

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**



**EVALUACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CITOCOMPATIBILIDAD DE
MATRICES BIOCOMPUESTAS DE PCL/PVP CON MEMBRANA AMNIÓTICA
DESCELULARIZADA PARA SU USO EN MEDICINA REGENERATIVA**

PRESENTADO POR:

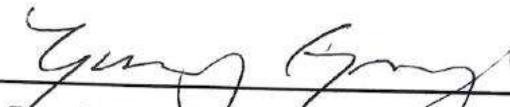
Q.F.B. JUAN DE DIOS MÉNDEZ QUEZADA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

MONTERREY, NUEVO LEÓN; AGOSTO 2025.

**EVALUACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CITOCOMPATIBILIDAD DE MATRICES
BIOCOMPUESTAS DE PCL/PVP CON MEMBRANA AMNIÓTICA
DESCELULARIZADA PARA SU USO EN MEDICINA REGENERATIVA**

Aprobación de la tesis



Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño

Directora de tesis



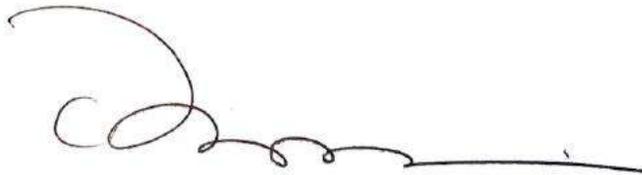
Dr. C. José Francisco Islas Cisneros

Codirector de tesis



Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Miembro de la Comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

LUGAR DE TRABAJO

Esta investigación se llevó a cabo en:

Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”, Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.

Con la colaboración de:

Departamento de Traumatología y Ortopedia, Banco de Huesos y Tejidos, Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”

Laboratorio de Nanociencias y Nanotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Físico Matemáticas. Facultad de Ciencias Físico Matemáticas

Departamento de Histología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”

Colaboradores:

- Dr. Mario Alberto Simental Mendía
Departamento de Traumatología y Ortopedia
- Dr. C. Héctor Manuel Leija Gutiérrez
Facultad de Ciencias Físico Matemáticas.
- Dra. Med. Paulina Delgado González
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.
- Dr. C. Sergio Alberto Obregón Alfaro
Facultad de Ciencias Físico Matemáticas.
- M. C. Antonio Rojas Murillo
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, especialmente a mis madres, Iliana Quezada y Conchi. Ustedes son mi mundo, mi todo. Todo lo que soy y seré es por ustedes. No hay palabras que pueda plasmar que transmitan todo lo que siento. Las amo.

A mi familia, todos y cada uno de ustedes. Sé que siempre estarán conmigo, siempre han creído en mí, y siempre lo harán. Permítanme demostrarles lo lejos que llegaré si me lo propongo.

A mí. Lo logré. No podría decir si fue más fácil o más difícil de lo que imaginaba; tal vez ambas cosas, aunque no en la forma que anticipé. El costo fue grande, pero aquí estoy. Y ahora, ¿cuál será la meta que sigue?

Por último, quiero tomarme la libertad de inmortalizar esta sección para declarar que este momento es sólo un peldaño para el futuro que construiré. Futuro del que ustedes, pero sobre todo yo nos sentiremos orgullosos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL por permitirme entrar a sus instalaciones; al personal docente del departamento por permitirme expandir mis horizontes y enseñarme a apuntar a cielos más altos; al personal administrativo del departamento, que, sin saberlo, aminoraron y alegraron mi día a día en tierras desconocidas (al menos con quienes interactué). Gracias por permitirme ser parte del equipo. Entré siendo una persona inexperta y, al término de este trayecto, a pesar de que aprendí y sé más que ayer, también comprendí que me queda mucho por aprender. Gracias por todo.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Celia Nohemí, Dra. Paulina y Dra. María del Carmen. Grandes docentes, pero, sobre todo, excelentes seres humanos. Siempre me sentí en confianza con ustedes. Cuando más nervioso y cabizbajo me sentía, sabía que podía contar con ustedes. Espero poder permanecer en contacto por muchos años más, siempre y cuando no se olviden de mí hahahahah.

Al Dr. Héctor Leija. Nuestro tiempo siempre fue limitado, pero puedo decir que siempre disfruté nuestras interacciones. Aprendí mucho de usted. Me ayudó más de lo que se puede imaginar. Espero que nuestro contacto no se pierda, y también poder contar con usted en el futuro. P.D. Por favor, mejórese y coma a sus horas.

Al Dr. Islas y al Dr. Padilla. Tal vez no pude convivir mucho con ustedes, pero siempre me dieron la confianza de poder acudir a ustedes en lo académico. Además, siento que nos hubiéramos llevado bien fuera del ámbito escolar; espero que no sólo hayan sido suposiciones mías. P.D. Sean más amables y comprensivos con Itzel, por favor. Se las encargo. La dejé sana y entera, espero encontrarla así al término de su doctorado.

A la Dra. Elsa Nancy Garza Treviño. Quisiera poder disculparme por todo lo que la hice pasar, lamentablemente esta sección se llama “agradecimientos” y no “arrepentimientos”. Aun así, quiero agradecerle por todo lo que hizo por mí. No sé si usted me volvería a aceptar como alumno, o si me hubiera aceptado sabiendo mi persona, pero yo sí la elegiría nuevamente como mi tutora. No tengo pruebas, pero tampoco dudas de que usted es la mejor doctora y asesora del departamento; la recomendaría y elegiría mil y una vez. Gracias por animarme cuando estaba deprimido, gracias por llamarme la atención cuando era necesario, gracias por su apoyo y por estar pendiente de mí (aun con muchos más alumnos y responsabilidades a su cargo). Gracias por la sinceridad y el aprecio mostrado en nuestras interacciones. Gracias por tanto y perdón por tan poco. Uno de mis más

grandes lamentos es no haber aprendido todo lo que usted sabe; tal vez en un futuro, uno nunca sabe. Espero haber dejado una buena impresión, al menos un poco. Espero podamos seguir en contacto; quién sabe, una colaboración en el futuro no suena tan mal. Gracias por todo, Dra. Aprecio demasiado todo lo que hizo por mí.

A mis amigos de maestría: Óscar, Tobi, Meli y otra Meli. A mis amigos del curso de doctorado: Antonio y Luis. A la generación pasada: Larli, Selene, Dani, Adri y Aldo. Muchas gracias por todo. Realmente hicieron divertida y llevadera esta experiencia. Espero me sigan invitando a salir, tanto fuera de mi cascarón como de mi casa. A Mich, Álvaro y David: a ustedes los conocí por relaciones secundarias, pero no cabe duda de que fue un evento que no cambiaría por nada, espero que nuestra amistad perdure. A mis kasimeritos: Brenda, Roachito, la chiapaneca y Viri. El tiempo con algunos de ustedes fue breve, pero aprendí mucho de ustedes. Espero hayan aprendido algo de mí, al menos a saber qué es lo que no se debe hacer. Espero volverlos a ver. Pero sobre todo a ustedes: Sergio, Joss, Itzel y Yare. No sé qué hubiera sido de mí sin ustedes. Generación apachurrada y sin ganas de salir, pero no los cambiaría por nada. Son los mejores amigos que yo podría haber pedido. Hay tantas cosas que agradecerles, pero confórmense con eso. Con ustedes no espero mantenerme en contacto, lo haré aunque no quieran. En realidad, a todos los mencionados aquí no los cambiaría por nada. Los amo demasiado, aunque no lo parezca. Gracias por aceptarme. Si estoy a gusto en MTY es por ustedes. No duden en llamarme si necesitan algo.

A toda mi familia, a mis madres: Iliana, Conchi y Male. A mis hermanas: Nata y Ali. A mi primo Álvaro, y cómo olvidarme de mis sobrinos: Dana, Nati, Alvarito y Mati. Mi pequeña y unida familia. Mi travesía ha sido dura sin ustedes. Los extraño y amo tanto. Aprovéchenme porque no sé cuándo nos veremos otra vez hahahaha.

A mis amigos que tengo en mi ranchito, si alguna vez leen esto, lo dudo, sepan que los tengo presentes. Espero y sepan a quienes me refiero. No los menciono tanto porque luego se pierden y no contestan, pero los tengo presentes.

Por último, a pesar de que ya no estés, a ti. Gracias por impulsarme a seguir mis sueños. Gracias por apoyarme tanto. Gracias por creer tanto en mí, por creer que llegaré lejos. Si estoy aquí, gran parte es por ti. Espero puedas ver lo que logré, no por jactarme de, sino para que sepas que no te equivocaste. Hay tantas cosas que quisiera decir, pero con esto me conformo. Muchas gracias por todo. Espero logres todo lo que te propongas, sé que lo harás, y si alguna vez nos volvemos a encontrar, espero me saludes como a un viejo y querido amigo. Siempre te llevaré en mi corazón. Adiós. PhD penguin.



TABLA DE CONTENIDO

GLOSARIO	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	37
3. JUSTIFICACIÓN.....	40
4. HIPÓTESIS.....	41
5. OBJETIVOS.....	42
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	43
8. METODOLOGÍA.....	44
Obtención de Células Madre Mesenquimales	44
Cultivo, Expansión y Mantenimiento de las BM-MSC de ratón:.....	44
Obtención de las matrices biológicas de membrana amniótica	45
Evaluación del efecto de los extractos de matriz de membrana amniótica descelularizada (dHAM) sobre las BM-MSC de ratón	46
Preparación de soluciones de extracto de dHAM:	46
Ensayo de Viabilidad Celular:	47
Fabricación de andamios.....	48
Soluciones de PCL y PVP:	48
Elaboración de los andamios de PCL y PVP	49
Elaboración de matrices biocompuestas	49
Esterilización de los andamios.....	50
Tratamiento de los andamios con óxido de etileno:.....	50
Tratamiento de los andamios con luz ultravioleta:	51
Determinación de la hidrofobicidad:.....	51
Caracterización fisicoquímica mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada (ATR FT-IR).....	51

Caracterización de las propiedades biológicas.....	52
Microscopía de Fluorescencia	52
Ensayo de Viabilidad y Muerte Celular:	52
Ensayo de Migración por Cicatrización de herida.....	53
9. RESULTADOS	54
Efecto de los extractos solubles de dHAM sobre la proliferación celular	54
Fabricación de andamios a través del método de Spin-Coating.....	55
Determinación del grado de hidrofobicidad.....	58
Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	59
Conteo celular mediante microscopía de fluorescencia.....	62
Ensayo de viabilidad celular mediante kit de Live/Dead	65
Ensayo de cicatrización de herida <i>in vitro</i>	68
9. DISCUSIÓN.....	72
10. CONCLUSIÓN.....	78
11. PERSPECTIVAS	79
12. REFERENCIAS	80

GLOSARIO

HA	Ácido Hialurónico
A2M	Alfa-2-Macroglobulina
VEGF-A	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A
FGF	Factor de Crecimiento De Fibroblastos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
AM	Membrana Amniótica
dHAM	Membrana Amniótica Humana Descelularizada
MSC	Células Madre Mesenquimales
MSC-EV	Vesículas Extracelulares Derivadas de Células Madre Mesenquimales
AT-MSC	Células Madre Mesenquimales de Tejido Adiposo
hA-MSC	Células Madre Mesenquimales Humanas Derivadas de Amnio
BM-MSC	Células Madre Mesenquimales Derivadas de Médula Ósea
CD	Clúster de Diferenciación
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
PBS	Buffer Salino Fosfatado
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
FBS	Suero Fetal Bovino
NaOH	Hidróxido de Sodio
CO ₂	Dióxido de Carbono
ATP	Adenosin Trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EthD-1	Homodímero de Etidio-1
UV	Luz ultravioleta
EtO	Óxido de Etileno
PCL	Policaprolactona
PVP	Polivinilpirrolidona
PLA	Ácido Poliláctico
PLGA	Ácido Poliláctico-Co-Glicólico
PVA	Alcohol Polivinílico
PCL-dhAM	Policaprolactona combinada con Matriz de Membrana Amniótica Descelularizada
PVP-dhAM	Polivinilpirrolidona combinada con Matriz de Membrana Amniótica Descelularizada
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
pH	Potencial de Hidrógeno
ATR-FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

μg	Microgramo
g	Gramos
μm	Micrómetro
mm	Milímetro
μL	Microlitro
mL	Mililitro
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celsius
s	Segundos
cm^2	Centímetro cúbico
cm^{-1}	Centímetro recíproco. Unidad de medida empleada para espectroscopía infrarroja
$\times g$	Fuerza G o RCF
rpm	Revoluciones por minuto
%p/v	Porcentaje Peso-Volumen o gramos de soluto por cada 100 ml de disolvente
FDA	Food Drug Administration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Representación esquemática de la estructura de la membrana fetal.....	4
Figura 2.- Estructura química del Ácido Poliláctico	16
Figura 3.- Estructura química de la Polivinilpirrolidona	17
Figura 4.- Estructura química de la Policaprolactona.....	19
Figura 5.- Estrategia Experimental.....	43
Figura 6.- Porcentaje de viabilidad celular al exponer los extractos solubles de dHAM en BM-MSc	54
Figura 7.- Formación de películas poliméricas de PCL y PVP sobre portaobjetos utilizando la técnica de Spin-Coating.	56
Figura 8.- Formación de películas poliméricas de PCL y PVP funcionalizadas con matriz de membrana amniótica sobre portaobjetos utilizando la técnica de Spin-coating.....	56
Figura 9.- Medición del ángulo de contacto en distintas superficies poliméricas.....	58
Figura 10.- Espectro ATR-FTIR de policaprolactona (PCL).	59
Figura 11.- Espectro ATR-FTIR de Polivinilpirrolidona (PVP).	60
Figura 12.- Número de BM-MSc observadas en los andamios de PCL puro y con dHAM a distintos tiempos comparadas contra control de Poly-L-Lisina.	63
Figura 13.- Número de BM-MSc observadas en los andamios de PVP puro y con dHAM a distintos tiempos comparadas contra control de Poly-L-Lisina.	64
Figura 14.- Ensayo de viabilidad en andamios de PCL a través de la prueba Live/Dead a distintos tiempos.	66
Figura 15.- Ensayo de viabilidad en andamios de PVP a través de la prueba Live/Dead a distintos tiempos.	67
Figura 16.- Gráfica de viabilidad a través de la prueba Live/Dead a distintos tiempos	68
Figura 17.- Ensayo de cicatrización en Poly-L-Lisina a 0, 6, 12 y 24 h.....	69

Figura 18.- Ensayo de cicatrización en PCL-dHAM, PVP-dHAM, PCL, y PVP
24 h..... 70

LISTA DE TABLAS

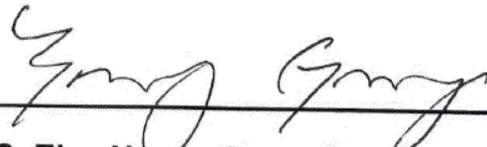
Tabla 1.- Algunos componentes bioactivos secretados por las líneas celulares amnióticas.	6
Tabla 2.- Ventajas y Desventajas de la técnica de Spin Coating	24
Tabla 3.- Técnicas empleadas para la caracterización física de andamios	28
Tabla 4.- Técnicas empleadas para la caracterización química de los andamios	29
Tabla 5.- Técnicas empleadas para la caracterización mecánica de los andamios	30
Tabla 6.- Técnicas empleadas para la caracterización biológica de los andamios	31
Tabla 7.- Concentración y parámetros empleados para la formación de andamios	57

RESUMEN

Q.F.B. Juan de Dios Méndez Quezada

Título: "Evaluación, caracterización y citocompatibilidad de matrices biocompuestas de PCL/PVP con membrana amniótica descelularizada para su uso en medicina regenerativa"

Introducción: La membrana amniótica humana (HAM) es un biomaterial rico en moléculas bioactivas con la capacidad de propiciar los procesos celulares. Sin embargo, su uso aislado presenta limitaciones mecánicas y de estabilidad. La combinación con polímeros como policaprolactona (PCL) y polivinilpirrolidona (PVP) puede optimizar sus propiedades. Al mismo tiempo, la técnica de spin coating ofrece una vía reproducible, de bajo costo y controlada para la fabricación de andamios con potencial en medicina regenerativa. **Objetivo:** Desarrollar y caracterizar matrices biocompuestas de PCL y PVP con HAM decelularizada (dHAM), evaluando sus propiedades fisicoquímicas y citocompatibilidad para su potencial uso en medicina regenerativa. **Material y métodos:** Se obtuvo dHAM a partir de placenta humana. Esta fue descelularizada, liofilizada, pulverizada y esterilizada con óxido de etileno. Para determinar la concentración de dHAM en las soluciones poliméricas, se evaluó la concentración mínima efectiva de dHAM capaz de inducir un efecto proliferativo a través de un ensayo de viabilidad medido por luminiscencia. Las soluciones de PCL (9% p/v) y PVP (12.5% p/v) se prepararon en ácido acético y etanol, respectivamente, incorporando dHAM (4 mg/mL) para generar las matrices compuestas mediante spin coating. Se caracterizaron por ángulo de contacto y espectroscopía ATR-FTIR. Se evaluó la citocompatibilidad con células madre mesenquimales de médula ósea murina (BM-MSC) mediante tinción DAPI y ensayo Live/Dead. Finalmente, se realizó un ensayo de cicatrización *in vitro*. **Resultados:** Las matrices mostraron superficies lisas, homogéneas y libres de defectos visibles. El ángulo de contacto indicó superficies hidrofílicas en todos los grupos analizados ($<90^\circ$). El ATR-FTIR confirmó la preservación estructural de los polímeros tras la incorporación de dHAM. La adición de dHAM incrementó significativamente la proliferación celular a las 24 y 48 h (PCL-dHAM +35%, PVP-dHAM +30%). En el ensayo de cicatrización, PCL-dHAM y PVP-dHAM alcanzaron cierres del 98.5% y 93.1% a las 24 h, superando a sus equivalentes sin dHAM ($p \leq 0.0001$). **Conclusión:** La incorporación de dHAM en andamios de PCL y PVP fabricados por spin coating mejora su desempeño biológico, favoreciendo la proliferación y migración celular sin comprometer la integridad química de los polímeros.


Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño

Directora de tesis

ABSTRACT

Q.F.B. Juan de Dios Méndez Quezada

Título: "Evaluation, Characterization, and Cytocompatibility of PCL/PVP Composite Matrices Incorporating Decellularized Amniotic Membrane for Regenerative Medicine Applications".

Introduction: The human amniotic membrane (HAM) is a biomaterial rich in bioactive molecules with the ability to promote cellular processes. However, its use presents mechanical and stability limitations. Combining it with polymers such as polycaprolactone (PCL) and polyvinylpyrrolidone (PVP) can optimize its properties. The *spin coating* technique offers a reproducible, low-cost, and controlled method for manufacturing scaffolds with potential applications in regenerative medicine.

Objective: This study aims to develop and characterize PCL and PVP composite matrices with decellularized HAM (dHAM), evaluating their physicochemical properties and cytocompatibility for potential use in regenerative medicine.

Materials and Methods: dHAM was obtained from human placenta, then decellularized, lyophilized, pulverized, and sterilized with ethylene oxide. To determine the dHAM concentration in the polymeric solutions, the minimum effective concentration capable of inducing a proliferative effect was evaluated through a luminescence-based viability assay. PCL (9% w/v) and PVP (12.5% w/v) solutions were prepared in acetic acid and ethanol, respectively, incorporating dHAM (4 mg/mL) to generate the composite matrices via *spin coating*. The matrices were characterized by contact angle measurement and ATR-FTIR spectroscopy. Cytocompatibility was assessed with murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSC) using DAPI staining and Live/Dead assay. Finally, an *in vitro* wound-healing assay was performed.

Results: The matrices exhibited smooth, homogeneous surfaces free of visible defects. Contact angle measurements indicated hydrophilic surfaces in all analyzed groups ($<90^\circ$). ATR-FTIR confirmed the structural preservation of the polymers after incorporating dHAM. The addition of dHAM significantly increased cell proliferation at 24 and 48 h (PCL-dHAM +35%, PVP-dHAM +30%). In the wound-healing assay, PCL-dHAM and PVP-dHAM achieved closure rates of 98.5% and 93.1% at 24 h, respectively, surpassing their equivalents without dHAM ($p \leq 0.0001$).

Conclusion: Incorporating dHAM into PCL and PVP scaffolds fabricated via *spin coating* enhances their biological performance, promoting cell proliferation and migration without compromising the chemical integrity of the polymers.


Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño

Thesis director

1. INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa es una ciencia emergente nacida de la creciente necesidad de obtener terapias que puedan recuperar la función fisiológica de tejidos u órganos dañados a través de diversos enfoques: 1) promover los mecanismos fisiológicos de reparación del organismo; 2) trasplante de órganos o tejidos, incluidos xenotrasplantes de especies genéticamente modificadas; 3) producción de organoides con estructura y función similar a órganos nativos; 4) modificación del entorno celular a través de terapia génica o celular; 5) uso e incorporación de biomateriales compatibles que promueven los mecanismos autoregenerativos; 6) encapsulación de factores o nanotecnología, etc (Altyar et al., 2023a).

La importancia de esta rama de la ciencia radica en la limitada o, incluso nula capacidad de las terapias convencionales, como la farmacología o la cirugía, para reparar o regenerar tejidos u órganos durante o después de ciertos trastornos patológicos o accidentales como el infarto al miocardio, quemaduras, extremidades amputadas, e insuficiencia orgánica (Altyar et al., 2023; Leal-Marin et al., 2021). Esta necesidad se extiende a procesos degenerativos relacionados con el envejecimiento natural como la osteoartritis primaria, la cual está asociada a factores de riesgo como edad, género, factores anatómicos, y no a trauma o enfermedades predisponentes (Sen, et al., 2023).

Basado en lo mencionado anteriormente, se infiere que la medicina regenerativa es un campo beneficiado por la participación de otras ramas de la ciencia, como la ingeniería, química, o medicina, esto con el fin de obtener un panorama completo de los procesos biológicos involucrados en la regeneración y en el desarrollo de novedosos enfoques terapéuticos, más efectivos y personalizados.

Ingeniería de tejidos

Es uno de los enfoques de la medicina regenerativa basada en el uso de células, materiales biocompatibles (andamios), factores bioquímicos (factores de crecimiento) y estímulos físicos (polímeros), así como la combinación de estos para crear estructuras similares a tejidos y/o que fomenten el crecimiento tisular (Berthiaume et al., 2011).

Haciendo hincapié en los componentes básicos de las estructuras formadas a partir de la ingeniería de tejidos, el uso de andamiajes, mejor conocidos como “scaffolds” por su traducción al inglés, es uno de los elementos más investigados en la actualidad.

Los andamios son materiales o constructos bi o tridimensionales compuestos por materiales que interactúan con sistemas biológicos y, por lo mismo, deben de ser biodegradables, biocompatibles y bioactivos. Los andamios actúan como una matriz extracelular temporal, proporcionando un ambiente óptimo y estructuralmente similar al del tejido nativo, para el crecimiento y desarrollo de células, promoviendo así la reparación tisular. Complementario a su función de soporte para las células cultivadas, pueden poseer un rol en su adhesión, crecimiento, diferenciación, proliferación, fenotipo y/o migración para el desarrollo de nuevo tejido (Echeverría., 2021; Van., 2023). Adicionalmente, con el fin de optimizar los procesos de reparación tisular, la porosidad de los andamios puede facilitar localmente la liberación controlada factores de crecimiento, nutrientes, enzimas, fármacos y otras proteínas funcionales, pudiendo incluso modificar la expresión de genes clave involucrados en la regeneración y restauración del tejido dañado (Mozafari et al., 2019).

Membrana amniótica

Por muchos años se ha evaluado el empleo de membranas amnióticas, o amnio, como biomaterial en medicina regenerativa e ingeniería de tejido, demostrando sus diversas y prometedoras propiedades, de tal manera que el primer artículo científico

escrito sobre su aplicación en ingeniería de tejidos, específicamente como sustituto de injertos de piel, data de 1910. A partir de entonces, su utilización se amplió a distintos campos clínicos, empleándose en el tratamiento de quemaduras, la elaboración de apósitos quirúrgicos y en procedimientos reconstructivos, entre otros. (Litwiniuk & Grzela, 2014).

La membrana amniótica juega un rol importante durante la gestación a través de la protección del feto contra traumas, sustancias ajenas e infecciones; en el transporte y regulación de nutrientes, agua, factores de crecimiento y citocinas necesarias, así como en la excreción de sustancias de desecho. Este material también provee de los nutrientes necesarios para el desarrollo fetal. Particularmente, destacan sus componentes celulares, como las células epiteliales amnióticas humanas y las células estromales mesenquimales amnióticas. Además, se han identificado más de 220 compuestos bioactivos, entre ellos proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento e inhibidores de proteasas, entre otros, como se muestra en la Tabla 1. Además de su papel durante la gestación, la membrana amniótica conserva sus propiedades biológicas después del parto. Gracias a estas características y a la facilidad de obtención, se considera un material abundante, accesible y de bajo costo, con alto potencial para aplicaciones en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos (Arki et al., 2023; Fenelon et al., 2023).

La membrana amniótica se encuentra en la parte más interna de la placenta fetal, rodeando al embrión y en contacto directo con el líquido amniótico. Histológicamente se compone de tres capas principales: una capa epitelial ectodérmica (epitelio amniótico) en la superficie fetal, una membrana basal gruesa inmediatamente debajo, y una capa estromal avascular compuesta de tres capas: una capa compacta, una fibroblástica y una de esponjosa o intermedia (Dadkhah Tehrani et al., 2021).

La capa epitelial consiste en una monocapa de células epiteliales amnióticas (AECs) que secretan glucoproteínas, fibras de colágeno, particularmente colágeno IV y VII las cuales contribuyen a la composición de la capa basal, además de

factores de crecimiento y citocinas (Salazar-Monsalve et al., 2024). Estas células se encuentran unidas a la capa o membrana basal, la cual se compone principalmente por colágeno tipo IV, V y VII, junto con laminina, fibronectina y otros componentes de matriz, lo que le confiere resistencia y la hace un sustrato excelente para la adhesión de células epiteliales (Dadkhah Tehrani et al., 2021; Malhotra & Jain, 2014; Tobin et al., 2025).

Por último, la capa estromal se subdivide en una capa compacta acelular y densamente poblada de fibras de colágeno, siendo responsable de la integridad mecánica y resistencia tensil del tejido; una capa fibroblástica, la cual se encuentra poblada por fibroblastos mesenquimáticos (también denominados células estromales mesenquimales amnióticas o AMSCs) junto con matriz extracelular laxa. Cabe destacar que estas dos capas son las principales responsables de la basta cantidad de colágeno dentro de la membrana amniótica. Por último, la capa esponjosa o intermedia se caracteriza por ser rica en proteoglicanos y fibras de colágeno más laxas (Salazar-Monsalve et al., 2024).

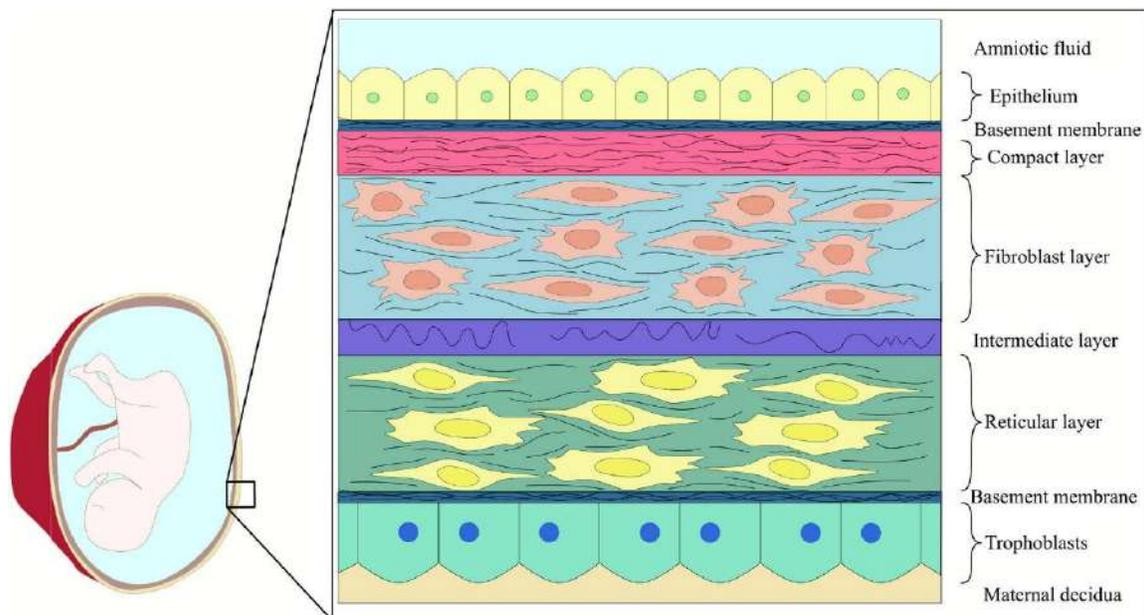


Figura 1.- Representación esquemática de la estructura de la membrana fetal

Fuente: A Review on Modifications of Amniotic Membrane for Biomedical Applications.

Dadkhah Tehrani et al., 2021.

Una característica que hace el uso de amnios una propuesta interesante para la ingeniería de tejidos son la presencia natural de factores de crecimiento y

componentes bioactivos, los cuales a su vez confieren diversas propiedades como: antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidante, citoprotectoras, regenerativas, entre otras. Algunos de los componentes bioactivos más comunes son el ácido hialurónico (HA), alfa-2-macroglobulina (A2M), fibronectina, factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Jahanafrooz et al., 2023; Wetzell., 2024).

Los componentes bioactivos de la membrana amniótica derivan principalmente de dos fuentes: la matriz extracelular (ECM) y las células que la conforman. La ECM está compuesta por proteínas estructurales y factores bioactivos, entre los que destacan colágenos (tipo I y III en la capa estromal; tipos IV, V y VII en la capa basal, la cual sustenta al tejido epitelial del tejido), así como elastina, laminina, fibronectina, nidógeno, perlecan, proteoglicanos y diversos glucosaminoglucanos (Fénelon et al., 2021).

Otro componente de gran importancia es el ácido hialurónico (HA), particularmente está presente en la matriz estromal de la membrana amniótica fetal. Más allá de su función como agente hidratante en la industria cosmética, el HA ha demostrado desempeñar un papel clave en la reparación tisular, al favorecer la migración celular y modular la respuesta inflamatoria. Se ha reportado que el HA presente en la matriz extracelular fetal puede contribuir a la supresión de la vía de señalización de TGF- β , reduciendo la expresión de sus isoformas (TGF- β 1, β 2 y β 3), así como la de su receptor tipo II (TGFBR2). Esta acción, llevada a cabo principalmente a través de la unión a receptores de membrana CD44, inhibe la fosforilación de Smad2/3, factores de transcripción involucrados en la vía de TGF- β , y por consiguiente, influyendo sobre la proliferación y diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, lo que disminuye la fibrosis y favorece la regeneración tisular (Malhotra & Jain, 2014).

Además de la ECM, las poblaciones celulares secretan componentes de la membrana basal, principalmente colágeno, así como diversos factores bioactivos. Estas células pueden liberar factores que promueven la proliferación, migración y diferenciación de células epiteliales, endoteliales y del tejido conectivo, facilitando

la reparación tisular; moléculas que ayudan a modular la respuesta inmune, reduciendo la inflamación y favoreciendo un ambiente reparativo; componentes que protegen la integridad del tejido en regeneración y previenen la degradación excesiva de la matriz extracelular; así como ciertos péptidos antimicrobianos que fungen como una barrera contra posibles infecciones (Fénelon et al., 2021; Salazar-Monsalve et al., 2024).

Tabla 1.- Algunos componentes bioactivos secretados por las líneas celulares amnióticas.

Factores regenerativos y de crecimiento	EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico)
	KGF (Factor de Crecimiento de Queratinocitos)
	HGF (Factor de Crecimiento de Hepatocitos)
	VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular)
	bFGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico)
	TGF- β (Factor de Crecimiento Transformante beta)
Moléculas moduladoras de la respuesta inmune	IL-10 (Interleucina 10)
	IL-1RA (Antagonista del receptor de interleucina-1)
	TGF- β
	Prostaglandina E2 (PGE2)
	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1/Serpina E1)
	Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV/CD26)
Factores antifibróticos y remodeladores de matriz	TIMPs 1-4 (Inhibidores tisulares de metaloproteinasas)
	Metaloproteinasas de Matriz
	PAI-1/Serpina E1
Moléculas antimicrobianas	β -defensinas
	Elafin
	Lisozima
	Lactoferrina

La membrana amniótica no solo es un material biocompatible y biodegradable, sino que también proporciona un ambiente favorable para que las células se adhieran, se establezcan, crezcan, se multipliquen y se especialicen, lo cual es fundamental para la regeneración efectiva de tejidos. Jahanafrooz et al. reportó que el amnio puede fungir como un andamio, optimizado y biológicamente enriquecido para el cultivo de células mesenquimales (Elkhenany et al., 2022; Jahanafrooz et al., 2023). Por lo tanto, gracias a su composición, la membrana amniótica es un andamiaje natural excelente ya que, gracias a su superficie y porosidad, las células pueden adherirse, organizarse, migrar y proliferar.

Algunos autores han señalado que la membrana basal de la membrana amniótica presenta una composición de colágeno favorable para la adhesión, proliferación y migración de células epiteliales, lo que la hace especialmente útil en terapias orientadas a la regeneración y cicatrización de heridas epiteliales (Malhotra & Jain, 2014). Aunado a esto, el amnio posee una baja inmunogenicidad ya que sus células no presentan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, y solo presentan débilmente las moléculas MHC de clase I (Elkhenany et al., 2022; Jahanafrooz et al., 2023).

Pese a todos los beneficios y ventajas que ofrece el uso de las matrices biológicas, especialmente la membrana amniótica, también posee ciertas limitaciones tales como: 1) variabilidad en la morfología (como el grosor de la membrana, lo que puede afectar la reproducibilidad y el rendimiento del material); 2) relativamente alta velocidad de degradación; 3) propiedades mecánicas deficientes, 4) tiempo de vida media en almacenamiento; 5) posible riesgo inmunogénico; entre otros. Cabe destacar que las propiedades de la membrana amniótica pueden modificarse por factores externos, como la capa de la que se extraiga, el método de esterilización, el estado de conservación o el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, también existe una variabilidad asociada al donante, ya que parámetros como la edad y el estado de salud materno, así como el sexo fetal, pueden influir en los niveles de componentes bioactivos presentes, aumentando o disminuyendo su concentración y, en consecuencia, sus propiedades

finales. (Fenelon et al., 2023; Gholipourmalekabadi et al., 2020; Jahanafrooz et al., 2023).

Actualmente se dispone de productos comerciales en distintas presentaciones para su uso clínico. En oftalmología, la membrana amniótica se utiliza como injerto biológico para favorecer la regeneración corneal y reducir la inflamación; en dermatología y cirugía, se emplea como apósito en el tratamiento de quemaduras y heridas crónicas; en traumatología, como recubrimiento en defectos óseos. A su vez, áreas de la ciencia básica como la terapia celular para el cultivo de células, diferenciación celular, y la ingeniería de tejidos, también han incursionado en sus posibles aplicaciones a través de la formación de andamios (Li et al., 2023).

Algunos ejemplos de productos comercialmente disponibles en el mercado que hacen uso de la membrana amniótica son: EpiEffect® (MIMEDX), el cual es un parche de placenta humana liofilizada cutáneo que ayuda a la cicatrización de heridas y úlceras venosas; AmnioGraft® (Bio Tissue), es un injerto de membrana amniótica criopreservada que favorece a la recuperación postoperatoria en procedimientos oculares; AMCL® (Wang Vision Institute), los cuales son lentes de contacto de membrana amniótica descelularizada que propicia la cicatrización de la córnea y mejora el síndrome del ojo seco (Li et al., 2023)

Como se puede apreciar, la membrana amniótica puede encontrarse en distintos estados según el procesamiento al que es sometida, esto con la intención de postergar su vida útil o biocompatibilidad. Algunos ejemplos de los procesamientos posteriores son la descelularización, liofilización, criopreservación, etc.

Descelularización de la membrana amniótica

Uno de los procesamientos más empleados en la membrana amniótica es la descelularización o la eliminación del componente celular presente con el fin de reducir la respuesta inmunitaria mientras se conservan las proteínas estructurales, aumentando su biocompatibilidad y versatilidad en el cuerpo. Así mismo, se ha observado que la descelularización provoca la exposición de las proteínas de la matriz extracelular, conservando y mejorando las propiedades innatas del amnio (Fenelon et al., 2023).

Otro de los beneficios de emplear amnios descelularizados en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos es que, además de facilitar la adhesión celular, este biomaterial mantiene proteínas de ECM y diversos factores bioactivos que favorecen la proliferación, viabilidad y la diferenciación de diversos tipos celulares. Nazari y colaboradores (2022), demostraron que el amnio descelularizado promueve la viabilidad y proliferación de células cardíacas embrionarias de rata (Nazari et al., 2022); Hadipour y colaboradores (2021) reportaron que facilitó la adhesión y diferenciación de células madre derivadas de tejido adiposo de rata (Hadipour et al., 2021); Hasmad y colaboradores (2018) evidenciaron que su uso como andamio favorece la diferenciación osteogénica en células musculoesqueléticas humanas (Hasmad et al., 2018); Liu y colaboradores (2018) observaron un aumento en la supervivencia y expansión de células madre del limbo (Liu et al., 2018); Gholipourmalekabadi y colaboradores (2018) encontraron que promovió la proliferación y mantenimiento del fenotipo en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (Gholipourmalekabadi et al., 2018); finalmente, Arasteh y colaboradores (2018) observaron un ambiente favorable para la proliferación de fibroblastos embrionarios de ratón (Arasteh et al., 2016). En conjunto, estos estudios evidencian que el amnio descelularizado no solo actúa como recubrimiento físico para la adhesión, sino que constituye un microambiente bioactivo capaz de promover procesos celulares clave en la regeneración tisular.

Liofilización como proceso de conservación

La correcta elección de la metodología de preservación de la membrana amniótica impactará en la preservación de sus propiedades biológicas y mecánicas, incluyendo, pero no limitándose a la integridad de las proteínas de la matriz extracelular, así como aumentar la disponibilidad a largo plazo, además de facilitar su transporte y, en algunos casos, su aplicación. En contraste, la utilización de métodos inadecuados de preservación puede acelerar su degradación, comprometer su estructura y funcionalidad, y aumentar el riesgo de contaminación microbiana, limitando así su aplicabilidad clínica (Gholipourmalekabadi et al., 2020; Leal-Marin et al., 2021).

La liofilización es un método de preservación basado en la congelación del amnio para luego reducir la presión ambiental y eliminar el agua por sublimación. Las ventajas de este método son la baja probabilidad de contaminación, la facilidad de almacenamiento a temperatura ambiente sin necesidad de congeladores o nitrógeno líquido y la adecuada preservación de las propiedades físicas del tejido. Así mismo, se ha corroborado la eficacia de este método en la preservación de las propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antifibroblásticas (Gholipourmalekabadi et al., 2020; Leal-Marin et al., 2021).

Biomateriales en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos

Una estrategia empleada para superar inconvenientes estructurales, mecánicos y de degradación de la membrana, es la creación de matrices híbridas o compuestas derivadas de la combinación con otros biomateriales, ya sea naturales, sintéticos, u orgánicos (Fenelon et al., 2023).

El término "Biomaterial" fue definido por primera vez en 1986 (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2019), el uso de materiales o compuestos data desde el siglo XIX, después de la invención del acero inoxidable. Durante los primeros años, la única propiedad que debían mantener era ser biológicamente inerte, siendo esta considerada la primera generación de biomateriales, y no fue hasta mediados de

1980 que se propuso la incorporación de propiedades bioactivas o reabsorbibles como criterio de inclusión, siendo esta la segunda generación. En la tercera, y actual generación, las propiedades y/o criterios para acreditar un biomaterial son variados, siendo la activación de células y genes que estimulen la curación y/o regeneración de órganos y/o tejidos parte crucial de esta generación (Yang et al., 2017). No obstante, investigaciones recientes sobre el comportamiento electrofisiológico de las células y los tejidos han generado un creciente interés en el desarrollo de biomateriales capaces de estimular a células específicas en los tejidos u órganos. Esta tendencia ha dado lugar a lo que podría considerarse la cuarta generación biomateriales, funcionalizados e inteligentes (Reyes-Blas et al., 2021).

Los biomateriales son sustancias o elementos que interactúan con sistemas biológicos con el fin de tratar, reparar o reemplazar tejidos y órganos del cuerpo, Estas interacciones ayudan a promover la adhesión y proliferación celular, mejorando las propiedades intrínsecas de la matriz, retener y liberar compuestos bioactivos, transmitir señales físicas y químicas similares al entorno natural, entre otros. Idealmente, los biomateriales necesitan ser biocompatibles, biodegradables, bioactivos, proveer soporte mecánico y estructural, ser porosos, procesables y estables, sólo por mencionar algunas características deseables (Bhaskar et al., 2021).

Tradicionalmente los biomateriales se agrupan en cuatro categorías principales según su naturaleza química: polímeros, cerámicas, metales y materiales compuestos. No obstante, algunos autores proponen ampliar esta clasificación para incluir los biomateriales derivados de origen biológico y/o nanomateriales (Prasad et al., 2017; Rahmati, Pennisi, Budd, et al., 2018; Rahmati, Pennisi, Mobasheri, et al., 2018; Vaiani et al., 2023). Cada uno de estos biomateriales posee ciertas cualidades y limitaciones, por lo que no existe un material ideal para todas las aplicaciones.

A pesar de que un biomaterial pueda ser clasificado como biocompatible, es necesario especificar que esta característica deberá ser evaluada dependiendo de la aplicación ya que un material que resulta biocompatible en un contexto

determinado puede no serlo en otro (Prasad et al., 2017). Un ejemplo se observa en la elección de biomateriales para la regeneración de tejidos óseos. Los metales ofrecen excelentes propiedades mecánicas y buena biocompatibilidad, aunque presentan el inconveniente de ser más pesados y rígidos. En contraste, las cerámicas destacan por su elevada resistencia a la compresión, pero su fragilidad las hace menos confiables frente a cargas de flexión o condiciones de fatiga. Por ello, la selección de cada biomaterial debe realizarse considerando tanto la aplicación como la función que se espera desempeñe en el tejido (Marin, 2023).

Metales

Los metales son elementos ampliamente usados en biomedicina gracias a sus altas propiedades mecánicas y durabilidad. Son utilizados principalmente en reemplazos de articulaciones, implantes dentales, fijaciones ortopédicas y stents (Prasad et al., 2017). Aunado a esto, ciertas propiedades pueden ser modificadas con el objetivo de mejorar su compatibilidad con el hospedero. Por ejemplo, algunas modificaciones se centran en modificar la superficie del metal, como su rugosidad, con el fin de promover la osteointegración del implante (Cao & Ding, 2022). Otras modificaciones incluyen la combinación con otros metales para la formación de aleaciones, como el descrito por Zhang Y (2020) quien combinó Ti con Nb para mejorar la resistencia a la tracción del titanio en aras de emplearlo en implantes ortopédicos y dentales (Y. Zhang et al., 2020); o inclusive, el uso de vesículas extracelulares, como las derivadas de células madre mesenquimales (MSC-EV), para recubrir y funcionalizar el área, promoviendo así la compatibilidad de los osteoblastos y la actividad osteoinductiva, tal y como fue reportado (Chen et al., 2021).

Los metales, además de exhibir buenas propiedades mecánicas, también son excelentes conductores térmicos y eléctricos, por lo que su uso también se ha extendido a la fabricación de válvulas cardíacas, marcapasos o stents vasculares (Chong et al., 2023; Pandey et al., 2020).

Los metales más empleados para la fabricación de productos biomédicos se agrupan principalmente en tres categorías: el titanio y sus aleaciones, el acero inoxidable y las aleaciones de cobalto-cromo (Co-Cr). Dentro de ellos, el titanio y sus aleaciones, en particular el Ti-6Al-4V, son de los más utilizados en aplicaciones médicas por su resistencia mecánica y a la corrosión. No obstante, existen otros metales y aleaciones en investigación o con uso más limitado que también poseen potencial biomédico (Chong et al., 2023; NeoNickel, n.d.). Este material es una aleación de titanio alfa-beta con aluminio y vanadio, es una de las aleaciones con mayor potencial, esto con base en sus propiedades, siendo más fuerte, ligero, y resistente a la corrosión en el cuerpo humano frente al acero inoxidable y las aleaciones de Cobalto-Cromo (Co-Cr) (Campanelli, 2021).

El uso de metales también conlleva limitaciones. Los metales empleados en la actualidad son biodegradables y biocompatibles, pero su uso excesivo o degradación prematura puede ser contraproducente para el paciente. Además, ciertas modificaciones pueden acrecentar los problemas de compatibilidad, como la adición Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Al o Pa, los cuales pueden ser causantes de reacciones alérgicas o inflamación local (Chaturvedi, 2016).

Por último, aunque los metales poseen gran resistencia a la degradación, estos no son perpetuos. En Estados Unidos, aproximadamente 1 millón de implantes de cadera se espera que fallen entre los 15 y 25 años de uso causado por la interacción de los restos del implante con las células inmunitarias del huésped, principalmente las células de la respuesta innata ocasionando una respuesta inflamatoria local (Hall et al., 2020; Hallab & Jacobs, 2017), pero también en la adaptativa, promoviendo la sensibilidad al metal relacionada con los implantes (Hallab & Jacobs, 2017).

Cerámicas

Las cerámicas biomédicas, o biocerámicas, son un biomaterial prometedor para la medicina regenerativa, especialmente para el área de odontología y ortopedia

donde el uso de metales, a pesar de poseer buenas propiedades mecánicas y de tracción, carece de estética y, por el contrario, el uso de polímeros tiende a ser inadecuado por su fragilidad. Se le denomina cerámica a todo aquel biomaterial inorgánico, natural o sintético, que no sea químicamente metal y que posea biocompatibilidad, biofuncionalidad, seguro para el huésped (sin componentes potencialmente carcinogénicos o tóxicos); además de poseer aplicaciones médicas (Cao & Ding, 2022). A su vez, las biocerámicas son fabricadas a partir de la combinación de elementos metálicos y no metálicos unidos por enlaces covalentes y/o iónicos (Cao & Ding, 2022; Jodati et al., 2020)

Las cerámicas biomédicas fueron desarrolladas en los años 1960 y 1970 con el objetivo de emplearse como sustituto o reparación de placas óseas, uso como cementos óseos, ligamentos artificiales, tendones y reemplazo de articulaciones (S Navalagunda B, 2023). Estos biomateriales, usualmente cristalinos o vitreos, se caracterizan por poseer una alta densidad, resistencia al agua, ser biocompatibles, estabilidad química, y además de propiciar un ambiente similar al de tejidos duros. (Cao & Ding, 2022).

Con base en su comportamiento dentro del cuerpo, se pueden clasificar en tres categorías: bioinertes, bioactivas y bioreabsorbibles. Las cerámicas bioinertes (alúmina, zirconia, etc.), como su nombre menciona, no reaccionan con el tejido orgánico y, por consiguiente, son estables y seguros para el organismo al inducir nula o, en algunos casos, levemente respuestas biológicas. Las cerámicas bioactivas (vidrio bioactivo, vidrio cerámico) interactúan con tejidos locales propiciando el crecimiento y reparación del tejido; y las cerámicas biodegradables, solubles o reabsorbibles, eventualmente reemplazan o son absorbidas por el tejido local (Rahmati, Pennisi, Budd, et al., 2018; Rahmati, Pennisi, Mobasheri, et al., 2018; S Navalagunda B, 2023).

Pese a las cualidades mostradas por las cerámicas biomédicas, el uso de estas generalmente se restringe a áreas específicas. Su principal limitación es la fragilidad o baja tenacidad, o, en otras palabras, propiedades mecánicas deficientes, especialmente a las fuerzas de tracción o flexión y su elasticidad o alto

módulo de Young, siendo su principal uso en estado puro como injertos óseos, recubrimientos óseos o dentales, implantes dentales, sólo por mencionar algunos (BoydBiomedical, n.d.)

Polímeros

El empleo de polímeros como biomaterial para la formación de andamios ha ido en aumento en los últimos años por a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, además de existir una amplia gama de compuestos y costos. Los polímeros naturales son aquellos que se derivan de fuentes biológicas: Plantas, animales, microorganismos; y se caracterizan por ser biocompatibles, biodegradabilidad, de baja inmunogenicidad y similitud estructural con la ECM natural. Aunado a esto, muchos son bioactivos al propiciar señales biológicas que coadyuvan procesos celulares como la adhesión, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Bhaskar et al., 2021).

A pesar de que los polímeros naturales poseen una estructura nativa equiparable a la natural y forman productos inocuos, estos pueden ser inmunogénicos, presentar ausencia de reproducibilidad entre lotes, y propiedades mecánicas relativamente bajas (Bhaskar et al., 2021). En contraste, los polímeros sintéticos ofrecen ventajas respecto a los naturales, ya que permiten modificar sus propiedades mecánicas, estructurales y de degradación mediante su formulación, procesamiento y el método de elaboración del andamio, lo que también favorece su reproducibilidad. Además, algunos generan subproductos inocuos y/o presentan baja inmunogenicidad (Bhaskar et al., 2021; Mozafari et al., 2019).

Entre los principales polímeros sintéticos empleados para la construcción de andamios se destaca el ácido poliláctico (PLA), la polivinilpirrolidona (PVP), la policaprolactona (PCL), el copolímero ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y el alcohol polivinílico (PVA). Cada uno de estos polímeros sintéticos se encuentra aprobado para su uso biomédico por la FDA (Xu et al., 2023), presentando distintas

cualidades fisicoquímicas que pueden propiciar o limitar su uso dependiendo de la aplicación clínica.

El ácido poliláctico, o PLA, es un poliéster alifático derivado del ácido láctico con gran potencial en áreas biomédicas. Este polímero es ampliamente empleado en diversas industrias, principalmente en medicina y agricultura, esto en parte al uso de recursos renovables (maíz, caña de azúcar, etc.) para su producción, por lo que es considerado un material verde y amigable con el medio ambiente (Singhvi et al., 2019). Las propiedades del PLA pueden ser modificadas en función a su estructura. El PLA se compone de ácido láctico (LA), una molécula quiral que existe en dos formas enantioméricas: L-LA y D-LA. Al polimerizar los monómeros, la naturaleza de estos impactará en la estructura final del polímero, pudiendo resultar en PLLA (ácido poli-L-láctico), PDLA (ácido poli-D-láctico), o una mezcla de los dos, PDLLA (ácido poli-D-L-láctico (S et al., 2023).

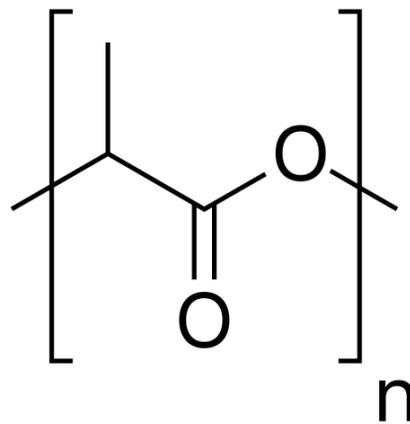


Figura 2.- Estructura química del Ácido Poliláctico

Fuente: *Polycaprolactone structure* por Polimerek (2017), *Wikipedia*. Disponible en: [https://en.wikipedia.org/wiki/Poly\(lactic_acid\)#/media/File:Poly\(lactid\)_skeletal.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Poly(lactic_acid)#/media/File:Poly(lactid)_skeletal.svg)

El uso de PLA como biomaterial presenta ciertas ventajas tales como: degradación en monómeros que son metabolizados para obtener energía, su inocuidad para el organismo, la posibilidad de modificar sus propiedades mecánicas con base a ajustes en su estructura, su resistencia a métodos de esterilización como autoclave, irradiación gamma o gas de óxido de etileno, y ser un polímero sustentable (S et al., 2023). No obstante, se ha reportado que exhibe propiedades mecánicas deficientes

al compararlas con otros polímeros, además de ser hidrofóbico, lo que en limita sus aplicaciones reales al emplearse como polímero puro. En la práctica, se ha observado que los andamios de PLA empleados como revestimientos epiteliales artificiales muestran propiedades reológicas limitadas, son frágiles y una baja viscoelasticidad en comparación con el tejido de piel natural. (Pang et al., 2010). Por ello, existen múltiples investigaciones que ahondan en su uso combinado con otros polímeros como PCL, gelatina, cerámicas a base de zinc, colágeno, etc. (Gui-Bo et al., 2010; Kobsa et al., 2013; Xie et al., 2022; Z. Zhang et al., 2021).

La polivinilpirrolidona, también conocida como polividona, povidona o PVP, es un polímero sintético hidrofílico altamente empleado en varias áreas, incluyendo la biomedicina, aprobado por la FDA gracias a sus diversas propiedades tal como: soluble en agua, no tóxico, biocompatible, biodegradable, químicamente inerte, ópticamente transparente, resistente a la temperatura, estable al pH, afín a superficies polares y no polares, no iónico e incoloro (Teodorescu et al., 2019). Otra característica muy importante para su uso es su capacidad de mejorar la hidrofobicidad o humectabilidad de polímeros no polares (Irfan et al., 2019), además de mejorar la vida media en anaquel al ser crioprotector y lioprotector (Teodorescu et al., 2019).

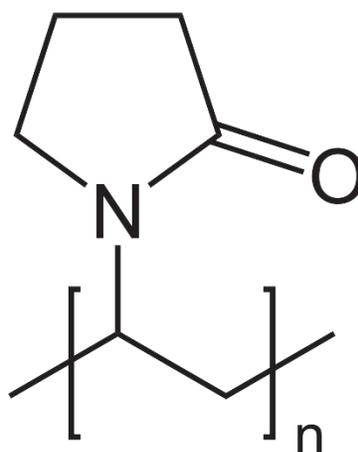


Figura 3.- Estructura química de la Polivinilpirrolidona

Fuente: *Polyvinylpyrrolidone*structure por NEUROtiker (2008), *Wikipedia*. Disponible en: <https://en.wikipedia.org/wiki/Polyvinylpyrrolidone#/media/File:Polyvinylpyrrolidon.svg>

Entre las muchas industrias que se ven beneficiadas de las aplicaciones de este polímero se encuentra la: medicina, industrias con aplicaciones ópticas, eléctricas, cosméticas, detergentes, cerámicas, fotográficas, entre otras (Teodorescu & Bercea, 2015). La industria farmacéutica también se ha beneficiado de su uso. Algunas de sus aplicaciones farmacéuticas son: expansor de plasma sanguíneo, y como componente de distintas formulaciones farmacéuticas como comprimidos, cápsulas, geles, recubrimientos, entre otros, esto con base a la capacidad de mejorar la estabilidad las propiedades mecánicas, y ajustar la tasa de liberación de principios activos al emplearse como recubrimiento (Luo et al., 2021).

Otra propiedad interesante del polímero es su versatilidad como adhesivo empleándose tanto en aplicaciones comerciales e industriales, como en la formulación adhesivos cutáneos (Teodorescu & Bercea, 2015). Pese a la basta cantidad de propiedades, el uso individual de este polímero da como resultado constructos con una fuerza mecánica deficiente, además de que debido a su naturaleza anfipática que le permite interactuar con una gran cantidad de solventes polares y no polares, su combinación con otros polímeros o biomateriales puede reducir su solubilidad y mejorar sus propiedades mecánicas (Pushp et al., 2021; Teodorescu et al., 2019).

El uso de este polímero también se ha investigado en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. La aplicación más reportada de este polímero en ingeniería de tejidos es la creación de andamios electrohilados con el fin de propiciar la cicatrización/recubrimiento epitelial de heridas. Este se ha empleado con hidrogeles de alginato, resveratrol, PVA, PCL, y nanopartículas de plata, siendo que esta última, aunado a las propiedades antimicrobianas exhibidas por el andamio, se observó tiene un efecto sobre la producción de factores relacionados a la angiogénesis, propiciando de esta forma la integración y regeneración del tejido (Kang et al., 2011; Momesso et al., 2010; Singh & Singh, 2012; Teodorescu & Bercea, 2015).

La policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático semicristalino producto de la polimerización de apertura de anillo de la ϵ -caprolactona (Labet & Thielemans,

2009). La PCL, al igual que otros poliésteres, se degradan con el tiempo, principalmente gracias a la hidrólisis de sus enlaces éster, siendo la tasa de degradación dependiente del volumen de agua, el pH, presencia u ausencia de catalizadores, estructura de la cadena polimérica, y temperatura. Las principales vías de degradación pueden ocurrir a través de la hidrólisis de enlaces éster, pudiéndose degradarse superficialmente o en masa dependiendo si el agua penetra o no el material; y la transferencia de hidrógeno β -C-H (ruptura en la cadena principal). Los principales productos de degradación de la hidrólisis son ácidos carboxílicos, alcoholes, oligómeros, ácido 6-hidroxicaproico, ésteres vinílicos, y fragmentos insaturados para la degradación por transferencia de hidrógeno (Scaffaro et al., 2019).

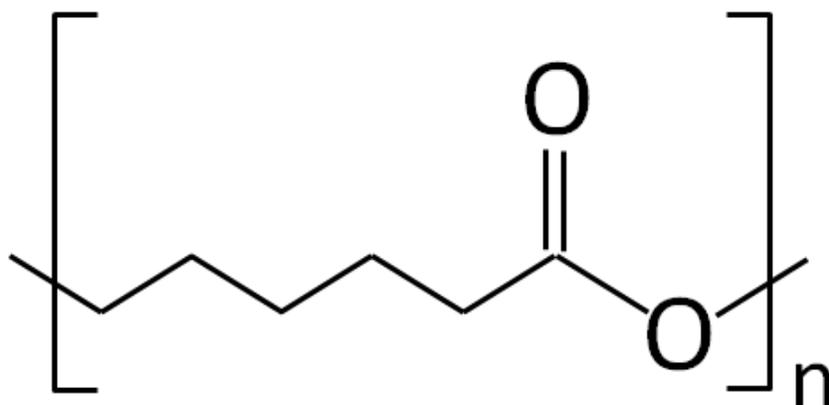


Figura 4.- Estructura química de la Policaprolactona

Fuente: *Polyvinylpyrrolidone* structure por Sbyrnes321 (2012), *Wikipedia*. Disponible en: https://en.wikipedia.org/wiki/Polycaprolactone#/media/File:Polycaprolactone_structure.png

Además de los mecanismos de degradación previamente mencionados, en sistemas biológicos se lleva a cabo la degradación enzimática. Este proceso es considerablemente más rápido en hongos y bacterias debido a la alta expresión de enzimas como lipasas, esterasa y cutinasas; y, aunque en humanos existen enzimas capaces de degradar el polímero, las enzimas se encuentran en menor cantidad y con menor eficacia que en microorganismos, por lo que la degradación es más lenta (con una duración aproximada de entre 6 meses a 4 años). Por lo mismo, la degradación *in vivo* se lleva a cabo en dos fases: la primera fase involucra

una hidrólisis química del polímero que fragmenta el polímero en oligómeros y monómeros, que serán internalizados por células del sistema inmune, principalmente macrófagos y células dendríticas, mediante procesos de endocitosis o fagocitosis (Scaffaro et al., 2019)

Es un poliéster alifático con una baja tasa de degradación, estabilidad a altas temperaturas, buenas propiedades mecánicas, y facilidad de procesamiento, lo que lo hace un excelente candidato para su uso en ingeniería de tejidos (Robles et al., 2024; Siddiqui et al., 2018). Otra característica destacable de este polímero es su clasificación como un compuesto hidrofóbico o baja humectabilidad, la cual es una propiedad importante en la fabricación de andamios gracias a su estrecha relación con el número de sitios de unión para células, pudiendo dificultar la adhesión, migración y proliferación celular; además de empeorar la interacción con líquidos biológicos, complicando la integración del andamio en el entorno biológico (Moghe et al., 2009). La hidrofobicidad también es su principal limitante en aplicaciones *in vivo*, por lo que investigaciones recientes recomiendan la introducción de modificaciones en su estructura o su combinación con componentes más hidrofílicos (Bhaskar et al., 2021; de Boer et al., 2023; Kesharwani et al., 2022; Xu et al., 2023).

Actualmente, los usos de este poliéster alifático no sólo se encuentran limitados a la fabricación de andamios, sino también se emplean en la fabricación de sistemas de entrega de fármacos, relleno óseo; en oftalmología para la fabricación de lentes; o inclusive en otras industrias como la farmacológica, cosmética, producción y recubrimiento de materiales médicos, entre otros (Malikmammadov et al., 2018).

Formación de andamios

Con el avance de la tecnología, hoy en día se dispone de múltiples técnicas empleadas para la fabricación de andamios. La elección del método de fabricación de andamios influye directamente sobre las propiedades mecánicas, biológicas y fisicoquímicas del andamio (Kumar & Jacob, 2022), lo que se traduce en la

compatibilidad que tendrá no sólo en el tejido objetivo, sino en la adhesión y supervivencia de las células. Así mismo, los biomateriales empleados, además de poder proveer de características bioactivas, también pueden delimitar el método de fabricación del andamio, esto con base a la compatibilidad térmica, química o mecánica (Adel et al., 2022; Ullah & Chen, 2020).

Se han propuesto múltiples clasificaciones para organizar las técnicas de fabricación de andamios, pero de manera simplificada podemos distinguirlas en dos categorías: las técnicas convencionales y avanzadas.

Las técnicas avanzadas en la fabricación de andamios se basan en la integración de tecnologías de impresión 3D guiadas por diseño asistido por computadora (CAD). Estas técnicas, como estereolitografía (SLA), bioplotting y sinterizado selectivo por láser (SLS), permiten fabricar andamios con arquitecturas altamente controladas que mantienen la porosidad deseada, promueven la interacción celular, mejoran la estabilidad mecánica y permiten un control preciso sobre la disposición y organización de la ECM (Kumar & Jacob, 2022).

Entre las técnicas avanzadas para la fabricación de andamios tenemos:

- **Electrospinning** es una de las técnicas avanzadas más empleadas para la producción de andamios fibrosos. Esta técnica se basa en la adición de una solución polimérica a una jeringa a la que se le impartirá una corriente eléctrica mientras se va decantando sobre un colector, formando así fibras electrohiladas elongadas y de grosor variable. Pese a estas características, una de sus principales limitaciones es el mantenimiento de una estructura homogénea entre lotes, el tiempo de fabricación, el tipo de polímero y solvente empleado para la fabricación del andamio, y la posible presencia de solventes residuales dentro del andamio (Adel et al., 2022) Do et al., 2018;
- **Sinterización Selectiva por Láser (SLS):** Técnica basada en el uso de laser para sinterizar materiales pulverizados como polímeros, cerámicas o metales. Una de sus principales ventajas es el alto grado de control que

ofrece sobre la microestructura del andamio formado, lo cual puede ajustarse mediante la modificación de parámetros como la composición porcentual de polímeros mezclados físicamente o la combinación de polvos compuestos, permitiendo así obtener propiedades específicas en función del tipo de andamio deseado (Eltom et al., 2019).

- **Bioimpresión 3D:** es una tecnología emergente con la que la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos ha incursionado para la fabricación de andamios. Esta técnica permite la fabricación de constructos tridimensionales, complejos y personalizables, mejorando así la adhesión y proliferación de las células cultivadas al proveerles estructuras equiparables a las fisiológicas. Otra de las ventajas del uso de esta técnica es la capacidad de incorporar numerosos biomateriales, desde polímeros hasta metales y cerámicas (Annath et al., 2024). No obstante, esta técnica avanzada requiere de biomateriales y equipo altamente especializado, costoso, además de capacitación para el personal, lo que dificulta el escalonamiento de la producción de los constructos (Placone et al., 2020).

Algunas técnicas convencionales empleadas en el desarrollo de andamios son:

- **Solvent Casting:** Esta técnica se basa en el uso de solventes orgánicos y volátiles para disolver el polímero, el cual se vierte en moldes junto con un agente porógeno (ej. NaCl). Tras la evaporación del solvente, se forma una matriz compuesta por partículas de sal dispersas en la red polimérica. Posteriormente, al sumergir la matriz en agua, el porógeno se disuelve, generando una estructura con alta porosidad. Una limitación importante de este método es la dificultad para controlar con precisión la forma y la interconectividad de los poros, lo cual restringe su aplicación (Aram & Mehdipour-Ataei, 2016)

- **Liofilización:** También conocido como "Freeze-Drying" por su nombre en inglés, se basa en el congelamiento, a una temperatura de entre -20 y -80°C, de una solución polimérica acuosa disuelta en un solvente para la formación de cristales de hielo. Una vez congelada la solución, esta se evaporará mediante sublimación con ayuda de un liofilizador para formar un andamio sólido con poros interconectados en su estructura interna. Ocasionalmente se realiza un segundo proceso de secado mediante desorción, esto con el fin de eliminar el agua residual (Bhushan et al., 2022a; Kumar & Jacob, 2022).
- **Hidrogel:** Andamios tridimensionales altamente hidrofílicos empleados para imitar la ECM. Este tipo de andamios usa comúnmente polímeros naturales como colágeno, gelatina, quitosano, agarosa, alginato y hialuronato, debido a su capacidad para recrear un entorno bioactivo similar al de la ECM. No obstante, sus principales desventajas son una baja resistencia mecánica, degradación no controlada y potencial inmunogénico. Por esta razón, con el objetivo de mejorar sus propiedades, se suele combinar con polímeros sintéticos como el alcohol polivinílico (PVA), el polihidroxietilmetacrilato (PHEMA) o el polietileno óxido (PEO) (Bhushan et al., 2022b).

Spin Coating

El spin coating es una técnica convencional poco empleada para la fabricación de matrices compuestas con polímeros. Este es un método altamente reproducible, simple, eficiente y de bajo costo, que permite la producción de capas o películas planas y lisas de grosor variable que va desde los nanómetros hasta los micrómetros (Moreira et al., 2021).

Aunque puede considerarse convencional por su simplicidad operativa y tecnológica, posee gran versatilidad gracias a la posibilidad de ajustar parámetros como la velocidad de giro, la viscosidad o la concentración de la solución. Esta

ventaja permite fabricar películas delgadas reproducibles y con propiedades controladas. Además, su compatibilidad con biomateriales sensibles y su fácil integración con otras metodologías avanzadas hacen que, en determinados contextos y aplicaciones, pueda clasificarse como una técnica híbrida (Moreira et al., 2021).

Tabla 2.- Ventajas y Desventajas de la técnica de Spin Coating

Ventajas	Desventajas
Compatibilidad con polímeros sintéticos y naturales	Bajo aprovechamiento del volumen de solución
Adherencia a sustratos sin la necesidad de componentes externos	Limitación en el tamaño y superficie de sustratos (sólo para superficies planas)
Alta reproducibilidad	Dificultad en el manejo de ciertas películas ultradelgadas
Técnica simple	
Bajo costo de producción	
Automatización de procesos	

El fundamento detrás de esta técnica se rige por la deposición de una solución sobre el centro de un sustrato que gira a alta velocidad, lo que dispersa el líquido por fuerza centrífuga. El espesor final depende de múltiples factores, como viscosidad, evaporación del solvente y velocidad de rotación (Moreira et al., 2021).

El proceso para la formación de andamios por este método se puede dividir en cuatro procesos básicos:

- **Fase de dispensación:** Es el dispensado del fluido, ya sea en sustrato estático o en movimiento (dinámico). La dispensación estática se realiza principalmente con fluidos altamente viscosos; por otro lado, la dispensación dinámica se realiza comúnmente a una velocidad de 500 rpm.

- **Fase de aceleración:** Es la aceleración del sustrato hasta alcanzar la velocidad deseada. Una vez alcanzada la velocidad máxima (generalmente comprendida entre 1500 y 6000 rpm), la película es lo suficientemente delgada para que las fuerzas de corte (o arrastre viscoso) se equilibren con las aceleraciones rotacionales, estabilizando así el fluido en el sustrato y promoviendo la expansión uniforme y controlada de la solución.
- **Expulsión estable del fluido:** El sustrato se encuentra girando a una velocidad constante (después de alcanzar la velocidad máxima), ocasionando que las fuerzas viscosas internas adelgacen gradualmente el fluido depositado. Este adelgazamiento es radial hacia los bordes del sustrato y, debido a los efectos de borde, se pueden acumular gotas en los márgenes, generando así irregularidades o acumulaciones (engrosamiento) en la periferia de la película.
- **Evaporación del solvente:** Fase simultánea a expulsión estable del fluido. En esta fase ocurre la evaporación del solvente, contribuyendo al adelgazamiento de la película. A medida que se evapora el solvente, aumenta la viscosidad de la solución hasta el punto donde el flujo radial es prácticamente nulo. Producto de este fenómeno, la película inicia un proceso de gelificación física, donde transita entre el estado líquido al sólido, fijando el polímero en el sustrato (Moreira et al., 2021)

El proceso para la formación de películas mediante Spin Coating se ve afectado por múltiples variables. Entre los parámetros se encuentra que: el espesor de la película, la morfología y la topografía superficial se ven afectados por la velocidad de giro, la viscosidad del fluido y la tasa de evaporación del solvente. A continuación, se enlistan algunos factores y su efecto:

- Velocidad de rotación (rpm): Mayor velocidad genera películas más delgadas. Usualmente entre 1500–6000 rpm.

- Viscosidad de la solución: Altas viscosidades resultan en películas más gruesas. En soluciones poliméricas, la viscosidad depende de la concentración de la solución y del solvente.
- Tasa de evaporación del solvente: Solventes con alta volatilidad tienden a formar películas más gruesas inicialmente, pero una evaporación más lenta mejora la uniformidad.
- Tiempo de rotación: Tiene efecto limitado en el espesor final, ya que la mayor parte del adelgazamiento ocurre en los primeros segundos del proceso.
 - Humedad relativa, temperatura y flujo de aire afectan principalmente a la evaporación del solvente. Se ha reportado que cambios mínimos en el porcentaje de humedad tienen impactos significativos sobre el grosor de la película.

El desarrollo de películas ultradelgadas mediante la técnica de spin coating no solo se ha limitado a la industria electrónica, sino también se ha observado un incremento gradual en el número reportado de aplicaciones biomédicas. Esta técnica ofrece la posibilidad de generar recubrimientos adhesivos, homogéneos, y con espesores controlados, propiedades atractivas en el generamiento de nanosheets y andamios funcionales. Un ejemplo de ello es (Hinoki et al., 2016) quien fabricó nanosheets de PLA con el objetivo de funcionar como barrera intestinal antiadherente eficaz incluso en presencia de contaminación bacteriana. Hinoki demostró que el nanosheet fabricado se adhirieron firmemente a la zona lesionada, evitaron que se formaran adherencias con otras asas intestinales y no favorecieron la proliferación bacteriana en la cavidad peritoneal, a diferencia de la barrera clínica estándar Seprafilm. Por otra parte, (Huang et al., 2017) diseñaron nanosheets

sandwich de liberación sostenida con proteína morfogenética ósea-2 (rhBMP-2) y su efecto sobre la regeneración ósea. Ellos observaron una liberación constante de la proteína durante 2 meses, la cual tuvo efectos positivos significativos a las 4 y 8 semanas, en contraste con el grupo control. Por último, (Shi et al., 2014) fabricaron nanosheets de PLGA con micropatrones, los cuales fueron adheridos a distintos andamios óseos y sobre el hueso mismo, fungiendo como un andamio. Los autores colocaron sobre bloques de Ti y cultivaron células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hASCs) sobre su superficie. Este experimento demostró que el nanosheet proporciona señales topográficas biomiméticas que estimulan la diferenciación osteogénica de células madre.

La producción de matrices por spin coating es una propuesta novedosa para la fabricación de andamios gracias a su simplicidad operativa y tecnológica, a la par que provee control sobre la morfología y la uniformidad de la superficie. Aunado a esto, el fundamento detrás de la técnica permite la incorporación de biomoléculas para la optimización de las propiedades superficiales, pudiendo mejorar así la adhesión, proliferación y diferenciación celular, aspectos cruciales para la medicina regenerativa (Moreira et al., 2021). No obstante, para poder determinar la eficacia de los andamios fabricados, es necesario evaluar sus características físicas, químicas, mecánicas y biológicas mediante técnicas de caracterización, determinando así las condiciones óptimas para obtener el rendimiento esperado según su aplicación.

Técnicas empleadas en la caracterización de andamios

Como se mencionó en el apartado previo, la caracterización de los andamios proporciona información crítica para analizar sus propiedades y determinar su potencial desempeño en aplicaciones específicas. Este proceso implica el empleo de técnicas que permiten determinar parámetros físicos, como la topografía y el espesor; propiedades mecánicas, como la resistencia y la elasticidad; características químicas, como la composición y la presencia de grupos funcionales; y aspectos biológicos, como la citocompatibilidad y la respuesta celular.

Las técnicas físicas permiten evaluar morfología, porosidad, rugosidad y humectabilidad de los andamios. Estos parámetros son determinantes para la adhesión y migración celular al simular la estructura de la matriz extracelular (Lopez Marquez et al., 2022).

Tabla 3.- Técnicas empleadas para la caracterización física de andamios

Técnica	Función/utilidad
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Se utiliza para examinar la morfología y microestructura del andamio, permitiendo así visualizar el tamaño y distribución de poros o fibras, la homogeneidad de la superficie y la integración de componentes en el andamio. Por otra parte, en ensayos <i>in vitro</i> , permite observar la adhesión y distribución de las células adheridas al andamio (Lopez Marquez et al., 2022a)
Ensayo de hinchamiento	Consiste en sumergir el andamio en un fluido (agua o medio fisiológico) durante cierto tiempo y medir la absorción del fluido a través de la variación del peso en el andamio. Un alto índice de hinchamiento, además de estar relacionado con la hidrofobicidad, influye sobre la liberación de fármacos y la integridad del andamio (Shera et al., 2018).
Ángulo de contacto	Esta prueba evalúa las propiedades de superficie o humectabilidad del andamio. Este parámetro se encuentra estrechamente relacionado con la capacidad de adherencia de las células, siendo que estas suelen adherirse mejor a superficies moderadamente hidrófilas. Un ángulo de contacto bajo ($<90^\circ$) significa superficie hidrófila, mientras que ángulos altos ($>90^\circ$) indican una superficie hidrofóbica (Huhtamäki et al., 2018).

Determinación de la porosidad y el tamaño de poro	El objetivo de este ensayo es determinar la capacidad de un andamio para permitir la infiltración celular, el transporte de nutrientes, el intercambio gaseoso y la integración tisular. La porosidad total (%) y la distribución de tamaños de poro se determinan mediante técnicas como el método de BET (Brunauer-Emmett-Teller) a través de la adsorción de gases para medir el área superficial; u otras técnicas como porosimetría de mercurio, o imágenes 3D (micro-CT) (Lopez Marquez et al., 2022b).
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	El AFM se emplea para mapear la topografía y rugosidad de la superficie del andamio a nivel nanométrico, proporcionando información 3D de la superficie. Es una técnica complementaria al SEM. La rugosidad de un andamio tiene un impacto sobre la adhesión celular ya que superficies más rugosas o con patrones pueden mejorar la adherencia de ciertas células al imitar mejor la textura del entorno natural (Lopez Marquez et al., 2022b).

La caracterización química confirma la composición molecular, la integridad de los polímeros y sus interacciones con biomoléculas. Métodos como FTIR o ensayos de degradación *in vitro* aseguran la estabilidad y seguridad del andamio (Gong et al., 2024).

Tabla 4.- Técnicas empleadas para la caracterización química de los andamios

Técnica	Función/utilidad
Espectroscopia FTIR	Técnica que hace uso de la radiación infrarroja para confirmar la presencia, interacción, degradación o transformación de los componentes dentro del andamio, esto a través de los grupos funcionales y sus enlaces. Cambios o desplazamientos en las

	bandas pueden indicar interacciones químicas o formación de nuevos enlaces (Gong et al., 2024)
Degradación <i>in vitro</i>	Método empleado para determinar la tasa de biodegradación o hidrólisis de un andamio a través de la pérdida de masa, productos liberados, o cambios en el mismo. El andamio es sumergido en condiciones simuladas (Buffer de PBS o medio con enzimas) durante periodos determinados (del-Mazo-Barbara et al., 2024).

Las pruebas mecánicas miden resistencia, elasticidad y comportamiento estructural bajo carga. Ensayos de tracción, compresión o fractura garantizan que el andamio soporte condiciones fisiológicas específicas (Saba et al., 2019).

Tabla 5.- Técnicas empleadas para la caracterización mecánica de los andamios

Técnica	Función/utilidad
Ensayos mecánicos (tracción y compresión)	Métodos empleados para medir la resistencia y rigidez del andamio. En los ensayos de tracción se obtiene la resistencia a la tracción (tensión máxima), el módulo de Young (pendiente en la región elástica) y la elongación a la rotura al estirar el andamio hasta su ruptura. Estos parámetros indican cuánta carga puede soportar el andamio y su deformabilidad (Saba et al., 2019).
	Los ensayos de compresión se basan, como su nombre sugiere, en la compresión del andamio para obtener la resistencia y módulo compresivo (Saba et al., 2019).
Tenacidad a la fractura	Análisis fractográfico que evalúa la capacidad del andamio para resistir la propagación de una grieta. Se emplea generalmente en andamios rígidos con aplicaciones de carga

	mecánica. Puede complementarse mediante SEM para analizar el modo de falla (Saba et al., 2019).
--	---

Las técnicas biológicas determinan citocompatibilidad, viabilidad, proliferación y diferenciación celular. Ensayos como Live/Dead o cicatrización in vitro evidencian la capacidad del andamio para promover procesos regenerativos (Lotfi et al., 2023; Pisani et al., 2025).

Tabla 6.- Técnicas empleadas para la caracterización biológica de los andamios

Técnica	Función/utilidad
Ensayos de viabilidad celular	Los ensayos de viabilidad celular se utilizan para evaluar si determinados componentes promueven la proliferación celular o inducen efectos citotóxicos. Existen múltiples métodos para evaluar la viabilidad celular, los cuales varían en función del método de detección: microplacas, citometría de flujo, microscopía o imagenología de alto contenido (HCI). Entre los métodos más empleados para lecturas con microplacas se encuentran: MTT, MTS, XTT, Alamar Blue, basados en la cuantificación de la actividad metabólica celular para determinar indirectamente el número de células viables (Riss et al., 2004).
	La viabilidad celular también puede evaluarse a través de microscopía al emplear tintes que ayuden a visualizar y discriminar células vivas y muertas. El azul de tripán es un tinte empleado para discriminar células vivas de las muertas. Este actúa penetrando la membrana celular dañada de las células muertas, tiñéndolas de un color azul, mientras que las células viables permanecen sin teñir. Existen otros tintes, como la Calceína AM y el homodímero de etidio-1 (Ethd-1) que se usan en conjunto para poder observar, bajo fluorescencia, la

		<p>viabilidad. EthD-1 es un fluorocromo que se une a los ácidos nucleicos, especialmente al DNA, emitiendo fluorescencia al unirse, por lo que la emisión de la señal evidencia ruptura en la membrana celular de células dañadas o muertas. Por otra parte, la calceína AM es un tinte permeable que atraviesa la membrana celular, y por la actividad metabólica de la misma, se transforma a calceína, una molécula fluorescente que exhibe la viabilidad de la célula (Gutiérrez et al., 2017; Kerschbaum et al., 2021)</p>
Adhesión y proliferación celular		<p>La adhesión celular es fundamental en el desarrollo de los andamios. Las células pueden unirse inicialmente al material través de interacciones no específicas, pero sólo a través de la adhesión mediada por receptores es que se promueve la supervivencia, señalización y diferenciación celular. Diversos autores hacen uso del SEM para observar la adhesión y morfología celular a distintos periodos de tiempo (Lotfi et al., 2023; Majidnia et al., 2022; Wang et al., 2023)</p>
Diferenciación celular		<p>Se ha demostrado que propiedades intrínsecas del andamio, como la rigidez, la topografía y la composición superficial, influyen directamente en las vías de señalización celular asociadas a la diferenciación. Por ello, es fundamental analizar la expresión génica de las células cultivadas mediante técnicas como PCR o inmunofluorescencia, con el fin de identificar marcadores fenotípicos específicos del linaje tisular deseado (Pisani et al., 2025)</p>
Ensayos de migración o cicatrización		<p>técnica in vitro que analiza la migración de células en dos dimensiones. En este ensayo, se crea una zona libre de células, o "herida" artificial en un cultivo en monocapa mediante la eliminación de células del área a través de daño mecánico, térmico o químico. La exposición a la zona libre de</p>

	células induce la migración de estas hacia el espacio intercelular. Este ensayo se realiza con el objetivo de evaluar la capacidad migratoria de las células bajo diferentes condiciones: presencia de biomateriales, moléculas bioactivas, o estímulos físicoquímicos, pudiendo simular eventos de reparación tisular (Jonkman et al., 2014).
Evaluación en modelos animales	Los estudios in vivo permiten observar la posible biocompatibilidad, integración, efecto y degradación del andamio sobre el tejido antes de probarlos en estudios clínicos. La información provista en este tipo de modelos proporciona un mayor panorama a los obtenidos en pruebas in vitro. En investigaciones que buscan replicar heridas de pie diabético o quemaduras, los modelos animales más empleados son ratas, ratones, cerdos y conejos (Mukherjee et al., 2022)

Como se aprecia en las tablas mostradas, estas técnicas pueden clasificarse en función de su objetivo: análisis físico o superficial del andamio; determinación de su composición química y posibles interacciones con otros compuestos o a lo largo del tiempo; y evaluación de sus interacciones con componentes biológicos. Antes de estudiar su desempeño en sistemas biológicos complejos, es necesario analizar su respuesta frente a componentes más simples, como las células, mediante ensayos *in vitro*. En este contexto, las células madre representan un modelo potencial para evaluar su desempeño debido a su versatilidad y potencial terapéutico.

Células Madre Mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSC) se definen como células multipotentes capaces de autorrenovarse y diferenciarse *in vitro*, bajo estímulos apropiados, hacia diversos linajes de origen, incluyendo osteoblastos, condrocitos y adipocitos, por lo

que toman un papel importante para distintas áreas de la salud, como la medicina regenerativa (Rodríguez-Fuentes et al., 2021).

Las MSC fueron descritas en 1867 por Julius Cohnheim, quien las observó en la médula ósea, pero no fue hasta 1968 que fueron aisladas por primera vez, nuevamente en un tejido de médula ósea. Desde su descubrimiento, se han identificado diversas fuentes de obtención entre las que se encuentran: endometrio, pulpa dental, músculo esquelético, placenta, tejido adiposo, cordón umbilical, o gelatina de Wharton, entre otras (Jo et al., 2021).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) establece tres criterios mínimos para la identificación de las MSCs expandidas *in vitro*. En primer lugar, las MSCs deben adherirse, crecer y proliferar en superficies plásticas de cultivo. En segundo, estas deben expresar en su membrana los antígenos de superficie CD73⁺, CD90⁺ y CD105⁺, además de carecer de los marcadores propios de células madre hematopoyéticas: CD11b⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD79α⁻ y HLA-DR⁻. El tercer criterio es que éstas deberán ser capaz de diferenciarse *in vitro* hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Viswanathan et al., 2019).

El uso de este tipo de células se basa en su capacidad autorrenovación y potencial de diferenciación; la relativa facilidad de aislamiento a partir del tejido de origen; en comparación con el uso de células madre embrionarias, su uso es menos controversial; a diferencia de las células madre pluripotentes inducidas, presentan un riesgo menor de formación de teratomas; y, gracias a su capacidad de migrar hacia tejidos dañados por mecanismos de quimioatracción, tienen diversas aplicaciones en medicina regenerativa (Jo et al., 2021). No obstante, cabe destacar que estudios recientes proponen un cambio en el paradigma, donde las MSC identificadas como pericitos o células perivasculares, no contribuyen directamente a la regeneración tisular *in vivo*, sino que su papel es paracrino, actuando como células señaladoras que modulan el microambiente tisular a través de la secreción de factores bioactivos (Guimarães-Camboa et al., 2017).

Gracias a las ventajas mencionadas, se ha hecho uso de las MSC en diversas investigaciones con el fin de emplearlas en terapias regenerativas, ya sea a través

de MSC derivadas de médula ósea, tejido adiposo o cordón umbilical, por mencionar algunos. Una de las principales aplicaciones de las células mesenquimales es en la cicatrización de heridas y regeneración epitelial. La cicatrización comprende 4 fases secuenciales: Hemostasis o coagulación, inflamación (infiltración de células mononucleares), proliferación (epitelización, fibroplasia y angiogénesis) y maduración (depósito y reorganización de colágeno, contracción de la herida y disminución de la vascularización) (Shpichka et al., 2019). Se ha observado que las MSC migran hacia el sitio de la herida, modulan la actividad proinflamatoria en la zona (evitando cronicidad), y estimulan la proliferación y diferenciación de fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, favoreciendo así la formación de nuevo tejido vascularizado y epitelial mediante mecanismos parácrinos (Jo et al., 2021).

En el ámbito de la ingeniería de tejidos, por su capacidad de diferenciarse y secretar factores que estimulan la regeneración, se utilizan en andamios que coadyuvan en la regeneración tisular. Meamar et al. desarrolló y evaluó la eficacia de andamios de nanofibras electrohiladas de gelatina (GNS) sembrados con MSC derivadas de placenta humana (hPDMSCs), con o sin la adición de plasma rico en plaquetas para la cicatrización de úlceras de pie diabético (DFU). Ellos observaron que el andamio aceleró la cicatrización y mejoró parámetros clínicos en pacientes con DFU (Meamar et al., 2021). Por otra parte, Mohammadi et al. observó el papel en conjunto de MSC derivadas de la gelatina de Wharton (WJSCs) sembradas sobre membrana amniótica acelular, fungiendo como un andamio biológico, en úlceras cutáneas crónicas; demostró que las células comenzaron a diferenciarse a una línea osteogénica a partir de las 3 semanas. Además, se observó una mayor viabilidad en las células cultivadas en el andamio de membrana amniótica descelularizada. Los autores concluyeron que el andamio aceleró significativamente la cicatrización en las heridas cutáneas (Hashemi et al., 2019).

Las células MSC son un recurso importante para la medicina regenerativa por su capacidad de diferenciación, su acción paracrina y su migración dirigida hacia sitios de lesión. La membrana amniótica, por su parte, aporta una ECM rica en colágeno,

factores de crecimiento y componentes bioactivos que favorecen la adhesión, proliferación y diferenciación celular, promoviendo aún más la capacidad de cicatrización. En este trabajo se propuso evaluar un andamio generado con polímeros sintéticos con membrana amniótica, esto con el fin de potenciar sus propiedades bioactivas, proporcionando una estructura tridimensional que actúe como soporte físico para las células y la matriz, compensando las limitaciones mecánicas de los componentes individuales.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

En 2024, Rojas-Murillo et al. evaluaron el efecto individual y combinado de matrices de cartílago articular (dACM) y membrana amniótica (dAMM) descelularizadas, liofilizadas y pulverizadas sobre el fenotipo condrogénico de condrocitos humanos. Las matrices se caracterizaron histológica e inmunohistoquímicamente, confirmando la descelularización y conservación del colágeno tipo IV en el dAMM y tipo II en el dACM. Los extractos solubles de las matrices fueron probados *in vitro* en diferentes concentraciones, encontrándose que dAMM a 6 mg/mL incrementó significativamente la proliferación y la expresión de genes condrogénicos.

Kanaujiya et al. (2024) diseñaron un andamio electrohilado de PVP y PVA enriquecido con colágeno y cargado con resveratrol (RSV) y ampicilina (AMP), esto con el objetivo de mejorar la reparación de heridas por quemaduras. La combinación mostró un incremento en la hidrofiliidad, atribuyéndoselo principalmente al colágeno dentro de la matriz; así como la liberación controlada de los fármacos. A su vez, se demostró la citocompatibilidad y actividad antimicrobiana. En un modelo *in vivo* de quemaduras en ratas, los andamios promovieron una cicatrización más rápida, con regeneración epidérmica y formación de colágeno más organizada respecto a los controles.

En 2023, Lotfi et al. desarrolló andamios nanofibrosos electrohilados compuestos por poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y membrana amniótica (AM) para aplicaciones en cicatrización de heridas. Se fabricaron andamios con distintas proporciones PCL:AM y se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido, FTIR y ensayos mecánicos, observando que la adición de AM mejoró la hidrofiliidad y la resistencia mecánica. Estudios *in vitro* con células madre derivadas de tejido adiposo humano demostraron que el andamio con proporción 90:10 PCL:AM promovió mayor proliferación y expresión de marcadores queratinocíticos. Se concluyó que la incorporación controlada de AM a PCL puede optimizar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los andamios para favorecer la regeneración cutánea.

Majidnia et al. (2022), diseñaron andamios electrohilados compuestos por policaprolactona (PCL) y colágeno, incorporando polvo de membrana amniótica humana (HAMP) liofilizada y pulverizada, con el objetivo de mejorar las propiedades biológicas de sustratos para el cultivo de células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE). Se prepararon soluciones de PCL/collágeno con diferentes concentraciones (0–7.2% p/p) para formar los andamios. Los ensayos de FTIR, SEM, ensayos de ángulo de contacto mostraron que la adición de HAMP aumentó el diámetro de fibra, mejoró la hidrofiliidad y aceleró la degradación del andamio. Los ensayos biológicos *in vitro* con células RPE demostraron alta viabilidad celular (>90%) en todos los grupos, con una proliferación significativamente mayor en las matrices con 7,2% HAMP. Este artículo concluyó que a incorporación de HAMP mejora las propiedades superficiales y biológicas del andamio.

Sruthi et al. (2020) desarrollaron fibras coaxiales electrohiladas de PCL/PVP con nanopartículas de quitosano cargadas con ácido verátrico (VA). El diseño generó un núcleo de PCL rodeado por PVP incorporado con nanopartículas de VA, esto con el objetivo de lograr una liberación controlada del fármaco. A través de ensayos morfológica, propiedades de hinchamiento, degradación, biomineralización, perfil de liberación y ensayos *in vitro* con MSC murinas, se concluyó que existe biocompatibilidad y diferenciación osteoblástica en el andamio, además del éxito en la liberación prolongada del fármaco.

En 2020, Eva Vonbrunn et al. compararon la similitud entre dos tipos de andamios para el transporte y aplicación de células madre mesenquimales humanas derivadas de membrana amniótica (hA-MSc) en la cicatrización de heridas, esto a través de sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas. Los andamios evaluados fueron un andamio clínicamente utilizado de colágeno/elastina (Matriderm), un andamio de PCL/PLA, MATRIDERM + Matrigel y PCL/PLA + Matrigel. Al término de este estudio se concluyó que las concentraciones de mezcla más altas dan lugar a fibras homogéneas con diámetros mayores, por lo que las concentraciones de PCL/PLA tienen un impacto significativo en la estructura tridimensional, propiedades mecánicas y de superficie. Se encontró que, al realizar

el ensayo de humectabilidad en las matrices de PCL-PLA, estas poseen un ángulo de contacto mayor al del de MATRIDERM, denotando una hidrofobicidad relativamente mayor, lo cual podría impactar en la adhesión y proliferación celular. No obstante, en los estudios de adhesión e infiltración se observó que la matriz de PCL/PLA con matrigel contenía una capa gruesa de células distribuidas uniformemente equiparable al de MATRIDERM con matrigel, y superior a los andamios de PCL/PLA sin matrigel.

3. JUSTIFICACIÓN

La membrana amniótica es un material invaluable en medicina regenerativa por la presencia de factores de crecimiento y su capacidad de propiciar un ambiente idóneo para el crecimiento y desarrollo de células, promoviendo la reparación tisular. Pese a esto, sus características nativas, tales como sus propiedades fisicoquímicas o velocidad de degradación, limitan sus aplicaciones.

La creación de matrices biocompuestas a través de la combinación con otros biomateriales es una estrategia que pretende afrontar los inconvenientes del uso individual de la membrana amniótica. Aunado a esto, la fabricación de matrices a través del método de spin coating es una propuesta novedosa altamente reproducible, simple, eficiente y de bajo costo.

Con base a esto, se propone el desarrollo de matrices biocompuestas de membrana amniótica descelularizada con PCL y PVP a través de la técnica de spin coating con el fin de mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los componentes individuales pertenecientes a la matriz.

4. HIPÓTESIS

La incorporación de polímeros PCL y PVP a una membrana amniótica descelularizada mejorará las propiedades fisicoquímicas y biológicas nativas de la membrana.

5. OBJETIVOS

Desarrollar matrices biocompuestas de membrana amniótica humana descelularizada con la incorporación de PCL y PVP, evaluando sus propiedades físicoquímicas y biológicas a través de un cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Determinar la viabilidad y concentración mínima necesaria de membrana amniótica humana descelularizada capaz de promover proliferación en un cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón.
- 2.** Analizar la estructura e hidrofobicidad de los andamios de PCL y PVP con y sin membrana amniótica humana descelularizada fabricados por spin coating.
- 3.** Estudiar la actividad biológica de las matrices biocompuesta de PCL y PVP mediante ensayos de viabilidad, proliferación, migración.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

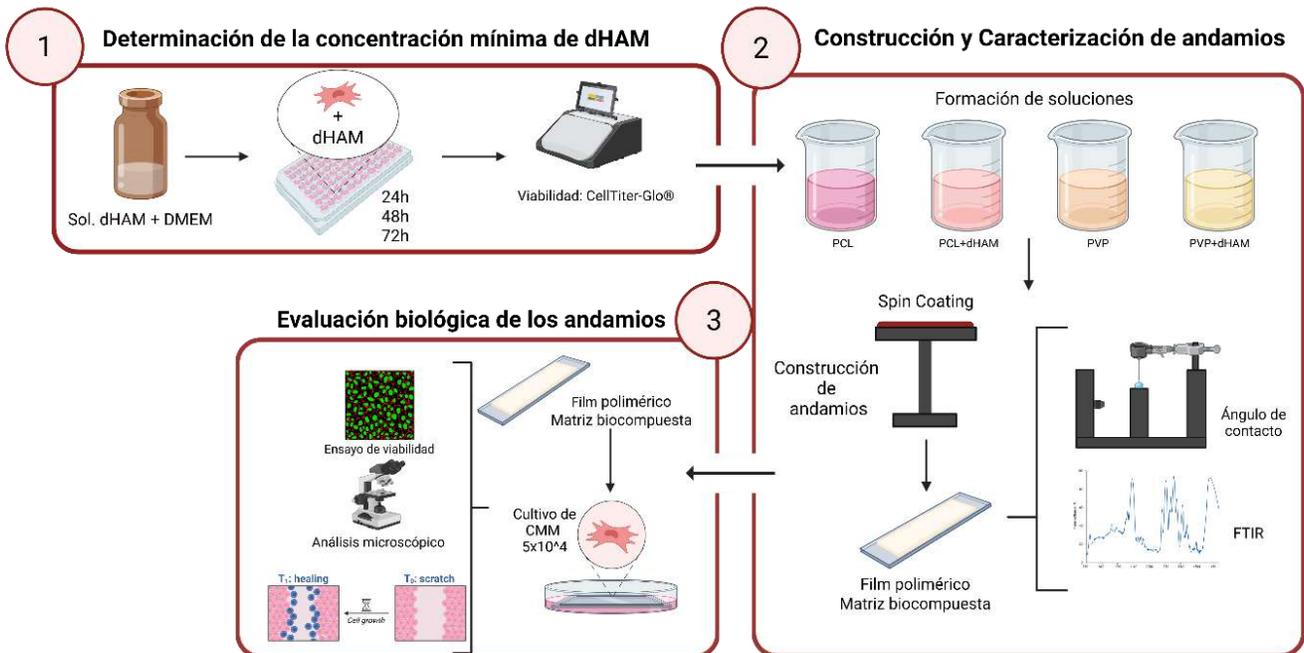


Figura 5.- Estrategia Experimental

La estrategia experimental presentada se divide en 3 objetivos:

OBJETIVO 1: Tiene la finalidad de determinar la concentración idónea para la formación de matrices biocompuestas con membrana amniótica humana mientras se mantiene un efecto positivo significativo sobre el crecimiento y proliferación celular de un cultivo primario de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón (BM-MS) a través de un ensayo de viabilidad o citocompatibilidad.

OBJETIVO 2: La finalidad del segundo objetivo fue la construcción y caracterización de los andamios o matrices biocompuestas a partir de los polímeros de Policaprolactona (PCL) o Polivinilpirrolidona (PVP), puros o en conjunto con membrana amniótica descelularizada y liofilizada.

OBJETIVO 3: Por último, tenemos la integración y evaluación del efecto de la matriz biocompuesta sobre un cultivo de BM-MS de ratón a través de ensayos de viabilidad, proliferación, migración.

8. METODOLOGÍA

Obtención de Células Madre Mesenquimales

Se empleó un stock de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea (BM-MSC) previamente aislado por el equipo de trabajo, el cual fue obtenido a partir de fémures de ratones BALB/c, criados en el Laboratorio de Experimentación Animal del Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL. Las células fueron caracterizadas mediante los marcadores de superficie CD105, CD90 y CD34, además de evaluarse su capacidad de diferenciación hacia linajes osteogénico y adipogénico, esto de acuerdo con lo publicado por Quiroz-Reyes (2020).

Cultivo, Expansión y Mantenimiento de las BM-MSC de ratón:

Las BM-MSC fueron cultivadas en frascos de poliestireno con superficie tratada (25 cm², Corning®), empleando 5 mL de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM GlutaMAX, Gibco™), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco™). Para minimizar el riesgo de contaminación, se adicionaron 2.5 µg/mL de anfotericina B y 100 µg/mL de gentamicina (Gibco™).

Una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia, se aspiró el medio de cultivo y se añadieron 1 mL de tripsina-EDTA al 0.25% (Gibco™). Las células se incubaron durante 5 minutos a 37 °C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂ para facilitar su desprendimiento. Posteriormente, se inactivó la tripsina mediante la adición de 4 mL de medio DMEM con FBS. La suspensión celular se transfirió a un tubo cónico estéril (15 mL, Corning®) y se centrifugó a 400 × g durante 10 minutos. Luego, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el sedimento celular en 1 mL de medio fresco y se ajustó la densidad celular según fuese necesario.

Para resembrar las BM-MSC, se transfirieron 500 μ L del sedimento resuspendido a un nuevo frasco de cultivo de 25 cm² con 5 mL de medio fresco, y se incubaron bajo las mismas condiciones.

Para la criopreservación, se ajustó la densidad celular a 1×10^6 células/mL mediante el ensayo de exclusión con azul de tripán al 2% (Gibco™). Las células se mezclaron con dimetilsulfóxido (DMSO, ATCC®) al 10%, utilizado como agente crioprotector, y se transfirieron a viales criogénicos estériles de 1 mL (NUNC®). Los viales fueron colocados en un contenedor con isopropanol y refrigerados a -20 °C durante 1 hora, para lograr una tasa de enfriamiento aproximada de 1 °C/minuto. Posteriormente, se trasladaron a -80 °C para su almacenamiento temporal.

Obtención de las matrices biológicas de membrana amniótica

La membrana amniótica se obtuvo a partir de placentas donadas por pacientes atendidas en el servicio de tococirugía, mediante consentimiento informado (Número de aprobación del Comité de Ética en Investigación: BI23-001). Una vez procuradas las placentas, se separó la membrana amniótica del corión y de la placenta.

La membrana amniótica fue descelularizada (dHAM) mediante métodos físicos (congelación en nitrógeno líquido) y químicos (Tween 80, NaOH 0.1 M, ácido peracético al 0.15%, etanol al 96% y al 70%). Posteriormente, las dHAM fueron liofilizadas durante 24 horas, pulverizadas mediante un triturador criogénico y esterilizadas con óxido de etileno (EtO). Finalmente, una vez que se comprobó la eliminación del componente celular y la conservación de los componentes de la ECM, el producto se almacenó a -80 °C hasta su uso, de acuerdo con el protocolo descrito por (Rojas-Murillo et al., 2024).

Evaluación del efecto de los extractos de matriz de membrana amniótica descelularizada (dHAM) sobre las BM-MSC de ratón

Preparación de soluciones de extracto de dHAM:

Se partió de un vial de la matriz de membrana amniótica previamente descelularizada y liofilizada con un rango de partículas comprendido de 0.3 y 1700 μm . Para discriminar el tamaño de las partículas, la matriz fue cribada mediante el uso de tamices seriados con tamaños de poro de 595, 250 y 179 μm . Este procedimiento permitió clasificar las partículas por tamaño, seleccionando aquellas retenidas en el tamiz de 179 μm .

Las partículas con tamaño de partícula menor a 179 μm se transfirieron a viales estériles de 5 mL con tapón de goma y tapa de rosca, y se esterilizaron por gas con óxido de etileno en el servicio de Traumatología y Ortopedia del Hospital Universitario, esto a fin de preservar la integridad de las biomoléculas termosensibles presentes en la matriz. Posterior a su esterilización, la matriz se mantuvo almacenada a -80°C hasta su uso.

En condiciones estériles, dentro de una campana de flujo laminar, se pesaron 12 y 18 mg de dHAM estéril y se colocaron en viales con un agitador magnético, junto con 3 mL de medio DMEM, para obtener soluciones a concentraciones de 4 y 6 mg/mL, respectivamente. Los viales fueron incubados a 37°C durante 24 horas bajo agitación constante.

Posteriormente, el sobrenadante fue recolectado y transferido a tubos cónicos estériles de 15 mL (Corning®), los cuales se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos para separar el extracto soluble de los residuos insolubles. Finalmente, las soluciones obtenidas se almacenaron a -80°C hasta su uso experimental.

Ensayo de Viabilidad Celular:

Para evaluar el efecto de los factores solubles presentes en la dHAM sobre la proliferación de BM-MSc de ratón, se empleó el ensayo de viabilidad CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega®, G7572). Este método cuantifica la actividad metabólica celular mediante una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP intracelular, como indicador de viabilidad celular.

Las BM-MSc fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 2×10^3 células/pozo. A cada pozo se le añadieron 100 μ L de medio DMEM suplementado con 10% FBS, 2.5 μ g/mL de anfotericina B y 100 μ g/mL de gentamicina. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂ para permitir la adhesión celular.

Tras este periodo, se retiró cuidadosamente el medio de cada pozo y se añadieron a los pozos 100 μ L de los extractos solubles de dHAM a concentraciones de 4 y 6 mg/mL como tratamientos experimentales. Las placas fueron incubadas nuevamente bajo las mismas condiciones durante 24 horas.

Una vez concluida la incubación, se añadieron 100 μ L del reactivo CellTiter-Glo® a cada pozo. Las placas se agitaron durante 2 minutos para homogenizar el contenido y se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz, esto con base a lo recomendado por el fabricante.

La señal de luminiscencia fue medida mediante un lector de placas Cytation 3 (BIOTEK®). El experimento fue realizado por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

La eficiencia del tratamiento se determinó a partir del cálculo de la viabilidad celular con la siguiente fórmula:

$$1 - \frac{\text{Luminiscencia muestra} - \text{Luminiscencia promedio del blanco}}{\text{Luminiscencia control} - \text{Luminiscencia promedio del blanco}} (100)$$

Además, se incluyeron los siguientes grupos experimentales:

- Grupo control: MSC cultivadas en medio DMEM sin FBS.
- Control de muerte celular: MSC expuestas a DMSO al 40% en medio DMEM.
- Grupo blanco: Medio DMEM sin células.

Fabricación de andamios

Soluciones de PCL y PVP:

Para preparar soluciones de PCL y PVP al 9 y 12.5% w/v, se pesaron 2.25 g y 3.125 g de los polímeros puros, respectivamente. La preparación de las soluciones poliméricas se inició con la medición de policaprolactona (PCL, Sigma-Aldrich®, 440744) y polivinilpirrolidona (PVP, Sigma-Aldrich®, 437190) utilizando una balanza analítica (Sartorius®).

Bajo condiciones controladas dentro de una campana de extracción, se midieron los solventes correspondientes, 25 mL de ácido acético glacial (99% CTR-Scientific, 9508-02) para el polímero de PCL, y etanol absoluto (>99.5%, Sigma-Aldrich®) para el polímero de PVP en una probeta. Posteriormente, se transfirió el volumen requerido de cada solvente a recipientes de vidrio con tapa hermética, cada uno con una barra magnética para agitación continua.

La adición de los polímeros se realizó de forma gradual para evitar la formación de aglomerados y favorecer la solubilización. Una vez incorporados completamente, las soluciones fueron mantenidas en

agitación continua a 300 rpm bajo temperatura ambiente toda la noche para asegurar su completa disolución.

Elaboración de los andamios de PCL y PVP

Las películas poliméricas fueron fabricadas mediante Spin Coating utilizando un equipo Spin Coater (L2001A3-Ossila®), instalado dentro de una campana de extracción para garantizar condiciones seguras y controladas, sin embargo, este procedimiento se realizó en ausencia de un ambiente estéril. Previamente, se calibró el equipo y se colocó un portaobjetos de vidrio de 25 × 75 mm (Corning®) sobre el soporte giratorio. La evaluación de cada concentración se basó en la homogeneidad, fluidez y comportamiento de la solución.

Se extrajo cuidadosamente 0.5 mL de la solución polimérica con una jeringa de 3 mL sin aguja, asegurando una transferencia suave y sin formación de burbujas. La solución se mantuvo en constante agitación hasta el momento de su aplicación para evitar la aglomeración del polímero. Posteriormente, la solución fue depositada sobre el portaobjetos, y el proceso de recubrimiento fue realizado utilizando diferentes combinaciones de velocidad y tiempo, según los resultados obtenidos.

Elaboración de matrices biocompuestas

Una vez obtenida la concentración y parámetros para la formación reproducible de andamios poliméricos (3000 rpm a 60 s para PCL y 5000 rpm a 90 s para PVP), se realizó la fabricación de matrices biocompuestas. Para este proceso, previo a la adición del polímero al solvente, se incorporó 40 mg de matriz de membrana amniótica descelularizada y liofilizada (dHAM) por cada 10 mL de solución a preparar, esto con base en las concentraciones determinadas durante los

ensayos de viabilidad celular (4 mg/mL). Una vez se dispersó el dHAM sobre la solución, se procedió a la incorporación de los polímeros correspondientes según el protocolo descrito en el apartado anterior a la (9% y 12.5% para PCL y PVP, respectivamente). La mezcla polimérica-biológica fue sometida a homogenización en agitación magnética continua durante un mínimo de 12 horas, con el propósito de garantizar una dispersión uniforme de la dHAM.

Una vez obtenida una mezcla homogénea, se procedió a la fabricación de las películas mediante Spin Coating, ajustando los parámetros del equipo (aumento de rpm y/o tiempo de giro) para contrarrestar el incremento en viscosidad ocasionado por la incorporación de la membrana.

Esterilización de los andamios

Tratamiento de los andamios con óxido de etileno:

Los andamios fabricados fueron esterilizados mediante exposición a gas de óxido de etileno (EtO). Previamente al tratamiento, se verificó que las películas estuvieran libres de suciedad o contaminantes visibles. Los andamios generados, después de 48 horas después de su fabricación, se almacenaron dentro de recipientes rígidos para asegurar la eliminación de posibles remanentes de solventes, además de garantizar su estabilidad durante el proceso de esterilización.

Posteriormente, los recipientes fueron empaquetados en bolsas permeables, diseñados para permitir la penetración eficiente del EtO. En cada envoltorio se colocó una tira indicadora química de esterilización (Color Test®, Grupo eee) y una cinta testigo, con el fin de verificar visualmente la efectividad del proceso.

La esterilización se llevó a cabo en una cámara (Steri-Vac™), donde el EtO se administró en mezcla con dióxido de carbono (CO₂) para

reducir su inflamabilidad. Este procedimiento permitió la eliminación de microorganismos viables sin comprometer la integridad estructural ni funcional de los andamios.

Tratamiento de los andamios con luz ultravioleta:

Como medida complementaria al tratamiento con EtO, los andamios fueron sometidos a irradiación con luz ultravioleta (UV) inmediatamente antes de su manipulación en condiciones estériles. Este procedimiento se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente, dentro de una cabina de bioseguridad equipada con función UV (Smith L, 2021), permitiendo una reducción adicional de la carga microbiana superficial previa a su uso en cultivos celulares.

Determinación de la hidrofobicidad:

Con el fin de evaluar los cambios físicoquímicos en la adición de dHAM a los andamios poliméricos, se realizó una caracterización inicial del factor de humectabilidad utilizando un goniómetro de ángulo de contacto (L2004A1-Ossila®). Para ello, se depositó cuidadosamente una gota de agua ultrapura (~8 µL) sobre la superficie de cada muestra, usando una microjeringa de 20 µL para cromatografía (HAMILTON®) montada en el equipo. La imagen de la gota fue capturada por la cámara integrada del goniómetro, y el análisis del ángulo de contacto se realizó con el software del equipo. Cada muestra fue evaluada al menos tres veces, y se calculó un promedio para obtener valores representativos (Girón Nava, 2019).

Caracterización fisicoquímica mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada (ATR FT-IR)

Las muestras de polímeros (PCL y PVP) y las matrices biocompuestas fueron desmontadas de los portaobjetos, pulverizadas y analizadas mediante espectroscopía FTIR (PerkinElmer-Frontier®). Se evaluó un

rango espectral de 1000 a 4000 cm^{-1} con el objetivo de detectar las bandas características de los polímeros y analizar posibles variaciones provocadas por la incorporación de membrana amniótica o por los procesos de esterilización con EtO y luz UV.

Caracterización de las propiedades biológicas

Microscopía de Fluorescencia

Se sembraron 50,000 células (5×10^4), en 300 μL de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, sobre las láminas o andamios (grupos experimentales) y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, se retiró el medio, se lavaron las muestras con PBS al 1 % y se añadieron 300 μL de una solución de metanol-acetona (4:1) durante 10 minutos a 4 °C para fijarlas. Tras un segundo lavado con PBS, las muestras se dejaron secar por 15 minutos. Luego, se aplicaron 7 μL de solución DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories©, H-2000) sobre un cubreobjetos y se incubaron en oscuridad durante 10 minutos. Los núcleos teñidos fueron observados con un microscopio de fluorescencia bajo un aumento de 10x, capturando imágenes representativas de 10 campos por muestra. Los datos fueron analizados mediante el software ImageJ, normalizándolos con controles positivos de Poly-L-lisina.

Ensayo de Viabilidad y Muerte Celular:

Se sembraron 50,000 células (5×10^4) en cada lámina y se incubaron durante 24, 48 y 72 horas, tal como fue descrito en el apartado anterior. Finalizado cada tiempo, se retiró el medio (300 μL) y se añadieron 200 μL de la solución del kit Live/Dead (Invitrogen™, L3224) (2.5 μL de Calceína AM y 2 μL de homodímero de etidio-1 por cada 5 mL de PBS) para determinar la viabilidad celular. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se observaron bajo un microscopio de

fluorescencia. Las células vivas emitieron fluorescencia verde (Calceína) y las células muertas, fluorescencia roja (EthD-1) (Hasmad et al., 2022).

Ensayo de Migración por Cicatrización de herida

Para evaluar la capacidad de migración celular, se sembraron 50,000 células sobre los andamios poliméricos PCL y PVP solos y biocompuestos con dHAM. Una vez alcanzado un 80 % de confluencia, se realizó una herida lineal utilizando una pipeta estéril de 200 μ L. Las muestras fueron incubadas durante 6, 12 y 24 horas, junto con una condición basal (0 h). Finalizados los tiempos, las células fueron fijadas con metanol-acetona (relación 1:1) y observadas bajo microscopio óptico. Se capturaron 10 campos aleatorios por muestra. La migración celular se evaluó midiendo la distancia entre los bordes de la herida con el software ImageJ, y se calculó el porcentaje de cicatrización celular (Akbay-Çetin, 2023).

9. RESULTADOS

Efecto de los extractos solubles de dHAM sobre la proliferación celular

La membrana amniótica es un biomaterial ampliamente estudiado en sistemas biológicos. Con el fin de validar y sustentar su posible uso en la fabricación de películas delgadas generadas por spin-coating, se determinó la cantidad mínima de dHAM capaz de promover la proliferación a tres distintos tiempos: 24, 48 y 72 horas, sobre una línea celular primaria de BM-MSC de ratón tratada con extractos solubles de dHAM a través de un kit comercial CellTiter-Glo (Promega®). Este método permitió cuantificar la actividad metabólica celular mediante luminiscencia como indicador de viabilidad y proliferación celular. Aunado a esto, este ensayo tuvo la finalidad de determinar la concentración de dHAM a emplear para la fabricación de los andamios biocompuestos.

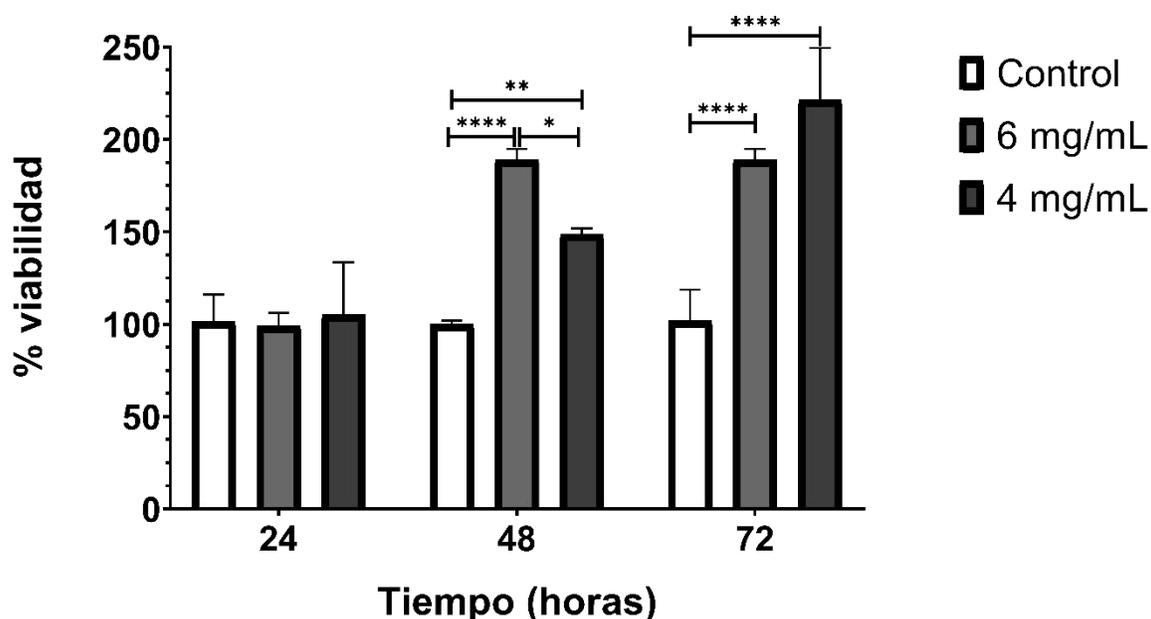


Figura 6.- Porcentaje de viabilidad celular al exponer los extractos solubles de dHAM en BM-MSC

*= ANOVA $p < 0.05$; **= ANOVA $p < 0.001$. **** = ANOVA $p < 0.0001$.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Figura 6, no se observaron efectos negativos sobre la viabilidad celular a ninguna concentración de los extractos solubles de dHAM evaluadas, demostrando así la biocompatibilidad del

tratamiento con la línea mesenquimal. Durante las primeras 24 horas no se aprecia diferencia significativa entre los grupos experimentales y el grupo control. A las 48 horas se observó un incremento estadísticamente significativo en la proliferación celular para ambos grupos experimentales comparados con el grupo control ($p \leq 0.01$ y $p \leq 0.0001$ para 4 y 6 mg/mL, respectivamente), siendo el grupo experimental de 6 mg/ml quien obtuvo los mejores resultados. Este incremento en la viabilidad se mantuvo constante a las 72 horas, donde se aprecia fuertemente el efecto positivo de los tratamientos experimentales sobre la proliferación. Por otra parte, se observó que a las 72 horas no existe diferencia significativa entre el efecto de los dos grupos experimentales (4 y 6 mg/mL), por lo que se decidió emplear la concentración de 4 mg/mL para futuros experimentos.

Fabricación de andamios a través del método de Spin-Coating

Se evaluaron distintos parámetros para la construcción de los andamios por el método de Spin-Coating en los que se varió el tiempo y la velocidad de giro. Las imágenes obtenidas de las películas poliméricas revelan que las láminas de PCL al 9% (3000 rpm/60 s) y PVP al 12.5% (5000 rpm/90 s) mostraron superficies lisas, homogéneas y libres de defectos visibles, además de una adecuada fijación al portaobjetos. Estas características contrastan con las películas obtenidas a partir de concentraciones superiores o con parámetros distintos, donde se observaron irregularidades como rugosidades, agrietamientos o desprendimientos parciales.

Si bien era esperable que las variaciones en concentración y condiciones de recubrimiento afectaran aspectos como el grosor o la opacidad de las películas, la aparición de defectos estructurales resultó inesperada y parece estar vinculada a propiedades intrínsecas de la solución, particularmente su viscosidad y la naturaleza del solvente empleado. En este sentido, la identificación de parámetros de procesamiento que generan películas reproducibles y estables constituye un resultado relevante para la estandarización de los andamios.

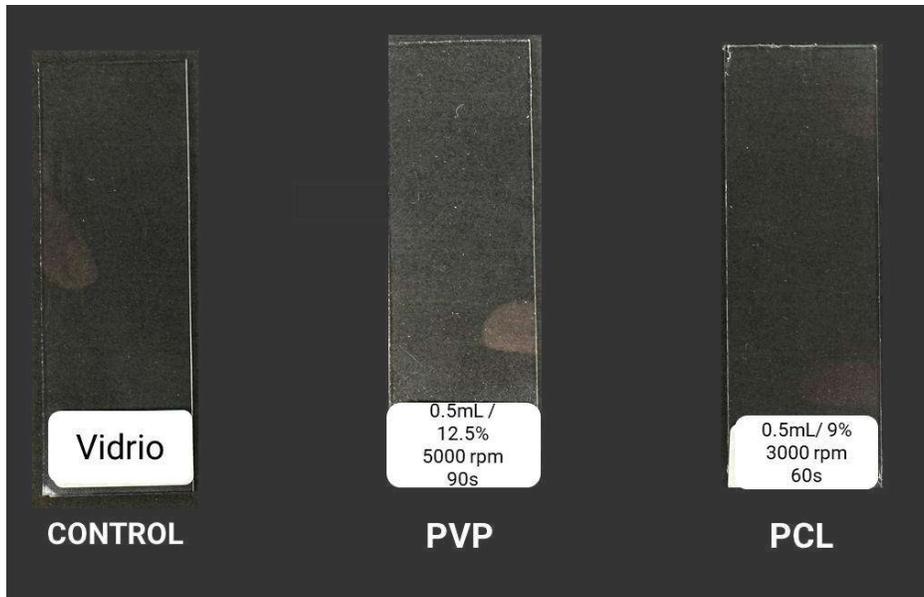


Figura 7.- Formación de películas poliméricas de PCL y PVP sobre portaobjetos utilizando la técnica de Spin-Coating.

Se observa la formación de una película translúcida, homogénea, con ausencia aparente de imperfecciones y adherida a la superficie del portaobjetos en ambos andamios poliméricos.

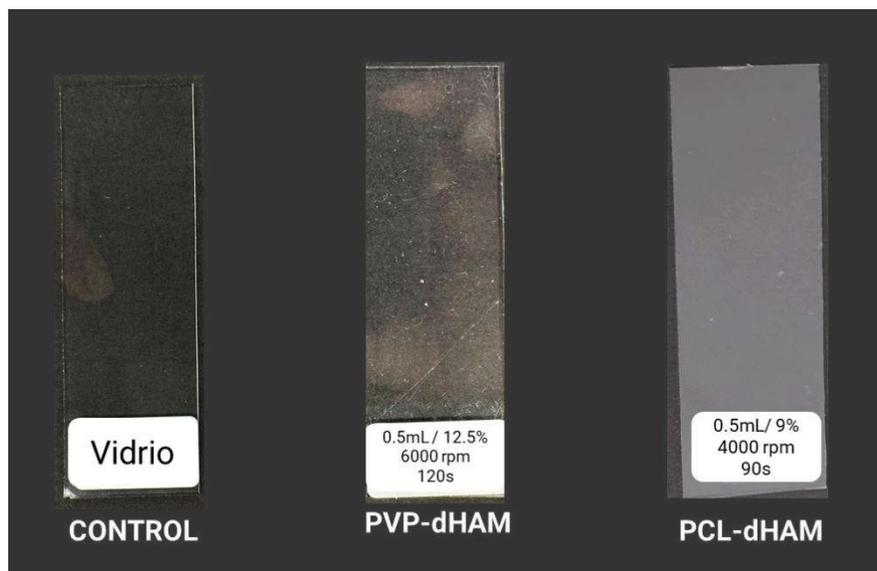


Figura 8.- Formación de películas poliméricas de PCL y PVP funcionalizadas con matriz de membrana amniótica sobre portaobjetos utilizando la técnica de Spin-coating.

Tabla 7.- Concentración y parámetros empleados para la formación de andamios

Scaffold	Concentration	Speed	Time	Volume
PCL	9%	300 × g (3000 rpm)	60 s	0.5 ml
PVP	12.5%	500 × g (5000 rpm)	60 s	0.5 ml
PCL-dHAM	9%	400 × g (4000 rpm)	90 s	0.5 ml
PVP-dHAM	12.5%	600 × g (6000 rpm)	90 s	0.5 ml

Para la fabricación de los andamios funcionalizados con dHAM, fue necesario incrementar tanto el tiempo como la velocidad de giro durante el proceso de spin-coating, con el propósito de contrarrestar el aumento en la fuerza interna de fricción del fluido, generado por la incorporación de la matriz (parámetros estandarizados para la fabricación de los andamios se observan en la Tabla 7). Tal como se muestra en la Figura 7 y 8, los andamios obtenidos presentan diferencias en sus características macroscópicas. En particular, se observa una mayor transparencia en los andamios biocompuestos elaborados con PVP en comparación con aquellos fabricados a base de PCL. No obstante, independientemente del tipo de polímero utilizado, los andamios exhiben una superficie homogénea y libre de defectos visibles, incluso tras la adición de dHAM.

Determinación del grado de hidrofobicidad

Uno de los parámetros más importantes a definir en la formación de superficies es la determinación del valor de hidrofobicidad, humectabilidad o ángulo de contacto. En la Figura 9 se aprecia que el ángulo de contacto más bajo corresponde al polímero de PVP, mientras que el valor más alto pertenece al andamio de PCL.

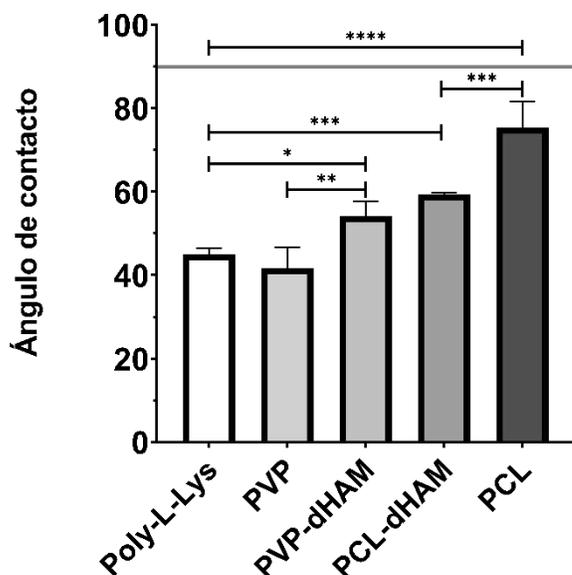


Figura 9.- Medición del ángulo de contacto en distintas superficies poliméricas. * = ANOVA $p \leq 0.05$; ** = ANOVA $p \leq 0.01$; *** = ANOVA $p \leq 0.001$; **** = ANOVA $p \leq 0.0001$.

En la gráfica comparativa del ángulo de contacto de los materiales analizados. Se incluye una línea continua a 90° como umbral de referencia para diferenciar superficies hidrofóbicas ($\geq 90^\circ$) e hidrofílicas ($< 90^\circ$).

En los andamios con dHAM los valores de humectabilidad se alteran para ambos andamios. El andamio de PCL-dHAM disminuyó la hidrofobicidad ($p \leq 0.001$) mientras que el andamio de PVP aumentó este parámetro (≤ 0.01). A su vez, no existe diferencia significativa entre los andamios biocompuestos de PCL y de PVP. Un ángulo mayor a 90° se interpreta como una superficie hidrofóbica. Por otra parte, un ángulo menor a 90° denota una naturaleza hidrofílica. En la gráfica podemos observar que ninguno de los andamios evaluados superó el límite de 90° , por lo que

todos los andamios fabricados conservan una naturaleza hidrofílica. Este parámetro no sólo indica el grado de afinidad a las moléculas de agua, sino que es un valor predictivo de la afinidad que tiene el material para la adhesión de células y los procesos celulares subsecuentes.

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Para corroborar la presencia y el mantenimiento estructural de los polímeros, o analizar las posibles variaciones provocadas por la incorporación de membrana amniótica o los procesos de esterilización, se llevó a cabo un análisis espectroscópico por transformada de Fourier.

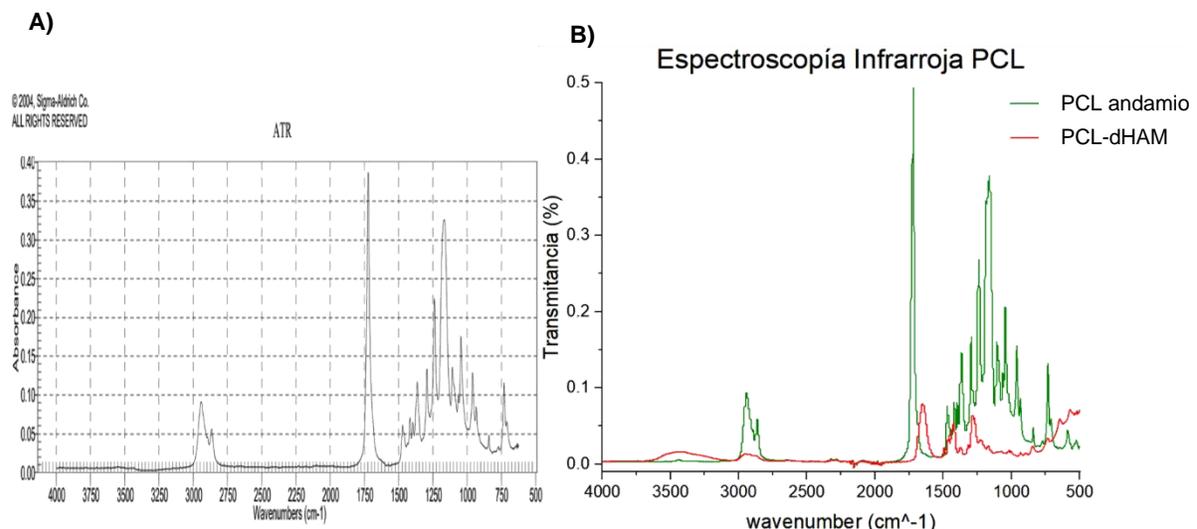


Figura 10.- Espectro ATR-FTIR de policaprolactona (PCL).

(A) Espectro FTIR de referencia (Sigma-Aldrich Co, 2004) **(B)** Espectro del polímero puro y funcionalizado con dHAM del proceso de solubilización, spin-coating y esterilización.

De acuerdo con los resultados de los espectros de ATR-FTIR de los andamios de PCL puro y en combinación con dHAM (PCL-dHAM) (Figura 10), ambos espectros presentan bandas de absorción características del PCL puro, con picos prominentes a 2940 cm^{-1} y 2860 cm^{-1} . Aunado a eso, se observa un pico agudo a 1722 cm^{-1} en

ambas muestras, atribuido a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo del éster (C=O), el cual es característico de la PCL.

No obstante, aunque el espectro del andamio de PCL-dHAM muestra las mismas bandas de absorción que la PCL pura, indicando que la estructura del polímero se conserva, existen ligeras variaciones en la intensidad de ciertos picos, en particular en la región de 1000 a 1500 cm^{-1} , sugiriendo interacciones o señales superpuestas con los componentes de la membrana amniótica.

Estos resultados confirman la presencia de ambos materiales en el andamio y respaldan la incorporación exitosa de la dHAM al andamio de PCL sin causar cambios significativos en la estructura química del mismo.

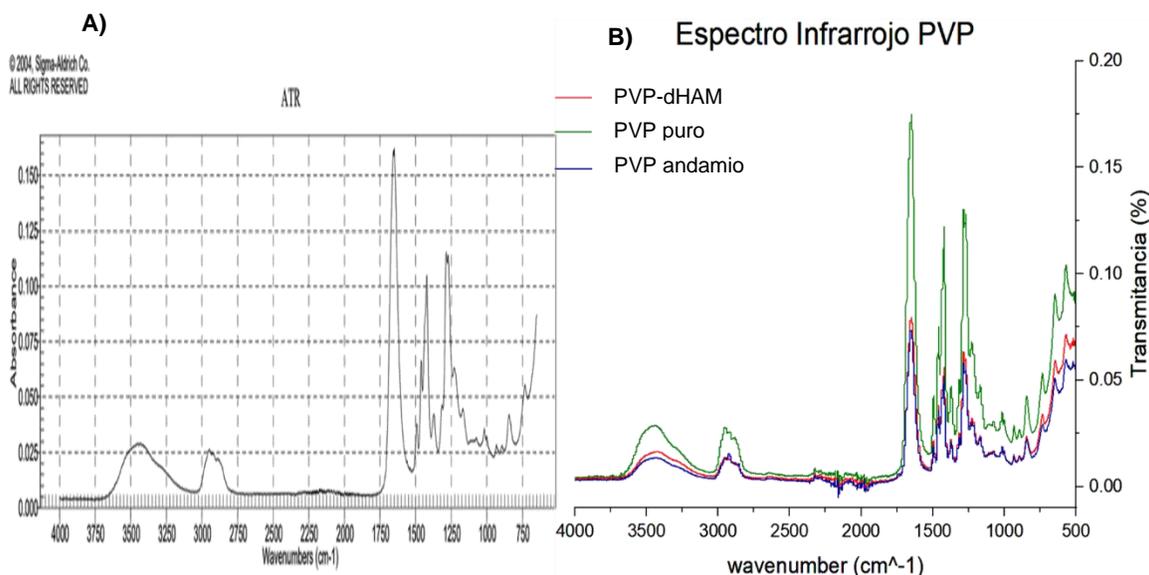


Figura 11.- Espectro ATR-FTIR de Polivinilpirrolidona (PVP).

(A) Espectro FTIR de referencia (Sigma-Aldrich Co, 2004) **(B)** Espectro del polímero puro y funcionalizado con dHAM del proceso de solubilización, spin-coating y esterilización.

Los espectros ATR-FTIR del PVP puro en el andamio y funcionalizado con dHAM, mostrados en la figura 11, demostraron bandas de absorción similares entre sí, teniendo únicamente ligeras disminuciones en la intensidad de ciertos picos, particularmente en los rangos de 1662 , 2961 y 3300 cm^{-1} . No obstante, la ausencia de nuevos picos y la similitud con el espectro de referencia provisto por la casa

comercial confirma tanto la presencia como el mantenimiento de la estructura química característica del PVP después de su solubilización, su combinación con dHAM, y la exposición a EtO y luz UV.

Conteo celular mediante microscopía de fluorescencia

En los andamios polimericos con o sin dHAM que fueron esterilizados por EtO y luz UV (3 días después de su fabricación), se sembraron BM-MSK de ratón y después de determinados intervalos de tiempo, se tiñeron con DAPI y observaron bajo microscopía de fluorescencia.

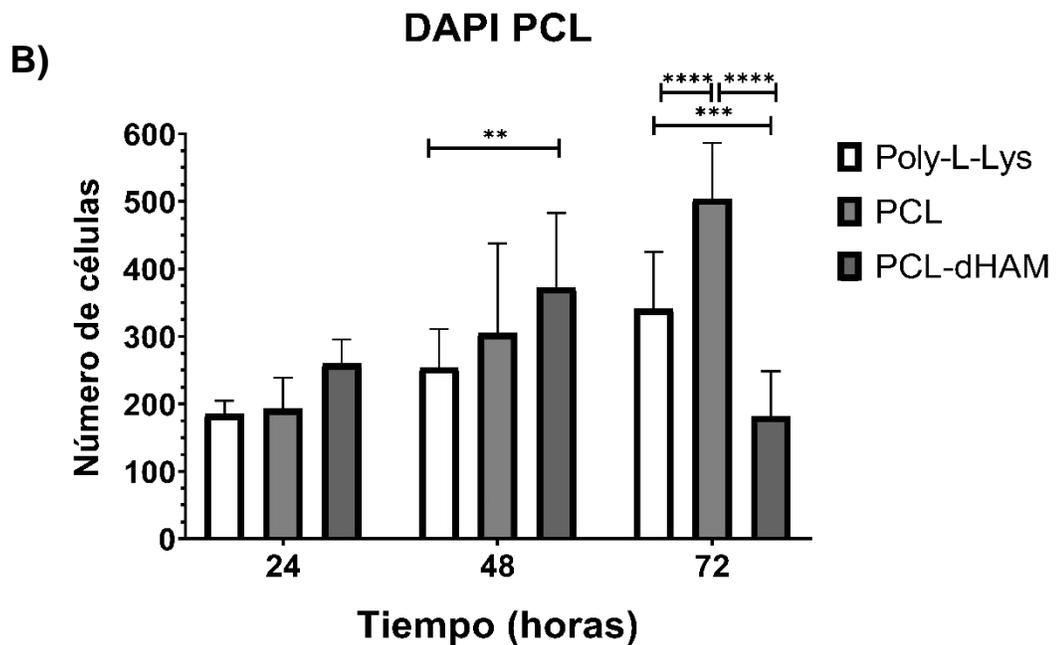
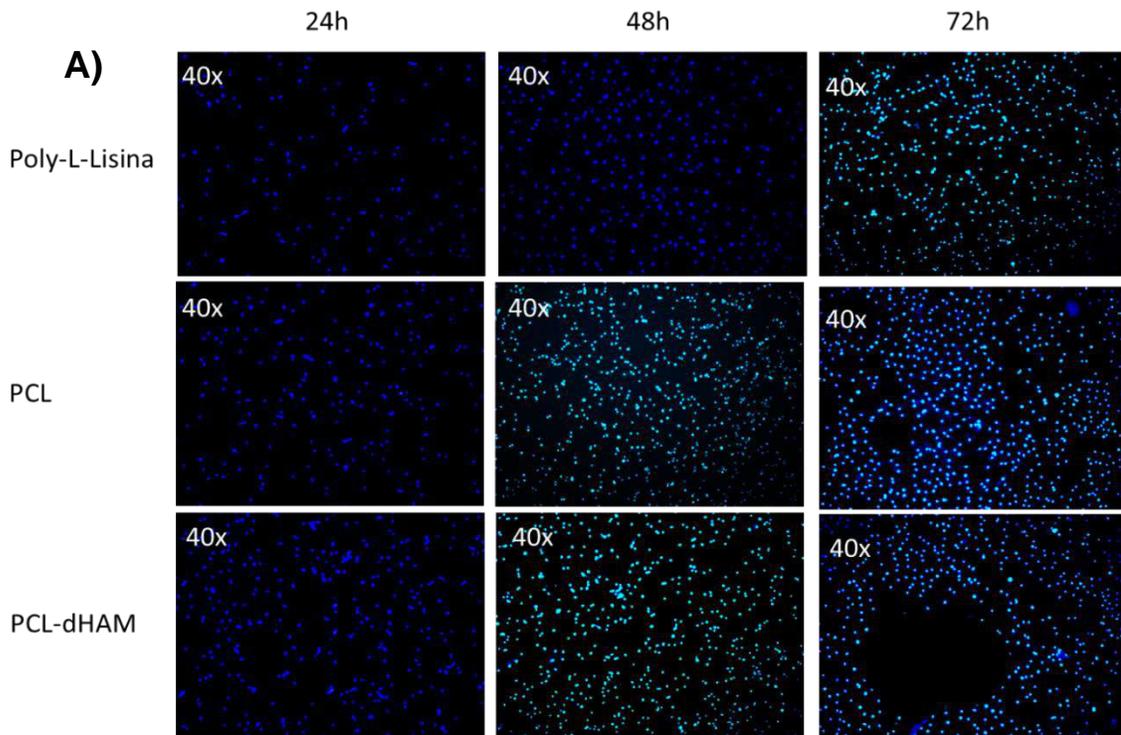


Figura 12.- Número de BM-MSC observadas en los andamios de PCL puro y con dHAM a distintos tiempos comparadas contra control de Poly-L-Lisina.

A) imágenes fluorescencia B) Análisis semicuantitativo del número de células por andamio. El conteo celular se realizó en 10 campos de visión aleatorios por condición. DAPI a 40x. **= ANOVA $p \leq 0.01$; ***= ANOVA $p \leq 0.001$. **** = ANOVA $p \leq 0.0001$.

En la Figura 12 se muestran campos representativos del número de células presentes en cada uno de los andamios evaluados, determinado por la cantidad de núcleos celulares observados (teñidos en azul) en las micrográficas. Según nuestros resultados, los núcleos presentaron una morfología típica, con forma ovoide, bordes bien definidos y una distribución uniforme de la cromatina, sin signos evidentes de apoptosis en ninguno de los distintos andamios analizados.

El andamio PCL-dHAM mostró el mayor número de células a las 24 y 48 horas, lo que sugiere una mayor capacidad de adhesión y proliferación celular en este biomaterial. Sin embargo, a las 72 horas, se observaron áreas en dicho andamio con escasa presencia de núcleos o sin células adheridas, lo que podría indicar una disminución en la viabilidad o un desprendimiento celulares localizado.

Se puede señalar en la misma figura que el análisis semicuantitativo demostró a las 24 horas un incremento inicial en el número de células viables en los andamios de PCL-dHAM comparados con el andamio de PCL puro y el control de Poly-L-Lisina ($p \leq 0.01$). Esta tasa de proliferación se ve frenada a las 48 horas, donde a pesar de que existe un aumento en el número de células observadas en el andamio de PCL-dHAM, no existe diferencia significativa con el andamio de PCL puro, pero sí existe diferencia con el grupo control. Por último, se observa que existe un cambio en el número de núcleos observados a las 72 horas, donde el número de células en el andamio de PCL-dHAM disminuyó drásticamente, siendo significativamente inferior al observado tanto en los andamios de PCL puro ($p \leq 0.0001$) como al control ($p \leq 0.001$).

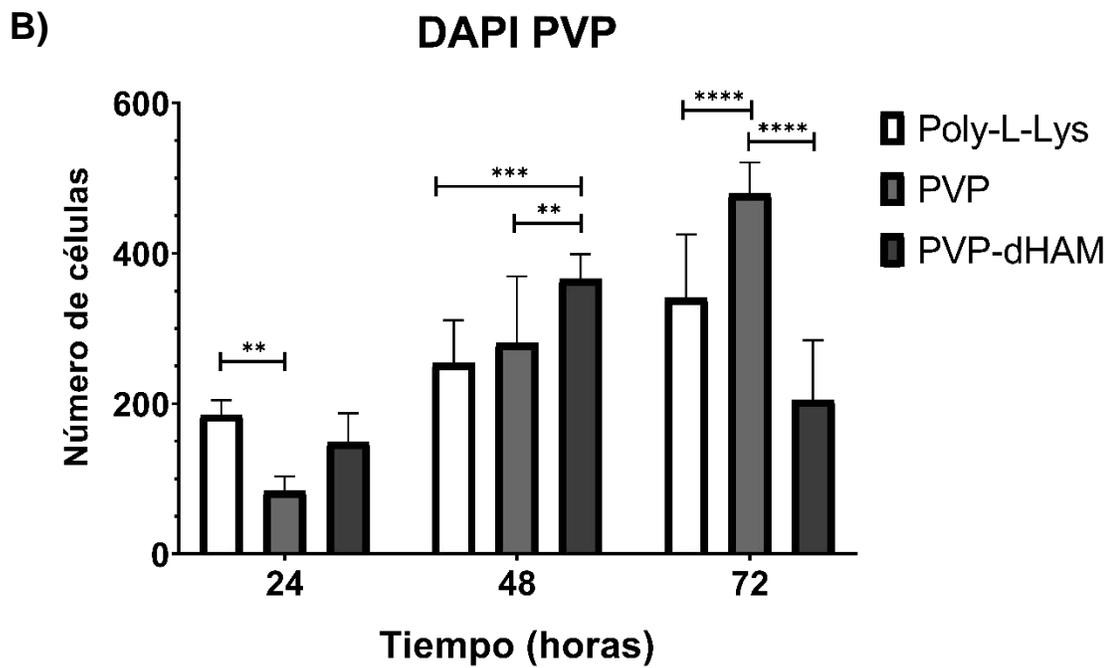
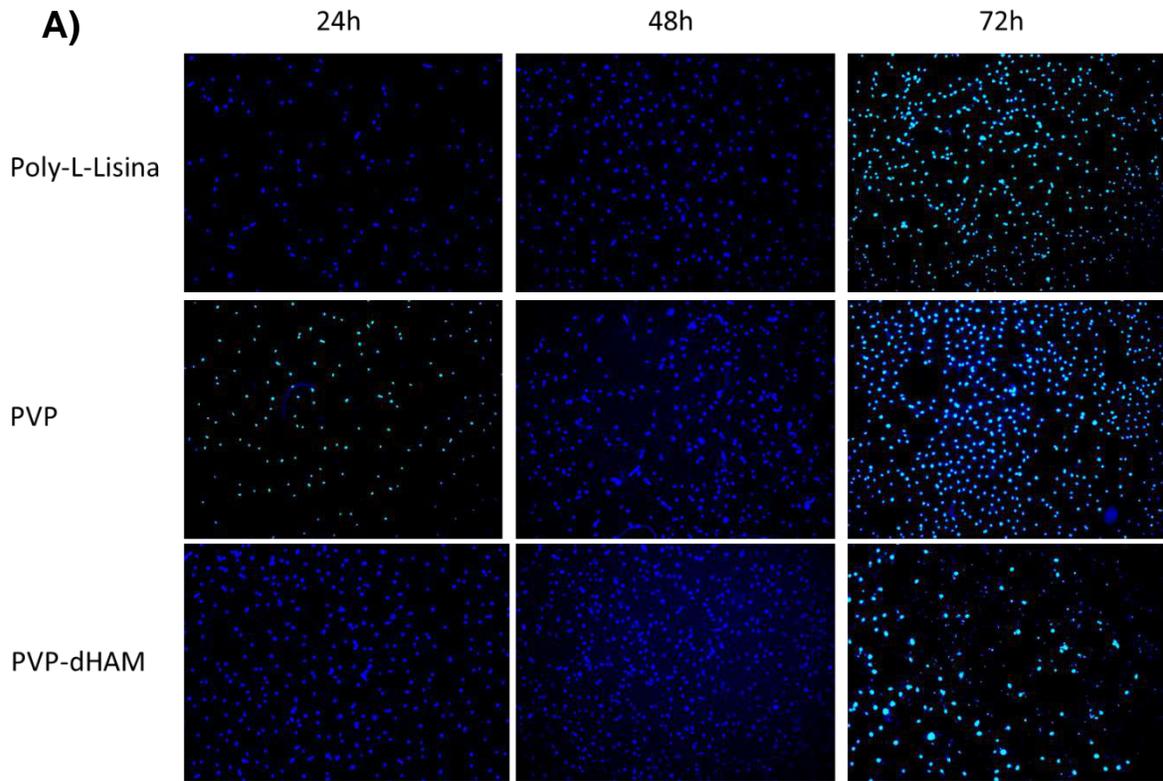


Figura 13.- Número de BM-MSc observadas en los andamios de PVP puro y con dHAM a distintos tiempos comparadas contra control de Poly-L-Lisina.

A) imágenes fluorescencia B) Análisis semicuantitativo del número de células por andamio. El conteo celular se realizó en 10 campos de visión aleatorios por condición. DAPI a 40x. **= ANOVA $p \leq 0.01$; ***= ANOVA $p \leq 0.001$. **** = ANOVA $p \leq 0.0001$.

En la figura 13 se muestra semicuantitativamente el número de células adheridas a los distintos tipos de andamios visto a través de la tinción de sus núcleos con DAPI. Nuevamente, se aprecia el incremento en el número de células con base al tiempo, además del efecto aparente de la dHAM sobre la proliferación celular. No obstante, a las 72 horas, el número de células observadas en el andamio de PVP-dHAM disminuye notablemente en comparación con el andamio de PVP puro y el control.

De la misma forma, el análisis sugiere una correlación entre el número de células observadas en los andamios con el tiempo de cultivo. El grupo control provee resultados significativamente superiores frente a los grupos experimentales de PVP ($p \leq 0.01$). No obstante, esta tendencia se invierte a las 48 horas, donde el grupo de PVP-dHAM exhibe los mejores resultados tanto frente al andamio de PVP puro ($p \leq 0.01$) como al control ($p \leq 0.001$). A las 72 horas el número de células viables se reduce fuertemente en los andamios de PVP-dHAM, mientras que en los andamios de PVP-puro y el grupo control mantienen una tendencia al alza. Cabe destacar que los resultados presentados a las 72 horas muestran una tendencia similar a los observados para los andamios de PCL.

Ensayo de viabilidad celular mediante kit de Live/Dead

Para corroborar la compatibilidad celular de las células cultivadas en los andamios, se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante microscopía de fluorescencia a través del kit comercial de citotoxicidad LIVE/DEAD™ (Thermo-Fisher®). Este tipo de ensayo discrimina las células vivas de las muertas a través de la fluorescencia emitida, siendo una señal fluorescente verde indicativa de células viables y una fluorescencia roja proveniente de aquellas células con pérdida de la integridad de la membrana plasmática.

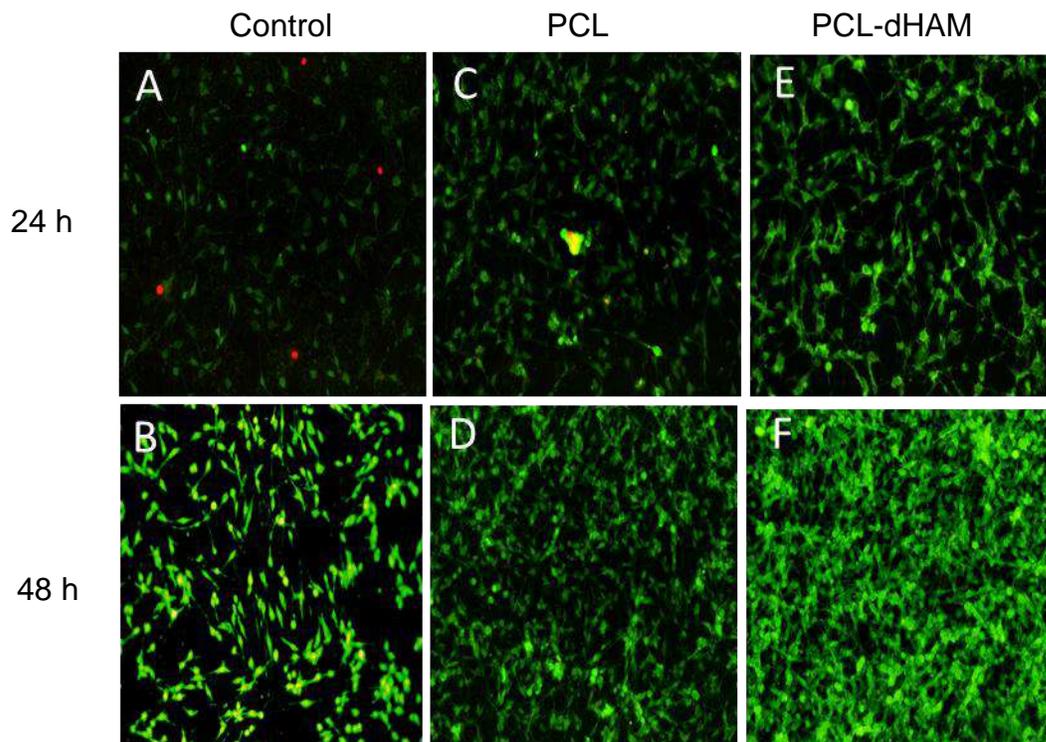


Figura 14.- Ensayo de viabilidad en andamios de PCL a través de la prueba Live/Dead a distintos tiempos.

Comparativa en la viabilidad celular observada entre el grupo de Poly-L-Lisina (**A, B**) frente a las células cultivadas en un andamio de PCL (**C, D**) y PCL-dHAM (**E, F**).

La Figura 14 muestra las BM-MSc cultivadas en los andamios de PCL comparadas con el grupo control de Poly-L-Lisina. Como se observó en las micrografías, existe una ausencia aparente de fluorescencia roja, indicando buena compatibilidad celular por los andamios. Así mismo, también se apreció un aumento en la densidad celular observable en los andamios de PCL-dHAM a las 48 horas.

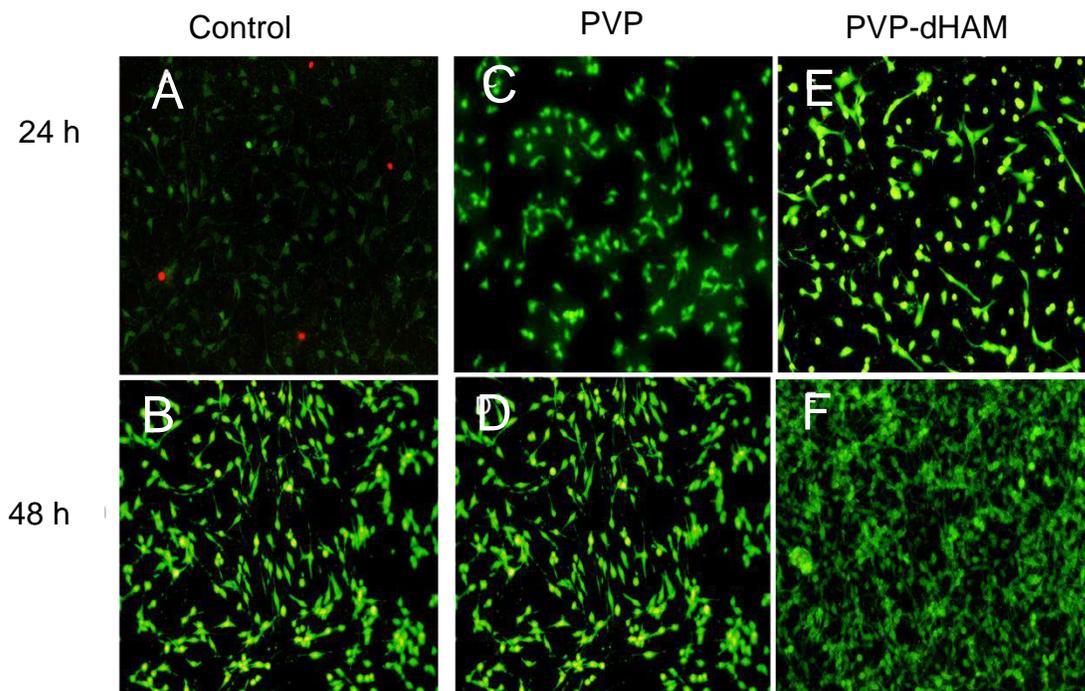


Figura 15.- Ensayo de viabilidad en andamios de PVP a través de la prueba Live/Dead a distintos tiempos.

Comparativa en la viabilidad celular observada entre el grupo de Poly-L-Lisina (**A, B**) frente a las células cultivadas en un andamio de PCL (**C, D**) y PCL-dHAM (**E, F**).

En los ensayos realizados para los andamios de PVP, mostrados en la figura 15, se obtuvieron resultados muy similares tanto en la biocompatibilidad celular por la superficie de cultivo, como en el efecto positivo de la dHAM sobre la proliferación celular en los andamios de PVP-dHAM.

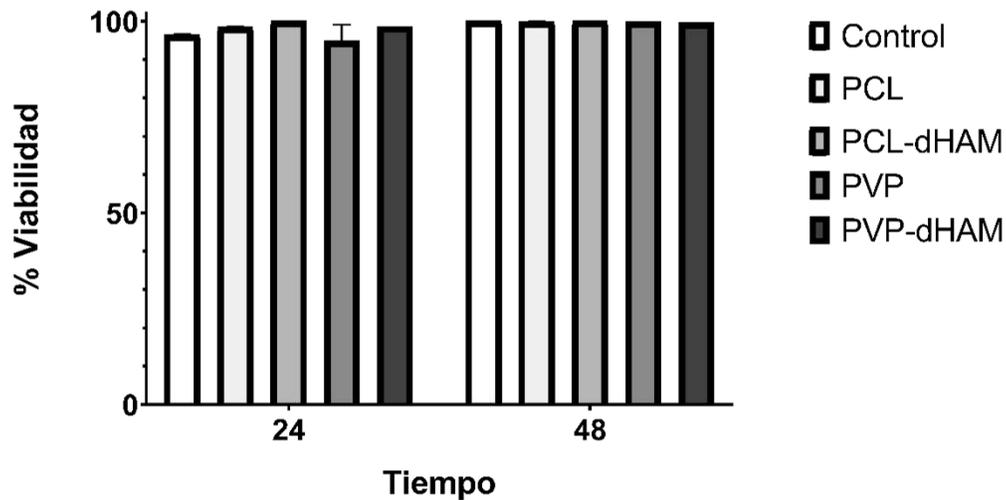


Figura 16.- Gráfica de viabilidad a través de la prueba Live/Dead a distintos tiempos

Imagen comparativa de la viabilidad celular observada entre el grupo de Poly-L-Lisina frente a las células cultivadas en los andamios de PCL y PVP.

La figura 16 provee una gráfica con el porcentaje de viabilidad calculado para este ensayo, obteniendo que todos los andamios evaluados a las 24 y 48 horas exhiben una viabilidad arriba del 90%.

Ensayo de cicatrización de herida *in vitro*

Con el objetivo de evaluar el potencial funcional de los andamios en procesos asociados a la regeneración tisular, se realizó un ensayo de cicatrización. Esta prueba permite analizar la capacidad de migración celular a través del cierre de una herida artificial generada.

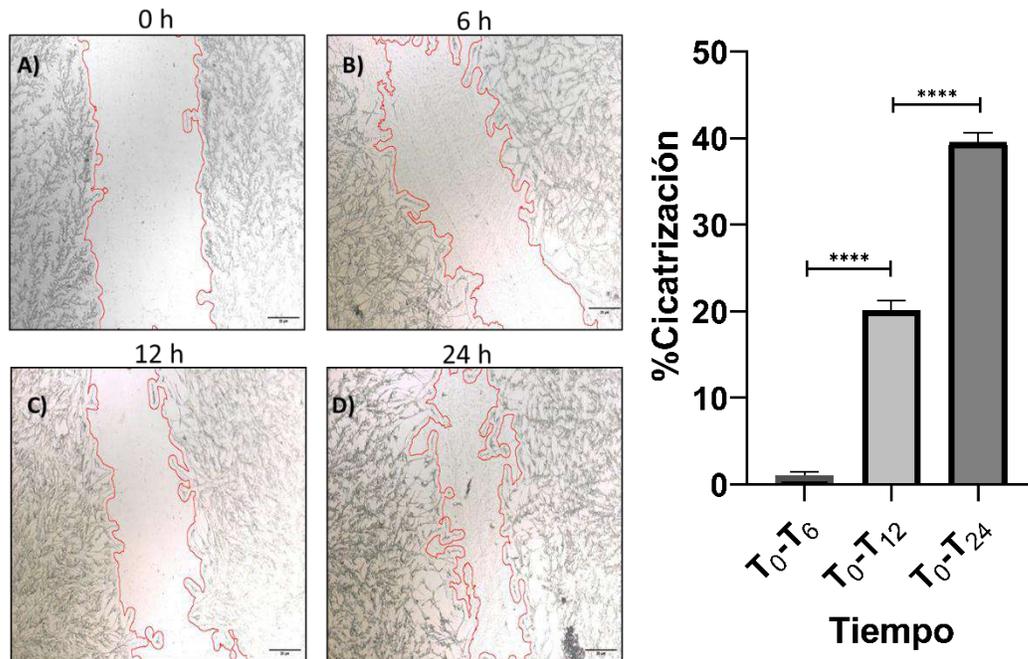


Figura 17.- Ensayo de cicatrización en Poly-L-Lisina a 0, 6, 12 y 24 h.

(A-D) Micrografías representativas (10x) del ensayo realizado en láminas recubiertas con Poly-L-Lisina distintos tiempos. (E) Gráfica del porcentaje de cicatrización observado a través del tiempo. **** = ANOVA $p \leq 0.0001$.

Para evaluar la capacidad migratoria de las BM-MSc de ratón, se realizó un ensayo de cicatrización sobre los andamios fabricados. Observamos en la figura 17 que, a las 6 horas, el cierre de la herida alcanzó un 1.04%; sin embargo, este valor aumentó significativamente a las 12 horas con un cierre del 20.08% y finalmente alcanzó un 39.51% a las 24 horas en las láminas recubiertas con Poly-L-Lisina.

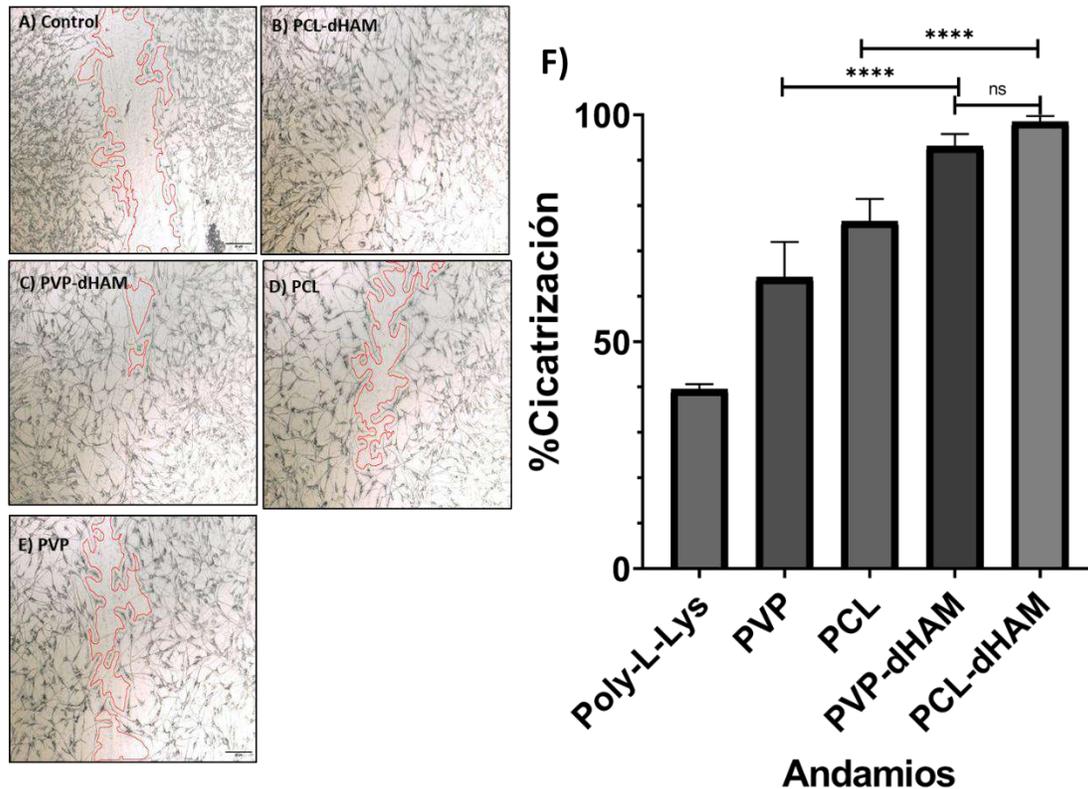


Figura 18.- Ensayo de cicatrización en PCL-dHAM, PVP-dHAM, PCL, y PVP 24 h.

(A-E) Micrografías representativas de los ensayos de cicatrización realizados en los distintos andamios después de 24 h de la formación de la herida. **(F)** Gráfica comparativa del porcentaje de cicatrización a través del tiempo. ** = ANOVA $p \leq 0.0001$

Tras la migración promedio en el grupo de Poly-L-Lisina, se evaluó la capacidad de cicatrización de las BM-MSc de ratón cultivadas sobre los distintos andamios a las 24 horas. La elección de este tiempo es determinar la capacidad final de cicatrización, observada a través de la migración celular, tras un periodo suficiente para observar diferencias significativas entre grupos.

Los resultados en la figura 18 muestran diferencias notables entre los grupos. El andamio de PVP presentó una tasa de cicatrización del 64.20%, mientras que el de PCL alcanzó un 76.56%. Al incorporar la dHAM, se observó un incremento significativo en la migración celular: el andamio PVP-dHAM mostró una cicatrización

del 93.13%, y el andamio PCL-dHAM alcanzó el valor más alto con un 98.47% de cierre de herida.

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los andamios sin dHAM y sus respectivos equivalentes con dHAM: PCL vs. PCL-dHAM ($p = 0.0001$) y PVP vs. PVP-dHAM ($p = 0.0001$). No se encontraron diferencias significativas entre los andamios PCL-dHAM y PVP-dHAM, lo que sugiere que la presencia de la matriz biológica es el principal factor que favorece la migración celular

9. DISCUSIÓN

La membrana amniótica es uno de los biomateriales más investigados en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos (Jahanafrooz et al., 2023). Su facilidad de obtención, bajo costo de procuración, así como sus múltiples propiedades biológicas reportadas, la convierten en una fuente valiosa para la medicina regenerativa. No obstante, su alta velocidad de degradación y bajas propiedades mecánicas pueden limitar sus aplicaciones.

En el presente estudio se desarrollaron andamios de PCL y PVP, con y sin incorporación de matriz de membrana amniótica descelularizada (dHAM), mediante la técnica de spin coating, esto con el objetivo de obtener una matriz híbrida que combine la bioactividad de la dHAM, rica en colágeno y factores de crecimiento, con la resistencia y estabilidad química de los andamios poliméricos, superando las limitaciones individuales de los componentes. De igual forma, el uso de la técnica de spin coating facilita la integración de los componentes en un sistema controlado, produciendo recubrimientos homogéneos que favorezcan la interacción célula-sustrato, preservando la bioactividad de los biomateriales. Los resultados obtenidos demuestran que la adición de dHAM favoreció significativamente la proliferación y migración celular, manteniendo al mismo tiempo la integridad estructural de los polímeros, lo que sugiere una mejora sinérgica derivada de la combinación.

Se realizó un ensayo de viabilidad celular para determinar la concentración mínima efectiva de dHAM a emplear en los andamios que tenga efecto sobre la proliferación celular. Para este fin se estimó mediante luminiscencia la cantidad de células viables utilizando extractos solubles de dHAM. Los resultados del estudio avalan la biocompatibilidad de las concentraciones evaluadas de dHAM a los tiempos evaluados, así como un incremento en la tasa de proliferación de la línea celular con base al tiempo de exposición. Al contrastar estos hallazgos con lo reportado por Rojas-Murillo et al. (2024), se observa similitud en los resultados. En este estudio previamente se emplearon extractos solubles de dHAM sobre condrocitos humanos y observaron que a una concentración de 3 y 6 mg/mL incrementó la proliferación celular a las 48 h, y un aumento del 40% en todas las

concentraciones a las 72 h (Rojas-Murillo et al., 2024). En nuestro caso, aunque es diferente el tipo celular evaluado y las concentraciones de los extractos de dHAM empleados, se observa un incremento similar en la viabilidad, demostrando la actividad biológica de la dHAM y sus componentes solubles sobre la proliferación celular.

Por otra parte, Lofti, 2021 evaluó el efecto de los factores solubles de un andamio de PCL con matriz de membrana amniótica pulverizada, sobre un cultivo células madre derivadas de tejido adiposo (AT-MSc) a través de un ensayo de MTT. Los extractos solubles fueron preparados depositando medio de cultivo sobre los andamios por 3, 7 y 14 días. Lofti et al. observaron una mayor intensidad en la absorbancia de los grupos tratados con membrana amniótica contraste al grupo de PCL puro y al control (sin PCL ni membrana amniótica) en todos los tiempos evaluados, lo que demuestra la ausencia de citotoxicidad de los andamios y el efecto de los factores solubles sobre la actividad proliferativa de las células cultivadas. Aunado a esto, ellos observaron que los extractos solubles de los andamios con mayor concentración de membrana amniótica (relación 80:20) tuvieron ligeramente mejores resultados en comparación con el andamio de menor concentración (90:10), adjudicando este fenómeno a la mayor cantidad de factores de crecimiento existentes en el andamio 80:20 (Lotfi et al., 2023).

La hidrofobicidad o humectabilidad de una superficie, cuantificada por el ángulo de contacto, es un parámetro crítico que influye directamente en la afinidad de un material para la adhesión y diferenciación celular (Huhtamäki et al., 2018) y, por consiguiente, en los procesos celulares subsecuentes. En general, la mayoría de las células de mamífero muestran preferencia por adherirse y proliferar en superficies con una hidrofobicidad moderada, evitando tanto las superficies superhidrofílicas (ángulo de contacto $< 5^\circ$) como las superhidrofóbicas ($> 150^\circ$). La adhesión celular óptima suele observarse en superficies con ángulos de contacto entre 40° y 70° (Al-Azzam & Alazzam, 2022).

En la evaluación de la humectabilidad, los valores de ángulo de contacto evidenciaron que la adición de dHAM produjo distintos efectos en la hidrofobicidad

de los polímeros: Para el andamio de PCL, la matriz de dHAM redujo su hidrofobicidad, mientras que el PVP-dHAM presentó un incremento significativo de este parámetro. Esto entra en concordancia con lo previamente reportado. Lo que indica que la hidrofobicidad o humectabilidad de una superficie puede ser modificada a través de la adición de grupos hidrofílicos o hidrofóbicos (Guo et al., 2016). Kanaujiya et al. (2024), en su investigación de fibras compuestas de PCL/PVP enriquecidas con colágeno y cargadas con RSV y AMP, atribuyen el aumento en la hidrofiliidad principalmente a la incorporación de colágeno dentro de la matriz quien, por su naturaleza rica en grupos polares, incrementa la afinidad del andamio por el agua y reduce el ángulo de contacto (Kanaujiya et al., 2024). De la misma forma, este hallazgo también es congruente con lo reportado por Majidnia et al. (2022), quienes observaron que la incorporación de pulverizado de membrana amniótica en matrices electrohiladas de PCL/colágeno, a concentraciones superiores a las evaluadas en nuestro trabajo, aumentó la hidrofiliidad. La disminución del ángulo de contacto en PCL podría atribuirse a la presencia de proteínas hidrofílicas y glicoproteínas de la dHAM, especialmente de elastina, fibronectina, laminina y colágeno (Krishani et al., 2023; Majidnia et al., 2022). En contraste, el aumento de la hidrofobicidad observado en PVP-dHAM podría estar relacionado con la redistribución superficial del polímero hidrofílico durante el proceso de spin coating en conjunto con la matriz de dHAM, lo que podría reducir la exposición de grupos polares del PVP. Nuevamente, Kanaujiya et al. proponen que la distribución y orientación de los grupos polares es determinante en la disminución del ángulo de contacto, lo cual es reafirmado por otros autores (Irfan et al., 2019; Pushp et al., 2021). No obstante, cabe destacar que todos los andamios presentaron una naturaleza hidrofílica ($<90^\circ$), condición favorable para la adhesión y proliferación celular.

En los espectros ATR-FTIR realizados para los andamios de PCL-dHAM y PVP-dHAM, se observan las bandas características de los polímeros, así como la presencia de señales atribuibles a proteínas y otros componentes de la membrana amniótica, especialmente en el espectro de PCL, correspondientes a la Amida I ($1635\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$), Amida II ($1530\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$) y Amida A ($3300\text{--}3310\text{ cm}^{-1}$). No

obstante, en el espectro de PCL, se observa un corrimiento de la banda Amida 1 y una disminución en la intensidad de la Amida II. Aguirre-Chagala et al. (2017) realizó un andamio electrohilado de PCL combinado con colágeno y elastina, el cual mostró cambios en la intensidad y desplazamientos en las bandas Amida I y Amida II, lo cual se interpretó como modificaciones en la estructura proteica producto de la adición de PCL (Aguirre-Chagala et al., 2017). No obstante, las variaciones observadas en los espectros son mínimas, presumiblemente debido a interacciones o superposición entre los componentes de la dHAM y la matriz polimérica. La superposición en las bandas del espectro de PVP explicaría la atenuación de las bandas amida, y junto al aumento reportado en el ángulo de contacto, puede sugerir un posible reordenamiento de los grupos polares de la membrana amniótica hacia el interior de la matriz y no en la superficie del recubrimiento, contribuyendo al aumento en la hidrofobicidad del andamio. De forma general, se presume que el proceso de spin coating no indujo cambios estructurales significativos a la estructura del polímero ni al de la matriz de dHAM, teniendo un comportamiento similar al reportado por Lotfi et al y Majidnia et al (Lotfi et al., 2023; Majidnia et al., 2022).

Para corroborar la compatibilidad celular de las células cultivadas en los andamios y el efecto de la matriz de dHAM sobre las células, se realizó un ensayo de proliferación y de viabilidad mediante microscopía de fluorescencia. Los ensayos de conteo celular mediante DAPI y viabilidad Live/Dead mostraron que la adición de dHAM favoreció significativamente la proliferación a las 24 y 48 horas tanto en PCL como en PVP, con incrementos del 35% y 30%, respectivamente, frente a los andamios sin dHAM. La biocompatibilidad de los materiales y la aparente ausencia de citotoxicidad aguda en nuestros andamios tienen similitud a lo expuesto por Qasim et al. (2024) en las nanofibras de PVP-PVA-colágeno, quien observó un incremento en la proliferación en los andamios de PVP-PVA-colágeno, y especialmente, un ligero incremento en el andamio de PVP-RSV-Colágeno (Kanaujiya et al., 2024); mientras que Lotfi et al, y Majidnia et al tuvieron resultados similares para el andamio de PCL, quien mostró una ligera mejora en la proliferación frente a los andamios de PVP-dHAM (Lotfi et al., 2023; Majidnia et al., 2022). Los resultados observados comprueban la presencia e integración de dHAM en los

andamios, así como la liberación de factores bioactivos que estimulan la adhesión y división celular, concordando con la capacidad proliferativa de los extractos solubles de dHAM observada.

No obstante, un fenómeno notable es la disminución en el número de células observadas en los andamios de PCL/PVP con dHAM a las 72 horas. Esta disminución contrasta con la tendencia al alza en los andamios de PCL/PVP y el grupo de Poly-L-Lisina a las 72 horas. La disminución observada en el número de células viables a las 72 horas en ambos andamios podría explicarse por fenómenos de confluencia celular, limitación de nutrientes o desprendimiento por sobrepoblación. Los investigadores, Abo-Aziza y Zaki, explican que la viabilidad celular en BM-MSK se ve disminuida en confluencias del 100% y 20%, siendo que cultivos celulares con alta densidad celular se encuentran relacionadas con una baja expansión y altos niveles de apoptosis (Abo-Aziza & A A, 2017).

Aunque la dHAM inicialmente promueve una proliferación más rápida, esto podría llevar a que las células en los andamios biocompuestos alcancen la confluencia de saturación más rápido que en los andamios puros. Este comportamiento sugiere la necesidad de evaluar curvas de crecimiento a tiempos más prolongados, así como intervalos intermedios entre los tiempos evaluados con el fin de comprender aún más la dinámica de interacción célula-material.

En los ensayos de cicatrización se evaluó la capacidad de migración de las células sobre los andamios. Se observó que la adición de dHAM incrementó de manera significativa la tasa de cicatrización a las 24 horas, alcanzando valores del 98.5% en PCL-dHAM y 93.1% en PVP-dHAM. Estos resultados superan ampliamente los obtenidos con los polímeros puros y se encuentran por encima de lo reportado en superficies recubiertas con Poly-L-Lisina, el cual es un recubrimiento empleado en cultivo celular por propiciar una mejora en la tasa de crecimiento celular, además de una regulación a la alza de genes involucrados en la adhesión y proliferación y, en algunas células como fibroblastos, un aumento en la tasa de cicatrización, esto en contraste con aquellas cultivadas en placas sin recubrimiento (Heo et al., 2016; Lin et al., 2019); así como lo reportado por Unalan et al, quien al

evaluar andamios de PCL combinados con gelatina (PCL-GEL) cultivados con células de fibroblasto dérmico humano normal, se observó un cierre de herida a las 24 h similar al reportado por nuestro equipo de trabajo. La gelatina, al igual que la dHAM, es un polímero natural que contiene componentes bioactivos presentes en la ECM que promueven la adhesión y proliferación celular (Unalan et al., 2019). De la misma forma, la dHAM posee componentes bioactivos colágeno, laminina, fibronectina y factores de crecimiento (EGF, bFGF, VEGF) capaces de promover adhesión migración. Young-Lin et al. afirma que la migración celular es un proceso regulado por distintos estímulos físicos y químicos, conocidos como "taxis", entre los que encontramos quimiotaxis, durotaxis, entre otros. Por lo mismo, en los ensayos de wound healing, tasa de cicatrización no sólo depende del tipo celular empleado, sino también de las propiedades físicoquímicas del sustrato, como la rigidez superficial (Lin et al., 2019). Por otra parte, el tipo de células usado y la composición del recubrimiento pueden influenciar la cicatrización ya que no todas las células requieren los mismos estímulos. Klein et al reportó que los recubrimientos con fibronectina (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) aceleran el desplazamiento de las células de Schwann, pero recubrimientos de colágeno I (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), laminina (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) o sintéticos como la poly-L-lisina (3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pueden tener efectos neutros o incluso inhibitorios (Klein et al., 2016)

Estos resultados evidencian que la interacción célula-sustrato es específica de cada modelo y que la composición superficial influye de forma determinante en la respuesta migratoria. En este sentido, la incorporación de dHAM en los andamios fabricados mediante *spin coating* podría modificar el microambiente del sustrato al aportar colágeno, laminina, fibronectina y factores de crecimiento, los cuales propiciaron el desplazamiento y cicatrización de las BM-MSc cultivadas en los ensayos realizados.

10. CONCLUSIÓN

Mediante la técnica de *Spin-Coating* se fabricaron andamios de PCL y PVP, con y sin incorporación de dHAM, los cuales presentaron superficies lisas, uniformes y sin defectos visibles aparentes. En términos de respuesta celular, la adición de dHAM mostró un efecto positivo y significativo en la proliferación celular a las 24 y 48 horas. A las 48 horas, el andamio PCL-dHAM incrementó la proliferación en un 35% en comparación con su equivalente sin matriz, mientras que el andamio PVP-dHAM mostró un aumento del 30% respecto al PVP puro.

Asimismo, en el ensayo funcional de cicatrización realizado a las 24 horas, se observó que la presencia de dHAM mejoró de forma notable la capacidad migratoria de las células. El andamio PCL-dHAM alcanzó un cierre de herida del 98.5%, lo que representa un incremento del 28.6% en comparación con el PCL sin matriz. De manera similar, el andamio PVP-dHAM logró un 93.1% de cierre, superando en un 45.1% a su equivalente sin dHAM.

Ambos andamios funcionalizados con dHAM mostraron un comportamiento muy similar en términos de proliferación celular y cicatrización, lo que sugiere que tanto PCL como PVP son materiales viables para su combinación con 4 mg/mL de dHAM, constituyendo así una estrategia prometedora para el desarrollo de andamios bioactivos en aplicaciones de medicina regenerativa.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar las propiedades mecánicas de los andamios fabricados, incluyendo pruebas de resistencia a la tracción y elasticidad, con el fin de determinar su comportamiento estructural en condiciones fisiológicas simuladas
- Realizar análisis fisicoquímicos complementarios para una caracterización más integral de los andamios, tales como espectroscopía Raman, análisis de degradación enzimática y estudios de estabilidad térmica.
- Ampliar los tiempos evaluados en los ensayos biológicos para obtener una curva completa de crecimiento celular, determinar el punto de máxima proliferación y evaluar posibles efectos tardíos. Asimismo, se propone la incorporación de ensayos de diferenciación celular, en particular hacia linajes osteogénicos, condrogénicos o epiteliales; determinar la estabilidad y tiempo de actividad de los factores de crecimiento
- Comparar la actividad de los andamios fabricados contra la matriz de dHAM sola y con los extractos solubles, esto con el fin de determinar las ventajas que posee la generación de este tipo de matriz.
- Realizar análisis de expresión génica, incluyendo RT-qPCR o RNA-Seq, para identificar los cambios transcripcionales inducidos por los distintos andamios. Además, se plantea estudiar las vías de señalización intracelular involucradas en procesos clave como la adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular.
- Implementar ensayos in vivo con el objetivo de evaluar la integración del andamio, su respuesta inmunológica y el potencial regenerativo del biomaterial.

12. REFERENCIAS

- Abo-Aziza, F. A. M., & A A, Z. (2017). The Impact of Confluence on Bone Marrow Mesenchymal Stem (BMMSC) Proliferation and Osteogenic Differentiation. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 11(2), 121–132.
- Adel, I. M., ElMeligy, M. F., & Elkasabgy, N. A. (2022). Conventional and Recent Trends of Scaffolds Fabrication: A Superior Mode for Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, 14(2), 306. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020306>
- Aguirre-Chagala, Y. E., Altuzar, V., León-Sarabia, E., Tinoco-Magaña, J. C., Yañez-Limón, J. M., & Mendoza-Barrera, C. (2017). Physicochemical properties of polycaprolactone/collagen/elastin nanofibers fabricated by electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 897–907. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.118>
- Al-Azzam, N., & Alazzam, A. (2022). Micropatterning of cells via adjusting surface wettability using plasma treatment and graphene oxide deposition. *PLOS ONE*, 17(6), e0269914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269914>
- Altyar, A. E., El-Sayed, A., Abdeen, A., Piscopo, M., Mousa, S. A., Najda, A., & Abdel-Daim, M. M. (2023a). Future regenerative medicine developments and their therapeutic applications. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 158). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114131>
- Altyar, A. E., El-Sayed, A., Abdeen, A., Piscopo, M., Mousa, S. A., Najda, A., & Abdel-Daim, M. M. (2023b). Future regenerative medicine developments and their therapeutic applications. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 158). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114131>
- Aram, E., & Mehdipour-Ataei, S. (2016). A review on the micro- and nanoporous polymeric foams: Preparation and properties. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65(7), 358–375. <https://doi.org/10.1080/00914037.2015.1129948>

- Arasteh, S., Kazemnejad, S., Khanjani, S., Heidari-Vala, H., Akhondi, M. M., & Mobini, S. (2016). Fabrication and characterization of nano-fibrous bilayer composite for skin regeneration application. *Methods*, 99, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.08.017>
- Arki, M. K., Moeinabadi-Bidgoli, K., Hossein-Khannazer, N., Gramignoli, R., Najimi, M., & Vosough, M. (2023). Amniotic Membrane and Its Derivatives: Novel Therapeutic Modalities in Liver Disorders. In *Cells* (Vol. 12, Issue 16). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells12162114>
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. In *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* (Vol. 2, pp. 403–430). <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- Bhaskar, B., Sreenivasa Rao, P., Kasoju, N., Nagarjuna, V., & Baadhe, R. R. (2021). Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: From Basic Concepts to State of the Art Approaches. In *Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: From Basic Concepts to State of the Art Approaches*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-0002-9>
- Bhushan, S., Singh, S., Maiti, T. K., Sharma, C., Dutt, D., Sharma, S., Li, C., & Tag Eldin, E. M. (2022a). Scaffold Fabrication Techniques of Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Critical Review. *Bioengineering*, 9(12), 728. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9120728>
- Bhushan, S., Singh, S., Maiti, T. K., Sharma, C., Dutt, D., Sharma, S., Li, C., & Tag Eldin, E. M. (2022b). Scaffold Fabrication Techniques of Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Critical Review. *Bioengineering*, 9(12), 728. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9120728>
- BoydBiomedical. (n.d.). *In depth on biomaterials in life science*. Retrieved August 6, 2025, from <https://boydbiomedical.com/knowledge-center/reports/in-depth-on-biomaterials-in-life-sciences?hsLang=en>

- Campanelli, L. C. (2021). A review on the recent advances concerning the fatigue performance of titanium alloys for orthopedic applications. *Journal of Materials Research*, 36(1), 151–165. <https://doi.org/10.1557/s43578-020-00087-0>
- Cao, D., & Ding, J. (2022). Recent advances in regenerative biomaterials. *Regenerative Biomaterials*, 9. <https://doi.org/10.1093/rb/rbac098>
- Chaturvedi, T. P. (2016). Corrosive behaviour of implant biomaterials in oral environment. *Materials Technology*, 31(12), 689–695. <https://doi.org/10.1080/10667857.2016.1213527>
- Chen, L., Mou, S., Hou, J., Fang, H., Zeng, Y., Sun, J., & Wang, Z. (2021). Simple application of adipose-derived stem cell-derived extracellular vesicles coating enhances cytocompatibility and osteoinductivity of titanium implant. *Regenerative Biomaterials*, 8(1). <https://doi.org/10.1093/rb/rbaa038>
- Chong, E. T. J., Ng, J. W., & Lee, P.-C. (2023). Classification and Medical Applications of Biomaterials—A Mini Review. *BIO Integration*, 4(2). <https://doi.org/10.15212/bioi-2022-0009>
- Dadkhah Tehrani, F., Firouzeh, A., Shabani, I., & Shabani, A. (2021). A Review on Modifications of Amniotic Membrane for Biomedical Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.606982>
- de Boer, J., Van Blitterswijk, C. A., Uquillas, J. A., & Malik, N. (2023). *Tissue Engineering*.
- del-Mazo-Barbara, L., Gómez-Cuyàs, J., Martínez-Orozco, L., Santana Pérez, O., Bou-Petit, E., & Ginebra, M.-P. (2024). In vitro degradation of 3D-printed polycaprolactone\biomimetic hydroxyapatite scaffolds: Impact of the sterilization method. *Polymer Testing*, 139, 108566. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2024.108566>
- Echeverria Molina, M. I., Malollari, K. G., & Komvopoulos, K. (2021). Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. In *Frontiers in*

Bioengineering and Biotechnology (Vol. 9). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.617141>

Elkhenany, H., El-Derby, A., Abd Elkodous, M., Salah, R. A., Lotfy, A., & El-Badri, N. (2022). Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02684-0>

Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering, 2019*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>

Fénelon, M., Catros, S., Meyer, C., Fricain, J.-C., Obert, L., Auber, F., Louvrier, A., & Gindraux, F. (2021). Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes*, 11(6), 387. <https://doi.org/10.3390/membranes11060387>

Fenelon, M., Galvez, P., Kalbermatten, D., Scolozzi, P., & Madduri, S. (2023). Emerging Strategies for the Biofabrication of Multilayer Composite Amniotic Membranes for Biomedical Applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 19). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms241914424>

Ghasemi-Mobarakeh, L., Kolahreez, D., Ramakrishna, S., & Williams, D. (2019). Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.02.004>

Gholipourmalekabadi, M., Farhadhosseinabadi, B., Faraji, M., & Nourani, M. R. (2020). How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? In *Burns* (Vol. 46, Issue 6, pp. 1254–1271). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.07.005>

Gholipourmalekabadi, M., Seifalian, A. M., Urbanska, A. M., Omrani, M. D., Hardy, J. G., Madjd, Z., Hashemi, S. M., Ghanbarian, H., Brouki Milan, P., Mozafari, M., Reis, R. L., Kundu, S. C., & Samadikuchaksaraei, A. (2018). 3D Protein-

Based Bilayer Artificial Skin for the Guided Scarless Healing of Third-Degree Burn Wounds in Vivo. *Biomacromolecules*, 19(7), 2409–2422. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01807>

Girón Nava, T. M. (2019). *Obtención de membranas mediante electrospinning para tratamiento de agua con alto contenido de sólidos*.

Gong, Y., Chen, X., & Wu, W. (2024). Application of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in sample preparation: Material characterization and mechanism investigation. *Advances in Sample Preparation*, 11, 100122. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2024.100122>

Gui-Bo, Y., You-Zhu, Z., Shu-Dong, W., De-Bing, S., Zhi-Hui, D., & Wei-Guo, F. (2010). Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93A(1), 158–163. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32496>

Guimarães-Camboa, N., Cattaneo, P., Sun, Y., Moore-Morris, T., Gu, Y., Dalton, N. D., Rockenstein, E., Masliah, E., Peterson, K. L., Stallcup, W. B., Chen, J., & Evans, S. M. (2017). Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell Stem Cell*, 20(3), 345-359.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.006>

Guo, S., Zhu, X., Li, M., Shi, L., Ong, J. L. T., Jańczewski, D., & Neoh, K. G. (2016). Parallel Control over Surface Charge and Wettability Using Polyelectrolyte Architecture: Effect on Protein Adsorption and Cell Adhesion. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(44), 30552–30563. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b09481>

Gutiérrez, L., Stepien, G., Gutiérrez, L., Pérez-Hernández, M., Pardo, J., Pardo, J., Grazú, V., & de la Fuente, J. M. (2017). Nanotechnology in Drug Discovery and Development. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (pp. 264–295). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12292-9>

Hadipour, A., Bayati, V., Rashno, M., & Orazizadeh, M. (2021). Aligned Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers Superimposed on Decellularized Human Amniotic

- Membrane Promoted Myogenic Differentiation of Adipose Derived Stem Cells. *Cell Journal*, 23(6), 603–611. <https://doi.org/10.22074/cellj.2021.7261>
- Hall, D. J., Pourzal, R., & Jacobs, J. J. (2020). What Surgeons Need to Know About Adverse Local Tissue Reaction in Total Hip Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*, 35(6), S55–S59. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2020.01.016>
- Hallab, N. J., & Jacobs, J. J. (2017). Chemokines Associated with Pathologic Responses to Orthopedic Implant Debris. *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00005>
- Hashemi, S., Mohammadi, A. A., Kabiri, H., Hashempoor, M. R., Mahmoodi, M., Amini, M., & Mehrabani, D. (2019). The healing effect of Wharton's jelly stem cells seeded on biological scaffold in chronic skin ulcers: A randomized clinical trial. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(6), 1961–1967. <https://doi.org/10.1111/jocd.12931>
- Hasmad, H., Yusof, M. R., Mohd Razi, Z. R., Hj Idrus, R. B., & Chowdhury, S. R. (2018). Human Amniotic Membrane with Aligned Electrospun Fiber as Scaffold for Aligned Tissue Regeneration. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 24(6), 368–378. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0447>
- Heo, J. S., Kim, H. O., Song, S. Y., Lew, D. H., Choi, Y., & Kim, S. (2016). Poly-L-lysine Prevents Senescence and Augments Growth in Culturing Mesenchymal Stem Cells *Ex Vivo*. *BioMed Research International*, 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/8196078>
- Hinoki, A., Saito, A., Kinoshita, M., Yamamoto, J., Saitoh, D., & Takeoka, S. (2016). Polylactic acid nanosheets in prevention of postoperative intestinal adhesion and their effects on bacterial propagation in an experimental model. *British Journal of Surgery*, 103(6), 692–700. <https://doi.org/10.1002/bjs.10122>
- Huang, K.-C., Yano, F., Murahashi, Y., Takano, S., Kitaura, Y., Chang, S. H., Soma, K., Ueng, S. W. N., Tanaka, S., Ishihara, K., Okamura, Y., Moro, T., & Saito, T. (2017). Sandwich-type PLLA-nanosheets loaded with BMP-2 induce bone

- regeneration in critical-sized mouse calvarial defects. *Acta Biomaterialia*, 59, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.041>
- Huhtamäki, T., Tian, X., Korhonen, J. T., & Ras, R. H. A. (2018). Surface-wetting characterization using contact-angle measurements. *Nature Protocols*, 13(7), 1521–1538. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0003-z>
- Irfan, M., Irfan, M., Idris, A., Baig, N., Saleh, T. A., Nasiri, R., Iqbal, Y., Muhammad, N., Rehman, F., & Khalid, H. (2019). Fabrication and performance evaluation of blood compatible hemodialysis membrane using carboxylic multiwall carbon nanotubes and low molecular weight polyvinylpyrrolidone based nanocomposites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(3), 513–525. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36566>
- Jahanafrooz, Z., Bakhshandeh, B., Behnam Abdollahi, S., & Seyedjafari, E. (2023). Human amniotic membrane as a multifunctional biomaterial: recent advances and applications. In *Journal of Biomaterials Applications* (Vol. 37, Issue 8, pp. 1341–1354). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/08853282221137609>
- Jo, H., Brito, S., Kwak, B. M., Park, S., Lee, M.-G., & Bin, B.-H. (2021). Applications of Mesenchymal Stem Cells in Skin Regeneration and Rejuvenation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2410. <https://doi.org/10.3390/ijms22052410>
- Jodati, H., Yilmaz, B., & Evis, Z. (2020). A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features. *Ceramics International*, 46(10), 15725–15739. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.03.192>
- Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 440–451. <https://doi.org/10.4161/cam.36224>
- Kanaujiya, S., Arya, D., Pandey, P., Singh, S., Pandey, G., Anjum, S., Anjum, M. M., Ali, D., Alarifi, S., MR, V., Sivakumar, S., Srivastava, S., & Rajinikanth, P.

- (2024). Resveratrol-Ampicillin Dual-Drug Loaded Polyvinylpyrrolidone/Polyvinyl Alcohol Biomimic Electrospun Nanofiber Enriched with Collagen for Efficient Burn Wound Repair. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 19, 5397–5418. <https://doi.org/10.2147/IJN.S464046>
- Kang, K., Lim, D.-H., Choi, I.-H., Kang, T., Lee, K., Moon, E.-Y., Yang, Y., Lee, M.-S., & Lim, J.-S. (2011). Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles. *Toxicology Letters*, 205(3), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.1033>
- Kerschbaum, H. H., Altuğ Tasa, B., Schürz, M., Oberascher, K., & Bresgen, N. (2021). Trypan Blue - Adapting a Dye Used for Labelling Dead Cells to Visualize Pinocytosis in Viable Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 55(S1), 171–184. <https://doi.org/10.33594/000000380>
- Kesharwani, R. K., Keservani, R. K., & Sharma, A. K. (2022). *Tissue Engineering: Applications and Advancements*.
- Klein, S., Prantl, L., Vykoukal, J., Loibl, M., & Felthaus, O. (2016). Differential Effects of Coating Materials on Viability and Migration of Schwann Cells. *Materials*, 9(3), 150. <https://doi.org/10.3390/ma9030150>
- Kobsa, S., Kristofik, N. J., Sawyer, A. J., Bothwell, A. L. M., Kyriakides, T. R., & Saltzman, W. M. (2013). An electrospun scaffold integrating nucleic acid delivery for treatment of full-thickness wounds. *Biomaterials*, 34(15), 3891–3901. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.016>
- Krishani, M., Shin, W. Y., Suhaimi, H., & Sambudi, N. S. (2023). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels*, 9(2), 100. <https://doi.org/10.3390/gels9020100>
- Kumar, A., & Jacob, A. (2022). Techniques in scaffold fabrication process for tissue engineering applications: A review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 163–176. <https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100321>

- Labet, M., & Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, 38(12), 3484. <https://doi.org/10.1039/b820162p>
- Leal-Marín, S., Kern, T., Hofmann, N., Pogozhykh, O., Framme, C., Börgel, M., Figueiredo, C., Glasmacher, B., & Gryshkov, O. (2021). Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. In *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* (Vol. 109, Issue 8, pp. 1198–1215). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34782>
- Li, Y., An, S., Deng, C., & Xiao, S. (2023). Human Acellular Amniotic Membrane as Skin Substitute and Biological Scaffold: A Review of Its Preparation, Preclinical Research, and Clinical Application. *Pharmaceutics*, 15(9), 2249. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092249>
- Lin, J.-Y., Lo, K.-Y., & Sun, Y.-S. (2019). Effects of Substrate-Coating Materials on the Wound-Healing Process. *Materials*, 12(17), 2775. <https://doi.org/10.3390/ma12172775>
- Litwiniuk, M., & Grzela, T. (2014). Amniotic membrane: New concepts for an old dressing. In *Wound Repair and Regeneration* (Vol. 22, Issue 4, pp. 451–456). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/wrr.12188>
- Lopez Marquez, A., Gareis, I. E., Dias, F. J., Gerhard, C., & Lezcano, M. F. (2022a). Methods to Characterize Electrospun Scaffold Morphology: A Critical Review. *Polymers*, 14(3), 467. <https://doi.org/10.3390/polym14030467>
- Lopez Marquez, A., Gareis, I. E., Dias, F. J., Gerhard, C., & Lezcano, M. F. (2022b). Methods to Characterize Electrospun Scaffold Morphology: A Critical Review. *Polymers*, 14(3), 467. <https://doi.org/10.3390/polym14030467>
- Lotfi, Z., Khakbiz, M., Davari, N., Bonakdar, S., Mohammadi, J., Shokrgozar, M. A., & Derhambakhsh, S. (2023). Fabrication and multiscale modeling of polycaprolactone/amniotic membrane electrospun nanofiber scaffolds for wound healing. *Artificial Organs*, 47(8), 1267–1284. <https://doi.org/10.1111/aor.14518>

- Luo, Y., Hong, Y., Shen, L., Wu, F., & Lin, X. (2021). Multifunctional Role of Polyvinylpyrrolidone in Pharmaceutical Formulations. *AAPS PharmSciTech*, 22(1), 34. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01909-4>
- Majidnia, E., Ahmadian, M., Salehi, H., & Amirpour, N. (2022). Development of an electrospun poly(ϵ -caprolactone)/collagen-based human amniotic membrane powder scaffold for culturing retinal pigment epithelial cells. *Scientific Reports*, 12(1), 6469. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09957-5>
- Malhotra, C., & Jain, A. K. (2014). Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. *World Journal of Transplantation*, 4(2), 111. <https://doi.org/10.5500/wjt.v4.i2.111>
- Malikmammadov, E., Tanir, T. E., Kiziltay, A., Hasirci, V., & Hasirci, N. (2018). PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 29(7–9), 863–893. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1394711>
- Marin, E. (2023). Forged to heal: The role of metallic cellular solids in bone tissue engineering. *Materials Today Bio*, 23, 100777. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100777>
- Meamar, R., Ghasemi-Mobarakeh, L., Norouzi, M.-R., Siavash, M., Hamblin, M. R., & Fesharaki, M. (2021). Improved wound healing of diabetic foot ulcers using human placenta-derived mesenchymal stem cells in gelatin electrospun nanofibrous scaffolds plus a platelet-rich plasma gel: A randomized clinical trial. *International Immunopharmacology*, 101, 108282. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108282>
- Moghe, A. K., Hufenus, R., Hudson, S. M., & Gupta, B. S. (2009). Effect of the addition of a fugitive salt on electrospinnability of poly(ϵ -caprolactone). *Polymer*, 50(14), 3311–3318. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.04.063>
- Momesso, R. G. R. A. P., Moreno, C. S., Rogero, S. O., Rogero, J. R., Spencer, P. J., & Lugão, A. B. (2010). Radiation stability of resveratrol in immobilization on poly vinyl pyrrolidone hydrogel dressing for dermatological use. *Radiation*

Physics and Chemistry, 79(3), 283–285.
<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.08.039>

Moreira, J., Vale, A. C., & Alves, N. M. (2021). Spin-coated freestanding films for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(18), 3778–3799.
<https://doi.org/10.1039/D1TB00233C>

Mozafari, M., Sefat, F., & Atala, A. (2019). *Handbook of tissue engineering scaffolds. Volume one* (Masoud Mozafari, Ed.; First edition, Vol. 1). Elsevier Science.

Mukherjee, P., Roy, S., Ghosh, D., & Nandi, S. K. (2022). Role of animal models in biomedical research: a review. *Laboratory Animal Research*, 38(1), 18.
<https://doi.org/10.1186/s42826-022-00128-1>

Nazari, H., Heirani-Tabasi, A., Esmaeili, E., Kajbafzadeh, A.-M., Hassannejad, Z., Boroomand, S., Shahsavari Alavijeh, M. H., Mishan, M. A., Ahmadi Tafti, S. H., Warkiani, M. E., & Dadgar, N. (2022). Decellularized human amniotic membrane reinforced by MoS₂-Polycaprolactone nanofibers, a novel conductive scaffold for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(9), 1527–1539. <https://doi.org/10.1177/08853282211063289>

NeoNickel. (n.d.). *Ti 6Al-4V (Grade 5)*. Retrieved August 6, 2025, from <https://www.neonickel.com/es/alloys/all-alloys/ti-6al-4v-grade-5>

Pandey, A., Awasthi, A., & Saxena, K. K. (2020). Metallic implants with properties and latest production techniques: a review. *Advances in Materials and Processing Technologies*, 6(2), 405–440.
<https://doi.org/10.1080/2374068X.2020.1731236>

Pang, X., Zhuang, X., Tang, Z., & Chen, X. (2010). Polylactic acid (PLA): Research, development and industrialization. *Biotechnology Journal*, 5(11), 1125–1136.
<https://doi.org/10.1002/biot.201000135>

Pisani, S., Evangelista, A., Chesi, L., Croce, S., Avanzini, M. A., Dorati, R., Genta, I., Benazzo, M., Comoli, P., & Conti, B. (2025). Nanofibrous Scaffolds' Ability to

- Induce Mesenchymal Stem Cell Differentiation for Soft Tissue Regenerative Applications. *Pharmaceuticals*, 18(2), 239. <https://doi.org/10.3390/ph18020239>
- Prasad, K., Bazaka, O., Chua, M., Rochford, M., Fedrick, L., Spoor, J., Symes, R., Tieppo, M., Collins, C., Cao, A., Markwell, D., Ostrikov, K. (Ken), & Bazaka, K. (2017). Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities. *Materials*, 10(8), 884. <https://doi.org/10.3390/ma10080884>
- Pushp, P., Bhaskar, R., Kelkar, S., Sharma, N., Pathak, D., & Gupta, M. K. (2021). Plasticized poly(vinylalcohol) and poly(vinylpyrrolidone) based patches with tunable mechanical properties for cardiac tissue engineering applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(6), 2312–2325. <https://doi.org/10.1002/bit.27743>
- Rahmati, M., Pennisi, C. P., Budd, E., Mobasheri, A., & Mozafari, M. (2018). *Biomaterials for Regenerative Medicine: Historical Perspectives and Current Trends* (pp. 1–19). https://doi.org/10.1007/5584_2018_278
- Rahmati, M., Pennisi, C. P., Mobasheri, A., & Mozafari, M. (2018). *Bioengineered Scaffolds for Stem Cell Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (pp. 73–89). https://doi.org/10.1007/5584_2018_215
- Reyes-Blas, H., Olivas-Armendáriz, I., Martel-Estrada, S. A., & Valencia-Gómez, L. E. (2021). *Use of Functionalized Biomaterials with Bioactive molecules in Biomedical Engineering* [Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica]. <https://doi.org/10.17488/RMIB.40.3.9>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). *Cell Viability Assays*.
- Robles, K. N., Zahra, F. tuz, Mu, R., & Giorgio, T. (2024). Advances in Electrospun Poly(ϵ -caprolactone)-Based Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *Polymers*, 16(20), 2853. <https://doi.org/10.3390/polym16202853>
- Rodríguez-Fuentes, D. E., Fernández-Garza, L. E., Samia-Meza, J. A., Barrera-Barrera, S. A., Caplan, A. I., & Barrera-Saldaña, H. A. (2021). Mesenchymal

Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives of Medical Research*, 52(1), 93–101.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>

Rojas-Murillo, A., Lara-Arias, J., Leija-Gutiérrez, H., Franco-Márquez, R., Moncada-Saucedo, N. K., Guzmán-López, A., Vilchez-Cavazos, F., Garza-Treviño, E. N., & Simental-Mendía, M. (2024). The Combination of Decellularized Cartilage and Amniotic Membrane Matrix Enhances the Production of Extracellular Matrix Elements in Human Chondrocytes. *Coatings*, 14(9), 1083.
<https://doi.org/10.3390/coatings14091083>

S Navalagunda B, P. (2023). Bioceramic Materials: A Review. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 12(6), 1620–1625.
<https://doi.org/10.21275/SR23612172321>

S, Shiva., R G, A. Prabu., Bajaj, G., John, A. E., Chandran, S., Kumar, V. V., & Ramakrishna, S. (2023). A review on the recent applications of synthetic biopolymers in 3D printing for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 34(12), 62. <https://doi.org/10.1007/s10856-023-06765-9>

Saba, N., Jawaid, M., & Sultan, M. T. H. (2019). An overview of mechanical and physical testing of composite materials. In *Mechanical and Physical Testing of Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites* (pp. 1–12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102292-4.00001-1>

Salazar-Monsalve, L., Sterling-Castaño, D., Méndez-Vega, D. A., Otalora, M., Pineda-Amaya, W. H., Hermann, S., Muñoz-Cerón, Y., & Castellanos, J. (2024). Desarrollo embriológico e importancia clínica de la membrana amniótica. Revisión narrativa de literatura. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 89(1). <https://doi.org/10.24875/RECHOG.23000071>

Scaffaro, R., Maio, A., Sutera, F., Gulino, E., & Morreale, M. (2019). Degradation and Recycling of Films Based on Biodegradable Polymers: A Short Review. *Polymers*, 11(4), 651. <https://doi.org/10.3390/polym11040651>

- Shera, S. S., Sahu, S., & Banik, R. M. (2018). Preparation of Drug Eluting Natural Composite Scaffold Using Response Surface Methodology and Artificial Neural Network Approach. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(2), 131–143. <https://doi.org/10.1007/s13770-017-0100-z>
- Shi, X., Fujie, T., Saito, A., Takeoka, S., Hou, Y., Shu, Y., Chen, M., Wu, H., & Khademhosseini, A. (2014). Periosteum-Mimetic Structures Made from Freestanding Microgrooved Nanosheets. *Advanced Materials*, 26(20), 3290–3296. <https://doi.org/10.1002/adma.201305804>
- Shpichka, A., Butnaru, D., Bezrukov, E. A., Sukhanov, R. B., Atala, A., Burdukovskii, V., Zhang, Y., & Timashev, P. (2019). Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1203-3>
- Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R., & Rao, S. (2018). PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Molecular Biotechnology*, 60(7), 506–532. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0084-5>
- Singh, R., & Singh, D. (2012). Radiation synthesis of PVP/alginate hydrogel containing nanosilver as wound dressing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(11), 2649–2658. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4730-3>
- Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S., & Gokhale, D. V. (2019). Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *Journal of Applied Microbiology*, 127(6), 1612–1626. <https://doi.org/10.1111/jam.14290>
- Smith L, Z. (2021). *BIOFUNCTIONALISATION OF ALIGNED FIBRE SCAFFOLDS FOR ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT TISSUE ENGINEERING* Zara Smith. University Of Manchester.
- Teodorescu, M., & Bercea, M. (2015). Poly(vinylpyrrolidone) – A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 54(9), 923–943. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.979506>

- Teodorescu, M., Bercea, M., & Morariu, S. (2019). Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. *Biotechnology Advances*, 37(1), 109–131. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.008>
- Tobin, M. J., Mustoe, A. K., Nickman, S., Raquipo, T. M., Yamin, M., Posso, A. N., Karinja, S. J., Lee, B. T., & Cauley, R. P. (2025). Comparing Amniotic Membranes to Other Bioengineered Skin Substitutes in Wound Healing: A Propensity Score-Matched Analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 14(12), 4272. <https://doi.org/10.3390/jcm14124272>
- Ullah, S., & Chen, X. (2020). Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue engineering. *Applied Materials Today*, 20, 100656. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100656>
- Unalan, I., Endlein, S. J., Slavik, B., Buettner, A., Goldmann, W. H., Detsch, R., & Boccaccini, A. R. (2019). Evaluation of Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone)/Gelatin Nanofiber Mats Containing Clove Essential Oil for Antibacterial Wound Dressing. *Pharmaceutics*, 11(11), 570. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110570>
- Vaiani, L., Boccaccio, A., Uva, A. E., Palumbo, G., Piccininni, A., Guglielmi, P., Cantore, S., Santacroce, L., Charitos, I. A., & Ballini, A. (2023). Ceramic Materials for Biomedical Applications: An Overview on Properties and Fabrication Processes. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(3), 146. <https://doi.org/10.3390/jfb14030146>
- Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., Nolte, J., Phinney, D. G., & Sensebe, L. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*, 21(10), 1019–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.08.002>

- Wang, F., Cai, X., Shen, Y., & Meng, L. (2023). Cell–scaffold interactions in tissue engineering for oral and craniofacial reconstruction. *Bioactive Materials*, 23, 16–44. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.10.029>
- Xie, Y., Zhang, F., Akkus, O., & King, M. W. (2022). A collagen/PLA hybrid scaffold supports tendon-derived cell growth for tendon repair and regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110(12), 2624–2635. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35116>
- Xu, R., Fang, Y., Zhang, Z., Cao, Y., Yan, Y., Gan, L., Xu, J., & Zhou, G. (2023). Recent Advances in Biodegradable and Biocompatible Synthetic Polymers Used in Skin Wound Healing. *Materials*, 16(15), 5459. <https://doi.org/10.3390/ma16155459>
- Yang, K., Zhou, C., Fan, H., Fan, Y., Jiang, Q., Song, P., Fan, H., Chen, Y., & Zhang, X. (2017). Bio-Functional Design, Application and Trends in Metallic Biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 24. <https://doi.org/10.3390/ijms19010024>
- Zhang, Y., Sun, D., Cheng, J., Tsoi, J. K. H., & Chen, J. (2020). Mechanical and biological properties of Ti–(0–25 wt%)Nb alloys for biomedical implants application. *Regenerative Biomaterials*, 7(1), 119–127. <https://doi.org/10.1093/rb/rbz042>
- Zhang, Z., Li, W., Liu, Y., Yang, Z., Ma, L., Zhuang, H., Wang, E., Wu, C., Huan, Z., Guo, F., & Chang, J. (2021). Design of a biofluid-absorbing bioactive sandwich-structured Zn–Si bioceramic composite wound dressing for hair follicle regeneration and skin burn wound healing. *Bioactive Materials*, 6(7), 1910–1920. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.12.006>