

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FARMAZIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE FARMACIA

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Farmacia

***SCAFFOLDS MULTICAPA PREPARADOS MEDIANTE
ELECTROSPINNING PARA FAVORECER LA
CICATRIZACIÓN DE HERIDAS CRÓNICAS***

AUTORA: MARINA PÉREZ PEÑA

DIRECTORA: ROSA MARÍA HERNÁNDEZ MARTÍN

CODIRECTORA: ITXASO GARCÍA ORUE

Curso Académico: 2020/2021

ÍNDICE

Resumen

Palabras clave

Abreviaturas

1.	Introducción.....	1
2.	Objetivo.....	5
3.	Métodología	6
4.	Desarrollo.....	6
4.1.	Cicatrización de heridas agudas y crónicas.....	6
	4.1.1. Proceso normal de cicatrización.....	6
	4.1.2. Cicatrización de heridas crónicas.....	8
4.2.	Biomateriales empleados en la fabricación de scaffolds.....	9
4.3.	Electrospinning.....	12
	4.3.1. Fundamento de electrospinning.....	12
	4.3.2. Tipos de electrospinning	13
	4.3.3. Parámetros que afectan a la morfología de las fibras.....	15
4.4.	Avances e investigaciones de interés.....	17
5.	Conclusión.....	20
6.	Bibliografía.....	21

RESUMEN

La curación de las heridas es un proceso fisiológico complejo que consta de diferentes etapas, cuya finalidad es reparar el tejido dañado y recuperar la funcionalidad de la piel.

Sin embargo, las heridas crónicas son incapaces de seguir el proceso normal de cicatrización, por lo tanto, su recuperación es más lenta y costosa. Entre estas heridas se encuentran las úlceras por presión, úlceras venosas, arteriales, úlceras neoplásicas y úlceras diabéticas.

Según estudios recientes, en la actualidad, entre el 1 y el 2% de la población adulta padece heridas crónicas. Esta prevalencia es cada vez mayor consecuencia del aumento de la esperanza de vida y de enfermedades crónicas que son algunos de los factores de riesgo más importantes.

Resulta fundamental la búsqueda de terapias efectivas que favorezcan el proceso de curación de estas heridas, como son los scaffolds multicapa elaborados mediante *electrospinning* (electrohilado). Estos scaffolds constan de diversas capas que imitan la estructura nativa de la piel, con una capa exterior que ofrece protección a la herida frente a contaminantes externos y una capa interior cuya finalidad es contribuir al proceso regenerativo haciendo de soporte para que las células puedan adherirse, proliferar y diferenciarse exitosamente. El proceso de electrospinning se caracteriza por su simplicidad, versatilidad y flexibilidad y es ampliamente utilizado para fabricar scaffolds cuyas fibras tienen un tamaño comprendido entre los micrómetros y los nanómetros. En el proceso de elaboración pueden utilizarse tanto biomateriales naturales como sintéticos o una combinación de ambos para lograr unas mejores características de la estructura.

PALABRAS CLAVE: scaffolds multicapa, electrospinning, heridas crónicas, biomateriales.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS:

MEC: matriz extracelular.

3D: tridimensional.

PLA: ácido poliláctico.

PGA: ácido poliglicólico.

PCL: policaprolactona.

PLGA: ácido poli (láctico- co- glicólico).

PEG: polietilenglicol.

PVP: polividona polivinilpirrolidona.

PVA: acetato de polivinilo.

PEO: polióxido de etileno.

AC: acetato de celulosa.

TCH: clorhidrato de tetraciclina.

AS: alginato de sodio.

LbL: capa por capa (*Layer by Layer*).

PU: poliuretano.

EEP: extracto etanólico de propóleo

Gel: gelatina.

CMM: células madre mesenquimales.

Ref: referencias.

1. Introducción.

La curación de heridas es un proceso complejo y duradero que se desarrolla a lo largo de cuatro fases: homeostasis, inflamación, proliferación y remodelación tisular, en las cuales interaccionan una gran variedad de células y mediadores, dando lugar a su cicatrización. Sin embargo, hay ocasiones en las cuales el proceso se encuentra alterado y no se desarrolla de manera normal, dando lugar a lo que se conoce como úlceras o heridas crónicas. En ellas el proceso es mucho más lento y costoso de lo habitual [1,2]. Dentro de este tipo de heridas se encuentran, por ejemplo, las úlceras por presión, úlceras venosas y arteriales, úlceras neoplásicas y úlceras diabéticas [3,4].

El desarrollo de las heridas crónicas supone un gran problema tanto social como económico, debido a que son una de las principales causas de morbi-mortalidad en pacientes con diabetes, ancianos y personas que sufren enfermedades crónicas [5]. En Estados Unidos se estima que la incidencia es de más de 6 millones de personas, lo cual supone un gasto de unos 25 mil millones de dólares anuales para el sistema de atención sanitario [3]. Sin embargo, esta incidencia es cada día mayor a consecuencia del aumento de la esperanza de vida y el incremento en la incidencia de enfermedades crónicas como la diabetes, la obesidad, y trastornos vasculares, entre otras, que son un importante factor de riesgo para la aparición de úlceras [2,4]. Se ha estudiado que la prevalencia de estas heridas es alrededor del 1-2% de la población total [4].

En relación al aumento de la incidencia de las heridas crónicas, se han desarrollado una gran variedad de apósitos con el fin de proteger las heridas de posibles infecciones y a su vez, promover su cicatrización. Algunos de los apósitos más utilizados son: los apósitos tradicionales de gasa (Xeroform, Curity...), que forman un ambiente oclusivo con una retención de humedad limitada que logra una mayor tasa de reepitalización del tejido y por tanto, una cicatrización exitosa de la herida. Sin embargo, estos pueden degradarse durante el proceso de curación y a su vez, provocar más lesiones en el momento de su retirada [2]. Por otro lado, se encuentran las películas semipermeables o apósitos de baja adherencia (Cutifilm, Flexigrid, Tegaderm...) que impiden la penetración de líquidos y microorganismos responsables de infecciones y permiten la entrada de aire y vapor de agua. Son oclusivos y por lo tanto, solo son útiles en el caso de heridas no exudativas [2,6]. Por su parte, los hidrocoloides (Aquacel, Tegisorb, DuoDERM...) son impermeables al aire y son duraderos (tiempos prolongados entre cambios), son oclusivos e impermeables, por lo que no son útiles en las heridas infectadas. Los hidrogeles (Curagel, Nu-Gel SAF-gel...), al igual que los hidrocoloides, absorben el exudado. Pueden utilizarse

para mantener hidratadas heridas secas, sin embargo, hay que tener precaución ya que pueden causar sobrehidratación. Las fibras no tejidas (Tegagen, Sorbsan, Algisite...) y las espumas (Lyof foam, Tielle, Allevyn...) son capaces de absorber grandes cantidades de líquido por lo que se usan para heridas muy exudativas y con exudación moderada, respectivamente [2]. Finalmente, la ingeniería de tejidos llevó a cabo el desarrollo de sustitutos de piel que consisten en la combinación de una sustancia de origen biológico con un material que actúe de sustento para su colocación en la herida [5]. Dentro de este grupo pueden distinguirse scaffolds biodegradables, celulares o acelulares, que replazan la matriz extracelular (MEC) (Integra, Alloderm, Epifix...). Para ello, se utilizan componentes que se encuentran de manera natural en la misma (colágeno, glucosaminoglicanos o ácido hialurónico, por ejemplo) y juegan un papel fundamental en la infiltración de células de tejido circundante para que lleven a cabo sus funciones y logren la cicatrización del tejido dañado. Por otro lado, se encuentran las terapias basadas en células. En este caso se emplean scaffolds en los cuales se siembran células que son importantes en el proceso de reparación de las heridas, tales como fibroblastos o queratinocitos [5].

Tal y como se ha descrito, hay una amplia variedad de tratamientos que se utilizan en la actualidad para la curación de las heridas crónicas, sin embargo, estos solo son moderadamente efectivos. En la mayoría de ocasiones los propios tratamientos tienen costes muy elevados y además, requieren tiempos largos de hospitalización, lo que supone un coste muy elevado para el sistema sanitario y un gran impacto en la calidad de vida del paciente [5]. En muchas ocasiones las heridas persisten durante largos periodos de tiempo y el riesgo de sufrir infecciones es mucho más elevado, por lo que finalmente los tratamientos no son efectivos en estos casos [2]. Todo esto hace necesario seguir investigando para desarrollar terapias que sean más eficaces en la cicatrización de heridas crónicas [5].

La ingeniería de tejidos ha basado sus investigaciones en el desarrollo de alternativas eficaces para la regeneración de tejidos dañados con el objetivo de superar las limitaciones de los tratamientos disponibles [7,8]. Una de estas alternativas es el desarrollo de scaffolds multicapa para la cicatrización de heridas crónicas [7].

Los scaffolds son estructuras porosas que actúan como soporte para la unión, proliferación y crecimiento celular, gracias a lo cual se produce la formación de un nuevo tejido que dará lugar a la cicatrización de la herida [6]. Además, también pueden actuar como vehículos para administrar sustancias terapéuticas [9].

Estas estructuras pueden estar fabricadas a partir de polímeros naturales, sintéticos o de una combinación de los dos. Además, deben cumplir una serie de requisitos que son fundamentales. Deben ser biocompatibles y biodegradables; no inmunogénicos; tener un tamaño de poro y porosidad adecuados [10]; tener unas propiedades mecánicas que imiten a las del tejido que pretenden reparar, en este caso, la piel [7] y mantener la actividad metabólica de las células apoyando tanto el intercambio gaseoso como el aporte de nutrientes y factores de crecimiento necesarios para la cicatrización del tejido [7,9].

En cuanto a su estructura, se pueden encontrar scaffolds monocapa o multicapa, en los cuales se va a centrar esta revisión. Al contrario que los scaffolds monocapa, los multicapa son aquellos que están formados por dos o más capas con diferentes propiedades y funciones cada una.

Por un lado, los de una capa presentan bastantes carencias, ya que no pueden facilitar el cierre de la herida y al mismo tiempo ejercer su acción protectora frente a los agentes externos, que pueden causar infecciones, ni frente al estrés mecánico que empeora el proceso de cicatrización. En este aspecto, los scaffolds multicapa con una estructura tridimensional (3D) presentan muchas ventajas con respecto a los monocapa. Lo ideal es que sean al menos de dos capas, de manera que cada una de ellas pueda cumplir una función diferente. En general, la capa superior, que está en contacto con el exterior, suele ser menos porosa y más rígida. De esta manera protege la piel de los contaminantes externos y previene la posible deshidratación de la herida generando un ambiente húmedo que pueda beneficiar el intercambio de nutrientes y productos metabólicos celulares. Por su parte, la capa interna, en contacto con la herida, es porosa y tiene la posibilidad de absorber los exudados que se generan, para evitar un exceso de humedad. También imita la estructura de la MEC, actuando como soporte para promover la adhesión, proliferación, infiltración y diferenciación celular, funciones que se encuentran alteradas en el proceso de cicatrización de heridas crónicas. Además, en la mayoría de estos scaffolds pueden incluirse en su interior moléculas bioactivas o principios activos lo que aumenta la funcionalidad de las estructuras y las hace más eficaces en el proceso de curación de las heridas crónicas [11,12].

En la actualidad existen una gran variedad de técnicas para llevar a cabo la fabricación de scaffolds multicapa. Algunas de las más destacables son, por ejemplo, la técnica de electrospinning, en la cual se centrará esta revisión, aunque también se pueden utilizar la liofilización, la impresión 3D... [13].

En primer lugar, la impresión 3D, consiste en la colocación de capas sucesivas de material que finalmente formarán la estructura 3D. Esta técnica permite un gran control de la porosidad de la estructura de la matriz, la estructura y el tamaño de los poros. Es un proceso que permite la fabricación de estructuras 3D complejas y muy controladas. Sin embargo, tiene algunas limitaciones como la baja porosidad de las estructuras obtenidas o la dificultad para lograr una buena resolución [13].

La liofilización es otro método utilizado para la fabricación de scaffolds. Permite obtener scaffolds con una porosidad elevada que, junto con el tamaño de los poros (del orden de micrómetros), puede modificarse controlando diferentes parámetros del proceso, como son la presión de liofilización, la proporción de agua en la solución de polímero o la viscosidad de la emulsión. Otra de sus ventajas es que permite usar agua, evitando así el empleo de disolventes orgánicos. En cambio, el proceso requiere un gran control para poder obtener estructuras altamente homogéneas [13,14].

Otras técnicas que se pueden encontrar son: la lixiviación de partículas, separación de fases o autoensamblaje entre otras. Sin embargo, estas técnicas no permiten un control exhaustivo de la estructura interna del scaffold ni la fabricación de estructuras altamente complejas, además, en el caso del autoensamblaje, en muchas ocasiones es necesario la utilización de solventes orgánicos [13]. En la Tabla 1 puede verse un pequeño resumen de las diferentes características de procesos que pueden utilizarse para la fabricación de scaffolds [13,14,15].

El electrospinning es la técnica más utilizada para la elaboración de membranas continuas a partir de fibras poliméricas, cuyo diámetro se encuentra entre los nanómetros y los micrómetros, en función de cómo se regulen los diferentes parámetros que afectan al proceso. Se trata de un proceso bastante sencillo, rápido y económico, que consiste en la aplicación de un voltaje elevado que provoca la eyección de un chorro nanométrico de la solución polimérica desde la punta de la gota de la jeringa hasta el colector. A lo largo del trayecto el solvente de la solución se evapora y en el colector se depositan fibras sólidas ultrafinas. Este método presenta ciertas ventajas con respecto a los otros. Permite ajustar en gran medida el diámetro de las fibras de manera que se logra obtener estructuras ultrafinas que además presentan una gran similitud con la MEC. Finalmente, el electrospinning es un proceso que permite la utilización de una gran variedad de materiales para la obtención de las estructuras finales [13, 14].

Tabla 1. Diferentes métodos utilizados para la fabricación de scaffolds [13, 14, 15].

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Impresión 3D	Tamaño de poro controlado	Baja porosidad
Liofilización	Alta porosidad, sin necesidad de emplear disolventes orgánicos	Requiere mucho control del proceso para obtener estructuras adecuadas
Separación de fases	Alta porosidad	Fibras finas y poros pequeños
Autoensamblaje	Una ruta sencilla para sintetizar nanofibras multifuncionales	Introducción del solvente orgánico
Electrospinning	Proceso sencillo y morfología de fibra controlada	Poros pequeños

2. Objetivo.

El aumento de la esperanza de vida y de la incidencia de enfermedades crónicas, como la diabetes o la insuficiencia venosa, está provocando un aumento cada vez mayor de la prevalencia de aparición de heridas crónicas. Esto supone un gran problema tanto para el sistema sanitario debido al elevado coste asociado como para las personas que lo padecen y los de su alrededor ya que presentan una elevada morbi-mortalidad y disminuyen, en gran medida, la calidad de vida de los enfermos.

Es por ello, que se ha propuesto la realización de una revisión bibliográfica sobre los scaffolds multicapa preparados mediante técnicas de electrospinning, con el fin de estudiar y resumir la información principal sobre una terapia muy prometedora para favorecer el proceso de cicatrización de las úlceras.

Para ello se han propuesto como objetivos específicos:

- Estudio de los diferentes polímeros más comúnmente utilizados para la elaboración de estos materiales.
- Explicar de manera específica el proceso de electrospinning y los parámetros que pueden afectar a la estructura final de las fibras.
- Hacer mención de algunos artículos de investigación que se han desarrollado en los últimos años con novedades en la síntesis de scaffolds multicapa obtenidos mediante electrospinning.

3. Metodología.

Con el fin de desarrollar los diferentes objetivos planteados en el punto anterior se llevó a cabo una revisión bibliográfica de diferentes artículos científicos en bases de datos como PubMed o Google Scholar. Para realizar la búsqueda se utilizaron diferentes términos y su combinación, tales como: “chronic wound healing”, “electrospinning”, “scaffolds multilayer” utilizando “AND” y “OR” como métodos inclusivos o restrictivos de los diferentes artículos. La búsqueda se ha realizado en inglés.

4. Desarrollo.

4.1. Cicatrización de heridas agudas y crónicas.

4.1.1 Proceso normal de cicatrización.

El proceso natural de curación de heridas transcurre de manera dinámica y altamente organizada a través de una serie de fases que finalmente logran la restauración de la estructura anatómica y funcional de la piel [10]. En la figura 1 se encuentran representadas todas las etapas descritas a continuación [16].

En primer lugar, inmediatamente después de producirse la lesión, se produce la hemostasia. En esta fase se produce la contracción de los vasos sanguíneos y la formación de un coágulo que, principalmente, taponar la herida evitando la pérdida excesiva de sangre, pero también actúa formando una matriz provisional de fibrina que sirve como estructura para la infiltración celular y evita la invasión bacteriana. Las plaquetas son las protagonistas de esta etapa, ya que además de lo mencionado anteriormente, son esenciales para llevar a cabo el reclutamiento de células del sistema inmunológico, en el lugar de la lesión, que llevarán a cabo la fase inflamatoria. Al final de esta etapa, la cascada de coagulación se detiene evitando el desarrollo de una trombosis excesiva [16,17].

Aproximadamente un día después, se desarrolla la fase inflamatoria que ocasiona rojez e hinchazón en la zona [7]. En esta etapa, los neutrófilos y macrófagos, células inflamatorias que han sido reclutados en la lesión gracias a la liberación de factores de crecimiento y quimiocinas proinflamatorias por parte de las plaquetas; a las señales quimiotácticas liberadas por el tejido necrosado y a los productos de degradación bacteriana, se encargan de fagocitar los desechos celulares y los patógenos que hay en

la herida. Además, secretan mediadores que estimulan la quimiotaxis de las células que se encargan de llevar a cabo la etapa de proliferación [10, 17]

Posteriormente, entre los dos y diez días posteriores a la lesión, se desarrolla la fase de proliferación [17], a través de la cual se forman tejidos y vasos sanguíneos nuevos que contribuirán al cierre de la herida [7]. Esta etapa tiene lugar a través de la migración de los diferentes tipos celulares que se encargan de reepitalizar la zona, de depositar MEC provisional y llevar a cabo el proceso de angiogénesis. Estos tipos celulares son: queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales [10].

Por un lado, los queratinocitos serán los encargados de reformar la capa epidérmica, proceso que se conoce con el nombre de reepitelización. Durante este proceso también se induce la proliferación de células madre cuya función será satisfacer las necesidades celulares para llevar a cabo el cierre de la herida [16].

Al mismo tiempo, los fibroblastos se encargan de reemplazar la matriz provisional de fibrina por un tejido de granulación [16], tejido conectivo poco diferenciado y muy vascularizado [17], que actúa como andamio para la migración y diferenciación de las células encargadas de la formación de nuevos vasos sanguíneos y la deposición de la MEC definitiva en la siguiente etapa [16].

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos gracias a las células endoteliales. Los macrófagos juegan un importante papel en esta fase debido a que producen proteasas que degradan la red de fibrina y liberan factores quimiotácticos que impulsan la migración de las células endoteliales a la zona. De esta manera se consigue satisfacer las demandas metabólicas del tejido proliferante que es mayor de lo habitual como consecuencia de la gran actividad metabólica de las células durante el proceso [16].

Finalmente, ocurre la fase de remodelación o maduración de los tejidos. Tiene lugar desde tres semanas tras producirse la herida hasta, aproximadamente, un año. Los fibroblastos son los principales responsables de esta etapa en la cual, el tejido de granulación se sustituye por una MEC madura rica en colágeno tipo I y otras proteínas [17]. Durante la fase de proliferación, los fibroblastos secretan, sobre todo, colágeno tipo III, sin embargo, a medida que progresa el proceso de cicatrización este se va sustituyendo por colágeno I, el mayoritario en piel adulta sana [16]. Además, se produce el cese de los procesos que se han ido desarrollando en las etapas anteriores (reclutamiento de células del sistema inmunológico, proliferación y migración celular, reepitalización, angiogénesis,

deposición de MEC) y la apoptosis o reubicación de los diferentes tipos celulares, como macrófagos, células endoteliales y fibroblastos [17].

Según como se desarrolle la etapa de maduración pueden diferenciarse dos procesos: reparación y regeneración de la herida. En el primer caso se produce un reordenamiento de la MEC de las células diferente al propio de la piel sana, que dará lugar al cierre de la herida y algunos casos dejando una cicatriz bastante extensa y pérdida de algunas funciones biológicas, como la movilidad. Por el contrario, en el segundo caso se restaura la MEC de manera similar al momento previo de la lesión [7].

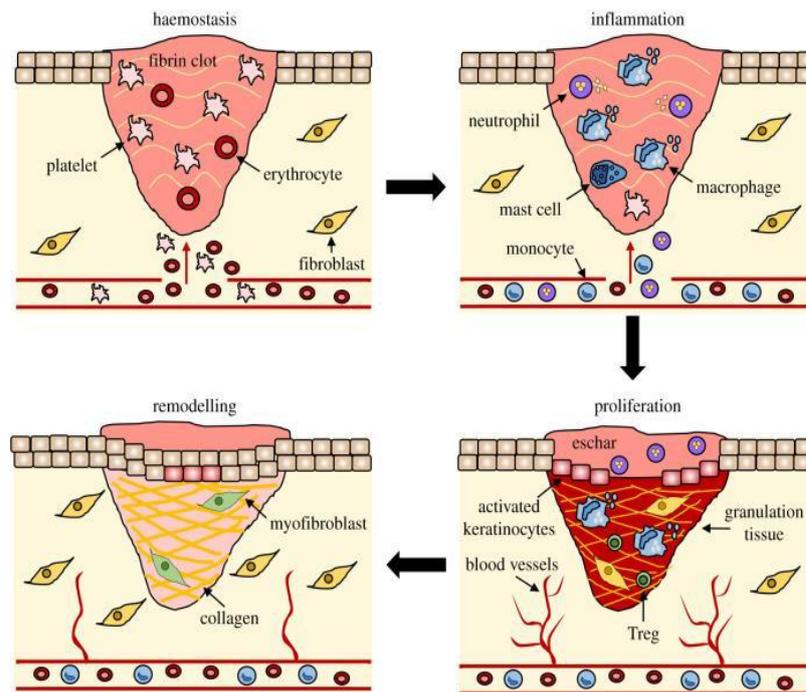


Figura 1. Etapas que transcurren durante el proceso normal de cicatrización de heridas. Obtenida de Wilkinson et al. (2020) [16].

4.1.2 Cicatrización de heridas crónicas.

Al contrario que en las heridas agudas, en las úlceras el proceso de cicatrización se encuentra alterado y no transcurre de manera ordenada [17].

Hay diferentes factores que favorecen que se produzca este fallo del proceso. En este caso, los elementos celulares, moleculares y bioquímicos son inusuales y esto hace que haya un estado de inflamación persistente en el tiempo que deriva en una difícil cicatrización consecuencia de una destrucción continua del tejido, la inhibición de la migración de fibroblastos, de la síntesis de MEC y la disminución de células madre [10].

Por otro lado, las células inmunitarias presentan una función de defensa alterada, lo que junto con el aumento de la vulnerabilidad de las heridas crónicas a las infecciones contribuye a la formación de biopelículas [17] que deriva en una infección crónica y contribuye al estado inflamatorio que dificulta la reparación del tejido [16].

Además, la senescencia o envejecimiento celular que puede existir en estos casos [16], implica una disminución en el potencial proliferativo de las células [18], éstas además, adquieren un fenotipo hipersecretor que produce una secreción excesiva de citocinas proinflamatorias y proteasas que destruyen el tejido; degradan los componentes de la MEC y contribuyen a la persistencia del estado inflamatorio inflamación [16]. En el caso de los fibroblastos, su tasa de migración y proliferación se encuentra disminuida y, así como la su síntesis de colágeno, lo que deriva en una inhibición en la deposición de MEC madura. Por otro lado, la migración de los queratinocitos está inhibida y no pueden cerrar la herida, sin embargo, son hiperproliferativos y en los bordes de la lesión forman una gruesa capa hiperqueratósica y paraqueratósica, es decir, con un engrosamiento y una queratinización anormal de la capa externa de la piel en esa zona [10, 16].

4.2. Biomateriales empleados en la fabricación de Scaffolds.

Los biomateriales empleados para la fabricación de scaffolds pueden ser de origen natural, sintético o incluso una combinación de ambos. El biomaterial ideal debe tener una serie de características. Por un lado debe ser biocompatible y biodegradable, además, que tenga similitud con la estructura natural de la MEC será una ventaja añadida. Por otro lado, deberá poseer unas propiedades mecánicas adecuadas, unas características de degradación controladas y una baja inmunogenicidad. Todas estas características se logran gracias a la combinación de diferentes tipos de polímeros [7,19].

Los polímeros de origen natural ofrecen buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y un gran parecido con la MEC natural, lo cual es muy útil para el desarrollo de scaffolds con aplicaciones biomédicas, como es el caso de la cicatrización de las heridas crónicas. Además, tienen lugares de unión celular y estimulan la cicatrización reparando el tejido que ha sido dañado y promoviendo una regeneración cutánea eficaz. Sin embargo, en muchas ocasiones presentan una elevada inmunogenicidad y tienen peores propiedades mecánicas en comparación con los polímeros sintéticos [20, 21].

Estos polímeros pueden ser tanto de naturaleza proteica como carbohidratos. Por un lado, las proteínas más destacadas para este uso son: el colágeno, la gelatina, la elastina, la fibroína de seda y el ácido hialurónico. Sin embargo, como la queratina, la albúmina de

suero bovino o las proteínas de membrana de la cáscara de huevo que han demostrado eficacia en la regeneración de tejido cutáneo [21]. Por su parte, los carbohidratos de origen natural más utilizados son el dextrano, acetato de celulosa y quitosano [20]. En la tabla 2 pueden encontrarse resumidas las diferentes ventajas y desventajas de algunos de estos polímeros naturales [22,23].

Los biomateriales sintéticos, pueden ser biodegradables o no. Los biodegradables son los más empleados para aplicaciones biomédicas y dentro de ellos, los más utilizados son los poliésteres hidrófobos tales como: ácido poliláctico (PLA), poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL) y sus combinaciones, entre las que destaca el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Dentro de los polímeros sintéticos biodegradables que pueden usarse para la elaboración de scaffolds con fines biomédicos, también se encuentran los de naturaleza hidrófila, como por ejemplo, poliuretano, polidioxanona, alcohol polivinílico y otros derivados [7,20,21]. Presentan numerosas ventajas entre las que se puede destacar la posibilidad de desarrollar estructuras con una gran variedad de propiedades y una uniformidad predecible, gracias a la capacidad de adaptación de estos polímeros. Además, son más baratos, y la fuente de obtención de estas materias es más segura que la de los de origen natural [20]. También son biocompatibles, cuentan con una alta resistencia mecánica, son flexibles y fáciles de procesar [7,21]. En la tabla 2 pueden verse de manera más específica las ventajas y desventajas de alguno de estos polímeros [22,23].

Otra opción es el uso de mezclas de polímeros, que pueden estar elaborados a partir de una combinación de polímeros naturales, sintéticos, o ambos. Estos pueden generar nuevas estructuras con unas características mejoradas gracias a las ventajas otorgadas por cada polímero [20].

Por un lado, al combinar polímeros naturales, cada uno aporta su bioactividad a la mezcla, logrando un scaffold que reúne distintas maneras de acelerar el proceso de cicatrización [20].

En cuanto al uso de copolímeros sintéticos, además de la mejora de las propiedades físicas o mecánicas, se ha comprobado que a través de la combinación de polímeros sintéticos hidrófobos (aportan buenas propiedades mecánicas) e hidrófilos (aumentan la afinidad celular) se consigue la elaboración de estructuras que pueden utilizarse para la liberación prolongada de fármacos. En la tabla 2 se encuentran las ventajas y desventajas del PLGA, uno de los copolímeros usados para la síntesis de scaffolds para cicatrización de heridas crónicas [20].

Finalmente, la existencia de scaffolds elaborados a partir de una combinación de biopolímeros naturales y sintéticos logra afrontar ciertos inconvenientes que se presentan usando cada uno de ellos por separado. Por un lado, los de origen natural aportan a la estructura mayor afinidad celular y en la mayoría de los casos, funciones biológicas que aceleraran el cierre de la herida y la regeneración del tejido dañado, mejorando de esta manera las propiedades biológicas. Por su parte, los materiales sintéticos le aportarán al scaffold mayor resistencia, flexibilidad y facilidad de procesamiento, logrando unas propiedades físicas mejoradas [20,21].

Tabla 2. Principales ventajas y desventajas de los polímeros más empleados en la síntesis de scaffolds con aplicaciones en la ingeniería de tejidos de la piel [21,22,23].

POLÍMEROS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Naturales		
Colágeno	Baja antigenicidad, biocompatible y biodegradable Promueve la proliferación y la adhesión celular	Rápida degradación Poca resistencia mecánica Caro
Gelatina	No antigénico, biocompatible y biodegradable Permite una mayor adhesión celular Bajo coste	Resistencia mecánica baja Inestabilidad física y térmica
Fibroína de seda	Biocompatible y baja inmunogenicidad Buenas propiedades mecánicas y tasa de degradación controlable Buena permeabilidad al vapor de agua y oxígeno Promueve la adhesión y proliferación de queratinocitos y fibroblastos	Coste elevado
Ácido hialurónico	Biocompatible Buena resistencia mecánica Estimula la migración, diferenciación y proliferación celular, y regula el metabolismo y la organización de la MEC Mantiene la hidratación de la piel, la elasticidad y humedad	Alta viscosidad a concentraciones bajas Rápida degradación enzimática
Quitosano	Baja antigenicidad, biocompatible y biodegradable Actividad antimicrobiana y antioxidante Promueve la migración y proliferación de fibroblastos y mejora la infiltración de células inflamatorias Coagulación sanguínea natural	Baja solubilidad Tasa de degradación lenta e incontrolable
Alginato de sodio	No antigénico, biocompatible, biodegradable y baja toxicidad Bajo coste Activación de macrófagos Aumenta los niveles de citocinas en heridas	Falta de sitios de reconocimiento celular y propiedades biológicas bajas Poca resistencia mecánica

Sintéticos		
PLA	Rigidez mecánica controlable, correcta tasa de degradación y fácil procesabilidad Estabilidad térmica	Fragilidad mecánica Baja tasa de cristalización
PLGA	Rigidez mecánica controlable, fácil procesabilidad y correcta tasa de degradación Grado de humectación ajustable Solubilidad en disolventes comunes	Baja ductilidad Baja eficiencia de carga de fármaco Alto coste de síntesis Baja afinidad celular
PCL	Rigidez mecánica controlable, fácil procesabilidad Durabilidad a largo plazo	Baja resistencia mecánica y tasa de degradación lenta
PEG	Alta biocompatibilidad Sensibilidad a diferentes estímulos físicos y químicos Solubilidad en agua y en variedad de disolventes orgánicos	No biodegradable Posibilidad de causar alergia por contacto
PVA	Biodegradable Permeable a los gases Bajo coste Mantiene un ambiente húmedo y es permeable a los gases	Carece de señales biofuncionales
PVP	Bajo coste Almacena grandes cantidades de agua sin perder su integridad mecánica	No es biodegradable Debilidad mecánica y baja estabilidad térmica

4.3. Electrospinning.

4.3.1 Fundamento de electrospinning.

El electrospinning es un método ampliamente utilizado para la fabricación de scaffolds cuyas fibras tienen un tamaño micrométrico o nanométrico [23], gracias a su simplicidad, versatilidad y flexibilidad [24]. Estas fibras se caracterizan por tener una buena relación superficie-volumen, lo que garantiza una buena interacción entre las células y el material, y promueve una hemostasia rápida. Además, promueven las actividades celulares necesarias para que se lleve a cabo el proceso de cicatrización de la herida debido a que imitan la estructura natural de la MEC [19,23].

Para llevar a cabo el proceso de electrospinning, se necesita una aguja conectada a una fuente de alimentación de alto voltaje, una jeringa que se encargará de suministrar el material y un colector que se encargará de la recogida de las fibras [25,26]. En la figura 2 están recogidos todos estos elementos [27].

En primer lugar, se carga la jeringa con la solución del polímero, y se presiona el émbolo (normalmente mediante una bomba) hasta que se forme una gota colgante en la aguja. Debido al voltaje aplicado a través de la fuente de alimentación, ocurre una repulsión entre las cargas superficiales, haciendo que la gota se deforme y de lugar a lo que se conoce como cono de Taylor. De este cono sale un chorro que se extiende hacia el colector en forma de línea recta y, como consecuencia del voltaje eléctrico, pasa por una etapa de inestabilidad de flexión, de manera que a medida que se estira, se agita y se va haciendo cada vez más fino. A su vez, el disolvente se evapora, solidificando el chorro y dando lugar a las finas fibras sólidas que se depositarán en el colector [15,25,26]. En la figura 2 puede verse representado el esquema general del proceso de electrospinning [27].

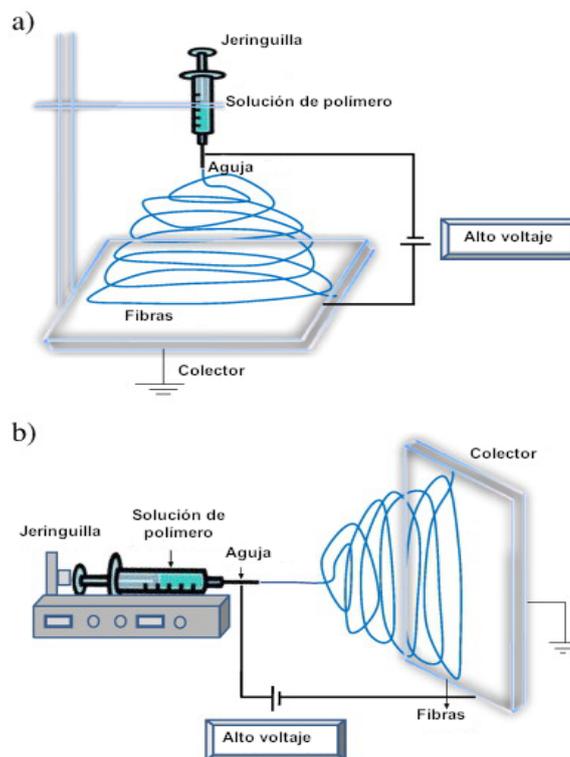


Figura 2. Representación de los diferentes elementos básicos que son necesarios en el proceso de electrospinning y esquema del proceso. El montaje puede encontrarse tanto en vertical (a) como en horizontal (b). Obtenida de Bhardwaj et al. (2010) [27].

4.3.2 Tipos de electrospinning.

Utilizando el método de electrospinning pueden obtenerse scaffolds 3D que imiten la estructura tridimensional de la piel utilizando diferentes vías. Esto aparece representado en la figura 3 [28].

En la figura 3a se muestra el proceso de electrospinning multicapa, en el cual se utilizan diferentes polímeros. Cada uno se electrohilará de manera individual para que sus fibras formen una capa, y todas las capas se recogerán de manera secuencial en el mismo colector [28]. De esta manera, obtendremos un scaffold compuesto por capas con diferentes composiciones, para que cada una de ellas cumpla diferentes funciones [20].

El proceso esquematizado en la figura 3b se trata de un proceso llevado a cabo tras el electrospinning en el cual se enrollan o apilan las diferentes capas 2D de fibras hasta formar una estructura fibrosa tridimensional [28].

En el caso de la figura 3c, los scaffolds se consiguen simplemente utilizando un colector de recolección 3D en lugar del colector plano 2D que se usa generalmente. Estos colectores de recolección 3D pueden ser, por ejemplo, un colector mecánico [28].

Finalmente, se ha estudiado la posibilidad de construir estructuras fibrosas 3D sin la necesidad de un proceso posterior al electrospinning. Esto se consigue controlando y modificando los diferentes parámetros del proceso, como la concentración o la viscosidad de la solución, el campo eléctrico o modificando parámetros ambientales como la humedad. De este modo durante el electrospinning se logra un crecimiento o autoensamblaje de las estructuras fibrosas 3D [28].

En la figura 3d, aparece representada una estructura fibrosa 3D con forma esponjiforme que se obtiene mediante el proceso de electrospinning con diferentes modificaciones de sus parámetros [28].

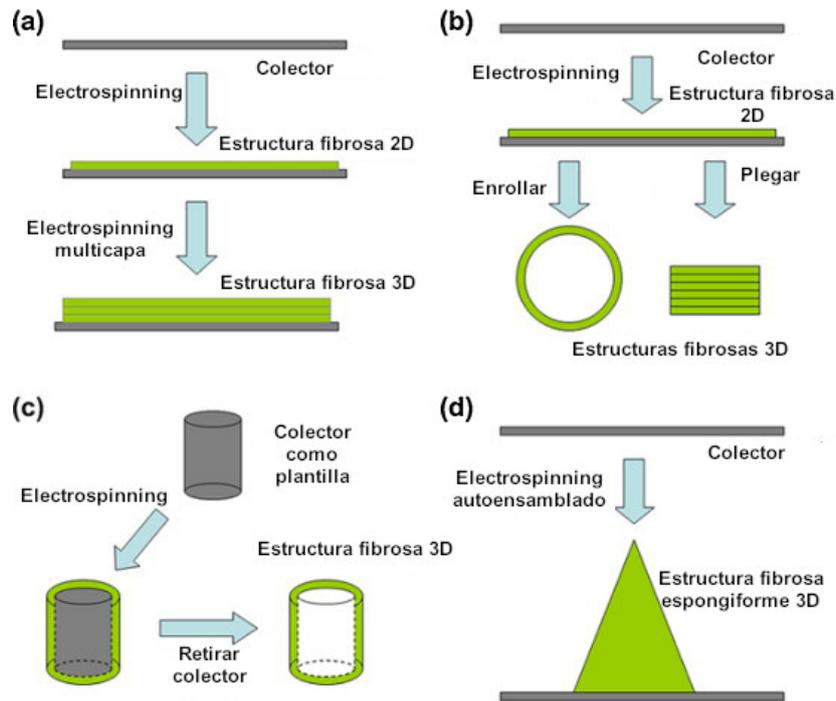


Figura 3. Comparativa de cuatro tipos de electrospinning y los diferentes tipos de scaffolds obtenidos de cada uno de ellos: (a) electrospinning multicapa; (b) enrollar o apilar fibras 2D; (c) plantilla de recolección 3D y (4) crecimiento o autoensamblaje durante el proceso de electrospinning modificando diferentes parámetros. Obtenida de Sun et al. (2014) [28].

4.3.3 Parámetros que afectan a la morfología de las fibras.

Existen diferentes variables que pueden modificarse en función de los resultados buscados, todos ellos se encuentran esquematizados en la tabla 4.

En primer lugar, se encuentran las variables directamente relacionadas con el proceso de electrospinning, como son: voltaje aplicado, distancia entre el colector y la punta de la aguja, diámetro interior de la aguja, caudal/velocidad de flujo y tipo de colector [15,29,30,31]

En segundo lugar, se encuentran los parámetros que afectan a la solución, que son principalmente: concentración de polímero, volatilidad y conductividad del solvente, además de la tensión superficial y la viscosidad de la solución [27,30].

Finalmente, los parámetros ambientales, como la temperatura o la humedad, también pueden afectar a la morfología de las fibras [15].

Tabla 3. Efectos de los diferentes parámetros del proceso de electrospinning sobre la morfología final de las fibras.

Parámetros	Efecto sobre la morfología de la fibra	Ref.
Parámetros de procesamiento		
Voltaje aplicado	Aumenta o disminuye el diámetro según distintos autores. Existe un rango óptimo para cada tipo de polímero	[15,28,29,30]
Distancia	Aumenta o disminuye el diámetro según distintos autores. Distancia mínima requerida para fibras uniformes	[15,26,30,31]
Diámetro de la aguja	A medida que aumenta, también lo hace ligeramente el diámetro de las fibras	[31]
Caudal/ Velocidad de flujo	Aumento del diámetro de la fibra y del tamaño de los poros con el aumento del caudal. Generación de perlas con un caudal demasiado alto	[26,30]
Colector	Los colectores más utilizados son mallas de cobre, papel de aluminio, agua y papel. La configuración del colector puede dar fibras con orientación aleatoria (placa estacionaria) o fibras alineadas (colector giratorio).	[15,30]
Parámetros de la solución		
Concentración de polímero	Aumento del diámetro de la fibra con aumento de la concentración. Cada polímero tendrá un rango de concentraciones óptimo.	[32]
Volatilidad	El solvente debe presentar una volatilidad adecuada. Una volatilidad excesiva forma fibras con una alta densidad de poros y una volatilidad baja forma fibras sin poros.	[30]
Conductividad	El diámetro de las fibras disminuye con la conductividad.	[30]
Viscosidad	El diámetro de las fibras aumenta con la viscosidad. A viscosidades bajas o elevadas no se forman las fibras.	[27,32]
Parámetros ambientales		
Humedad	A medida que aumenta se forman fibras más delgadas.	[27]
Temperatura	El diámetro de las fibras disminuye a mayor temperatura.	[27]

4.4. Avances e investigaciones de interés.

La técnica de electrospinning se utiliza principalmente para la fabricación de estructuras bidimensionales (2D), por ello, para obtener las estructuras tridimensionales (3D) o scaffolds multicapa analizados en esta revisión se deben realizar modificaciones estructurales de las fibras obtenidas tras el proceso de electrospinning. En este aspecto, Reis y colaboradores (2016) llevaron a cabo un estudio sobre la combinación de la técnica de electrospinning con el ensamblaje “Layer by Layer” (LbL) [33]. El ensamblaje LbL se trata de una técnica bastante simple que permite la incorporación de materiales sobre la superficie de estructuras poliméricas ultrafinas mediante la adsorción secuencial de moléculas multivalentes complementarias, que se produce a través de interacciones electrostáticas o no electrostáticas [34]. Con la combinación de estos dos procesos, i.e. el electrospinning y el ensamblaje LbL, se han conseguido scaffolds 3D multicapa mejorados que cuentan con varias ventajas: impermeabilidad a fuentes de infección líquidas externas, tales como el sudor; absorción del exudado de la herida gracias a su estructura interna; y el mantenimiento del grado de humedad equilibrado para generar las condiciones idóneas para la cicatrización de la herida. Además, la funcionalización de estas estructuras tridimensionales gracias a la técnica LbL proporciona un medio que modula la interacción superficie-tejido logrando así su retirada sin dolor pero manteniendo a su vez la liberación continua de fármacos para la cicatrización de la herida. El polímero utilizado en este estudio fue el PCL y posteriormente, se añadió quitosano y ácido hialurónico a través de un equipo LbL. El quitosano actúa como agente antimicrobiano, procoagulante y por su actividad en la proliferación celular; y el ácido hialurónico, que cuenta con una elevada biocompatibilidad, tiene un papel fundamental en la MEC, favoreciendo la proliferación y la migración celular. En este estudio se comprobó que la herida se cierra más rápido con las estructuras recubiertas de quitosano y ácido hialurónico en comparación con el empleo de los mismos scaffolds de PCL sin dicho recubrimiento [33].

En estudios recientes, se ha dado importancia al potencial curativo de diferentes proteínas que se encuentran de manera natural en la MEC y por tanto, al uso de apósitos constituidos por dichos compuestos como una estrategia interesante para el tratamiento de heridas crónicas infectadas. Una de las proteínas en las que se centró la atención fue el colágeno, que tiene un papel muy importante en la regeneración del tejido, ya que estabiliza los componentes vasculares y celulares de la lesión [35].

Relacionado con el colágeno, Vonbrunn et al. (2020) llevaron a cabo un estudio en el que compararon la idoneidad para mantener células madre mesenquimales (CMM) en el

lecho de la herida de un scaffold bicapa, elaborado a base de los polímeros sintéticos PCL y PLA (PCL/PLA), con respecto a un scaffold elaborado a base de polímeros naturales, colágeno y elastina, como es el Matriderm, disponible comercialmente. La estructura de PCL y PLA se desarrolló a partir de un equipo de electrospinning personalizado con un colector giratorio, que daría lugar a estructuras bicapa. La capa celular (portadora de las CMM) se encuentra en contacto con la herida, de manera que contribuye de manera activa a la cicatrización y en la parte externa se encuentra una capa densa que actúa como barrera, protegiendo a la herida y a las células de la capa basal. En este estudio se descubrió que, aunque ambas estructuras eran buenas portadoras de las CMM, células que contribuyen al cierre acelerado de la herida, el scaffold de PCL/PLA presentó mejor rendimiento en los experimentos llevados a cabo en modelos animales de ratón [36].

Trinca y colaboradores (2017) desarrollaron un scaffold bicapa a partir de PCL y quitosano mediante electrospinning. La capa exterior estaba formada por PCL o una mezcla de PCL con acetato de celulosa (AC), actuando como soporte mecánico, y la capa interior por quitosano y mezcla de polióxido de etileno (PEO), en contacto directo con la herida. En este caso, el proceso llevado a cabo para formar las capas fue el siguiente: en primer lugar se realizó el proceso de electrospinning para formar las fibras del scaffold de PCL y PCL con AC y en segundo lugar, sobre el anterior se electrohiló la solución de quitosano y PEO. Los resultados obtenidos en el estudio muestran el desarrollo de scaffolds que cumplen con los requisitos para usarse en el proceso de cicatrización de heridas: no presentan citotoxicidad, la capa en contacto con la piel presenta una adhesión limitada a la herida y las propiedades mecánicas son las adecuadas incluso en el tratamiento de heridas exudativas. Otras de las ventajas que presentan estos scaffolds es la capacidad de mejorar su rendimiento pudiendo incorporar en su interior diferentes principios activos o moléculas bioactivas que ayuden en el proceso de cicatrización de la herida [37].

Posteriormente, Dodero y colaboradores (2020) desarrollaron mediante electrospinning scaffolds a base de alginato con nanopartículas de ZnO y evaluaron las actividades de estos compuestos. Comprobaron que el alginato era capaz de eliminar los exudados de la herida, prevenir la proliferación de las bacterias, y proporcionar el ambiente ideal para que se produzca el proceso de regeneración del tejido y consecuentemente, el cierre de la herida, mientras que las nanopartículas de ZnO tenían importantes propiedades antibacterianas [38]. Sin embargo, se encontraron ciertas limitaciones, los scaffolds obtenidos absorbían demasiado agua y no adquirían el grosor suficiente para proteger la herida. Por lo que en un estudio posterior llevado a cabo también por Dodero

et al. (2020) desarrollaron por primera vez un scaffold multicapa mediante electrospinning compuesto por una capa externa de PCL y una interna de alginato de sodio (AS) (PCL-AS) con nanopartículas de ZnO. Nuevamente, la capa de PCL confiere a la estructura las propiedades mecánicas idóneas, propiedades hidrófobas que otorgan una gran protección frente a posibles agentes externos, entre otras características ya mencionadas de dicho polímero. Adicionalmente, el scaffold PCL-AS con nanopartículas de ZnO presenta una gran capacidad de liberación de fármacos, lo que añadido a las ventajas anteriores, lo convierte en una alternativa muy eficaz para el tratamiento de heridas crónicas de la piel, como las úlceras diabéticas y para las heridas provocadas por daños traumáticos [39].

Por su parte, Eskandarinia y colaboradores (2020) elaboraron un scaffold bicapa compuesto por una capa densa de poliuretano y extracto etanólico de propóleo (PU/EEP) elaborada a través de la técnica de moldeo por solvente, y otra capa de PCL y gelatina (PCL/Gel) elaborada mediante la técnica de electrospinning sobre la otra capa, preparada previamente (scaffold PU/EEP-PCL/Gel). En el estudio se comprobó las buenas propiedades mecánicas, de biodegradabilidad y biocompatibilidad del scaffold para ser empleado como apósito para heridas. La capa superior de PU/EEP aporta a la estructura actividad antimicrobiana contra las bacterias más comunes en infecciones de heridas. Finalmente, en los estudios llevados a cabo en animales, donde se compara el scaffold estudiado, con un grupo control sin tratamiento y otro grupo que es tratado con scaffolds elaborados únicamente a partir de PU y EEP, se observa que el scaffold bicapa (PU/EEP-PCL/Gel), acelera de manera significativa el proceso de cicatrización de la herida, lo que muestra que este scaffold puede ser una alternativa prometedora [12]. Esto puede apreciarse en la figura 4 [12].

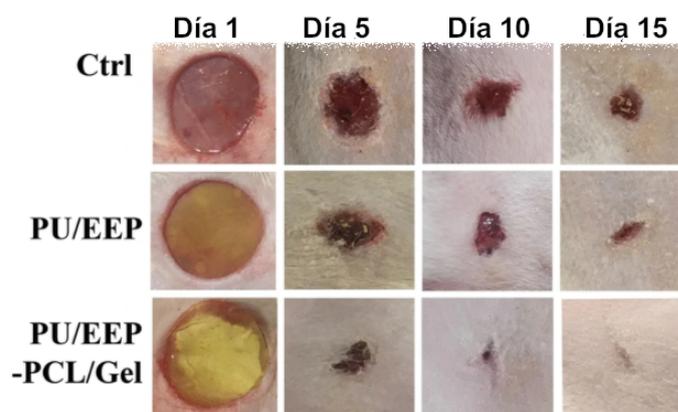


Figura 4. Fotografías macroscópicas de las heridas en puntos de tiempo definidos (1^{er}, 5^o, 10^o y 15^o día tras la creación de la herida) para mostrar la progresión del cierre de la herida en diferentes grupos: Control (Ctrl), PU / EEP y PU / EEP-PCL /Gel). Obtenida de Eskandarinia et al. (2020) [12].

5. Conclusión.

El número de personas afectadas por heridas crónicas está en auge, debido en gran medida al envejecimiento de la sociedad y al aumento de enfermedades crónicas asociadas a la aparición de estas heridas. De hecho, se estima que el 25 % de personas con diabetes sufren heridas crónicas. [2]. Esto supone un gran problema para el sistema sanitario y para los pacientes, dada la tasa de morbi-mortalidad de esta enfermedad.

La ingeniería de tejidos en su búsqueda para encontrar alternativas que superen las limitaciones que presentan los tratamientos para la cicatrización de heridas crónicas, ha desarrollado scaffolds multicapa formados por al menos dos capas, una exterior que proteja la herida de los posibles contaminantes externos que puedan desarrollar una infección y retrasar aún más el cierre de la lesión y otra capa interior, en contacto con la herida, que estimule el proceso de migración, proliferación y diferenciación celular [21]. Además, en muchos de los casos, puede incluirse en su interior principios activos ya que estas estructuras son capaces de producir su liberación controlada y con ello aumentar la funcionalidad de los scaffolds en el proceso de curación de las heridas.

Uno de los métodos más eficaces, por su coste, sencillez y flexibilidad en cuanto al uso de diferentes polímeros, es el electrospinning, cuyo proceso lleva a la formación de fibras con un diámetro micrométrico y nanométrico.

El scaffold multicapa ideal debe presentar una serie de características como son: buenas propiedades mecánicas, semejanza estructural con la MEC, capacidad de participar de manera activa en el proceso de cicatrización y presentar una tasa de degradación controlable. Además de ser biodegradable, biocompatible y resistente. Todas estas características están determinadas, en gran medida, por los biomateriales empleados en su fabricación, que pueden ser tanto de origen sintético como natural. Sin embargo, se ha visto que el empleo de copolímeros, y sobre todo, de mezclas de diferentes polímeros, y variando las proporciones de cada uno de ellos, se pueden obtener estructuras con las propiedades más adecuadas para la cicatrización de heridas crónicas. Además, las modificaciones en los diferentes parámetros del proceso de fabricación también van a permitir modificar la longitud, el diámetro y el grado de porosidad de las fibras obtenidas, y por tanto, las propiedades y la funcionalidad final del scaffold.

En los últimos años, estas estructuras están adquiriendo especial importancia gracias a los resultados prometedores que están demostrando en los estudios realizados,

suponiendo una alternativa muy eficaz para combatir el gran problema de las úlceras crónicas.

6. Bibliografía.

1. Liu C, Teo MHY, Pek SLT, Wu X, Leong ML, Tay HM, et al. A Multifunctional Role of Leucine-Rich α -2-Glycoprotein 1 in Cutaneous Wound Healing Under Normal and Diabetic Conditions. *Diabetes* 2020 Nov;69(11):2467-2480. doi: [10.2337/db20-0585](https://doi.org/10.2337/db20-0585)
2. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther* 2017 Mar;34(3):599-610. doi: [10.1007/s12325-017-0478-y](https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y)
3. Chen L, Cheng L, Gao W, Chen D, Wang C, Ran X. Telemedicine in Chronic Wound Management: Systematic Review And Meta-Analysis. *JMIR Mhealth Uhealth* 2020 Jun 25;8(6):e15574. doi: [10.2196/15574](https://doi.org/10.2196/15574)
4. Groppa E, Colliva A, Vuerich R, Kocijan T, Zacchigna S. Immune Cell Therapies to Improve Regeneration and Revascularization of Non-Healing Wounds. *Int J Mol Sci* 2020 Jul 23;21(15):5235. doi: [10.3390/ijms21155235](https://doi.org/10.3390/ijms21155235)
5. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev* 2019 Jan 1;99(1):665-706. doi: [10.1152/physrev.00067.2017](https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017)
6. Rahmani Del Bakhshayesh A, Annabi N, Khalilov R, Akbarzadeh A, Samiei M, Alizadeh E, et al. Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018 Jun;46(4):691-705. doi: [10.1080 / 21691401.2017.1349778](https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1349778)
7. Urciuolo F, Casale C, Imperato G, Netti PA. Bioengineered Skin Substitutes: the Role of Extracellular Matrix and Vascularization in the Healing of Deep Wounds. *J Clin Med* 2019 Dec 1;8(12):2083. doi: [10.3390 / jcm8122083](https://doi.org/10.3390/jcm8122083)
8. Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2006;1(1):15-30. doi: [10.2147 / nano.2006.1.1.15](https://doi.org/10.2147 / nano.2006.1.1.15)
9. Alghuwainem A, Alshareeda AT, Alsowayan B. Scaffold-Free 3-D Cell Sheet Technique Bridges the Gap between 2-D Cell Culture and Animal Models. *Int J Mol Sci* 2019 Oct 4;20(19):4926. doi: [10.3390 / ijms20194926](https://doi.org/10.3390 / ijms20194926)
10. Dickinson LE, Gerecht S. Engineered Biopolymeric Scaffolds for Chronic Wound Healing. *Front Physiol* 2016 Aug 5;7:341. doi: [10.3389 / fphys.2016.00341](https://doi.org/10.3389 / fphys.2016.00341)
11. Franco RA, Min YK, Yang HM, Lee BT. Fabrication and biocompatibility of novel bilayer scaffold for skin tissue engineering applications. *J Biomater Appl* 2013 Jan;27(5):605-615. doi: [10.1177 / 0885328211416527](https://doi.org/10.1177 / 0885328211416527)

12. Eskandarinia A, Kefayat A, Agheb M, Rafienia M, Amini Baghbadorani M, Navid S, et al. A Novel Bilayer Wound Dressing Composed of a Dense Polyurethane/Propolis Membrane and a Biodegradable Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous Scaffold. *Sci Rep* 2020 Feb 20;10(1):3063-2. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59931-2>
13. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev* 2013 Dec;19(6):485-502. doi: [10.1089 / ten.teb.2012.0437](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437)
14. Lu T, Li Y, Chen T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2013;8:337-350. doi: [10.2147 / IJN.S38635](https://doi.org/10.2147/IJN.S38635)
15. Wang C, Wang J, Zeng L, Qiao Z, Liu X, Liu H, et al. Fabrication of Electrospun Polymer Nanofibers with Diverse Morphologies. *Molecules* 2019 Feb 26;24(5):834. doi: [10.3390/molecules24050834](https://doi.org/10.3390/molecules24050834).
16. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol* 2020 Sep;10(9):200223. doi: [10.1098 / rsob.200223](https://doi.org/10.1098/rsob.200223)
17. Tottoli EM, Dorati R, Genta I, Chiesa E, Pisani S, Conti B. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics* 2020 Aug 5;12(8):735. doi: [10.3390 / pharmaceutics12080735](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735)
18. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ* 2002 Jan 19;324(7330):160-163. doi: [10.1136 / bmj.324.7330.160](https://doi.org/10.1136/bmj.324.7330.160)
19. Zhao X, Sun X, Yildirim L, Lang Q, Lin ZYW, Zheng R, et al. Cell infiltrative hydrogel fibrous scaffolds for accelerated wound healing. *Acta Biomater* 2017 Feb;49:66-77. doi: [10.1016 / j.actbio.2016.11.017](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.017)
20. Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 Dec 10;59(14):1392-1412. doi: [10.1016 / j.addr.2007.04.021](https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.021)
21. Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, Sahu R, Dixit S, Dennis V, et al. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *Int J Mol Sci* 2016 Nov 25;17(12):1974. doi: [10.3390 / ijms17121974](https://doi.org/10.3390/ijms17121974)
22. Memic A, Abudula T, Mohammed HS, Joshi Navare K, Colombani T, Bencherif SA. Latest Progress in Electrospun Nanofibers for Wound Healing Applications. *ACS Appl Bio Mater* 2019;2(3):952-969. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00637>
23. Hong J, Yeo M, Yang GH, Kim G. Cell-Electrospinning and Its Application for Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 2019 Dec 9;20(24):6208. doi: [10.3390 / ijms20246208](https://doi.org/10.3390/ijms20246208)
24. Ibrahim YS, Hussein EA, Zagho MM, Abdo GG, Elzatahry AA. Melt Electrospinning Designs for Nanofiber Fabrication for Different Applications. *Int J Mol Sci* 2019 May 17;20(10):2455. doi: [10.3390 / ijms20102455](https://doi.org/10.3390/ijms20102455)

25. Zhou Y, Chyu J, Zumwalt M. Recent Progress of Fabrication of Cell Scaffold by Electrospinning Technique for Articular Cartilage Tissue Engineering. *Int J Biomater* 2018 Mar 25;2018:1953636. doi: [10.1155 / 2018/1953636](https://doi.org/10.1155/2018/1953636)
26. Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chem Rev* 2019 Apr 24;119(8):5298-5415. doi: [10.1021 / acs.chemrev.8b00593](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593)
27. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* 2010;28(3):325-347. doi: [10.1016 / j.biotechadv.2010.01.004](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004)
28. Sun B, Long YZ, Zhang HD, Li MM, Duvail JL, Jiang XY, et al. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science* 2014;39(5):862-890. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.002>
29. Beachley V, Wen X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering: C* 2009;29(3):663-668. doi: [10.1016 / j.msec.2008.10.037](https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.037)
30. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29(13):1989-2006. doi: [10.1016 / j.biomaterials.2008.01.011](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011)
31. Sencadas V, Correia DM, Areias A, Botelho G, Fonseca AM, Neves IC, et al. Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydr Polym* 2012;87(2):1295-1301. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.017>
32. Tiwari SK, Venkatraman SS. Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers. *Materials Science and Engineering: C* 2012;32(5):1037-1042. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.019>
33. Reis TC, Castleberry S, Rego AM, Aguiar-Ricardo A, Hammond PT. Three-dimensional multilayered fibrous constructs for wound healing applications. *Biomater Sci* 2016 Feb;4(2):319-330. doi: [10.1039 / c5bm00211g](https://doi.org/10.1039/c5bm00211g)
34. Borges J, Mano JF. Molecular interactions driving the layer-by-layer assembly of multilayers. *Chem Rev*. 2014 Sep 24;114(18):8883-942. doi: [10.1021 / cr400531v](https://doi.org/10.1021/cr400531v)
35. Gomes A, Teixeira C, Ferraz R, Prudêncio C, Gomes P. Wound-Healing Peptides for Treatment of Chronic Diabetic Foot Ulcers and Other Infected Skin Injuries. *Molecules* 2017 Oct 18;22(10):1743. doi: [10,3390 / mol22101743](https://doi.org/10.3390/mol22101743).
36. Vonbrunn E, Mueller M, Pichlsberger M, Sundl M, Helmer A, Wallner SA, et al. Electrospun PCL/PLA Scaffolds Are More Suitable Carriers of Placental Mesenchymal Stromal Cells Than Collagen/Elastin Scaffolds and Prevent Wound Contraction in a Mouse Model of Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol* 2020 Dec 16;8:604123. doi: [10.3389 / fbioe.2020.604123](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.604123)

37. Trinca RB, Westin CB, da Silva, José Alberto Fracassi, Moraes ÂM. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. *European Polymer Journal* 2017;88:161-170. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.021>
38. Doderò A, Scarfi S, Pozzolini M, Vicini S, Alloisio M, Castellano M. Alginate-Based Electrospun Membranes Containing ZnO Nanoparticles as Potential Wound Healing Patches: Biological, Mechanical, and Physicochemical Characterization. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020;12(3):3371-3381. doi: [10.1021 / acsami.9b17597](https://doi.org/10.1021/acsami.9b17597)
39. Doderò A, Alloisio M, Castellano M, Vicini S. Multilayer Alginate-Polycaprolactone Electrospun Membranes as Skin Wound Patches with Drug Delivery Abilities. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020 Jul 15;12(28):31162-31171. doi: [10.1021 / acsami.0c07352](https://doi.org/10.1021/acsami.0c07352)