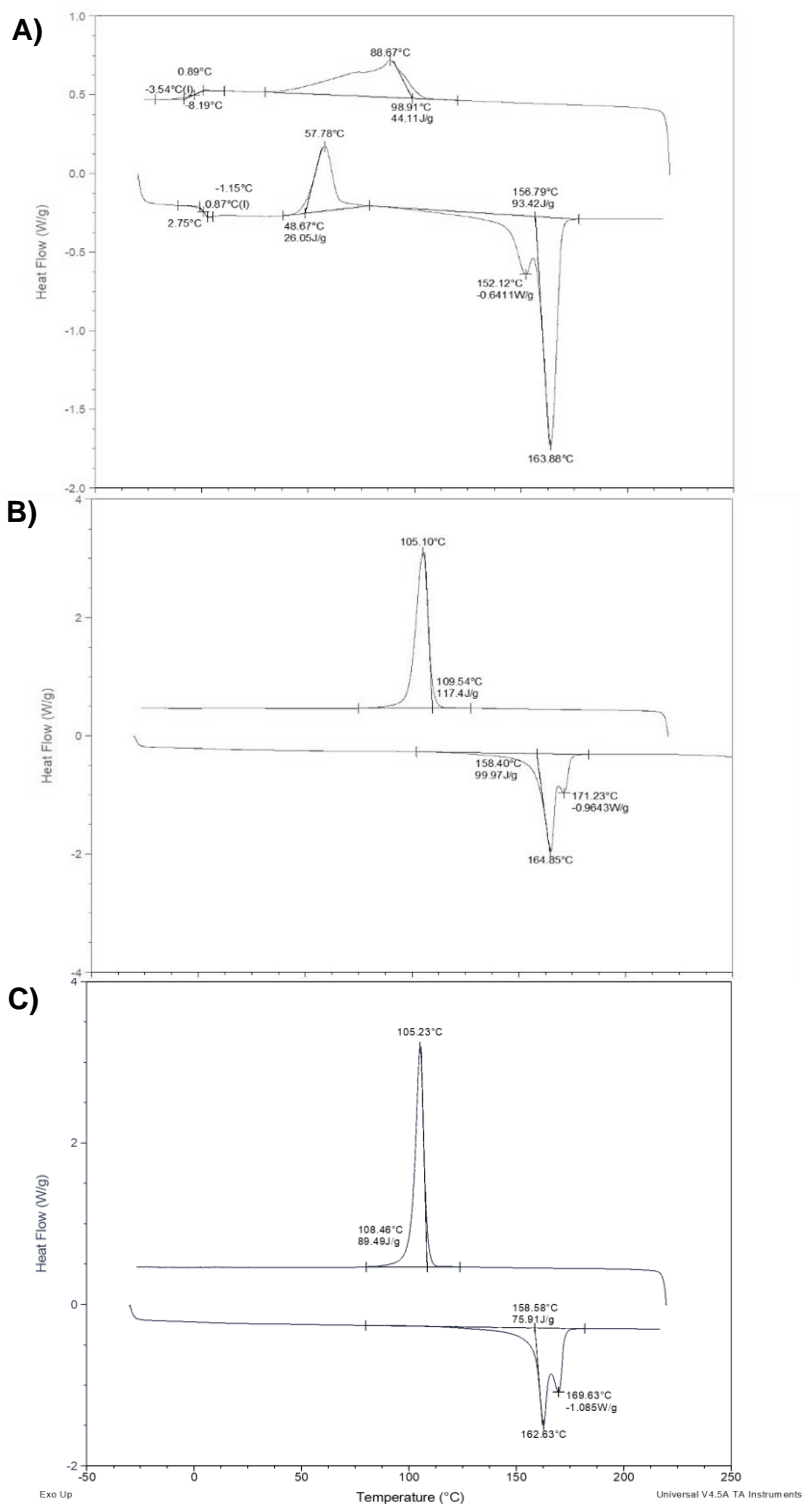


Figura 16 Termogramas de DSC del P3HB obtenido de cada uno de los métodos de ruptura y extracción. A) Con hipoclorito-cloroformo, B) Por secado por aspersión-SDS, C) Con etanol-acetona.

8.1.3.3 Determinación del módulo de Young

El módulo de Young es un parámetro que relaciona el comportamiento lineal de un material elástico en función de la fuerza que se le aplique. Este parámetro se obtuvo sometiendo las probetas generadas de P3HB (Figura 9 B) en una mini-tensora en la facultad de Ciencias Químicas de la UNAM.

Los resultados obtenidos del P3HB generado mediante cada uno de los métodos de extracción se muestran en la Tabla 13. Se observó un mayor módulo de Young para el P3HB obtenido del método de ruptura y extracción con etanol-acetona (261 MPa), en comparación con el módulo de Young del P3HB obtenido por el método de ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo (217 MPa).

Tabla 13 Módulo de Young del P3HB recuperado por los distintos métodos de extracción.

Método de recuperación del P3HB	Módulo de Young del P3HB (MPa)
Ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo	217
Ruptura y extracción con etanol-acetona	261
Ruptura y extracción por secado por aspersión-SDS	N/D

N/D: Dato no determinado debido a la contingencia sanitaria ocasionada por el SARS-CoV2.

8.2 Generación del filamento y andamios de P3HB

Una vez obtenido el P3HB por los distintos métodos de extracción, el material se secó en un horno a las condiciones previamente descritas en la sección de metodología para retirar humedad y residuos de solventes previo a la extrusión para la elaboración de filamento que se utilizó para alimentar la impresora 3D durante la fabricación de los andamios.

Se realizaron pruebas de extrusión de cada uno de los materiales recuperados, comenzando con el P3HB obtenido por el método con hipoclorito-cloroformo, sin embargo, el material no fue apto para realizar el filamento debido a que generó vapores en la cámara de fusión del extrusor y se degradó. Lo anterior podría deberse posiblemente a dos razones: la primera debido a la presencia de residuos de cloroformo e hipoclorito de sodio en el

material, tal como se evidenció en el FTIR (Figura 15 A), en donde aparece un pico pronunciado en la longitud 700 cm^{-1} , el cual corresponde al enlace C-Cl ($730\text{-}550\text{ cm}^{-1}$); y la segunda, pudo deberse a que el sensor del extrusor indicara temperaturas erróneas, ya que al utilizar la tm de este material no se logró extruir el filamento, por lo que al utilizar una tm de $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ el material generó vapores debido a la degradación del P3HB.

Por otro lado, con 100 g del material recuperado por los métodos de ruptura y extracción con etanol-acetona y secado por aspersión-SDS se logró generar aproximadamente 15 m filamento flexible y con textura ligeramente rugosa (Figura 17).

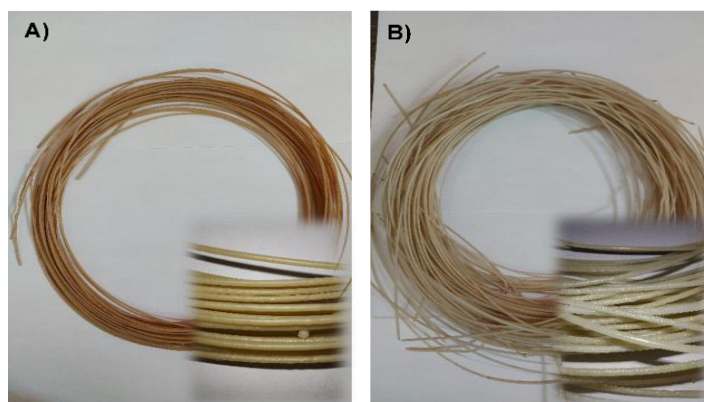


Figura 17 Filamento de P3HB generado en el FILABOT a partir de los métodos de extracción y ruptura. A) Con etanol-acetona), B) Secado por aspersión-SDS.

Una vez generado el filamento de P3HB, se procedió a diseñar y generar andamios en la impresora 3D. Los andamios generados tuvieron un grosor $200\text{ }\mu\text{m}$, tamaños de poro que oscilaron entre $70\text{-}90\text{ }\mu\text{m}$ y con una coloración caramelizada para el P3HB obtenido por el método de ruptura y extracción con etanol-acetona (Figura 18).

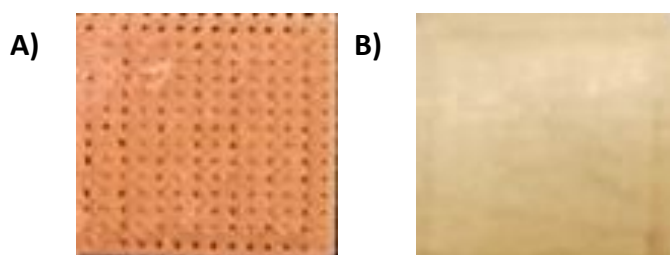


Figura 18 Primeros andamios diseñados de P3HB por impresión 3D. A) Con poros, B) Sin poros.

Se realizaron las primeras pruebas de biocompatibilidad de los andamios anteriormente descritos con células HaCaT, comprobándose la adherencia de estas células a dichos andamios a través de microscopía de epifluorescencia (Figura 24). Derivado de lo anterior, se procedió a generar los andamios con el P3HB obtenido de los dos métodos de ruptura y extracción con etanol-acetona y con el de secado por aspersion-SDS, pero ahora con una forma circular (puesto que se pretendía evaluar dichos andamios en un sistema Transwell) a través de impresión 3D y moldeado en placa (Figura 19), con tamaños de 1 y 2 cm, un grosor de 200 μm . Para el caso de los andamios generados por impresión 3D, estos presentaron coloración café claro homogéneo, en tanto que los andamios generados por moldeado en placa presentaron una coloración fue más clara debido a un menor tiempo de exposición a la temperatura de fusión (180 $^{\circ}\text{C}$).

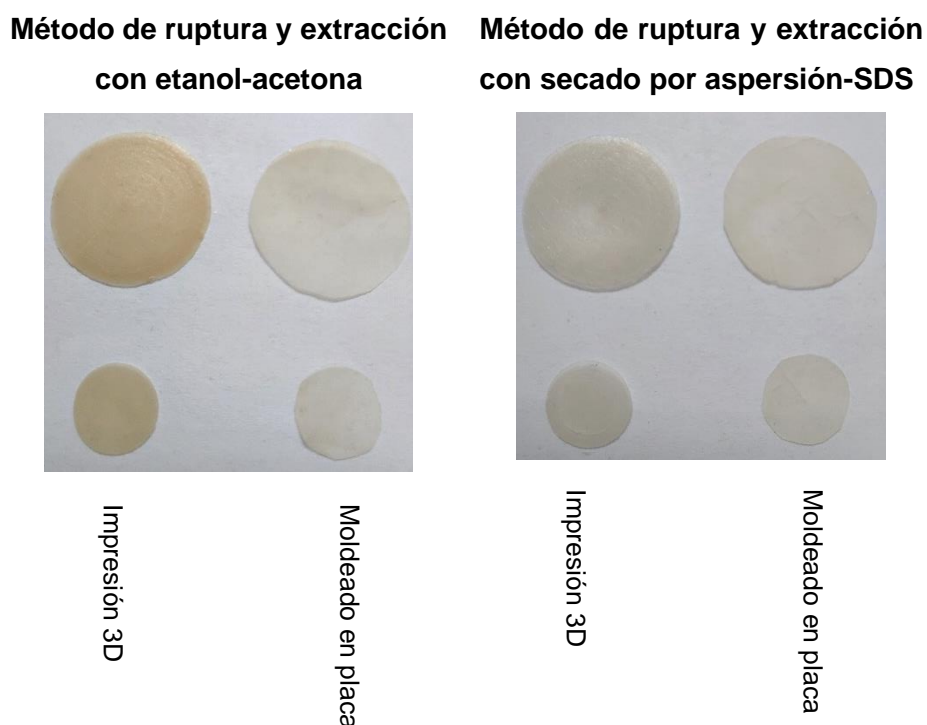


Figura 19 Andamios generados por la técnica de impresión 3D y moldeado en placa.


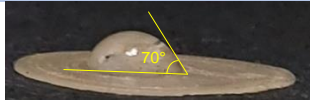

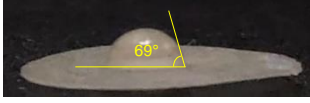

8.2.1 Determinación del ángulo de contacto

Una vez generados los andamios por las técnicas de impresión 3D (empleando el filamento generado previamente) y moldeado en placa (con el P3HB en polvo recuperado de los

métodos de extracción) se determinó el ángulo de contacto de cada uno de ellos utilizando la técnica de gota sésil, la cual consiste en la medición del ángulo entre la gota de agua y la superficie del andamio para determinar si la superficie del andamio es hidrofílica o hidrofóbica.

En la Tabla 14 se muestran los valores de ángulos de contacto de cada uno de los andamios generados. Se obtuvieron valores menores de 75°, lo que indicó que los andamios generados en el presente trabajo tienen una superficie hidrofílica, característica que permite la adherencia de las células al andamio, en comparación con el andamio generado por electrohilado por Mondragón-Guillen (2020), cuyo ángulo de contacto fue de 100°.

Tabla 14 Ángulo de contacto de los andamios de P3HB generados.

Método de recuperación	Técnica	Muestra
Ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo	Electrohilado (control)	
Ruptura y extracción con etanol-acetona	Impresión 3D	
	Moldeado en placa	
Ruptura y extracción por secado por aspersión-SDS	Impresión 3D	
	Moldeado en placa	

8.2.2 Caracterización superficial de los andamios

Se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) de cada uno de los andamios fabricados en el presente trabajo por moldeado en placa e impresión 3D, así como del andamio control que fue fabricado por Mondragón-Guillen (2020) por

electrohilado. Lo anterior para comparar su morfología superficial y verificar si las superficies de los andamios generados en este trabajo eran porosas. Para ello se aplicaron 15 kV de voltaje señal de electrones secundarios y retrodispersados para lograr ampliaciones de 300X, 1,000X y 4,000X (Figura 20) con objeto de visualizar la estructura panorámica y detalles de la superficie de los andamios.

El andamio generado por moldeado en placa de P3HB obtenido del método de secado por aspersión (Figura 20 A) mostró la presencia de pequeños poros, aproximadamente de 5 μm en la ampliación de 300X; mientras que en las ampliaciones 1,000 y 4,000X se observó una superficie estriada con pequeñas protuberancias distribuidas. Siguiendo con el soporte que se obtuvo por la técnica de moldeado en placa de andamios de P3HB obtenido por el método etanol-acetona (Figura 20 C) la morfología de la superficie mostró cierta relieve en la superficie y ausencia de poros.

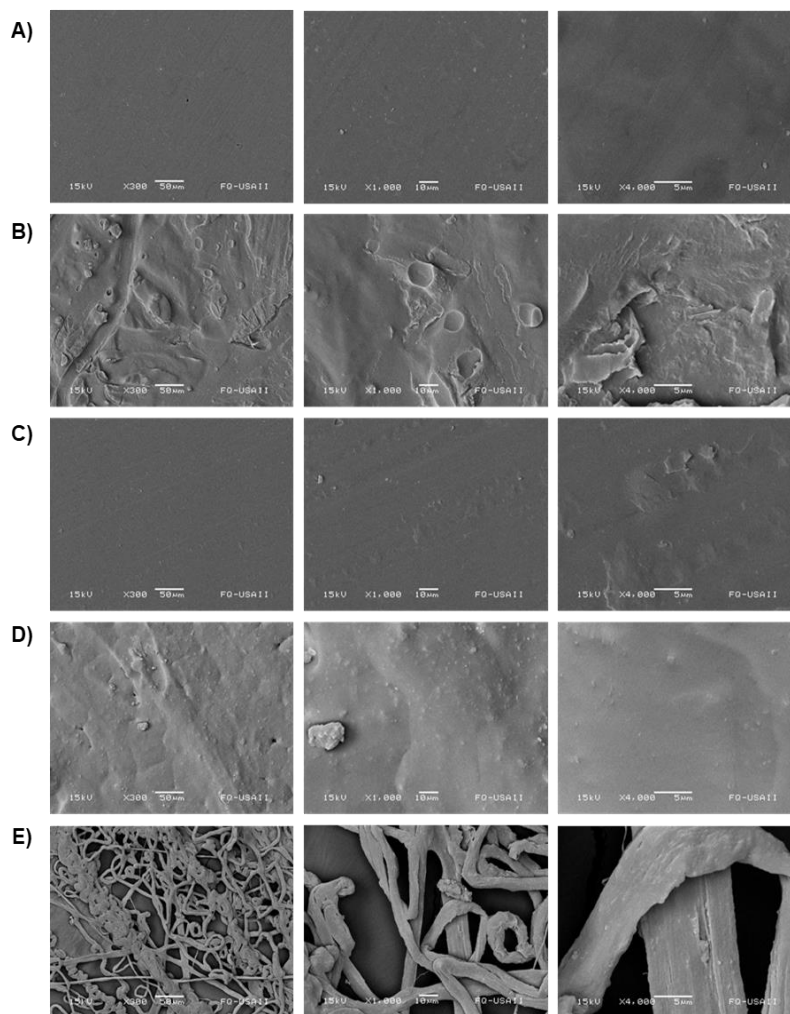


Figura 20 Microscopía Electrónica de Barrido de superficies de andamios de P3HB por los métodos de ruptura y extracción: secado por aspersión-SDS: A) Moldeado en placa, B) Impresión 3D; etanol-acetona: C) Moldeado en placa, D) Impresión 3D; hipoclorito-cloroformo: E) Electrohilado.

Por otro lado, en los andamios generados de P3HB obtenido del método de secado por aspersión-SDS por la técnica de impresión 3D (Figura 20 B) mostró una superficie con relieve, protuberancias y ciertos hundimientos de aproximadamente 10 μm de ancho (los cuales se observan en las micrografías de 300X y 1,000X). Respecto a la superficie del andamio de P3HB obtenido del método etanol-acetona generado por impresión 3D (Figura 20 D), presentó poros pequeños (3-9 μm) en el objetivo 300X, mayor protuberancias y un mayor relieve superficial en comparación con los otros andamios.

Finalmente, en la Figura 20 E, correspondiente al andamio control generado por la técnica de electrohilado de P3HB obtenido del método hipoclorito-cloroformo, con el objetivo de 300X mostró tamaños de poro de 4 a 80 μm , así como acumulaciones de fibras del P3HB en algunas zonas y morfología heterogénea en cuanto al grosor de las fibras.

8.3 Cultivo y biocompatibilidad de las células HaCaT en andamios de P3HB

8.3.1 Cinéticas de crecimiento para la caracterización de la línea celular de queratinocitos HaCaT

Se realizó la caracterización de las células HaCaT a fin de determinar su velocidad específica de crecimiento y su tiempo en dos medios de cultivo diferentes: i) la primera cinética se realizó en medio DMEM-F12 con 10 % SFB, medio de cultivo en el cual se encontraban las células adquiridas, mismo que se usó para las pruebas preliminares de biocompatibilidad con los andamios de P3HB generados por impresión 3D (este mismo medio fue utilizado por Mondragón-Guillen, 2020 para el crecimiento de células de queratinocitos en los andamios control generados por electrohilado), ii) la segunda cinética se realizó en medio específico KTC, previa adaptación de las células en este medio, usando dos concentraciones diferentes de CaCl_2 : a 0.03 mM y 2.4 mM (Figura 21).

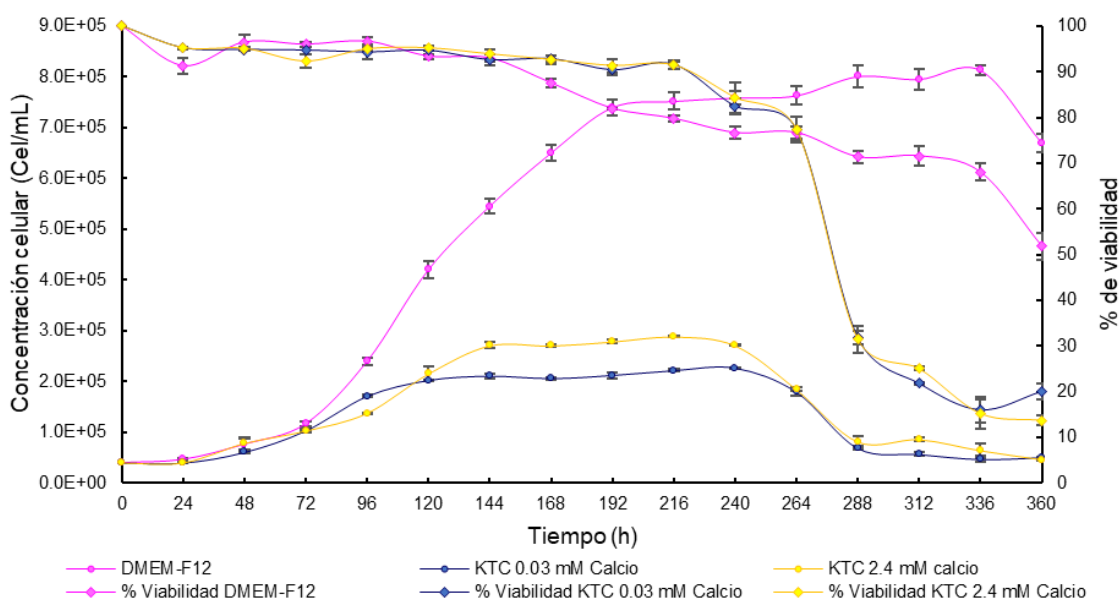


Figura 21 Cinéticas de crecimiento de la línea celular HaCaT en medio DMEM-F12 y en medio específico KTC libre de suero a baja y alta concentración de CaCl_2 .

Se observó que la fase exponencial de crecimiento celular en las cinéticas en medio DMEM-F12 con 10 % SFB y en el medio KTC 2.4 mM CaCl₂ comenzó a partir de las 72 h, en tanto que esta fase para la cinética en medio KTC 0.03 mM CaCl₂ inició a las 48 h. No obstante lo anterior, en las tres cinéticas de caracterización de la línea celular, la viabilidad se mantuvo alrededor del 90 % durante la fase exponencial de crecimiento.

La fase de muerte para las cinéticas en medio KTC a 0.03 y 2.4 mM CaCl₂ comenzó a partir de las 240 h, en tanto que esta fase para la cinética en medio de cultivo DMEM-F12 con 10 % SFB se presentó a partir de las 336 h.

Los datos obtenidos de las cinéticas se procesaron y se calculó la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación celular (Tabla 15). Para la velocidad específica de crecimiento, se observó que esta fue mayor en el cultivo en medio DMEM-F12 con 10 % SFB en comparación con la obtenida para el medio KTC a 0.03 y 2.4 mM de CaCl₂. Este mismo orden se observó con el tiempo de duplicación, el cual fue menor para el cultivo realizado en medio DMEM-F12 con 10 % SFB en comparación con los obtenidos para el medio KTC a 0.03 y 2.4 mM de CaCl₂.

Tabla 15 Resumen de los parámetros cinéticos de la línea celular HaCaT.

Condición	μ (h ⁻¹)	Tiempo de duplicación (h)
DMEM-F12	0.022 ± 0.001	32 ± 1.49
KTC 0.03 mM CaCl ₂	0.017 ± 0.001	40 ± 1.43
KTC 2.4 mM CaCl ₂	0.015 ± 0.002	45 ± 5.37

En cada una de las cinéticas fueron tomadas imágenes cada 24 h; sin embargo, por la cantidad de imágenes solo se muestran a continuación las micrografías de cada 48 h (Figura 22).

Las células de las cinéticas DMEM-F12 y KTC 2.4 mM de CaCl₂ mostraron una morfología epitelial y poliédrica (Figura 22, inciso A y C, respectivamente). Sin embargo, cuando la concentración de calcio en el medio KTC fue de 0.03 mM CaCl₂, la morfología celular fue más parecida a la fibroblástica y fusiforme (Figura 22 C).

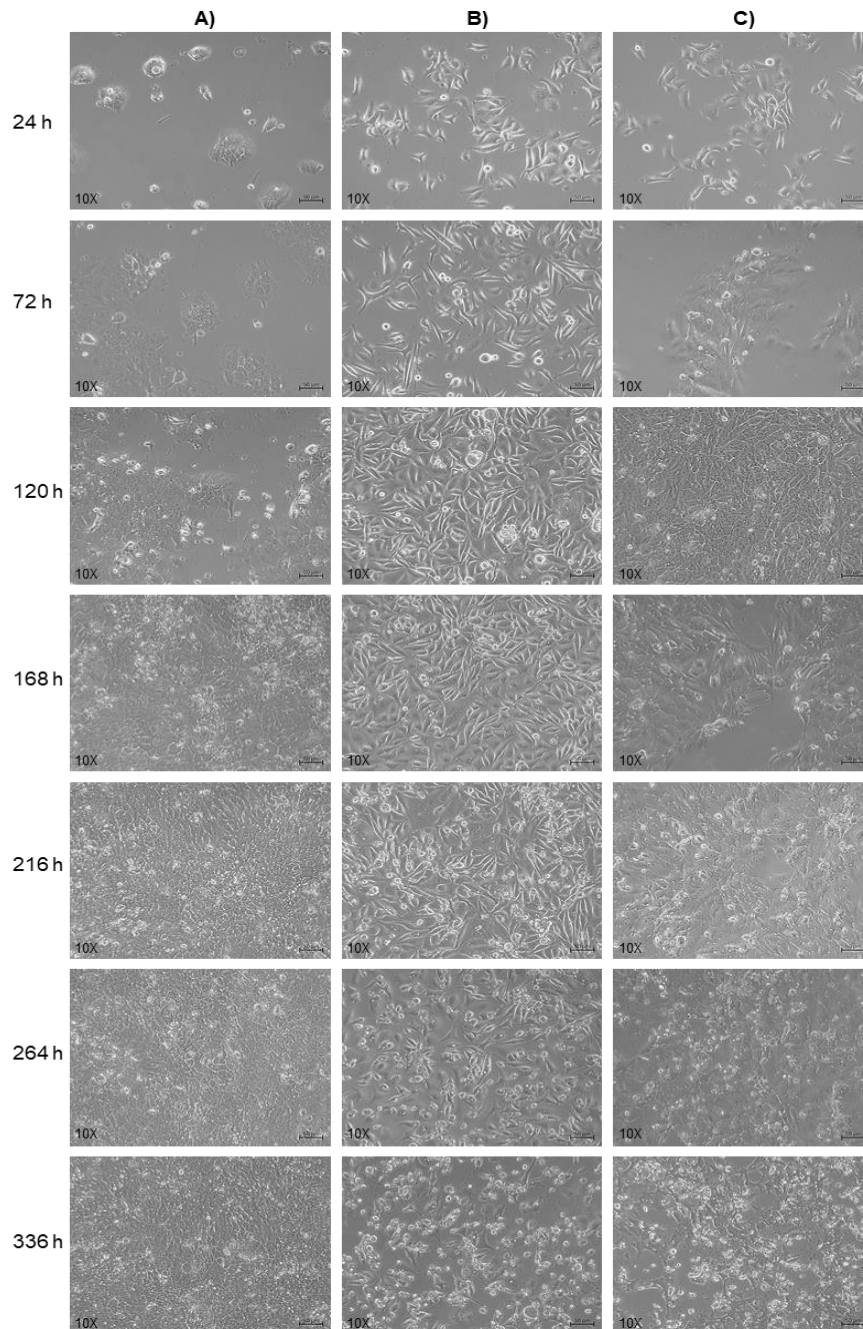


Figura 22 Microscopía de campo claro de las cinéticas de crecimiento tomadas cada 48 h. A) DMEM-F12, 10% SFB, B) KTC 0.03 mM CaCl₂ y C) KTC 2.4 mM CaCl₂.

8.3.2 Biocompatibilidad de las células HaCaT con los andamios de P3HB

Se realizó un primer análisis de biocompatibilidad con los andamios generados por impresión 3D con P3HB recuperado del método de ruptura y extracción con etanol-acetona

y usando medio de cultivo DMEM-F12 con 10 % SFB para replicar las mismas condiciones de cultivo utilizadas por Mondragón-Guillen (2020) para este análisis del andamio control generado por la técnica de electrohilado de P3HB obtenido del método de hipoclorito-cloroformo (Figura 23).

En la Figura 23 A se observa que el andamio control está compuesto por fibras del polímero y tiene tamaños de poro heterogéneos. Por otro lado, con el P3HB obtenido del método de etanol-acetona, se generaron andamios por impresión 3D sin y con poros (Figura 23 incisos B y C, respectivamente) con un grosor de 200 μm .

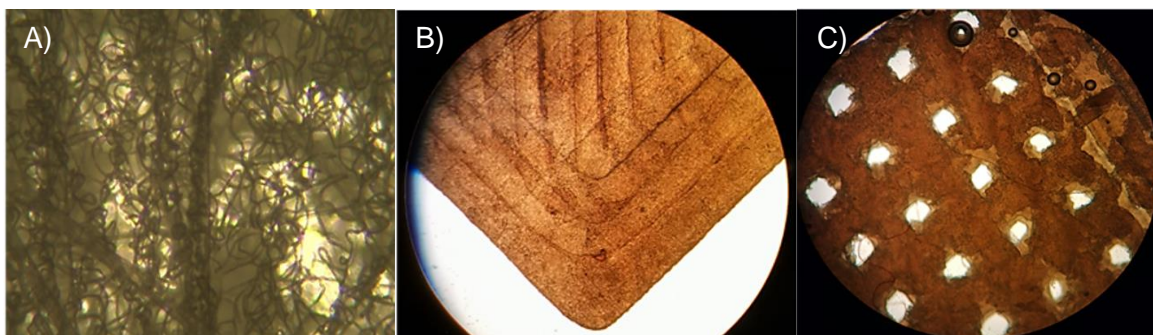


Figura 23 Andamio de P3HB para el análisis de biocompatibilidad. A) Control, electrohilado, B) Impresión 3D sin poros, C) Impresión 3D con poros.

Los andamios se esterilizaron con óxido de etileno antes de realizar el cultivo de las células. Posteriormente se inocularon los soportes con una concentración celular de 5×10^4 cel/mL. Transcurridos 5 días de cultivo, los andamios en conjunto con las células fueron sometidos a tinciones: la primera con tinción Hoechst y después con naranja de acridina y yoduro de propidio para identificar células vivas y muertas sobre el andamio control y los andamios generados por impresión 3D.

En la Figura 24 se muestran las micrografías por epifluorescencia en cada uno de los andamios utilizados para dicho análisis. En los tres andamios (control, impresión 3D sin poros e impresión 3D con poros) en el filtro FITC se observaron células HaCaT viables que flourecieron de color verde, en tanto que con el filtro TRIC no se observaron células muertas (color rojo) y, por último, en el filtro HOESCH flourecieron de color azul los núcleos de las células vivas.

En la Figura 24 A y C se muestra un crecimiento heterogéneo de las células HaCaT sobre el andamio control y en el andamio por impresión 3D con poros, respectivamente, a diferencia del crecimiento homogéneo de las células sobre el andamio por impresión 3D sin poros (Figura 24 B).

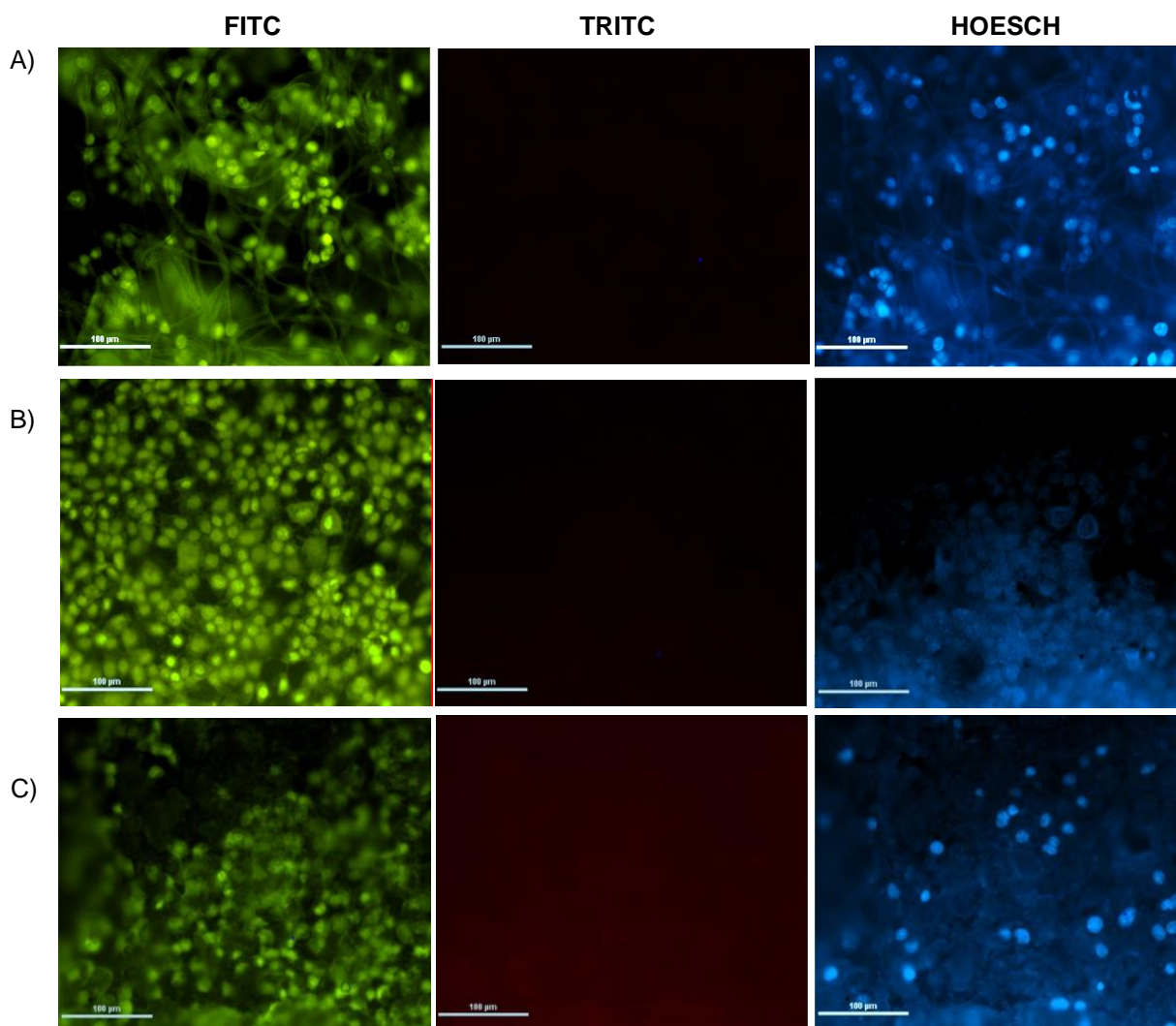


Figura 24 Biocompatibilidad de las células HaCaT con los andamio; A) Control (electrohilado), B) Impresión 3D sin poros y C) Impresión 3D con poros.

8.4 Comprobación de la diferenciación de la línea celular HaCaT

Transcurridos 15 días de cultivo de las células HaCaT en una caja T-25 con los medios de cultivo DMEM-F12 con 10 % SFB y KTC a 0.03 y 2.4 mM CaCl_2 , se realizó la extracción de

ARNm, siguiendo el protocolo descrito en la sección de metodología, para confirmar, a través de la identificación de la expresión de los genes que codifican para las proteínas queratina 1, queratina 10 e involucrina, que este último medio de cultivo permite la diferenciación celular de la línea HaCaT, la cual es indispensable para dar funcionalidad al cultivo sobre el andamio mediante la obtención de células basales y diferenciadas que permitan la estratificación celular y con ello la formación de los diferentes estratos que conforman la dermis.

En la Figura 25 se muestra la presencia del gen constitutivo GAPDH en los productos de RT-PCR del ARNm extraído de células cultivadas en los diferentes medios (control positivo de la RT-PCR). Asimismo, el producto de RT-PCR del ARNm extraído de células cultivadas en medio DMEM-F12 con 10 % SFB, evidenció que las células están diferenciadas dada la identificación de la expresión de los genes K1, K10 e involucrina. Lo anterior era de esperarse ya que el medio de cultivo contiene CaCl_2 , de acuerdo con lo especificado por el fabricante. Por otra parte, el producto de RT-PCR del ARNm extraído de células cultivadas en medio KTC a 0.03 mM de CaCl_2 , evidenció que las células se encontraban en estado basal porque no se identificó la expresión del gen K1 que codifica para queratina K1, la cual marca el inicio del proceso de diferenciación celular. Finalmente, con el producto de RT-PCR del ARNm extraído de células cultivadas en medio KTC a 2.4 mM de CaCl_2 , se evidenció que las células estaban diferenciadas ya que se identificaron los genes que expresan tanto para queratina K1, queratina K10 e involucrina.

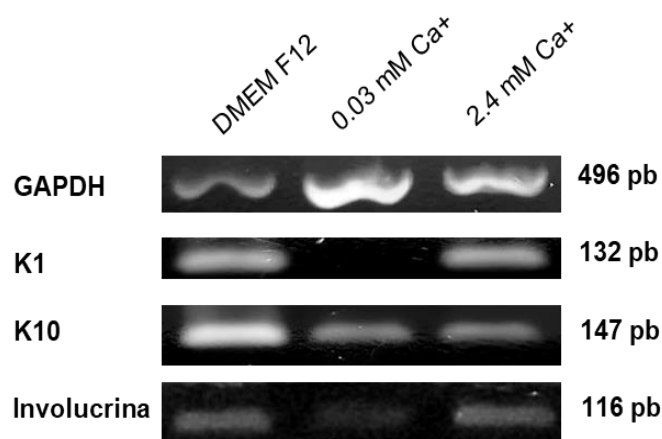


Figura 25 Identificación de la expresión de los genes que codifican para GAPDH (control +), K1, K10 e involucrina por electroforesis de una reacción de RT-PCR.

Con base en lo observado en la Figura 25, se realizó el análisis de las bandas del gel de electroforesis utilizando el programa ImageJ para cuantificar las Unidades Relativas de Absorbancia (URA) de los genes expresados durante la RT-PCR. La expresión del gen K1 en el medio de cultivo KTC a 2.4 mM CaCl₂ fue de 1.12 URA en comparación con las 0.01 URA obtenidas para el medio de cultivo KTC a 0.03 mM CaCl₂. No obstante lo anterior, las URA obtenidas a la condición de 2.4 mM CaCl₂ fue 3.43 veces menor en comparación con el medio DMEM-F12 con 10 % SFB (3.85 URA). La expresión para el gen K10 en el medio de cultivo KTC a 2.4 mM CaCl₂ fue de 0.45 URA en comparación con las 0.34 URA obtenidas para el medio de cultivo KTC a 0.03 mM CaCl₂. No obstante lo anterior, las URA obtenidas a la condición de 2.4 mM CaCl₂ fue 8.78 veces menor en comparación con el medio DMEM-F12 con 10 % SFB (3.95 URA). Finalmente, la expresión para el gen involucrina en el medio de cultivo KTC a 2.4 mM CaCl₂ fue de 1.31 URA en comparación con las 0.38 URA obtenidas para el medio de cultivo KTC a 0.03 mM CaCl₂. No obstante lo anterior, las URA obtenidas a la condición de 2.4 mM CaCl₂ fue 2.69 veces menor en comparación con el medio DMEM-F12 con 10 % SFB (3.52 URA).

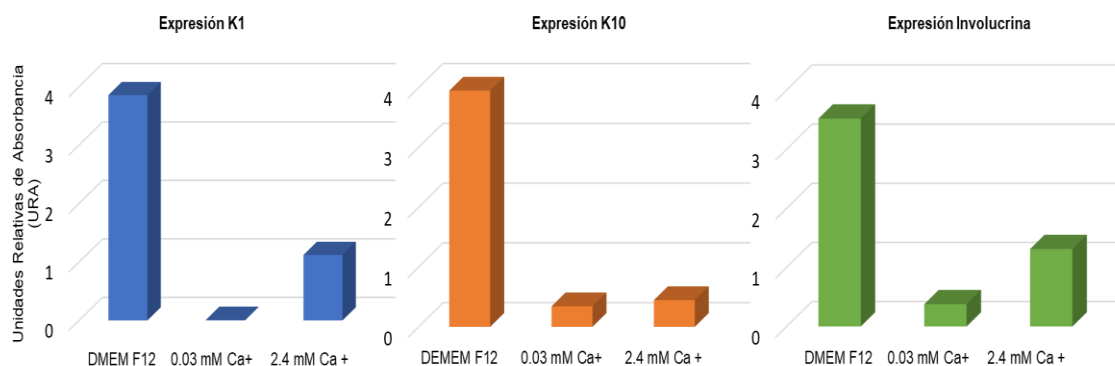


Figura 26 Cuantificación de la expresión de los genes K1, K10 e involucrina en células HaCaT.

9. DISCUSIÓN

9.1 Caracterización del P3HB recuperado

En la literatura se ha reportado el uso de P3HB para distintas aplicaciones, que van desde materia prima para la producción de pinturas, hasta aplicaciones más especializadas en el área biomédica para la fabricación de material quirúrgico y regeneración de tejidos. Sin embargo, para este tipo de aplicaciones, se requieren pesos moleculares superiores a 1,000 kDa, debido a que el peso molecular determina el comportamiento elástico del material y su aplicación final (Koller *et. al.*, 2013; Fei *et. al.*, 2016).

El peso molecular también se ve afectado por el método de extracción, esto debido a que las condiciones o solventes utilizados durante la extracción rompen las cadenas del polímero, formando cadenas de menor tamaño, no obstante, la extracción con cloroformo sigue siendo el más utilizado debido a su simplicidad y rapidez (Jacquel *et. al.*, 2008; Aramvash *et. al.*, 2016). Sin embargo, en trabajos anteriores se demostró que una solución cloroformo-hipoclorito de sodio permitía la recuperación de P3HB con una menor cantidad de solvente (Hahn *et. al.* 2011).

No obstante, Millán (2017) reportó que el método de hipoclorito-cloroformo causa ruptura de las cadenas de P3HB, afectando su peso molecular negativamente disminuyéndolo hasta un 50 %, esto debido a la existencia de gránulos nativos amorfos del P3HB los cuales son bastante vulnerables a la saponificación alcalina y se descomponen rápidamente en productos solubles, como monómeros y oligómeros (Hahn *et. al.*, 1994; Jaquel *et. al.*, 2008, Raza *et. al.*, 2018).

Este mismo efecto se observó en el presente trabajo, debido a que el peso molecular obtenido por el método de ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo fue de 416 ± 68 kDa respecto al P3HB obtenido por los métodos de ruptura y extracción con etanol-acetona ($1,750 \pm 98$ kDa) y el de secado por aspersión-SDS ($1,440 \pm 84$ kDa).

En cuanto a pureza, el P3HB es más soluble en cloroformo; por lo tanto, después de la recuperación del polímero por el método de hipoclorito-cloroformo se obtuvo un material con una pureza del 99 % y un rendimiento del 30 %. En cuanto a pureza, es un valor dentro

de lo reportado en la literatura, el cual va desde 98-100 %; sin embargo, en cuanto al rendimiento, se reportan valores de 79-90 % (Hahn *et. al.*, 1994; Jaquel *et. al.*, 2008; Aramvach *et. al.*, 2016). El rendimiento tan bajo que se obtuvo se debe a la pérdida del P3HB en el momento de realizar la separación de las fases acuosas y orgánicas que se forman en dicho método de extracción.

En comparación con el material recuperado con etanol-acetona, el rendimiento fue del 79 % y su pureza del 93%, lo anterior debido a que el material contenía residuos celulares y de solventes, mismos que fueron evidenciados en el espectro de FTIR (Figura 15 C). No obstante lo anterior, la pureza del material fue similar a la reportada por Aramvach y colaboradores (2016), quienes al realizar extracciones de P3HB a partir de biomasa húmeda, obtuvieron valores de pureza entre $97-98 \pm 2$ %, con rendimientos de entre $35-96 \pm 3$ %.

Se considera que para mejorar la pureza del material obtenido por etanol-acetona se podría adicionar un lavado con SDS y uno más con agua destilada para retirar una mayor cantidad de proteínas y restos celulares.

Al analizar los espectros de FTIR del P3HB recuperado por los distintos métodos de extracción (Figura 15) se encontraron bandas características de poli-3-hidroxitirato (Tabla 7): i) la banda característica a $1,720 \text{ cm}^{-1}$, correspondiente al estiramiento éster carbonilo (C = O) de la parte cristalina de P3HB (Sato *et. al.*, 2004; Hu *et. al.*, 2006; Aarthi *et. al.*, 2011), ii) las bandas características de la estructura helicoidal del P3HB aproximadamente a 1379, 1275-1279, 1261, y 1228 cm^{-1} (Sato *et. al.*, 2004), iii) la banda del estiramiento C-O-C de la columna vertebral de P3HB aproximadamente a 1180 cm^{-1} (Hu *et. al.*, 2006).

Cabe mencionar que en el FTIR para el P3HB obtenido por el método de ruptura y extracción con etanol-acetona, además de las bandas descritas en el párrafo anterior, se observó una banda aproximadamente a 1650 cm^{-1} (banda amida I), correspondiente al enlace C=O de amidas asociadas con proteínas, que también puede contribuir a la señal del grupo C=C característica de compuestos olefínicos y aromáticos; se observó la banda referente al grupo amida II (N-OH) aproximadamente a $1535-1540 \text{ cm}^{-1}$, la cual está asociada con proteínas y puede tener contribuciones al enlace C=N. Estas bandas han sido

encontradas en células secas de *Dinoroseobacter sp.* aislado de *Phaeodactylum tricornutum Bohlin* que son productoras de polihidroxibutirato (PHA) (Xiao *et. Al.*, 2011), por lo cual indicarían residuos de otros componentes de bacterias, como se puede inferir su relación con grupos asociados con proteínas. Finalmente se observó la banda entre 3280-3285 cm^{-1} correspondiente al grupo hidroxilo (OH), característica de solventes residuales (Coates, 2000).

Respecto a las muestras de P3HB obtenidas de los métodos de ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo y el de secado por aspersion-SDS, los picos en el espectro de FTIR coinciden con los de un P3HB estándar (Bhagowati *et. al.*, 2015), como se observa en la Figura 27.

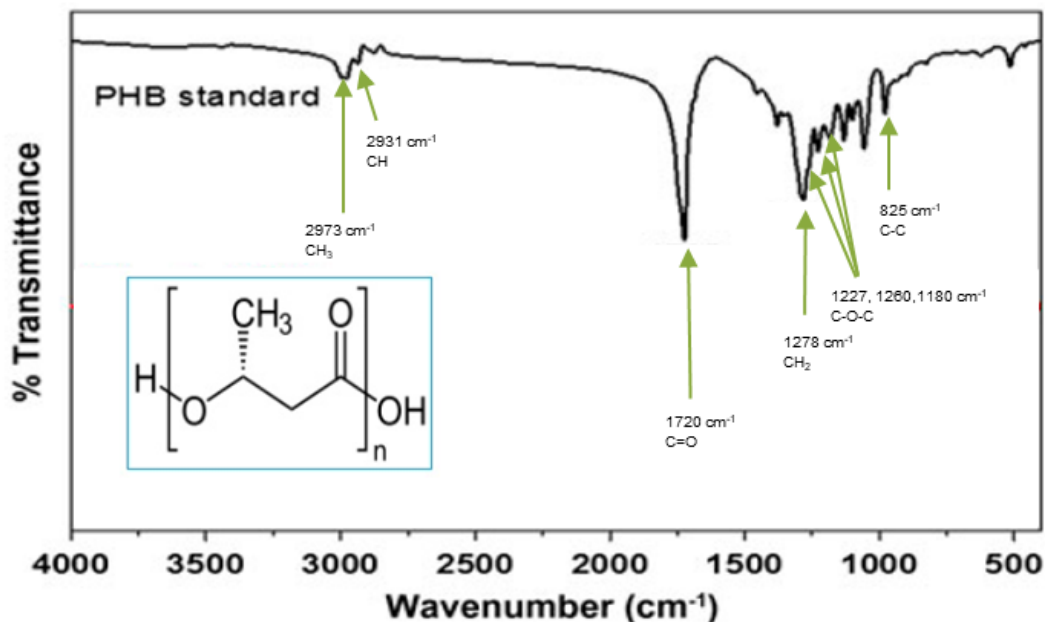


Figura 27 Espectro de FTIR de P3HB estándar comercial (Bhagowati *et. al.*, 2015).

9.1.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Solo para el material recuperado a través del método con hipoclorito-cloroformo se logró identificar tanto la T_g , la T_c y la T_m en comparación con los métodos en donde se utilizó secado por aspersion-SDS y etanol-acetona, en donde los termogramas solo evidenciaron estas últimas dos temperaturas.

Si bien la T_g indica el punto de transición vítrea del material debido al incremento de la capacidad calorífica del polímero a causa de un mayor flujo de energía (calor) respecto a la variación de la temperatura, esta no se observó en los métodos de secado por aspersión-SDS y etanol-acetona posiblemente porque la velocidad de calentamiento utilizada ($10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) en los análisis no permitió el suministro del calor necesario para lograr, a través de la energía cinética ganada por los núcleos de la parte cristalina del PHB, un ordenamiento de las cadenas poliméricas del material (Ebnesajjad, 2016).

Respecto a la T_c del material recuperado a través del método con hipoclorito-cloroformo ($57.78\text{ }^\circ\text{C}$), pudo haber estado muy por debajo de los $105.10\text{ }^\circ\text{C}$ y $105.23\text{ }^\circ\text{C}$ registrados para los materiales obtenidos por secado por aspersión-SDS y etanol-acetona, respectivamente, debido a que el PHB tuvo un peso molecular menor en comparación con el PHB obtenido por los otros métodos (246.15% menor al peso molecular del PHB recuperado por el método de secado por aspersión-SDS y 320.68% menor al peso molecular del PHB recuperado por el método de etanol-acetona), lo que permitió una mayor activación molecular y reordenamiento de la parte cristalina del polímero (Xin et. al., 2019) en menor tiempo en comparación con los otros materiales. No obstante lo anterior, la T_c del PHB obtenido por el método con hipoclorito-cloroformo estuvo más cercana a la reportada por Abdelwahab y colaboradores (2012): $48\text{ }^\circ\text{C}$ para un PHB de 425 kDa y un Índice de Polidispersión de 2.51.

La T_c también permitió evidenciar que el PHB recuperado por el método de secado por aspersión-SDS tuvo un mayor grado de cristalinidad en comparación con el material obtenido por el método de etanol-acetona (68% vs 52%) dado que las cadenas poliméricas lograron una mayor disposición ordenada (Barham et al., 1984; Lizarraga-Valderrama et. al., 2015), lo que le permitió la disipación de una energía latente de cristalización de 117.4 J/g , es decir 31.2% mayor en comparación con la energía correspondiente al PHB recuperado por el método de etanol-acetona (89.49 J/g).

En tanto que para los tres materiales recuperados por los métodos de extracción mencionados se observaron dos T_m , posiblemente debido a un igual número de

conformaciones de cristales en el P3HB, las cuales han sido reportadas por Kumar Rastogi y colaboradores (2017), así como por Botana y colaboradores (2010).

9.1.2 Determinación del módulo de Young

Los valores de Módulo de Young son directamente proporcionales al peso molecular del polímero, presentándose un comportamiento inverso para las muestras con pesos moleculares de entre 1,660 y 2,030 kDa, ya que ha sido reportado que en este rango existen regiones amorfas en las cadenas del polímero (Domínguez-Díaz *et. al.*, 2015). Por lo anterior y toda vez que el peso molecular del P3HB obtenido por el método de ruptura y extracción con etanol-acetona se encontró en este rango (1,750 kDa) su Módulo de Young fue de 217 MPa, en comparación con el Módulo de Young de 261 MPa para el P3HB obtenido por el método de ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo, el cual tuvo un peso molecular de 416 ± 68 kDa.

Si bien Domínguez-Díaz y colaboradores (2015) reportaron un Módulo de Young de 650 MPa para un P3HB con un peso molecular de 1,650 kDa, el material provenía de un método de extracción distinto al de etanol-acetona (extracción con cloroformo) y la medición del Módulo de Young la realizó utilizando películas de P3HB, a diferencia de las probetas empleadas en el presente trabajo.

Por último, para el método de recuperación de P3HB por ruptura y extracción por secado por aspersión-SDS no se logró determinar el valor del Módulo de Young, no obstante lo anterior, se estima que el Módulo de Young sería mayor al valor del P3HB obtenido por el método de etanol-acetona (217 MPa), ya que el peso molecular de $1,440 \pm 84$ kDa se encontró por debajo del rango en donde la proporcionalidad peso molecular-Módulo de Young se invierte.

9.1.3 Determinación del ángulo de contacto

La hidrofobicidad de una superficie es posible conocerla midiendo el ángulo de contacto a través de la dispersión de una gota de agua sobre la superficie; así, mientras menor sea el ángulo de contacto ($<90^\circ$) más hidrofílica será la superficie; en tanto que valores por arriba

de 90° se trata de una superficie hidrofóbica (Chang & Wang, 2011; Domínguez-Díaz *et. al.*, 2015; Lizárraga-Valderrama *et. al.*, 2015). Estudios han demostrado que esta característica influye sobre la adhesión, propagación, proliferación y diferenciación celular cuando las superficies son hidrofílicas (Xu and Siedlecki, 2007; Wei *et. al.*, 2009).

La medición del ángulo de contacto de la gota de agua sobre los andamios generados en el presente trabajo por moldeado en placa e impresión 3D a partir del P3HB obtenido por los métodos de etanol-acetona y secado por aspersion-SDS, arrojaron valores de entre 62 y 75°, indicando superficies hidrofílicas en comparación con la superficie del andamio control que fue generado por electrohilado a partir de P3HB recuperado por el método de ruptura y extracción con hipoclorito-cloroformo por Mondragón-Guillen (2020).

Lo anterior se atribuye a que los grupos hidroxilo (-OH) y carbonilo (-COH), presentes en la estructura del P3HB, dependiendo la conformación espacial del material, tienden a tomar un ion de hidrógeno adicional (aceptores de hidrógeno), lo que genera una fuerte influencia hidrofílica, aunado a la rugosidad de la superficie que favorecen ángulos de contacto menores (Chang & Wang, 2011).

9.1.4 Caracterización superficial de los andamios por SEM

Los andamios generados por la técnica de moldeado en placa, tanto para el P3HB obtenido por secado por aspersion-SDS y etanol-acetona (Figura 20 inciso A y C, respectivamente) mostraron una morfología superficial lisa y con algunas protuberancias en los andamios de P3HB. Lo anterior coincide con la morfología reportada en la literatura para andamios moldeados en placa con ayuda de una prensa (Abdelwahab *et. al.*, 2012; Lizarraga-Valderrama *et. al.*, 2015).

Por el contrario, los andamios generados por impresión 3D a partir de P3HB obtenido por los métodos mencionados en el párrafo inmediato anterior, mostraron una morfología con cierta rugosidad y protuberancias (Figura 20 inciso B y D, respectivamente). Adicionalmente, los andamios fabricados con P3HB obtenido por el método etanol-acetona presentaron algunos poros, lo cual no ha sido reportado para andamios generados por esta técnica y con un material con características similares a las del presente trabajo. Lo anterior

se consideraría una propiedad indeseable para la potencial aplicación de estos andamios para aplicaciones biomédicas, ya que podría influir negativamente sobre la adhesión, propagación y proliferación celular.

9.2 Cultivo y biocompatibilidad de las células HaCaT en andamio de P3HB

9.2.1 Cinéticas de crecimiento para la caracterización de la línea celular HaCaT

La velocidad específica de crecimiento de la línea celular en el medio de cultivo DMEM-F12, 10 % SFB fue de 0.022 h^{-1} , con un tiempo de duplicación de 32 h, valores que coincidieron con lo reportado en la literatura para la línea celular de queratinocitos HaCaT, así como la morfología resultante bajo las condiciones de cultivo (Scheitza *et. al.*, 2012).

Por otro lado, para el caso de la cinética de células HaCaT en medio de cultivo KTC con 0.03 mM CaCl_2 el tiempo de duplicación fue de 40 h, es decir 25% más respecto al control (DMEM-F12, 10 % SFB), debido a que el medio KTC es un medio de cultivo específico libre de SFB, en el cual las células crecieron a menor velocidad (0.017 h^{-1}) y con una morfología fusiforme y tipo fibroblástica a consecuencia del bajo nivel de calcio presente, elemento que desempeñan un papel importante en la activación de los queratinocitos epidérmicos para su proliferación (Boukamp *et. al.*, 1988; Micallef *et. al.*, 2009; Scheitza *et. al.*, 2012).

Por último, para la cinética de crecimiento celular en el medio KTC con 2.4 mM CaCl_2 se esperaba que el tiempo de duplicación fuera similar al obtenido para el cultivo en el medio DMEM-F12, 10 % SFB (el cual está suplementado por el fabricante con CaCl_2 a una concentración de 1.9 mM), no obstante lo anterior, este parámetro fue 40.6 % mayor en comparación con el tiempo de duplicación obtenido para el medio de control (45 h vs 32 h), ocasionado por el impacto del incremento de la concentración de CaCl_2 de 0.03 mM a 2.4 mM a las 24 h de haber iniciado la cinética. Este comportamiento también fue observado por Micallef y colaboradores (2009) durante una cinética de crecimiento de esta misma línea celular en medio KTC con 0.09 mM CaCl_2 y un incremento de este compuesto a 1.2 mM a las 72 h.

9.2.2 Biocompatibilidad de las células HaCaT con los andamios

Se comprobó que el P3HB no causó ningún tipo de toxicidad a las células, lo cual permitió que las células HaCaT se adhirieran en los tres andamios que se evaluaron de manera preliminar (Figura 25). Para el andamio de electrohilado (Figura 25 A) hubo un crecimiento heterogéneo, esto debido a dos posibles situaciones, la primera podría ser al ángulo de contacto evaluado (100°) y la segunda al tamaño de poros heterogéneo, lo cual ha sido reportado los trabajos de Domínguez-Díaz, (2016) y Mondragón-Guillen, (2020).

Los andamios generados por impresión 3D con poros del P3HB obtenido del método de ruptura y extracción con Etanol-acetona (Figura 25 C) se observó en el filtro FITC (células vivas fluorescen de color verde) un crecimiento celular homogéneo; sin embargo, bajo el filtro HOESCH (fluorescen de color azul los núcleos de las células vivas) se observó que la proliferación celular no fue homogénea.

Esto posiblemente se debió a los tamaños de poros del andamio ($75\text{-}100\ \mu\text{m}$), ya que estos fueron mayores que el tamaño de las células ($25\ \mu\text{m}$) y probablemente este andamio generó cierta fluorescencia en el filtro FITC por lo que de momento el crecimiento fue homogéneo de las células.

Por último, el andamio generado por impresión 3D sin poros de P3HB obtenido del método de ruptura y extracción con Etanol-acetona, se observó un crecimiento celular homogéneo tanto en el filtro FITC y en el HOESCH. Lo anterior coincide con andamios generados con diversas técnicas que proporcionan soportes con morfologías superficiales lisas, con ciertas protuberancias, relieve y algunos microporos, en los cuales han cultivado algunos linajes celulares. Tal es el caso del cultivo de células HaCaT, Osteoblastos, células neuronales y fibroblastos, encontrando que en andamios de P3HB hay una mayor proliferación celular, en comparación con otros polímeros o combinaciones de ellos (Coa *et. al.*, 2005; Misra *et. al.*, 2010; Lizarraga-Alderrama *et. al.*, 2015)

9.2.3 Diferenciación de la línea celular HaCaT en condiciones *in vitro*

El análisis de la expresión de los genes que codifican para la síntesis de queratina K1, K10 e involucrina permitió evidenciar que las células de queratinocitos HaCaT mantenían su capacidad de diferenciación en condiciones *in vitro*, no obstante de haberse llevado a cabo un proceso de adaptación de dicha línea celular del medio DMEM-F12, 10 % SFB al medio específico KTC suplementado con CaCl_2 .

Es importante mencionar que, como era de esperarse, a las 96 h de cultivo las células en el medio KTC con 0.03 mM CaCl_2 no se encontraban diferenciadas, ya que si bien en el gel de electroforesis del producto de RT-PCR se observó la banda correspondiente al gen K10 (Figura 25), diversos estudios han demostrado que el cambio morfológico y estructural de la diferenciación de las células de queratinocitos están ligados con la expresión tanto del gen que codifica para la queratina K1, como de los genes que codifican para la queratina K10 y la involucrina (Deyrieux *et. al.*, 2007; Micallef *et. al.*, 2009; Bikle *et. al.*, 2012). Adicionalmente, lo anterior evidenció que una baja concentración de calcio en el medio de cultivo mantuvo a las células en estado basal, favoreciendo la producción de queratinas K5 y K14, de acuerdo con lo reportado por (Deyrieux *et. al.*, 2007; Bikle *et. al.*, 2012) indispensables para la formación de una monocapa homogénea

Por otra parte, las células cultivadas en el medio KTC con 2.4 mM CaCl_2 a las 96 h sí se encontraban diferenciadas en virtud del resultado obtenido en el gel de electroforesis del producto de RT-PCR (Figura 25), en donde se observaron las bandas correspondientes a los genes que expresan tanto para K1, K10 e involucrina.

Las bandas observadas en la Figura 25, correspondientes al cultivo de células en el medio KTC a las diferentes concentraciones de CaCl_2 , también fueron observadas por Micallef y colaboradores (2009) en un ensayo de Western Blot para células HaCaT cultivadas en dicho medio a concentraciones de 0.09 y 1.2 mM de CaCl_2 durante 3 días (Figura 28). Cabe resaltar que a medida que evolucionó el cultivo, las células en bajo calcio se diferenciaron por la formación de desmosomas una vez alcanzada una confluencia mayor al 80%.

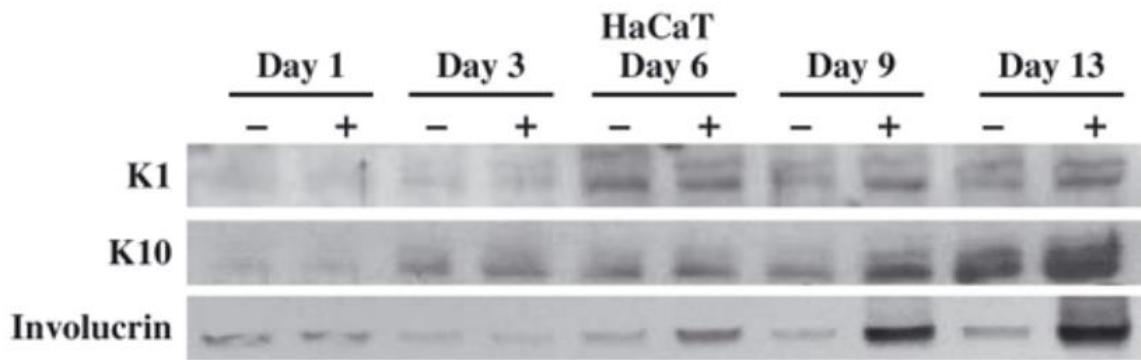


Figura 28 Análisis de Western y comparación de marcadores de diferenciación K1, K10 y expresión de involucrina; (-) bajo calcio, (+) alto calcio, tomada de Micallef *et. al.*, (2009).

10 CONCLUSIONES

- El P3HB obtenido por los métodos de extracción de secado por aspersión-SDS y etanol-acetona, mostraron propiedades adecuadas para ser usados como andamios en ingeniería tisular debido a su alto peso molecular: 1,440 y 1,750 KDa, respectivamente.
- Los andamios generados tanto por impresión 3D como por moldeado en placa, a partir de P3HB obtenido por los métodos de extracción de secado por aspersión-SDS y etanol-acetona, tuvieron ángulos de contacto menores a 90° y superficies hidrofílicas en comparación con el andamio control (generado por electrohilado a partir de P3HB obtenido por el método de hipoclorito-cloroformo).
- El análisis de biocompatibilidad reveló que en los andamios de P3HB recuperado por el método de extracción con etanol-acetona y fabricados por la técnica de impresión 3D sin poros, se tuvo una mayor proliferación celular en comparación con el andamio control.
- Los análisis de RT-PCR mostraron que las células HaCaT mantuvieron su capacidad de diferenciación una vez adaptadas al medio de cultivo KTC con alta concentración de CaCl_2 (2.4 mM), lo que en conjunto con lo mencionado en el punto anterior, aseguraría la funcionalidad de una biomatriz para la formación de un sustituto de piel en un sistema *in vivo*.

11 PERSPECTIVAS

Si bien la emergencia sanitaria provocada por SARS-CoV2 limitó en gran medida el desarrollo y el alcance del presente trabajo (quedando pendientes los ensayos en el sistema Transwell para evidenciar la formación de un tejido funcional a partir de un cultivo de células HaCaT sobre los andamios generados por impresión 3D y moldeado en placa a partir de P3HB recuperado por los métodos de etanol-acetona y el de secado por aspersion-SDS), se vislumbra que en futuros trabajos se podría realizar, mediante el uso de plasma atmosférico, la inclusión de nanopartículas de melanina en los andamios de P3HB obtenido mediante el método de ruptura y extracción por secado por aspersion (por no emplear solventes durante su recuperación y tener mayor pureza en comparación con el P3HB obtenido por el método de etanol-acetona), para realizar su caracterización física y fisicoquímica previo a su uso en cultivos para determinar, por microscopía electrónica de barrido, que las células HaCaT, además de estratificar adecuadamente en los soportes antes mencionados, también inclusionan las nanopartículas que favorecerían su pigmentación, igualando así la tonalidad de la piel del sistema *in vivo*.

Una vez caracterizados los andamios de P3HB-melanina y confirmada la pigmentación de las células, se podría generar un sustituto de piel en sistema "Transwell" para probarlo de manera *in vivo* en ratones, a fin de verificar que el tejido sustituto, además de no generar reacciones adversas o su rechazo por la piel del sistema de estudio, logra formar los distintos estratos que conforman la epidermis.

De lograrse y confirmarse todo lo anterior, se incrementarían las posibilidades que el soporte desarrollado es un candidato potencial para continuar sus estudios con otras líneas celulares y su posible uso en ingeniería de tejidos.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Aarhi N., Ramana K. V. (2011). Identification and Characterization of Polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *International Journal of Environmental Sciences*. 1(5):744-756.
- Abdelwahab M. A., Flynn A., Chiou B., Imam S., Orts W., Chiellini E. (2012). Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*. 97:1822-1828.
- Akita S., Einaga Y., Miyaki Y., Fujita H. (1976). Solution properties of Poly(D- β -hydroxybutyrate). 1. Biosynthesis and characterization. *Macromolecules*. 9(5):774-780.
- An J., Mei Teoh J. E., Suntornnond R., Chua C. K. (2015). 3D printing-Review: Design and 3D printing of scaffolds and tissues. *Engineering*. 1(2):261-268.
- Aramvash, A., Gholami-Banadkuki, N., Moazzeni-Zavareh, F. & Hajizadeh-Turchi, S. (2016). An environmentally friendly and efficient method for extraction of PHB biopolymer with non-halogenated solvents. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 1936–1943
- Barham P. J., Keller A., Otun E.L., Holmes P.A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal Materials Science*. 19-2781-2794.
- Begotti S. (2017). Patent N°. US9, 683, 076 B2. San Giorgio di piano, Italy. Foreign Patent Document.
- Bhagowati P., Pradhan S., Dash H. R., Das S. (2015). Production, optimization, and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 9(79): 1454-1463.
- Bikle D. D., Xie Z., Tu C. L. (2012). Calcium regulation of Keratinocyte differentiation. *Expert Reviews*. 7(4):461-472.
- Botana A., Mollo M., Eisenberg P., Torres Sánchez R. M. (2010). Effect of modified montmorillonite on biodegradable PHB nanocomposites. *Appl. Clay Sci.* 47-263-270.
- Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human Keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*. 16:761-771.

- Cao W., Wang A., Jing D., Gong Y., Zhao N., Zhang X. (2005). Novel biodegradable films blended with poly(3-hydroxybutyrate). *Journal of Biomaterials Science, Polymer*. 16(11):1379-1394.
- Casas L., Peña C., Salvador M., Frías P. (1992). Influence of spray drying on the permeability of *K. fragilis* measured by β -galactosidase activity. *Food Biotechnology*. 6(2):135-152.
- Castillo, T. 2013. La acetilación de los alginatos sintetizados por *Azotobacter vinelandii* en función de la tensión de oxígeno disuelto y de la velocidad específica de crecimiento. Tesis de Doctorado en Ciencias, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Fecha de consulta: 22 de abril de 2018.
- Castro-Vazquez, M., 2018. Desarrollo de un método de separación del Poli(3Hidroxibutirato) producido por la cepa OP de *Azotobacter vinelandii*. Mexico: s.n.
- Chang H., Wang Y. (2011). Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering-Cells and Biomaterials*. InTech, Croacia. 569-588.
- Chan, R.T.H., Russell, R.A., Marcal, H., Lee, T.H., Holden, P.J. & Foster, J.R. 2014. BioPEGylation of polyhydroxybutyrate promotes nerve cell health and migration. *Biomacromolecules*. 15: 339-349.
- Chen G. Q and Wang Y. (2013). Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Chinese Journal of Polymer Science*. 31(5): 719-736.
- Chen X., Niyonsaba F., Ushio H., Okuda D., Nagaoka I., Ikeda S., Okumura K., Ogawa H. (2005). Synergistic effect of antibacterial agents human β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Dermatological Science*. 40(2):123-132.
- Chiulan I., Frone A. N., Brandabur C., Panaitescu D. M. (2018). Recent advances in 3D printing of aliphatic polyesters. *Bioengineering*. 5(2):1-18.
- Coates J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons Ltd.
- Colorado A. C., Agudelo C. A., Moncada M. E. (2013). Análisis de biomateriales para uso en ingeniería del tejido de piel: revisión. *Revista Ingeniería Biomédica*. 7(14): 11-23.

- Dai Z., Ronholm J., Tian Y., Sethi B., Cao X. (2016). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*. 7:1-13.
- Deyrieux A. F., Rosas-Acosta G., Ozbun M. A., Wilson V. G. (2007). Sumoylation dynamics during Keratinocyte differentiation. *Journal of Cell Science*. 120:125-136.
- Do A. V., Khorsand B., Geary S. M., Salem A. K. (2015). 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications. *Advanced Healthcare Materials*. 4:1742-1762.
- Domínguez-Díaz M., Menesses-Acosta A., Romo-Uribe A., Peña C., Segura D., Espin G. (2015). Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly- β -hydroxybutyrates (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. *European Polymer Journal*. 63:101-112.
- Ebnesajjad S. (2016). Chapter 1: Introduction to Plastics, in *Chemical Resistance of Engineering Thermoplastics*, Elsevier Inc.
- Eckert R L, Green H. (1986). Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell Press*. 46(4): 583– 589.
- Falke G. F., Atala A. (2000). Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 98(2):103-114.
- Fei T., Cazeneuve S., Wen Z., Wu L., Wang T. (2016). Effective recovery of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biopolymer from *Cupriavidus necator* using a novel and environmentally friendly solvent system. *Biotechnology Progress*. 32(3): 678–685.
- Gomes M., Azevedo H., Malafaya P., Silva S., Oliveira J., Silva G., João Mano R. S., Reis R. (2013). Chapter 16: Natural polymers in tissue Engineering applications. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. 385-425.
- González-García Y., Meza-Contreras J. C., González-Reynoso O., Córdova-López J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29 (1): 77-115.
- Haake A, Scott GA, Holbrook KA. (2001). Chapter 2: Structure and Function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. Editorial: The Parthenon Publishing Group. 19-45.
- Hahn, S.K., Chang, Y.K., Kim, B.S. & Chang, H.N. 1994. Optimization of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 256-261.

- Hong S. G., Hsu H. W., Ye M. T. (2013) Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 111:1243-1250.
- Hu Y., Zhang J., Sato H., Futami Y., Noda I., Ozaki Y. (2006). C-H...O=C Hydrogen Bonding and Isothermal Crystallization Kinetics of Poly(3-hydroxybutyrate) Investigated by Near-Infrared Spectroscopy. *Macromolecules*. 39:3841-3847.
- Huyan Y., Lian Q., Zhao T., Li D., He J. (2020). Pilot Study of the biological properties and vascularization of 3D printed bilayer skin grafts. *International Journal of Bioprinting*. 6(1): 53-64.
- Ikada Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*. 3:589-601.
- Jacquel N., Lo C. W., Wei Y. H., Wu H. S., Wang S. S. (2008). Review: Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*. 39:15-27.
- Jafari M., Paknejad Z., Rezai Rad M., Motamedian S. R., Jafar Eghbal M., Nadjmi N., Khojasteh A. (2015). Polymeric scaffolds in tissue Engineering: a literatura review. *Society For Biomaterials*. 1058:431-459.
- Kabe T., Tsuge T., Kasuya K., Takemura A., Hikima T., Takata M., Iwata T. (2012). Physical an structural effects of adding ultrahigh-molecular-weight Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] to wild-type Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. *Macromolecules*.45:1858-1865.
- Kessler B., Witholt B. (2001). Factor involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoates metabolism. *Journal of Biotech nology*. 86:97-104.
- Kierszenbaum AL., Tres L.L. (2002) *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. Editorial: Elsevier. Fourth edition. 307-320.
- Kim S. W., Choi S. H., Kim J. T. Kim Y. H. (2015). An Additional Option for Split-Thickness Skin Graft Donors. *Annals of Plastic Surgery*. 75(6): 634-636.
- Kimura T. E., Merritt A. J., Garrod D. R. (2007). Calcium-Independent desmosomes of keratinocytes are Hyper-adhesive. *Journal of Investigative Dermatology*. 127(4):775-781.
- Koller M., Niebelschütz, H., Braunegg, G. (2013). Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. *Engineering in Life Sciences*. 13(6): 549–562.

- Kumar Rastogi V., Samyn P. (2017). Synthesis of Polyhydroxybutyrate Particles with Micro-to-Nanosized Structures and Application as Protective Coating for Packaging Papers. *Nanomaterials*. 7(5).
- Lewis J. E., Jensen P. J., Wheelock M. J. (1994). Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *Journal of Investigative Dermatology*. 102(6): 870– 877.
- Lizarraga-Valderrama L. R., Nigmatullin R., Taylor C., Haycock J. W. Claeysens F., Knowles J. C., Roy I. (2015). Nerve tissue engineering using blends of poly(3-hydroxyalkanoates) for peripheral nerve regeneration. *Engineering in Life Sciences*. 15:612-621.
- Nakamura M., Iwanaga S., Henmi C., Arai K., Nishiyama Y. Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. *International Society for Biofabrication*. 2:1-6.
- Niyonsaba F., Ogawa H. (2005). Review article: Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *Journal Dermatological Science*. 40:157-168.
- Nolan K., Millet Y., Ricordi C., Stabler C. L. (2008). Rissue Engieneering and biomaterials in regenerative medicine. *Cell Transplantation*. 17:241-243.
- Marchessault R. H., Okamura K., Su C. J. (1970) Physical properties of Poly (β -hydroxybutyrate). II Conformational aspects in solution. *Macromolecules*. 3(6):735-740.
- Micallef L., Belaubre F., Pinon A., Jayat-Vignoles C., Delage C., Charveron M., Simon A. (2009). Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Experimental Dermatology*. 18(2): 143-151.
- Millán, P.M. (2017). Estudio de los procesos de polimerización y depolimerización del poli-3hidroxibutirato (P3HB) en cultivos de *Azotobacter vinelandii* bajo condiciones controladas de tensión de oxígeno disuelto. Tesis de Doctorado en Ciencias. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Misra S. K., Ansari T. I., Valappil S. P., Mohn D., Philip S. E., Stark W. J., Roy I., Knowles J. C., Salih V., Boccaccini A. R. (2010). Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 31:2806-2815.

- Mondragón Guillén M. (2020). Caracterización de la biocompatibilidad de andamios de PHB con nanopartículas de melanina en modelos in vitro e in vivo. Tesis de licenciatura en Farmacia. Facultad de Farmacia-UAEM.
- Morales-Navarro D. (2014). Revisión bibliográfica: Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. *Revista Cubana de Estomatología*. 51(3): 288-304.
- Lee D. Y., Cho K. H. (2005). The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. *Arch Dermatol Res*. 296(7):296-302.
- Lemos-Delgado A. C., Mina-Cordoba A. (2015). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by bacteria and its potential application to industrial level. *Informador Técnico (Colombia)*. 79 (1): 93-101.
- Liu Q., Zhang H., Deng B., Zhao X. (2014). Poly(3-hidroxybutyrate) and Poly(3-hidroxybutyrate-co-3-hidroxyvalerate): Structure, property and fiber. *International Journal of Polymer Science*. 1-11.
- Lizarraga-Valderrama L.R., Nigmatullin R., Taylor C., Haycock J. W., Claeysens F., Knowles J. C., Roy I. (2015). Nerve tissue engineering using blends of poly(3-hidroxyalkanoates) for peripheral nerve regeneration. *Engineering in Life Sciences*. 15: 612-621.
- O'Brien F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*. 14(3): 88-95.
- Pasparakis M., Haase I., Nestle F. O. (2014) Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews*. 14:289-301.
- Peña C., Castillo T., García A., Millán M., Segura D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hidroxybutyrate): A review of recent research work. *Microbial Biotechnology*, 7(4), 278–293.
- Peña C., García A., Millán M., Castillo T. (2015). Tailor-made polyhydroxyalkanoates (PHAs) production. En: *Microbial factories: biodiversity, biopolymers, bioactive molecules*. Vol. 2. Editorial: Springer, editor: Kalia Vipin Chandra. Springer. 11-28.
- Pérez Martell T. M., González García I. (2010) Dermatologic affections with hypopigmentation in a health área. *Revista Médica Electrónica*. 728-737.

- Philip S., Keshavarz T., Roy I. (2007). Review. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82:233-247.
- Priya A. G., M. S., Jungvid H., Ph. D., Kumar Ph. D. (2008). Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Engineering*. 14(1):105-118.
- Ramier J., Boudelique T., Stoilova O., Manolova N., Rashkov I., Langlois V. (2014). Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering*. 38: 161–169.
- Raza Z. A., Abid S., Banat I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 126: 45-56.
- Roseti L., Parisi V., Petretta M., Cavallo C., Desando G., Bartolotti I., Grigolo B. (2017). Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering*. 78:1246-1262.
- Sabino M. A., Loaiza M., Dernowsek J., Rezende R., Da Silva J. V. L. (2017). Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. 37(2): 1-27.
- Sachlos E., Czernuszka J. T. (2003). Making tissue Engineering scaffolds work review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*. 5:29-40.
- Sánchez-Álvarez J. A. (2019). Desarrollo de un proceso a escala de 350 L para la producción y separación de P3HB en cultivos lote alimentado de la cepa mutante OPNA de *Azotobacter vinelandii*. Tesis en proceso.
- Salehizadeh H., Van Loosdrecht M.C.M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*. 22: 261-279.
- Sato H., Murakami R., Padermshoke A., Hirose F., Senda K., Noda I., Ozaki Y. (2004). Infrared Spectroscopy Studies of CH•••O Hydrogen Bondings and Thermal Behavior of Biodegradable Poly(hydroxyalkanoate). *Macromolecules*. 37:7203-7213.

- Scheitza S., Bonifas J., Blomeke B. (2012). Variable NAT1 enzyme activity in longterm cultured human HaCaT keratinocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 75 (8–10), 471–477.
- Shishatskaya, E.I., Nikolaeva, E.D., Vinogradova, O.N. & Volova, T.G. 2016. Experimental wound dressings of degradable PHA for skin defect repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 27: 165
- Smith I. O., Liu X. H., Smith L. A., Ma P. X. (2009). Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 1(2): 226-236.
- Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 25(10): 1503-1555.
- Summerfield A. Meurens F., Ricklin M. E. (2015). The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular Immunology*. 66:14-21.
- Suriyamongkol P., Weselake R., Narine S., Moloney M., Shah S. (2007) Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants –A review. *Biotechnology Advances*. 25:148-175.
- Tavira Montalván, C. A., Ortega García, A., Dávila González, I., Estrada Mondaca, S., & Meneses Acosta, A. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica Animal cell culture in pharmaceutical biotechnology: research and perspectives. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(4), 35–46.
- Van der Walle G.A.M., de Koning G.J.M., Weusthuis, R.A., Eggink G. (2001). Properties, Modifications and Applications of Biopolyesters. In: Babel W., Steinbüchel A. (eds) *Biopolyesters. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 71: 263-291. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Venegas-Vásquez D. (2017). Calorimetría diferencial de barrido. Departamento de Ingeniería de Materiales. 1-6.
- Vijayavenkataraman S., Lu W. F., Fuh J. Y. H. (2016) 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials and processes. *International Society for Biofabrication*. 8:1-31.

- Wei J., Igarashi T., Okumori N., Maetani T., Liu B. S., Yoshinari M. (2009). Influence of Surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblast. *Biomedical Materials*. 4: 045002.
- Woodcock-Mitchell J., Eichner R., Nelson W. G., Sun T. T. (1982). Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *Journal Cell Biology*. 95(2): 580– 588.
- Woods E. J., Benson J. D., Agca Y., Critser J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Science direct*. 48:146-156.
- Xiao N., Jiao N. (2011). Formation of Polyhydroxyalkanoate in Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria and Its Relationship to Carbon Source and Light Availability. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(11)-7445-7450.
- Xin J., Meng X., Xu X., Chu Q., Bilal Naveed H., Ma W. (2019). Cold Crystallization Temperature Correlated Phase Separation, Performance, and Stability of Polymer Solar Cells. *Matter*. 1:1316–1330.
- Xu L., Siedlecki C. A. (2007). Effect of Surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterial*. 28 (22):3273-3283.
- Yan W. C., Davoodi P., Vijayavenkataraman S., Tian Y., Cheng Ng W., Fuh J. Y. H., Robinson K., S., Wang C. H. (2018). 3D bioprinting of skin tissue: From pre-processing to final product evaluation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 132:270-295.
- Yao T. and Asayama Y. (2017). Review: Animal-cell culture media: History, characteristics and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*. 16:99-117.
- Yuspa S. H., Kilkenny A. E., Steinert P. M., Roop D. R. (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *Journal Cell Biology*. 109(3): 1207-1217.

10. ANEXOS

10.1 CONGRESOS Y PREMIOS

10.2 13° Encuentro de Estudiantes de posgrado de la Facultad de Farmacia



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

A través de la Facultad de Farmacia

Otorga la presente:

CONSTANCIA

a:

Sandra García Cerna, Angélica Meneses Acosta y Carlos Peña Malacara

Por su participación en la presentación del cartel titulado "Generation and Bioassessment poly-3-hydroxybutyrate (PHB) -melanin biomatrices with potential application to dermal implant" en el 13° Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia.

Cuernavaca, Morelos a 21 de noviembre del 2019.



Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director de la Facultad de Farmacia

10.3 14° Encuentro de Estudiantes de posgrado de la Facultad de Farmacia




XIV ENCUENTRO DE ESTUDIANTES DE POSGRADO EN FARMACIA

La Facultad de Farmacia a través de la Secretaría de Investigación, la Jefatura de Posgrado y el Consejo Estudiantil de Posgrado

Otorga la presente


CONSTANCIA

*A: **García-Cerna Sandra, Sánchez-Pacheco U. Abdallah, Meneses-Acosta Angélica y Peña-Malacara Carlos F.***

Por la PRESENTACIÓN DEL TRABAJO LIBRE titulado
“GENERACIÓN DE ANDAMIOS DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (PBH) CON POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR”
 en el 14vo. Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia
 Celebrado de forma virtual el 27 de noviembre del 2020, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernández Baltazar
 Director
 Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
 Jefe de Posgrado
 Coordinador Comité Organizador



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.


El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha:2020-12-04 18:47:33 | Firmante
 f8hA6T8oCuaA4hpgBueJwehC6E2R2u1m38Bq30WkA43D1yHba2E6C8jPMWwBGMdHRWdZLAn2b6CE6eWUgkzK1CjQr2vCP0D6a24d3Dp+1o6LQOnwNwWwCa6bG3L8kYCWzwh3CVJL5rcm1WZU11wRP24NndqhmPNISsE9vO6L02G889V1ncARF4M
 N6z0z6m0Kp46K46gretKf0U65t7DwKqW6o5A9y0U6e48M4GZ7he1S0z269vY0qM0m0vz2E4EEX1y6m2PM-H8QVQUsh06u4e+


SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2020-12-04 17:38:46 | Firmante
 Lp4umF87Lz3D0OxkAugsUfeyoAdokDaApB6H8R0Z+H0B8hoW+48K6fmmwe+P7T0xal2lcoC6kFpa5HhAg4UjSpAJSW11mnaK60Cz7M59PM/BF3C2hA3ro06E079U0AvnDD6z4v7UgW60TEHk0kL901uDN7yku0c3i0PRk6SjzzWjD4nARu6Bz88RjW5g3PvId
 qyAD03uwhU9Wfor20h26z6a065vH5C2QvNLD8AG0TEp06R0FyJ0e69D0LkRuzDqTUNg+T4Q3H1m1e7yW7hRVAJFDXv+Dq8Y02+

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



WVR220

<http://efma.uaem.mx/nc/Repudic/1VQ7OZdH0ens62fVd8H6JREgk/>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
 2017-2023



XIV ENCUENTRO DE ESTUDIANTES DE POSGRADO EN FARMACIA



La Facultad de Farmacia a través de la Secretaría de Investigación, la Jefatura de Posgrado y el Consejo Estudiantil de Posgrado

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A: *García-Cerna Sandra*

Por obtener el **PRIMER LUGAR** en la evaluación de TRABAJOS LIBRES, en el área de **BIOCIENCIAS FARMACÉUTICAS** para el grado de MAESTRÍA, con el trabajo titulado

“GENERACIÓN DE ANDAMIOS DE POLI-3HIDROXIBUTIRATO (PBH) CON POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR”

en el 14vo. Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia

Celebrado de forma virtual el 27 de noviembre del 2020, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Coordinador Comité Organizador



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha: 2020-12-01 19:22:13 | Firmante
Lj5z0b9ymZxITDFChpjmSg43z50ALU54jm+PwL4qul9c2ou7P1Y6Lh+h1j7c0y9hT78k44k3Dull5UvJZz+YGMWV8V4E8R52Zzr+6mZaRLWzZiYUhpFm1NA1Y3neU4V8X0VZr+V779P3MhH59QZz3Tbs226cJh9g2m1oK1MGMF033BxkdJ0e0z0DhJep8Fys0oP4Ej9W8P9p9yX9E8og7Zz989w0z9eR150cR9k8Y5rL8vUykeCTUkV7KZu02q9z2MO+Ov9jMkxq9NJuQ00WVEwysqumWp9q9FNuHrRy9cE=

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha: 2020-12-01 21:02:47 | Firmante
b0n30g7XmXRN05pofZ2evQz50m8J4U78APz94YEDRaM2o570s0Lkn8T3E0cRT80cDNYKukNkz2Z0bve03PFRi0axRcYUk10HYRY70r1YgpR87+2VDIT0bk8502Wb8WwCz2u30jbt8vP3qDQ88x7GYMEV8orUg2H+HkInNcE5q+SIV9jNPO+7xldYQ+ubOMUfhyZofe2zRE5UJETL0PAUJST2z0qCvZnuAv6Mj3ac0D2p0cNRkmY21C89ZaLUJ7WIEZMwbnZKlerRPNV0DUYz2ON0pmD2h8BqntaM/AuQgR1ym8GhtuA=

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



C4Gmxb

<https://efirma.uaem.mx/NoReputado?jru40qebEGEisfM6t7ng5RBmXMkv>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

10.4 Primer congreso virtual de Ciencias Farmacéuticas

ASOCIACIÓN FARMACÉUTICA MEXICANA
OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA



A: Sandra García Cerna, Uriel Abdallah Sánchez Pacheco; Angélica Meneses Acosta; Carlos Felipe Peña Malacara

Por la presentación del Trabajo Libre:
Generación y bioevaluación de andamios de P3HB con potencial aplicación en ingeniería tisular

En el PRIMER CONGRESO VIRTUAL, LIII NACIONAL Y VIII INTERNACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
“Profesionales farmacéuticos unidos a distancia”

Celebrado del 9 al 11 de noviembre de 2020.


Dra Elizabeth Sánchez González
Presidenta


**PRIMER CONGRESO VIRTUAL
LIII NACIONAL Y VIII INTERNACIONAL DE
CIENCIAS FARMACÉUTICAS
2020**
*Profesionales farmacéuticos
unidos a distancia*


MASS Cynthia Espinosa Contreras
Directora de Ciencia y Tecnología

ASOCIACIÓN FARMACÉUTICA MEXICANA
OTORGA EL PRESENTE
RECONOCIMIENTO



A: Sandra García Cerna, Uriel Abdallah Sánchez Pacheco, Angélica Meneses Acosta y Carlos Felipe Peña Malacara

Por haber obtenido el premio “SANTIAGO MAZA”, con el trabajo Libre:
Generación y bioevaluación de andamios de P3HB con potencial aplicación en ingeniería tisular

I CONGRESO VIRTUAL, LIII NACIONAL Y VIII INTERNACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
“Profesionales farmacéuticos unidos a distancia”

Celebrado del 9 al 11 de noviembre de 2020, con una duración de 30 horas.


Dra Elizabeth Sánchez González
Presidenta


**PRIMER CONGRESO VIRTUAL
LIII NACIONAL Y VIII INTERNACIONAL DE
CIENCIAS FARMACÉUTICAS
2020**
*Profesionales farmacéuticos
unidos a distancia*


MASS Cynthia Espinosa Contreras
Directora de Ciencia y Tecnología