



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

ANDAMIOS GENERADOS MEDIANTE ELECTROHILADO,
MODIFICADOS POR PLASMA Y EVALUADOS MECÁNICAMENTE
PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDO CARTILAGINOSO ARTICULAR

TESIS QUE PRESENTA
NANCY CECILIA ISLAS ARTEAGA
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS INGENIERÍA BIOMÉDICA

ASESORES:

DR. ROBERTO OLAYO GONZÁLEZ

DRA. ATLÁNTIDA MARGARITA RAYA RIVERA

JURADO CALIFICADOR:

PRESIDENTE:

DR. HUMBERTO VÁZQUEZ TORRES

SECRETARIO:

DR. JOSÉ RAFAEL GODÍNEZ FERNÁNDEZ

VOCAL

DRA. ATLÁNTIDA MARGARITA RAYA RIVERA

MÉXICO, D.F. ABRIL 2014

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo fue posible gracias a la colaboración de muchas personas que me brindaron su ayuda, apoyo y conocimientos, quiero agradecer a cada uno.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), por la formación que me brindo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Roberto Olayo González del departamento de Física en la UAM-I, por su paciencia, comentarios, sugerencias, dirección en la realización de esta tesis y brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo.

Al Dr. Juan Morales Corona del departamento de Física en la UAM-I, por sus enseñanzas, comentarios y colaboración en el recubrimiento superficial de las matrices.

A la Dra. Atlántida Margarita Raya Rivera jefa del departamento de Ingeniería de Tejidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez por sus comentarios y colaboración para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Diego Esquiliano Rendón y la Biol. Raquel González Pérez del departamento de Ingeniería de Tejidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, por su valiosa colaboración de los cultivos tanto *in vivo* como *in vitro* de las células sobre las matrices poliméricas.

A la Dra. Patricia Castillo Ocampo del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Laboratorio Central de la UAM-I, por su colaboración con los análisis de microscopía electrónica de las matrices.

Al Dr. Humberto Vázquez Torres y el Dr. Rafael Godínez Fernández, por tomarse el tiempo para la revisión y comentarios de este trabajo.

A la Dra. Gloria Sarabia Martínez del departamento de Química (UAM-I), por siempre hacerme saber que cuento con su apoyo.

Al Ing. Xinah Herón Gutiérrez García, por su colaboración con los ensayos mecánicos de las matrices.

Y al laboratorio de Polímeros de la UAM-I, por permitirme realizar la parte experimental de este proyecto.

Y a quienes sin querer esté omitiendo, les agradezco su colaboración.

DEDICATORIAS

Gracias a Dios por darme la vida y por estar conmigo en todo momento.

A mis padres por todos los sacrificios que hicieron para que yo pueda realizar mis metas, por todo el amor que siempre me han brindado. Además de su apoyo incondicional, su comprensión, su invaluable amor, por impulsarme a seguir adelante en la vida y, principalmente, por nunca dejar de creer en mí.

A mis hermanos Jorge y Oscar, por brindarme innumerables horas de felicidad y apoyo cuando más lo necesitaba.

A Roni por compartir tus sueños, alegrías, tristezas, además de brindarme tú apoyo, amor y comprensión.

A Leví.

A mis sobrinos que dan alegría a mi vida.

A mis amigos:

Las familias: González Durán, Montelongo Lerín, Rosas Castillo y Sifuentes Monroy.

El amigo siempre es amigo, y en los tiempos difíciles es más que un hermano. Prov.17:17

CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	7
II.	INTRODUCCIÓN.....	8
III.	ANTECEDENTES.....	9
1.	TEJIDO CARTILAGINOSO.....	9
2.	CARTÍLAGO HIALINO.....	10
3.	CÉLULAS CARTILAGINOSAS Y MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	10
4.	LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.....	12
5.	TRATAMIENTOS Y TERAPIAS PARA LA REPARACIÓN DE LESIONES.....	14
5.1	Sustitución de la articulación.....	14
5.2	Estimulación de la autorreparación por parte del organismo.....	14
5.3	Trasplantes e implantes de tejido cartilaginoso.....	14
5.4	Implante autólogo de condrocitos inducido en matriz extracelular (MACI).....	15
6.	INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	16
6.1	Andamios (scaffolds).....	17
6.1.1	Polímeros para la regeneración de tejido.....	18
7.	FUENTES CELULARES PARA REPARACIÓN DEL CARTÍLAGO.....	19
8.	ELECTROHILADO COMO TÉCNICA PARA ELABORACIÓN DE ANDAMIOS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	20
9.	POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.....	21
10.	EVALUACIÓN MECÁNICA.....	22
	Módulo de elasticidad:.....	23
	Fluencia o cedencia.....	24
	Máximo Esfuerzo:.....	24
	Tenacidad:.....	25
	Ductilidad:.....	25
	Deformación elástica y plástica:.....	25
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	26
V.	HIPÓTESIS.....	26
VI.	OBJETIVO.....	26
VII.	METODOLOGÍA.....	27
1.	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES POLIMÉRICAS Y CONDICIONES DE HILADO.....	27
2.	ELECTROHILADO.....	27

3.	POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.....	27
4.	PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE AGRECANOS.....	28
5.	RECUBRIMIENTO DEL ANDAMIO CON SOLUCIÓN DE AGRECANOS, LAVADO Y SECADO DE LAS MUESTRAS.	28
6.	OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS Y CULTIVO DE CONDROCITOS.....	29
7.	PRUEBAS CELULARES.....	30
8.	IMPLANTACIÓN DE MEMBRANAS CON CÉLULAS AUTÓLOGAS: PRUEBAS IN VIVO.....	31
9.	EXPLANTE DE MEMBRANAS.....	31
10.	CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS.....	32
	ANÁLISIS ELEMENTAL:.....	32
	• Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (SEM-EDS):.....	32
	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA:.....	33
	• Microscopía Electrónica de Barrido (SEM):.....	33
	COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	33
	• Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier por Reflectancia total atenuada (FTIR-ATR):.....	33
	Caracterización mecánica:.....	33
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
	ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA (SEM-EDS):.....	35
	POLIMERIZACIÓN POR PLASMA Y ADHESIÓN DE LA PROTEÍNA AGRECANO SOBRE LA MEMBRANA.	35
	CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS.	36
	Composición Química.....	36
	MORFOLOGÍA.....	38
	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	38
	POROSIDAD.	40
	HUMECTACIÓN DE LOS ANDAMIOS PARA CULTIVOS TANTO IN VITRO COMO IN VIVO.....	40
	PRUEBAS MECÁNICAS.	40
	Módulo:.....	42
	Cedencia:.....	44
	Máximo Esfuerzo:.....	47
	Ductilidad o máxima extensión a la rotura:.....	48
	Tenacidad:.....	49
	Curvas esfuerzo vs deformación, generadas del cultivo in vivo.....	51

IX. CONCLUSIONES..... 53

X. APÉNDICE 54

1. Cálculo de la tenacidad..... 54

2. Explante obtenido a los 30 días de cultivo in vivo 54

3. Resultados de los ensayos mecánicos:..... 56

BIBLIOGRAFÍA..... 59

I. RESUMEN.

El presente trabajo continúa con la línea de investigación entre la UAM-I y el Hospital Infantil Federico Gómez, donde se han probado materiales biodegradables generados mediante electrohilado de ácido poliláctico (PLA), poli-caprolactona (PCL), modificados superficialmente con Polipirrol Iodo (PPy-I), los cuales generaron resultados alentadores en su crecimiento celular *in vitro*, pero escasa formación de tejido cartilaginoso *in vivo* ya que las células no fueron capaces de mantener la suficiente matriz extracelular (Ávila Gutiérrez, 2011). Por lo que se buscó modificar el andamio anteriormente diseñado, añadiendo un componente importante de la matriz extracelular del cartílago nativo, el agregano, que es una proteína esencial para la función normal del tejido (Roughley, 2006) y su concentración favorece la definición de la forma en tejidos durante su desarrollo inicial y las propiedades mecánicas del mismo (Hardingham, 1998).

Los resultados de la evaluación en los andamios con Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), mostraron que sus características de tamaño y distribución de poro son adecuados para ingeniería de tejidos. Por otra parte se observó la presencia de la proteína agregano (AG) mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier por Reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), hallándose picos representativos de la proteína y mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se observaron cristales debido al azúcar y sulfatos contenidos en la molécula AG.

Los materiales fueron sometidos a pruebas de cultivo tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrando crecimiento celular y excelente biocompatibilidad, además se determinaron las propiedades mecánicas mediante ensayos de tracción de los andamios en diferentes condiciones: secos, mojados, con células y con tejido cartilaginoso, comparando estos dos últimos con un andamio comercial de ácido poliglicólico-ácido poliláctico-co- glicólico (PGA-PLGA), el cual es ampliamente utilizado para regeneración de tejido óseo y cartilaginoso, con lo que se obtuvo que el andamio de PLA-PCL-PPy-I-AG tanto a nivel celular como en su comportamiento mecánico cuenta con características prometedoras para tratamiento de defectos o lesiones condrales.

II. INTRODUCCIÓN.

El cartílago consta de una red de colágeno enmarañada y proteoglicanos, que proporcionan el tejido las propiedades mecánicas de la función *in vivo*, sin embargo, carecen de un suministro de sangre por lo que tiene una densidad celular baja, teniendo un potencial mínimo para la auto-reparación. Por lo tanto, un amplio daño en el cartílago, raramente se resuelve espontáneamente, por lo que al no recibir tratamiento causa degeneración secundaria del cartílago circundante y efectos negativos sobre las actividades de rutina. Existen numerosos tratamientos que se han desarrollado para reparar los daños en el cartílago siendo ejemplos típicos: trasplante de condrocitos, mosaicoplastia, y microfractura. Estos tratamientos han producido resultados satisfactorios, sin embargo, la literatura también documenta los fracasos del tratamiento (Chung & Burdick, 2008) (Álvarez, Ripoll, Restrepo, & Forriol, 2010) (Morales Villescusa, 2010) (Goro Ebihara, 2012).

La ingeniería de tejidos es un campo en evolución que tiene el potencial para proporcionar soluciones permanentes a los daños y la pérdida de tejido a millones de personas cada año. El enfoque básico para la ingeniería de tejidos implica el uso de las células y andamios, en donde debido a su limitada capacidad de auto-reparación, el cartílago es un candidato ideal para la ingeniería tisular.

Los biomateriales desempeñan un papel fundamental como andamios para ofrecer un entorno para la matriz extracelular y regeneración del tejido, el desarrollo tecnológico en la ingeniería de tejidos, especialmente en el cartílago *in vitro* ofrece un enfoque prometedor para su reparación. Estudios previos han declarado de manera preliminar la viabilidad de la construcción del cartílago *in vitro*, sin embargo, el cartílago actualmente regenerado *in vitro* es insatisfactorio para la aplicación clínica debido que la estructura del cartílago no es homogénea, tiene un espesor insuficiente y su propiedad mecánica es pobre (Yingying, y otros, 2012) (Steinert, Ghivizzani, Rethwilm, Tuan, Evans, & Nöth, 2007). Por esta razón el uso de la proteína agregcano (AG), busca proporcionar al andamio la capacidad de mejorar sus propiedades mecánicas (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010), gracias a la adhesión de ésta sobre el material, además de favorecer la formación de tejido, afectando la biología de los condrocitos y señalización de los factores de crecimiento (Domowicz, Cortes, Henry, & JudiSchwartz, 2009).

III. ANTECEDENTES.

1. TEJIDO CARTILAGINOSO.

El cartílago es un tejido conectivo denso y especializado que reduce la fricción y protege los extremos de los huesos de las fuerzas de cizallamiento que está asociado con la carga mecánica. Este forma el esqueleto transitorio en el embrión y persiste en el adulto en articulaciones, tracto respiratorio, costillas y orejas, sus principales características están dadas por ser avascular que lo diferencia del resto de los tejidos conectivos (Vinatier, y otros, 2009).

Según las fibras que se encuentran en la matriz extracelular se pueden encontrar tres tipos de cartílago:

- El cartílago hialino, que contiene fibras de colágeno tipo II en su matriz. Es el más abundante en el cuerpo humano y desempeña una diversidad de funciones. Es una sustancia flexible y semitranslúcida de color gris azulado. Se encuentra en la nariz y la laringe, en los extremos ventrales de las costillas donde conectan con el esternón, y en los anillos traqueales y bronquiales. Se encuentra también en las superficies articulares de las articulaciones móviles. Constituye el modelo cartilaginoso de muchos de los huesos durante el desarrollo embrionario y las placas epifisarias de los huesos en crecimiento (Fig. 1a) (Trujillo Martín, 1998).
- El cartílago elástico contiene colágeno tipo II y abundantes fibras elásticas, diseminadas por toda la matriz, por lo que es el más flexible. Las fibras elásticas están compuestas por elastina y microfibrillas que alcanzan hasta un 150% de su longitud en reposo sin romperse. Se encuentra en las orejas, los conductos auditivos externo e interno, la epiglotis y la laringe (Fig. 1b).
- El fibrocartílago posee fibras de colágeno densas y gruesas de tipo I en su matriz, lo que le permite soportar fuerzas intensas a tracción (Fig. 1c). El cartílago fibroso o fibrocartílago, es una forma de transición entre el tejido conjuntivo denso y el cartílago hialino, puesto que está formado por una combinación de fibras de colágeno y células cartilaginosas ubicadas en lagunas rodeadas por cantidades variables de matriz hialina. Los discos intervertebrales, los discos articulares, los meniscos y la sínfisis del pubis están compuestos fundamentalmente por cartílago fibroso (Mederos Pérez & Marrero González, 2000) (Couceiro Follente, Carpintero Arias, & Silva Rivera, 2002) (Zapata, Zuluaga, Betancur, & López, 2007).

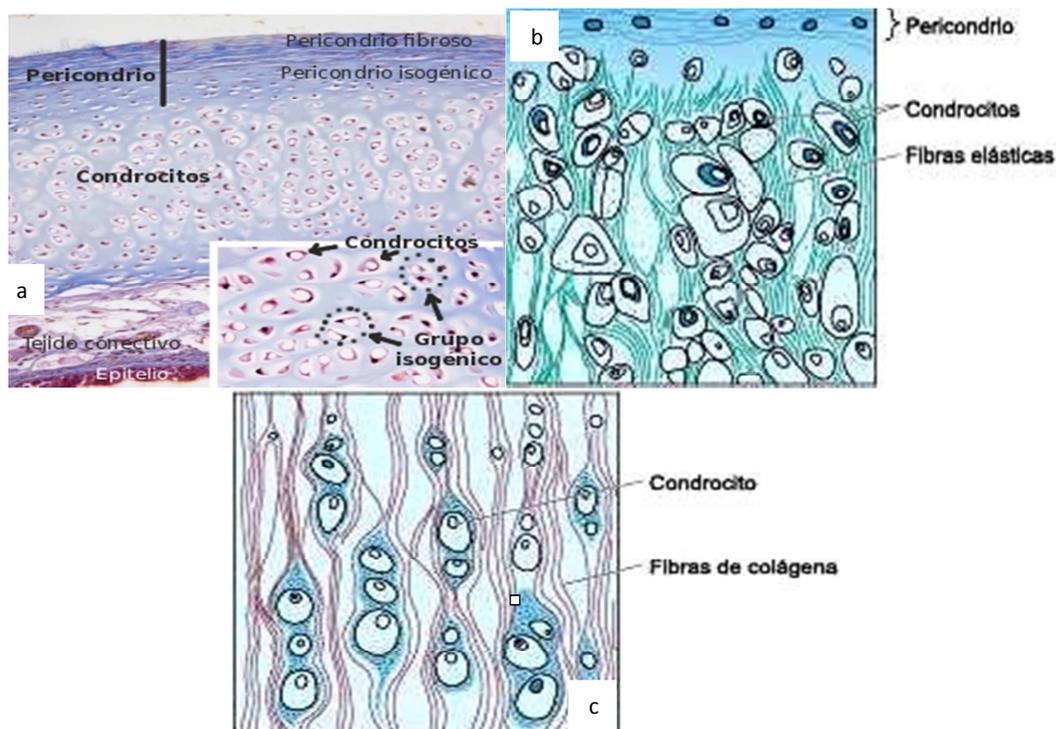


Fig. 1. a) Cartílago hialino, b) Cartílago Elástico, c) Cartílago fibroso.

2. CARTÍLAGO HIALINO.

Las articulaciones sinoviales o diartrosis constan de dos extremos óseos confrontados, recubiertos por cartílago hialino, una cápsula articular que los une y de ligamentos que mantienen su contacto (Fig. 2a). Todo lubricado por líquido segregado (líquido sinovial) por la parte interna de la cápsula articular (membrana sinovial) (Fig. 2b). Los diferentes tejidos que conforman las articulaciones no sólo permiten el deslizamiento de las superficies articulares, proporcionando un movimiento estable con un bajo nivel de fricción, sino que también deben soportar las cargas y amortiguar los choques. El tejido que más contribuye a estas extraordinarias capacidades funcionales es el cartílago articular hialino, aunque sólo posee unos pocos milímetros de espesor (menos de 5mm) tiene una sorprendente resistencia y elasticidad a la compresión y a los choques, y una excepcional capacidad para distribuir cargas; se caracteriza por tener unas cualidades bioquímicas y biofísicas altamente especializadas. Microscópicamente aparece como semisólido, de superficie brillante y de color blanco-azulado, se torna amarillento con la edad. Se encuentra firmemente adherido al hueso subcondral y en la periferia se continúa con la sinovial (Trujillo Martín, 1998).

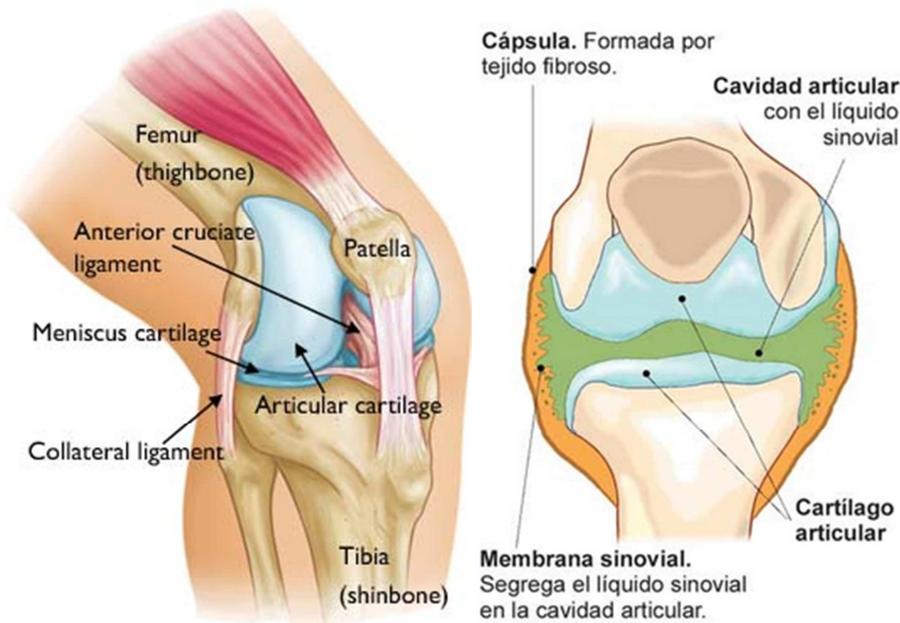


Fig. 2. a) Anatomía rodilla, b) cartílago articular.

3. CÉLULAS CARTILAGINOSAS Y MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).

El condrocito, única célula del cartílago y la responsable de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular, la cual debe organizar su propio metabolismo para garantizar la producción, renovación periódica y su organización tridimensional (Trujillo Martín, 1998) (Vinatier, y otros, 2009).

Los condrocitos se encuentran en las lagunas de la matriz extracelular con diámetros hasta de $40\mu\text{m}$, sintetizan y secretan los componentes orgánicos de la matriz extracelular que son básicamente colágeno, ácido hialurónico, proteoglucanos y glicoproteínas (Fig. 3). Se nutren con material que se difunde desde los capilares sanguíneos del tejido adyacente o líquido sinovial, puesto que los vasos sanguíneos no penetran la matriz cartilaginosa ya que es avascular (Ochi, Uchio, Kawasaki, Wakitani, & Iw, 2002) (Rosales Ibñez, 2008) (Morales Villescusa, 2010).

Debido a su avascularidad, la capacidad de autorregeneración del cartílago hialino o articular es muy limitada. Otros factores que explican la escasa capacidad de autorreparación del cartílago son la baja actividad metabólica, la incapacidad de los condrocitos de migrar debido a que se encuentran aislados en las lagunas (Sánchez Martínez A. H., 2012).

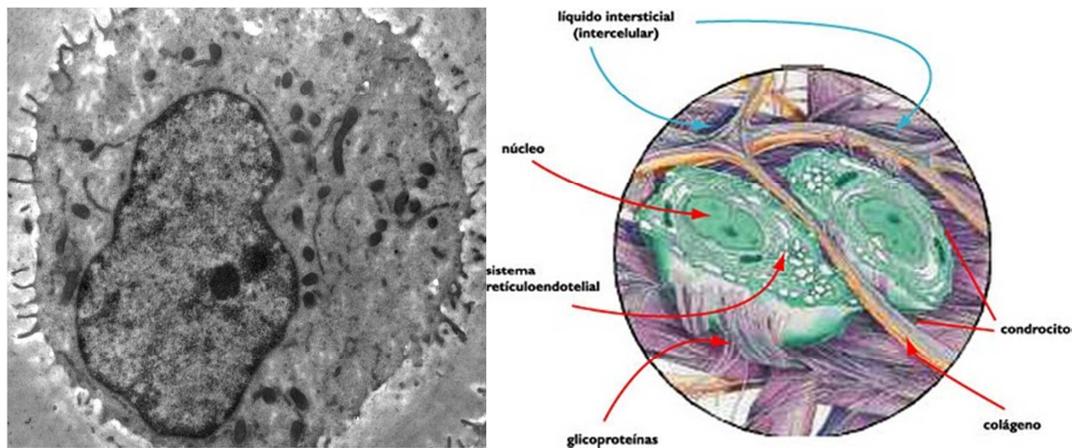


Fig. 3. Estructura condrocitos.

La matriz (Fig. 4) es la responsable de las características mecánicas del cartílago y está constituida por: (Trujillo Martín, 1998), (Martin Hernández, 2002), (Vinatier , y otros, 2009), (Morales Villaescusa, 2010)

- **Agua**, la cual constituye el aproximadamente el 80% del peso total del cartílago, y es más abundante en la capa superficial. La cantidad de agua depende de la concentración de proteoglicanos y organización macromolecular del colágeno además permite la deformación del cartílago en respuesta al estrés generado, fluyendo de adentro hacia afuera del mismo, gracias a la carga negativa de los proteoglicanos.
- **El colágeno tipo II** es producido y organizado por los condrocitos de forma tridimensional en forma de malla, limitando a las moléculas de agregano en los intersticios entre las fibras de colágeno, inmovilizándolos dentro de la matriz, proporcionando al cartílago su forma y estabilidad, siendo la responsable de las características mecánicas del cartílago.
- Los **Proteoglicanos**, que son macromoléculas sintetizadas por los condrocitos, y se encuentran constituidas por un eje central lineal de naturaleza proteica a las que están conectadas mediante enlaces covalentes cadenas de glucosaminoglicanos, los cuales son polisacáridos representados sobre todo por el condroitín 4 y 6 sulfato, el dermatán sulfato y por el queratán sulfato; la función de los proteoglicanos es formar un gel en el que están embebidas las proteínas fibrosas de la matriz extracelular, debido a su carga negativa retienen iones positivos (Na^+) junto con agua y esto hace que el tejido pueda deformarse y recuperar nuevamente su forma por fuerzas compresivas, además de contribuir en la difusión los nutrientes hasta las células. Las propiedades más importantes del cartílago dependen de los proteoglicanos (rigidez, compresión, hidratación tisular, presión osmótica). Las moléculas de agregano, a través de la repulsión electrostática de las cargas negativas, le dan al cartílago su resistencia a la compresión.
- El **ácido hialurónico** es un glucosaminoglicano producido por el condrocito que tiene la función de enlazar entre sí los diversos proteoglicanos a través de un enlace proteico (proteínas de la unión); formando voluminosos agregados de proteoglicanos, los cuales ocupan los espacios entre las redes de fibrillas colágena. En la matriz del cartílago la mayor parte de los agreganos se une al ácido hialurónico, por lo que el número de agreganos dependen del largo de la cadena de ácido hialurónico.

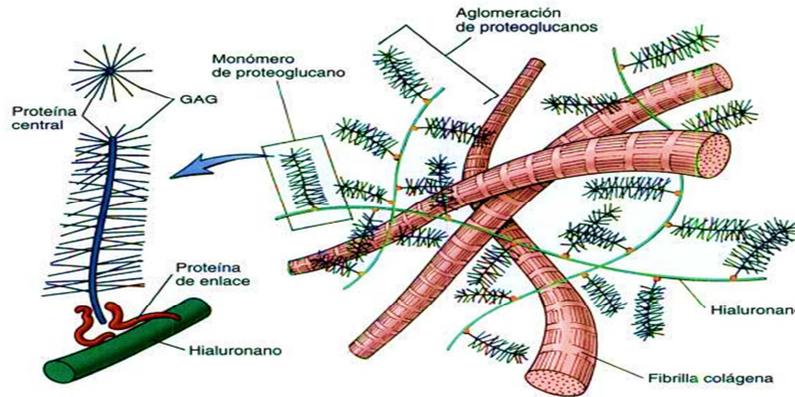


Fig. 4. Componentes de la matriz extracelular.

4. LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.

La integridad del cartílago articular se mantiene mediante la liberación regulada de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas producidas por los condrocitos; los que, a su vez, regulan la división celular, la síntesis y la degradación de la matriz extracelular condrogénica. Cuando el cartílago articular se lesiona, se pierde el equilibrio proporcionado por los factores presentes en el tejido, lo cual genera una respuesta de los condrocitos que consiste en el incremento de la proliferación celular y de la síntesis de matriz en el sitio de la lesión. Sin embargo, esta respuesta es temporal y cesa muy pronto, posiblemente debido a la falta de una provisión constante de estos factores. Después de una lesión, el cartílago articular tiene una capacidad muy limitada de autorregeneración, ya que no es penetrado por vasos sanguíneos ni linfáticos. Este tejido puede degenerarse mucho antes de que los síntomas clínicos se hagan evidentes (Zapata, Zuluaga, Betancur, & López, 2007).

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular crónica, degenerativa caracterizada por la degradación y pérdida progresiva del cartílago, el hueso subcondral y daño del tejido sinovial, que pueden ser generados por uno o varios factores como los que se muestran en la Fig.5, que desencadenan un desequilibrio entre los condrocitos anabólicos y catabólicos. El proceso degenerativo puede iniciarse con la pérdida de proteoglicanos de la MEC, seguida de los trastornos de la red fibrilar colágena, lo cual lleva a la apoptosis/necrosis de la célula y al deterioro funcional del tejido (Landínez Parra, Venegas Acosta, & Garzón Alvarado, 2008).



Fig. 5. Factores de Riesgo que generan desequilibrio en el cartílago articular.

La poca capacidad regenerativa del cartílago no puede revertir su destrucción, la cual es en ocasiones desencadenada por una respuesta inflamatoria proveniente de la sinovia, cuando ocurre tal inflamación, a esta patología se le conoce como osteoartritis (OA). Es por esto que hasta hace unos años se habían excluido las mutaciones genéticas como un factor de riesgo o predisposición a padecer osteoartritis. Los primeros genes identificados con la OA codifican para componentes de la matriz extracelular (MEC), como las colágenas *Col2a1*, *Col9a2* y *Col11a2*, las cuales fueron estudiadas en modelos de ratones transgénicos. De ese modo, se encontró que la sustitución de una glicina desestabiliza la estructura de triple hélice del colágeno y esto podría hacerla más susceptible a la degradación. A respecto, aunque la expresión de las colágenas aumenta durante la OA, éstas podrían ser más sensibles a las metaloproteinasas de la matriz (MMP) como la MMP-13. Ahora se sabe que otras moléculas de la MEC se relacionan con la OA; las enzimas ADAMTS-4 y ADAMTS-5 degradan al agregano, el proteoglicano más abundante del cartílago articular. De modo que, cuando el agregano se degrada, deja visible al colágeno II para que la enzima DDR-2 sea capaz de degradarla (Fig.6). La alteración de la MEC del cartílago articular ocasiona, en primera instancia, la proliferación celular y la formación de tejido fibroso que forma una cicatriz como respuesta al daño; ahí se producen factores de crecimiento como el Tgf- β , que podrían promover la hipertrofia de los condrocitos, de tal forma que la OA recapitula los mecanismos de diferenciación del cartílago de la placa de crecimiento para formar, en última instancia, nódulos de hueso en los bordes del cartílago articular conocidos como osteofitos. Es evidente la importancia de la MEC en la diferenciación del cartílago articular, pero existen diversos factores de crecimiento y factores de transcripción que regulan la maduración y proliferación de los condrocitos del cartílago articular y del cartílago de la placa de crecimiento, los cuales, además, controlan la expresión de muchos de los componentes de la MEC, y también dirigen la morfogénesis del esqueleto. Podemos agrupar las moléculas en función del proceso que regulan: condrogénesis, proliferación, diferenciación y muerte celular. Muchas de estas moléculas pueden ser buenos marcadores genéticos de predisposición a la OA (Garcíadiego Cázares, 2012).

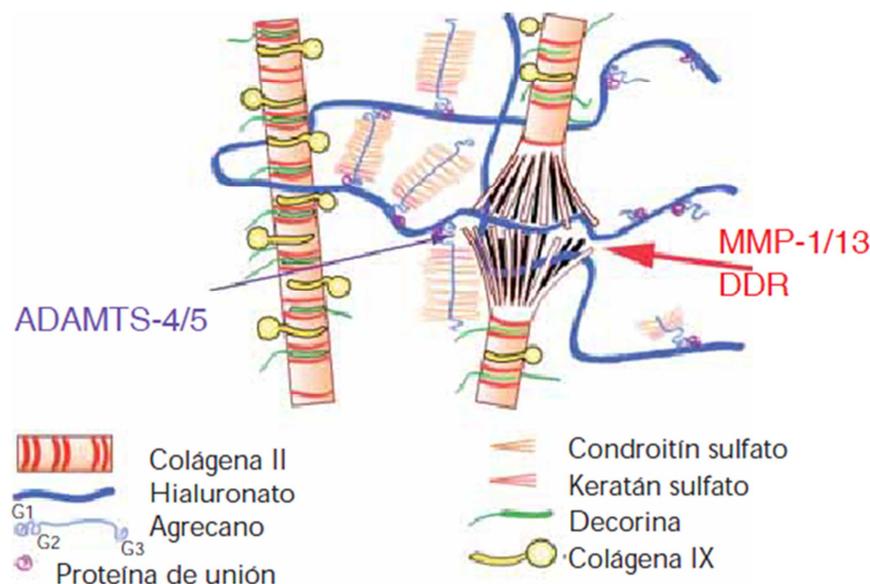


Fig. 6. El cartílago con OA se caracteriza por el agotamiento gradual de agregano, un despliegue de la matriz de colágeno, y la pérdida de colágeno de tipo II. Con estos cambios viene la creciente vulnerabilidad de los cartílagos, que ya no tiene la rigidez a la compresión.

La prevalencia de la osteoartritis (OA) ha aumentado en todo el mundo; en México es una de las primeras 10 causas de invalidez total, lo que incrementa la carga económica y social del país. Los tratamientos tienen como objetivos disminuir el dolor, conservar la movilidad articular y minimizar la discapacidad. La búsqueda de nuevos tratamientos se basa en el mayor conocimiento de la fisiopatología del cartílago, centrándose en la interacción entre el condrocito y la matriz extracelular (Espinoza Morales, y otros, 2013).

5. TRATAMIENTOS Y TERAPIAS PARA LA REPARACIÓN DE LESIONES.

Los tratamientos más populares para la reparación del cartílago articular incluyen: microfracturas, la mosaicoplastia, el trasplante de aloinjerto osteocondral, inyecciones de ácido hialurónico y el trasplante autólogo de condrocitos (ACT).

Entre las técnicas más utilizadas para la reparación de lesiones del cartílago articular se encuentran:

5.1 Sustitución de la articulación.

Artroplastia: Se trata de la opción final en caso de no poder reparar la articulación mediante ninguna otra técnica y consiste en sustituir la articulación por una prótesis artificial. La razón más común para esta operación es la artrosis severa, que causa dolor incesante, deformidad de las articulaciones y problemas de movilidad. Los implantes están fabricados de aleaciones de metales, materiales cerámicos o piezas de plástico, y se pueden unir al hueso con cemento acrílico. Sin embargo, se trata de una intervención traumática y no exenta de complicaciones. Además, las prótesis no siempre son una solución definitiva. La mayoría de personas de edad pueden esperar que la prótesis no deba ser recambiada durante el resto de su vida. En personas jóvenes y activas es probable que se precise una reintervención para el recambio protésico (Pelegay Salas, 2012) (Álvarez, Ripoll, Restrepo, & Forriol, 2010).

5.2 Estimulación de la autorreparación por parte del organismo.

Abrasión y microfractura: Se pretende estimular el hueso subcondral para que produzca fibrocartílago y cartílago hialino. Con la abrasi3n del extremo 3seo se penetra entre 1 y 3mm de profundidad y se destruyen vasos y cortical, llegando a hueso subcondral (Fig. 7). Mientras que con las perforaciones el agujero practicado se rellenar3 de tejido fibroso o fibrocartílago, nunca lo har3 de cartílago hialino. Los resultados son impredecibles. Parte de la mejoría que experimentan estos pacientes se debe a la limpieza de los fragmentos del cartílago inestables, a la limpieza de cuerpos sueltos y a la extracci3n de l3quido sinovial. A pesar de que este m3todo es t3cnicamente m3s f3cil y menos invasivo, se ha encontrado que la superficie del cartílago formado es mec3nicamente inferior que la del cartílago hialino (Pelegay Salas, 2012) (Álvarez, Ripoll, Restrepo, & Forriol, 2010).

5.3 Trasplantes e implantes de tejido cartilaginoso.

Autoinjerto osteocondral (Mosaicoplastia). La mosaicoplastia es el trasplante de peque3os cilindros osteocondrales aut3logos procedentes de regiones de la articulaci3n no sometidas a carga, hacia una lesi3n condral u osteocondral en zona de carga (Fig. 7). Su implantaci3n se asemeja a la forma de un "mosaico" y puede rellenar de un 60% a un 80% de la superficie de la lesi3n. Los resultados cl3nicos son similares a los del trasplante aut3logo de condrocitos, pero parece ser que son m3s prometedores desde el punto de vista histol3gico (Pelegay Salas, 2012) (Álvarez, Ripoll, Restrepo, & Forriol, 2010).

Implante Aut3logo de condrocitos (ICA). Tratamiento basado en el aislamiento, cultivo y posterior implantaci3n de condrocitos aut3logos, permite reparar con 3xito, peque3os defectos articulares (Fig. 7). Existen series que tienen unos resultados positivos del 90% y, adem3s, las biopsias tomadas de estos pacientes despu3s de la cirug3a muestran un cartílago hialino similar al articular normal; sin embargo las lesiones que asientan en el cartílago rotuliano son las que han mostrado una menor respuesta cl3nica a este tipo de tratamiento, obteniendo los niveles m3s bajos de satisfacci3n cl3nica. En realidad, se estar3an cultivando condrocitos que son implantados en

la articulación, pero realmente no se estaría reproduciendo la estructura columnar del cartílago; no se sabe la calidad ni el nivel de actividad y, además, no habría zonas de transición mecánica. Probablemente crezca un tejido de baja resistencia mecánica y, por tanto, se estarían creando áreas de dudosa longevidad real. Si bien esta técnica se realiza actualmente en humanos, la necesidad de realizar dos cirugías supone un inconveniente.

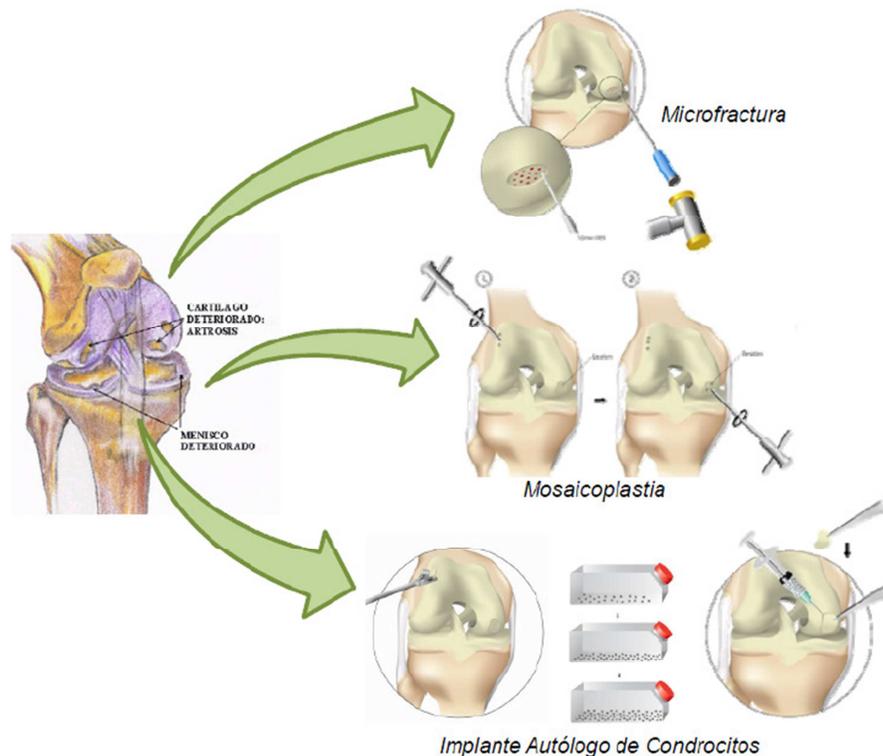


Fig. 7. Terapias para la reparación en la lesión cartílago.

5.4 Implante autólogo de condrocitos inducido en matriz extracelular (MACI).

Diversas modificaciones y diferentes técnicas de implantación de condrocitos se están estudiando actualmente. Muchas de estas técnicas se centran especialmente en la cirugía mínimamente invasiva y la combinación de ACL con andamios tridimensionales y factores de crecimiento con el objetivo de conseguir un entorno en el que el condrocito no pierda su fenotipo. La Ingeniería de Tejidos es la base sobre la cual se fundamenta esta nueva técnica (Fig. 8). En ella, matrices tridimensionales proporcionan un entramado que aporta el soporte estructural y facilitan la adhesión, proliferación y migración de las células favoreciendo la creación de nuevo tejido cartilaginoso. Estos andamios están fabricados a partir de biomateriales que pueden estar formados por colágeno, fibras de carbono, hidrogeles y otros materiales. Pero en muchas ocasiones la estructura interna de estos andamios no es suficiente para provocar la activación celular, sino que es necesaria la aplicación de estímulos sobre los andamios. Estos estímulos pueden ser de tipo térmico, químico, eléctrico, luminoso, mecánico o de presión osmótica entre otros. Se ha comprobado que los estímulos mecánicos en las células son uno de los factores relacionados con la actividad celular. La ventaja que ofrece esta técnica es que, al ser soportadas las células por una estructura 3D que actúa como sustituto de la matriz extracelular, se permite un mejor control de los estímulos mecánicos que sufren las células. Parámetros como la porosidad, el tamaño de poro y morfología del andamio juegan un papel importante en las propiedades mecánicas, la conducción de nutrientes, así como en la magnitud de los estímulos provocados en biorreactores. Una vez desarrolladas las células, el andamio es implantado en la

zona de lesión. Esta técnica está demostrando obtener resultados muy prometedores que parecen paliar los inconvenientes de las técnicas restantes.

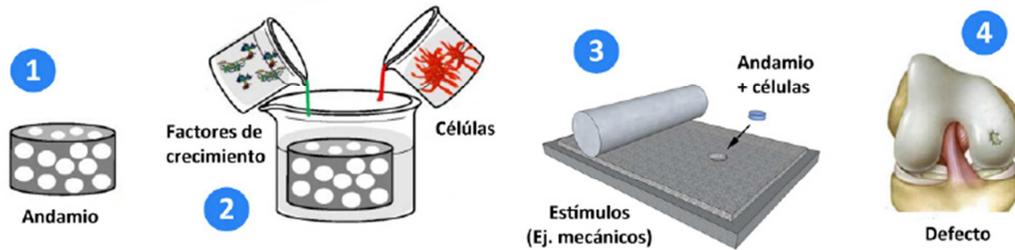


Fig. 8. Técnica de implantación de células en andamios estructurales. Las células introducidas en el andamio son estimuladas mediante factores de crecimiento y otros factores externos antes de ser implantadas en el cartílago dañado.

Aunque estas técnicas logran aliviar el dolor y mejorar la función articular, cada una cuenta con desventajas que pueden contraindicar su aplicación clínica, como son la morbilidad de la zona donante, las complicaciones en los procedimientos quirúrgicos, el riesgo de infección, el rechazo del injerto, y el desprendimiento del parche de periostio, además de que el tejido resultante carece de la estructura del cartílago nativo y es bioquímica y mecánicamente inferior. Por este motivo, las últimas técnicas se centran en la implantación de células progenitoras en andamios biológicos, para optimizar el entorno y que se mantenga el fenotipo de los condrocitos (Anders, Schaumburger, Schubert, Grifka, & Behrens, 2009).

6. INGENIERÍA DE TEJIDOS.

La pérdida total o parcial de tejido, como así también la pérdida de la función de un órgano, es uno de los más graves y costosos problemas de salud de un ser humano. Actualmente, la cirugía reconstructiva y trasplantológica es el arma fundamental para la atención de estos pacientes. La utilización de órganos para trasplantes comúnmente se ve limitada por la baja cantidad de donantes. Anualmente un gran número de pacientes muere en listas de espera y muchos otros no llegan siquiera a integrarlas. Esta creciente necesidad de órganos, llevó a los investigadores a utilizar células vivientes autólogas para la reconstrucción de órganos y tejidos. La ventaja de esta nueva tecnología es la de evitar la terapia inmunosupresora. Tratar la pérdida de función de los tejidos y órganos ha sido preocupación continua de los investigadores, habiéndose intentado a través de los cuatro procesos básicos: trasplantes, injertos autólogos, prótesis y regeneración tisular. Una alternativa al reemplazo de tejidos es la ingeniería tisular es un campo multidisciplinario basado en los principios de la ingeniería y otras ciencias hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que tengan la capacidad de restaurar, mantener y mejorar la función tisular (Fig.9). El enfoque de ingeniería de tejidos tiene importantes ventajas sobre el trasplante tradicional de órganos y evita el problema de la escasez de órganos (Falke & Atala, 2000) (Atala, 2012).

Los tres pilares básicos sobre los cuales se sustenta la ingeniería tisular para desarrollar reemplazos de tejidos son:

1. Prevenir una respuesta inmunológica, ya sea inflamación, rechazo o ambas. Idealmente, si se pudieran manipular células pluripotenciales, una vez diferenciadas éstas en el medio disminuirán la respuesta inmunológica.

2. Será necesario crear el sustrato ideal para la supervivencia, desarrollo y diferenciación celular. La utilización de implantes biocompatibles compuestos por moléculas integrantes de la matriz extracelular sembradas por células autólogas será una estrategia por considerar. El agregado de factores de crecimiento y diferenciación celular incrementará potencialmente la calidad del tejido a reemplazar.

3. Proveer un adecuado medio ambiente para el desarrollo celular y tisular es crucial para mantener la función celular y el desarrollo del tejido neoformado.

En el caso específico de la ingeniería de tejidos de cartílago, existen varios enfoques, pero todos coinciden en que son imprescindibles tres componentes esenciales: un cultivo de células específicas, moléculas bioactivas y un material tridimensional llamado andamio o *scaffold* (Escobar Ivirico, 2005) (Callén Palacio, 2009).

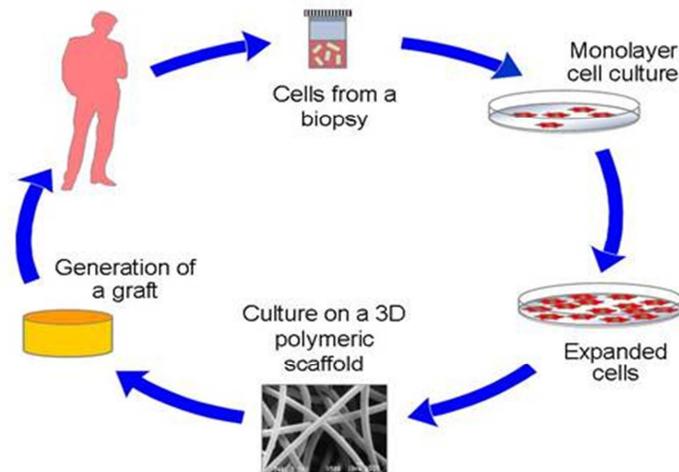


Fig. 9. Etapas básicas de la Ingeniería de tejidos.

6.1 Andamios (*scaffolds*).

Un tejido normal está constituido por un componente estructural y otro celular. Para que pueda llevar a cabo su función, ambos componentes deben estar interrelacionados, de tal manera que uno le da soporte al otro (Blanco García & Gimeno Lonjas, 2005)

La finalidad del uso de los andamios en el campo de la ingeniería de tejidos es servir de soporte a las células para su proliferación y su diferenciación; por lo tanto, su diseño y desarrollo debe considerar factores biológicos y físicos, que incluyen (Sandino, Ginebra, Plandell, & Lacroix, 2011):

- **Biocompatibilidad:** Las células deben adherirse, funcionar normalmente y migrar a la superficie a través del andamio, para comenzar la proliferación antes de que se establezca la nueva matriz. El andamio implantado no debe inducir una respuesta inmune que conduzca a un rechazo.
- **Biodegradabilidad:** Los andamios no están diseñados como implantes permanentes, ya que permiten que las propias células del cuerpo sustituyan el andamio. El andamio debe degradarse hasta productos no tóxicos que puedan salir del cuerpo sin interferir con otros órganos.
- **Propiedades mecánicas:** Los andamios deberán poseer propiedades mecánicas (por ejemplo, resistencia a la tensión, elasticidad y resistencia a la tracción) en consonancia con el sitio anatómico en el que han de ser implantados, y también ser lo suficientemente resistente como para soportar el manejo quirúrgico durante el implante.

- **Arquitectura del andamio:** Una estructura de poros interconectados y alta porosidad se requiere para asegurar la penetración celular y la difusión suficiente de nutrientes a las células dentro del andamio y a la matriz extracelular formada por estas células. La naturaleza porosa también permitiría la salida de los productos de desecho del cuerpo a través de la difusión (Tanaka, Yamaoka, Nishizawa, Nagata, & Ogasawara, 2010).

Los andamios se siembran típicamente con las células, y a menudo con factores de crecimiento, o sometidos a estímulos biofísicos (por ejemplo, un biorreactor, dispositivo o sistema que se aplica una serie de estímulos mecánicos o químicos a las células). Estas estructuras son cultivadas *in vitro* para desarrollar tejidos que se pueden implantar en un sitio de la lesión o bien se implantan directamente en el sitio de la lesión donde la regeneración de los tejidos u órganos se induce *in vivo* utilizando los sistemas propios del cuerpo. La gran mayoría de los andamios desarrollados para aplicaciones en el campo de la Ingeniería de Tejidos está constituida por estructuras elaboradas a partir de los llamados biomateriales (Pelegay Salas, 2012).

6.1.1 Polímeros para la regeneración de tejido.

Los biomateriales poliméricos, naturales o sintéticos, son ampliamente utilizados para la generación de andamios debido a que ofrecen una amplia gama de formas de fabricación, ya sea en forma de fibras, geles, bloques y demás, que dependiendo de su elección, generan características y propiedades tanto físicas como químicas apropiadas, con la finalidad de reparar parcial o totalmente el órgano o tejido que se encuentra dañado.

Las matrices naturales producen un medio más adecuado para el desarrollo, la adhesión y proliferación celular tal es el caso del colágeno, la fibrina y las matrices carbohidratadas, como el alginato, la agarosa, el quitosano y el ácido hialurónico. Por otro lado, los polímeros sintéticos como PLA y PCL, pueden utilizarse como copolímeros, ser manipulados (cambiando su peso molecular) y combinados para obtener las características adecuadas en el material, dependiendo de la aplicación a la que se destinen. Los polímeros de origen natural tienen una mayor rapidez de degradación en comparación con la de los sintéticos, debido a que son blanco fácil de las enzimas del organismo, ocasionando su fácil absorción. Caso contrario el de los sintéticos, pues se degradan por hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo, eliminándose completamente por vías metabólicas, por lo que son materiales más atractivos para la elaboración de andamios en Ingeniería de Tejidos (Álvarez, Ripoll, Restrepo, & Forriol, 2010) (Navarro Toro, 2005).

Colágeno:

Es la proteína principal de la matriz extracelular, existe para proporcionar resistencia y estabilidad a los tejidos conectivos. Se utiliza como andamios para crecimiento de condrocitos con el fin de mejorar las propiedades estructurales y biológicas del injerto, se utiliza de diferentes formas: esponja, espuma, gel y de membrana, todos estos están sujetos a la degradación enzimática (García Carvajal, Garcíadiago Cázares, Parra Cid, Aguilar Gaytán, & Castro Carmona, 2013). Sus principales desventajas son: Alta velocidad de degradación que conduce a pobres propiedades mecánicas en los tejidos, toxicidad en algunos agentes de entrecruzamiento y necesidad de purificación, (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

Ácido hialurónico (HA):

De la familia de los glucosaminoglicanos; es un componente fundamental de la matriz extracelular, que se encuentra en concentraciones elevadas en el cartílago y en el líquido sinovial, siendo responsable de su viscoelasticidad. Pocos estudios se han llevado a cabo con HA en el área de electrohilado, su alta viscosidad y tensión superficial dificultan la formación de fibras (Young, 2006). Sus principales desventajas son: ser soluble en agua y debido a su superficie aniónica no se promueve unión de las células y formación de tejido (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

Fibrina:

Es una proteína implicada en la coagulación de la sangre, se considera como un biomaterial para la reparación del cartílago ya que tiene una función adhesiva que también es biocompatible y biodegradable. Sin embargo, estudios *in vivo* en animales han demostrado que tienen una baja estabilidad mecánica y también pueden desencadenar una respuesta inmune. Se puede encontrar principalmente en forma de gel (García Carvajal, Garciadiego Cázares, Parra Cid, Aguilar Gaytán, & Castro Carmona, 2013).

Ácido poliglicólico (PGA):

El ácido poliglicólico (PGA) y los copolímeros poli(láctico-glicólico) (PLGA) por sus características estructurales, son los más investigados y utilizados en el desarrollo de estructuras biocompatibles para tejido cartilaginoso. No obstante, tienen algunos inconvenientes como la pobre adhesión celular, dificultad de moldeo y ligera reacción inflamatoria una vez implantados *in vivo* (Callén Palacio, 2009).

Ácido poliláctico (PLA):

Se han estudiado muchos biomateriales porosos combinados con condrocitos para reparar lesiones cartilaginosas, como son los polímeros sintéticos polilácticos, los cuales tienen una elevada resistencia a la tensión, una reducida deformación y un módulo de Young elevado, es idóneo para aplicaciones que tienen que soportar una carga como son las suturas y fijaciones ortopédicas, su tiempo de absorción es largo alrededor de 1.5 años para 50 y 90 mg. En general, en estas formas prefabricadas se pueden cultivar células gracias a que los andamios son mecánicamente estables y luego pueden ser implantados *in vivo* para una reparación completa. Los más comúnmente utilizados son los hechos de poli (hidroxi-ésteres) en forma de mallas, que se utilizan desde la década de 1990 para la regeneración del cartílago e incluyen el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), y sus copolímeros (PLGA) (Vinatier , y otros, 2009), (Landínez Parra, Garzón Alvarado, & Cardozo de Martínez, 2010) , (Wang, Li, Li, Jiang, Ouyang, & Gao, 2010), (Engelhardt, y otros, 2011.), (Atala, 2012) .

Policaprolactona (PCL):

Es un poliéster alifático lineal y, debido a su naturaleza semicristalina e hidrófoba, su degradación es muy lenta (años), por lo que se indica como material de base para el desarrollo de implantes a largo plazo, es un material hidrófobo, la cual es una desventaja que se soluciona con tratamiento con plasma; muestra una buena interacción con los osteoblastos, ya que promueve su crecimiento y mantenimiento de su fenotipo. Los andamios obtenidos mediante electrohilado han mostrado favorables características físicas y biológicas como mantenimiento de la estructura del andamio y apoyo a la proliferación y diferenciación celular. Las matrices no consiguen una distribución homogénea ni una densidad suficiente de condrocitos para que promuevan la diferenciación celular y la formación de la matriz cartilaginosa, (Engelhardt, y otros, 2011.) (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010) (Escobar Ivirico , 2006) (Claire , Jeong, & Hollister., 2010).

Otros, como la agarosa, alginato, quitosano y derivados del polietilenglicol , se han utilizado para obtener materiales elásticos de cartílago no articular como es el pabellón auricular , nariz o la membrana timpánica. Además, se han desarrollado modelos osteocondrales que contienen cartílago articular de las falanges y el cóndilo de la mandíbula (Couceiro Follente & Carpintero Arias, 2002) (Ochi, Uchio, Kawasaki, Wakitani, & Iw, 2002) (Álvarez, Ripoll , Restrepo, & Forriol , 2010) (Vinatier , y otros, 2009) (Yingying, y otros, 2012). Sus principales desventajas son : debilidad e inestabilidad mecánica, incapacidad para mantener una forma predefinida, impurezas que afectan las propiedades del material (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

7. FUENTES CELULARES PARA REPARACIÓN DEL CARTÍLAGO.

En diversos estudios se ha prestado atención al uso de condrocitos articulares como una fuente de células viables para la reparación de cartílago hialino (Vinatier , y otros, 2009); sin embargo, la recolección de este cartílago es un procedimiento altamente invasivo, con alto potencial de morbilidad del sitio donante y posible pérdida de su función, por lo que existen diferentes fuentes para la obtención de condrocitos autólogos en diferentes zonas del cuerpo: auricular, nasal y el cartílago costal. En un estudio realizado por Osth y otros encontraron que en comparación con el cartílago articular, los condrocitos auriculares presentaron una proliferación celular cuatro

veces más rápido *in vitro* y en el *cultivo in vivo*, se observó la construcción de matrices ricas en proteoglicanos, positivo a la tinción en colágeno tipo II y una débil presencia de elastina, además de una producción de neocartílago con mayor similitud bioquímica e histológica a la de cartílago nativo (Chung & Burdick, 2008). Por otra parte en un modelo canino experimental de daño en el cartílago articular en rodilla, se trasplantaron células de cartílago elástico (auricular) derivados de células progenitoras de cartílago autólogo. El cartílago reconstruido era rico en proteoglicanos y mostró características histológicas similares a las del cartílago hialino articular, además de que las propiedades mecánicas de los tejidos reconstruidos fueron más altas que las del cartílago elástico, igualando las del cartílago hialino (Mizuno, y otros, 2013).

8. ELECTROHILADO COMO TÉCNICA PARA ELABORACIÓN DE ANDAMIOS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

Para generar los andamios se emplean diferentes técnicas, una de ellas son las membranas electrohiladas. Durante el proceso de preparación (Fig. 10) se hace pasar un fluido a través de un electrodo capilar en forma de aguja o punta en presencia de un campo eléctrico producido por una fuente de alto voltaje (~30kV). Cuando éste llega a un determinado valor, se vence la tensión superficial de la pequeña gota que se forma en el extremo de la aguja, generándose un chorro (jet) líquido cargado eléctricamente que se acelera hacia una región de menor potencial, en donde se encuentra un colector conectado a tierra. A medida que el solvente se evapora, el chorro se estrecha, produciendo fibras continuas que forman una membrana tridimensional altamente porosa.

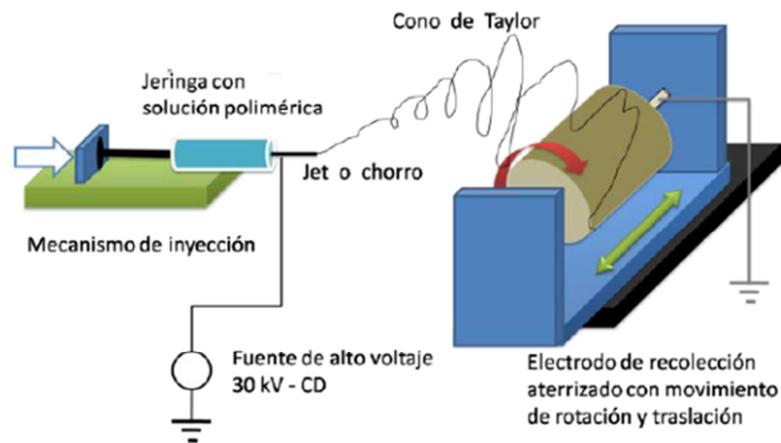


Fig. 10. Proceso de electrohilado.

La técnica tiene la característica de producir nanofibras de diferentes materiales y geometrías, además de que con la selección adecuada de los parámetros tanto de proceso (voltaje aplicado, temperatura, velocidad de inyección, distancia entre aguja y colector) como los parámetros de la solución (peso molecular, viscosidad, conductividad, la tensión superficial, concentración) se puede controlar el diámetro de las fibras y sus características, posibilitando el desarrollo de membranas y tubos con nanofibras, ampliando aún más la versatilidad de la técnica en la ingeniería de tejidos. En la última década ha atraído mucho la atención ya que la formación de nanofibras imita grandemente la matriz extracelular dentro del cuerpo (Young, 2006) (Shabani, Haddadi-Asl, Seyedjafari, & Soleimani, 2012).

Parámetros del proceso (Calderón Arenas & Martínez Rincón, 2012):

Tensión eléctrica aplicada: Un elemento fundamental es la tensión eléctrica aplicada a la solución; pues sólo después de alcanzar la tensión umbral, ocurre la formación de las fibras. Esto es debido a la afinidad de la solución con el campo eléctrico, dando inicio al proceso de electrohilado. Se ha demostrado que al aplicar altas tensiones

eléctricas, genera mayor eyección de polímero y esto a su vez facilita la formación de una fibra de menor diámetro así como también en la rápida evaporación del disolvente. Una consideración a tener en cuenta es que a mayor tensión eléctrica, también hay una mayor probabilidad de formación de perlas o aglomeraciones.

Caudal: La velocidad de flujo del polímero en la jeringa es un parámetro importante en el proceso, ya que influye en la velocidad del jet como en su reacción y tasa de transferencia del material. Una menor rapidez de flujo es más deseable ya que el disolvente tendrá un tiempo suficiente para la evaporación.

Tipos de colectores: Un colector sirve como un sustrato conductor, donde las nanofibras se recogen. Generalmente, como colector se utiliza una lámina de aluminio, pero debido a la dificultad en la transferencia de fibras recogidas y la necesidad de fibras alineadas para diversas aplicaciones, se han utilizado otros colectores tales como las ruedas giratorias.

Distancia al colector: La distancia entre la punta y el colector es otro parámetro importante para controlar los diámetros de las fibras y su morfología. Además, se requiere una distancia mínima para dar a las fibras el tiempo suficiente para secarse antes de llegar al colector; de lo contrario, se han observado la presencia de perlas o aglomeraciones.

Parámetros de la Solución (Calderón Arenas & Martínez Rincón, 2012).

Concentración: Es necesario contar con una concentración mínima de la solución del polímero. Los investigadores han intentado encontrar una relación entre la concentración de la solución y el diámetro de la fibra, obteniendo una relación conocida como ley de potencia, la cual induce a la siguiente conclusión “al aumentar la concentración de la solución, aumenta el diámetro de la fibra” (Deitzel, Kleinmeyer, Harris, & Beck Tan, 2001).

Peso molecular: Tiene un efecto significativo sobre las propiedades reológicas y eléctricas tales como: viscosidad, tensión superficial, conductividad y resistencia dieléctrica. Este es otro parámetro importante de la solución que afecta la morfología de la fibra en la técnica y es por ello que generalmente soluciones de alto peso molecular, se han utilizado, ya que proporcionan la viscosidad deseada para la generación de la fibra. Por otro lado, se ha observado que una solución de bajo peso molecular tiende a formar perlas en lugar de fibras y una solución de alto peso molecular tiende a formar fibras con grandes diámetros.

Se ha encontrado que con muy baja viscosidad no hay una formación continua de la fibra, y que con una viscosidad muy alta hay dificultad en la eyección del jet de la solución del polímero, por lo tanto una viscosidad óptima es un principal requisito para el proceso.

Conductividad: La conductividad de la solución está determinada principalmente por el tipo de polímero, y disolvente utilizado. Se ha encontrado que con el aumento de la conductividad eléctrica de la solución, hay una disminución significativa en el diámetro de las nanofibras, mientras que con una baja conductividad de la solución, allí resulta insuficiente el alargamiento del jet por la fuerza eléctrica para producir fibras uniformes.

9. POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.

La polimerización por plasma es la formación de materiales poliméricos bajo la influencia de un gas parcialmente ionizado (plasma). Es un método efectivo para la preparación de películas delgadas con estructura densa y entrecruzada que se puede usar como capa aislante, como recubrimiento protectorio, como membrana permeable, etc. Dentro del plasma es posible formar películas delgadas libres de agentes externos a la reacción de polimerización. En condiciones de plasma dos o más monómeros se pueden mezclar para formar iones y radicales para formar moléculas complejas. Estas moléculas pueden reaccionar entre sí para producir productos más complejos produciendo un nuevo copolímero aleatorio. Otros componentes se pueden adicionar a esta mezcla,

como el yodo, el cual se incorpora a la estructura del copolímero con el propósito de incrementar la conductividad eléctrica u otras propiedades del material. De esta forma es posible la síntesis de un nuevo copolímero aleatorio por plasma de forma más sencilla que la síntesis tradicional de estos polímeros. Para aumentar las propiedades mecánicas del material compuesto se requiere una buena transferencia de carga entre la matriz polimérica y la fibra, y depende de una adecuada adhesión entre las dos. La adhesión entre fibras orgánicas y matrices poliméricas en materiales compuestos generalmente es débil debido a la falta de enlaces químicos o mecánicos. El comportamiento mecánico de la fibra (resistencia a la tensión y módulo elástico) depende de qué tan eficiente sea la transferencia de cargas de la matriz a las fibras. El tratamiento por plasma es un buen método para lograr una buena adhesión de la interface del material compuesto. Este tratamiento puede alterar la química superficial de la fibra y promover la formación de enlaces químicos con la matriz. Puede remover capas débilmente enlazadas de la superficie de la fibra y promover el entrecruzamiento del polímero sobre la fibra lo cual le da al material compuesto una mejor adhesión en la interface (Corona, 2001).

El plasma está compuesto de una serie de partículas reactivas: iones, e-, moléculas en estados electrónicos excitados, átomos y especies neutras.

La polimerización por plasma se lleva a cabo bajo condiciones de vacío en una cámara de reacción donde se introducen un monómero y dopante en estado gaseoso y se ionizan por la influencia de un campo magnético generado por la diferencia de potencial entre dos electrodos. El polímero se forma a partir de las partículas de los reactivos activadas por el plasma. Las partículas ionizadas al interactuar con la superficie de un sustrato la recubren depositando una película delgada de material. En este proceso no se requiere de intermediarios químicos para que ocurra la oxidación ya que es promovida por el impacto de los e- libres que se encuentran a lo largo del campo eléctrico que colisionan con las moléculas del monómero (Olayo, y otros, 2008).

Ventajas de la polimerización por plasma

- La polimerización por plasma comienza su reacción en fase gaseosa, por lo que no necesita de agentes externos para que ocurra la polimerización.
- La generación de especies reactivas es promovida por el impacto de los electrones libres y las moléculas del monómero.
- Al sintetizarse el polímero ocurre ramificación y entrecruzamiento con otras cadenas modificando las propiedades químicas y físicas de los materiales.
- El polímero se deposita sobre cualquier superficie expuesta al plasma y recubriéndola en su totalidad.
- Debido a que los materiales sintetizados por plasma son sometidos a energías electromagnéticas, bajas presiones y a altas temperaturas electrónicas tanto el material como la superficie expuesta al plasma se esterilizan.
- El espesor de la película y la cantidad de material depositado se controla con el tiempo de reacción.
- Las materiales creados y/o tratados por plasma ofrecen atractivas posibilidades en el desarrollo de nuevos biomateriales, y mejoran la multifuncionalidad de dispositivos ya existentes.
- Los biomateriales sintetizados y/o tratados por plasma son reproducibles, con un tiempo de vida razonable, económicos, etc.

Esta técnica ha sido probada en andamios para crecimiento celular con éxito (Corona, 2001).

10. EVALUACIÓN MECÁNICA.

Uno de los principales problemas en la Ingeniería de tejidos es la fabricación de andamios que se asemejen mucho a las propiedades mecánicas de los tejidos regenerados. Para tejidos de cartílago, un adecuado andamio proporciona la estabilidad mecánica inicial y fomenta una distribución uniforme de células, estos andamios permiten la inmovilización de las células y mantienen diferenciado el fenotipo de los condrocitos.

El estudio de las propiedades mecánicas se refiere a la respuesta de un cuerpo cuando se le somete a una fuerza externa, la cual genera relaciones del tipo tensorial con la deformación que sufre este material. De los

diferentes ensayos existentes, el más empleado es el ensayo de tracción en una dimensión, el cual entrega la mayoría de los datos relevantes para un primer estudio mecánico de materiales (Florent, 2006).

Los datos obtenidos se pueden utilizar para comparar distintos materiales entre sí y para saber si una pieza de un cierto material podrá soportar unas determinadas condiciones de carga. Consiste en someter a una probeta de forma y dimensiones determinadas a un esfuerzo en la dirección de su eje, hasta romperla (Fig.11), el ensayo se inicia mediante el desplazamiento del cabezal de la máquina en las condiciones definidas, fijando la velocidad de desplazamiento, la velocidad de aplicación de carga, o la velocidad de deformación, definidos por el usuario. A medida que la probeta se alarga, la máquina universal (Fig. 11) registra la carga de la fuerza aplicada, y alargamiento de la probeta, hasta su rotura. Los datos obtenidos permiten generar la gráfica tensión/desplazamiento. A partir de las dimensiones iniciales de la probeta, los datos originales de fuerza y alargamiento se transforman en tensión y deformación, que nos permite caracterizar las propiedades mecánicas que se derivan de este ensayo.

Los resultados del ensayo de tracción quedan reflejados en un diagrama en el que los valores de deformación (alargamientos) producidos se representan en el eje de abscisas, y las tensiones de tracción aplicadas en el eje de ordenadas. Obtenemos datos tan relevantes como el límite de elasticidad, la resistencia a la tracción, o el alargamiento producido. Se ha investigado sobre el efecto de estimulación mecánica multiaxial sobre el crecimiento y propiedades de tejido cartilaginoso formado *in vivo*, combinando compresión y cizallamiento (elementos que soportan tracción y empuje) durante diferentes periodos de tiempo estudiando así las propiedades mecánicas del tejido y respuesta uniaxial (Stephen D. Waldman, 2007) .

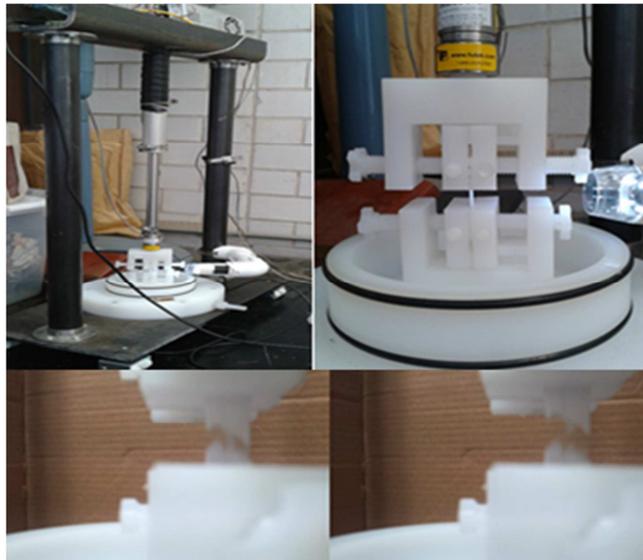


Fig. 11. Máquina universal de tracción y probeta sometida a ensayo de tracción.

Módulo de elasticidad:

El esfuerzo y la deformación dentro del rango elástico generalmente siguen una ley lineal. La pendiente en la porción lineal de la curva esfuerzo contra la deformación a tensión define al módulo de Young o módulo de elasticidad (E) de un material (Fig. 12) .

$$E = \text{módulo de Young} = \frac{\sigma}{\epsilon} = Pa, KPa, MPa \text{ o } \frac{N}{mm^2}$$

$$\sigma = \text{Esfuerzo} = \text{Mpa}$$

$$\epsilon = \text{Deformación} = \frac{mm}{mm}$$

Fluencia o cedencia:

Se define como el punto en el cual el material sufre una deformación plástica, es decir el material pasa de la zona de deformación elástica y queda deformado permanentemente. El cambio de comportamiento de elástico a plástico no se detecta con facilidad, por lo que se determina una fluencia convencional al 0.2%. La forma más común de definir este valor, es por medio de una gráfica que resulta de aplicar una prueba de tensión al material, trazando una línea paralela a la zona elástica pero con un desplazamiento del 0.2% sobre el eje X, el punto en el que esta línea se intersecta con la curva es el valor de esfuerzo de cedencia (Fig. 12) (Vergara Camacho & Martínez Cervantes, 2008).

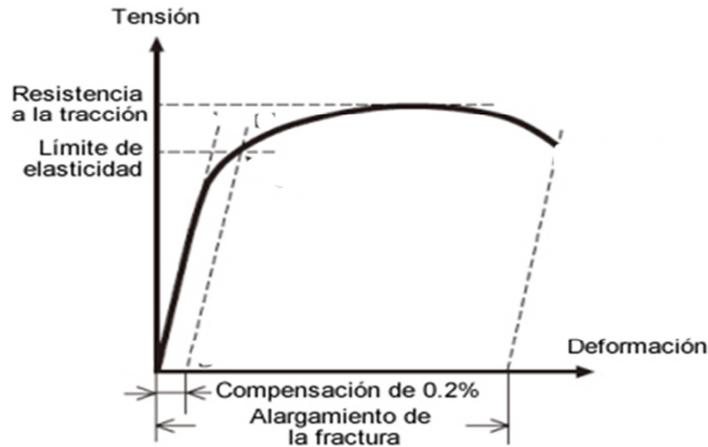


Fig. 12. Determinación de la fluencia o cedencia convencional del 0.2% de deformación.

Máximo Esfuerzo:

Es la resistencia máxima al material observada en la curva como el punto más alto, puede dar alguna indicación a la presencia de defectos. Si el material contiene porosidades o inclusiones, estos defectos pueden causar un decremento mayor al normal de la resistencia máxima del material (Fig. 13).

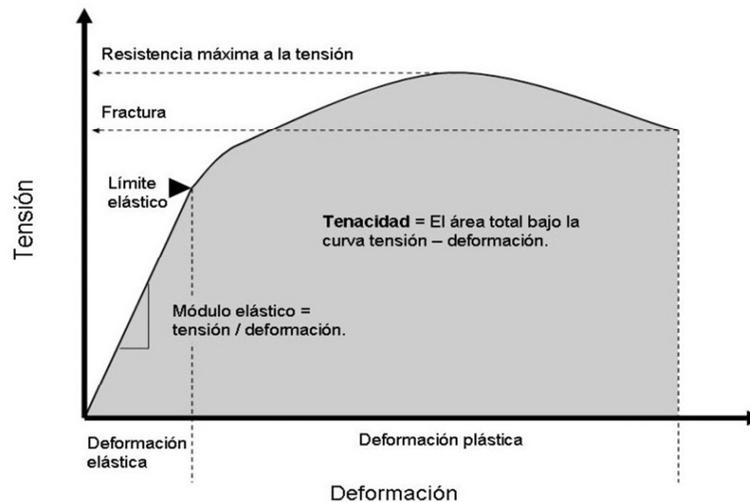


Fig. 13. Asignación del módulo de Young, fluencia o cedencia y máximo esfuerzo mediante la gráfica esfuerzo vs. deformación.

Tenacidad:

Es una medida de la capacidad del materia de absorber energía antes de la fractura, la geometría de la probeta, así como la manera en la que se aplica la carga son importantes para determinarla. Se calcula mediante el área bajo la curva que genera la gráfica de esfuerzo deformación, desde el comienzo del ensayo hasta la fractura del material, sus unidades son energía por unidad de volumen

$$\text{Unidades: } \frac{J}{\text{mm}^3} \text{ o } \frac{N \cdot \text{mm}}{\text{mm}^3} = \text{MPa}$$

Ductilidad:

Es una medida del grado de deformación plástica que puede ser soportada por el material hasta que este se fractura, un material que experimenta poca o ninguna deformación plástica se denomina frágil (Callister, 2007).

La ductilidad puede expresarse como alargamiento relativo o porcentual.

$$\%E = \left(\frac{L_f - L_0}{L_0} \right) * 100$$

$\%E$ = porcentaje de deformación plástica a rotura

L_f = longitud en el momento de la fractura

L_0 = longitud inicial

El conocimiento de la ductilidad es importante porque Indica el grado en que una estructura puede deformarse antes de producirse la rotura.

Deformación elástica y plástica:

El diagrama esfuerzo deformación se puede dividir en varias regiones, una región elástica la cual corresponde a la primera parte de la curva y se caracteriza por la inexistencia de deformación residual en el caso de que se produzca la descarga. Está compuesta a su vez por una zona proporcional que se caracteriza por la existencia de una relación lineal entre la tensión y la deformación. Más allá del límite elástico el alargamiento no se recupera y se conoce como deformación permanente o plástica. Al retirar todas las cargas, ocurre que la probeta queda afectada por una deformación permanente de su forma. (Fig. 14)

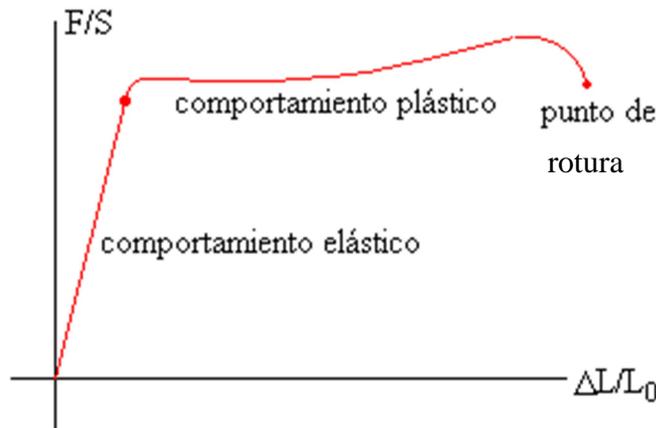


Fig. 14. Zona elástica y plástica del diagrama esfuerzo contra deformación.

IV. JUSTIFICACIÓN.

La pérdida de un tejido o de su función, debido a defectos congénitos, enfermedad o trauma, es uno de los problemas más frecuentes y costosos que enfrenta la medicina, tal es el caso del cartílago donde estudios previos han declarado de manera preliminar la viabilidad de la construcción del cartílago *in vitro*, sin embargo, el cartílago actualmente regenerado *in vitro* es insatisfactorio para la aplicación clínica debido a que la estructura del cartílago no es homogéneo, tiene un espesor insuficiente y su propiedad mecánica es pobre, a pesar de más de dos décadas de investigación en la ingeniería de tejido cartilaginosa, muy pocos productos han pasado del laboratorio. En vista de que ningún método usado en las terapias convencionales para reparar daños en cartílago restaura de forma duradera el problema principalmente en la osteoartritis, actualmente se utilizan sistemas basados en la implantación de células cultivadas en andamios creados con diferentes polímeros biodegradables y técnicas.

En este trabajo se pretende conformar un nuevo andamio a base de biomateriales que mejoren la adherencia celular y que se degrade lentamente y por consiguiente mantengan la estructura del cartílago articular por tiempo indefinido. Lo cual representa una aportación al conocimiento debido a que no se ha utilizado la combinación de estos polímeros, contribuyendo también al mejor entendimiento sobre los factores involucrados en mantener la integridad y regeneración del cartílago. Si los resultados son alentadores se pretende la aplicación clínica en un mediano plazo en el manejo de la osteoartritis y enfermedades asociadas al desgaste del cartílago.

V. HIPÓTESIS.

El ambiente generado artificialmente (andamio), para regeneración de tejido cartilaginosa mediante la técnica de electrohilado con Policaprolactona- ácido poliláctico (PLA-PCL) tratado superficialmente con PPy-I (polipirrol-iodo) y la adhesión de la proteína agregano (AG), es mejor que el ambiente proporcionado por el andamio comercial de PLGA-PGA, entonces el tejido y las propiedades mecánicas que se obtengan de este, resultarán de mejor calidad.

VI. OBJETIVO.

- Conformar un nuevo andamio a base de Policaprolactona (PCL) y ácido poliláctico (PLA) recubiertas con polipirrol (PPy)-I (iodo)- Agreganos (AG) que mejoren la adherencia celular y que se degrade lentamente manteniendo así la estructura del cartílago articular por tiempo indefinido.

Objetivos específicos:

- Mejorar las propiedades mecánicas y adhesión celular, modificando la membrana obtenida mediante la técnica de recubrimiento superficial por plasma.
- Evaluar las características de los andamios mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), Infrarrojo por Reflectancia Total Atenuada (ATR).
- Evaluar las propiedades mecánicas de los andamios para conocer su módulo de Young, cedencia, ductilidad, tenacidad y máximo esfuerzo, mediante ensayos de tracción.
- Evaluación de la viabilidad y proliferación celular de condrocitos tanto *in vitro* como *in vivo*.

VII. METODOLOGÍA.

1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES POLIMÉRICAS Y CONDICIONES DE HILADO.

Se desarrollaron andamios poliméricos de PLA, PCL a partir de la técnica de electrohilado, la concentración de la solución fue tomada de un reporte previo (Ávila Gutiérrez, 2011).

PLA (pellets).

Se preparó una solución al 12% (w/v) utilizando como solvente una mezcla cloroformo-etanol (2:1) hasta obtener una mezcla homogénea.

PCL (pellets).

Se preparó una solución al 12% (w/v) utilizando como solvente una mezcla cloroformo-etanol (2:1) hasta obtener una mezcla homogénea.

2. ELECTROHILADO.

Para la producción de los andamios, se precalentó la cámara de electrohilado a 30°C, posteriormente se colocaron las soluciones poliméricas por separado en 2 jeringas plásticas a una relación de 70:30 de PLA-PCL y se montaron en el inyector del equipo para su administración simultánea, mediante la aplicación de presión sobre el émbolo de la jeringa, la cual generó un flujo constante, en donde los efectos de la polarización y carga por causa del campo eléctrico arrojaron la solución a una superficie colectora conectada a tierra a una distancia de 20cm del cono de la aguja; durante el trayecto una parte del solvente se evapora, obteniendo una fibra de un diámetro aproximado de 700nm a 3µm, dependiendo de la viscosidad de la solución y el calibre de la aguja.

Las condiciones que se utilizarán durante el proceso de electrohilado se presentan en la tabla 1, manteniéndose una temperatura constante de 32°C durante todo el proceso:

Polímero	Concentración (w/v)	Calibre aguja	Flujo de Inyección (ml/h)	Voltaje (kV)	Distancia del Jet al colector
(70%) PLA Mv= 4531.75 calculada mediante viscosímetro.	12%	25G	0.129	24	20cm
(30%) PCL Mv= 65112.65 calculada mediante viscosímetro.	12%	23G	0.129	24	20 cm

Tabla 1. Condiciones de hilado de las muestras.

*aguja: 25G = diámetro interno 0.25mm, 23G= diámetro interno 0.33mm

A la membrana obtenida se le realizó un tratamiento después del hilado colocándola en un horno a vacío a 44°C, durante 3 días para eliminar el solvente remanente.

3. POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.

Usando la técnica de polimerización por plasma (Fig. 15) se depositó una película delgada de Polipirrol- Iodo (PPy-I) sobre la membrana, los reactivos utilizados fueron Sigma Aldrich.

La polimerización se llevó a cabo en un reactor tubular de vidrio de 9cm de diámetro externo y 20cm de longitud, descrito en trabajos previos (Corona, 2001).

Los parámetros de operación del reactor fueron, distancia entre electrodos 8cm, potencia de 20 Watts y presión de 1.2×10^{-1} mmHg, aplicando pirrol durante una hora continua y yodo de manera intermitente en intervalos de 6 minutos.

Después del tratamiento, el reactor se apagó y se mantuvo cerrado durante una hora en una atmósfera de monómero antes de la apertura a la atmósfera y retirar la membrana.

Se recortaron trozos de 0.5 y $1 \times 1 \text{ cm}^2$ y $1 \times 3 \text{ cm}$, posteriormente se introdujeron en el reactor y se llevó a cabo la polimerización.

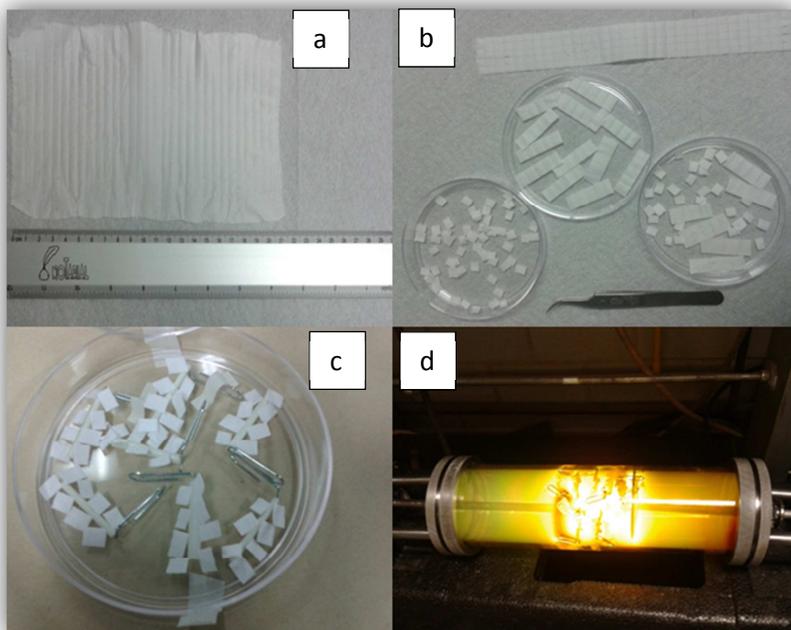


Fig. 15. a) Membrana obtenida del electrohilado, b y c) preparación del material para introducirlo al reactor d) polimerización plasma PPy-I.

4. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE AGRECANOS.

Se adquirió Aggrecan from bovine articular cartilage en Sigma Aldrich con número de catálogo A1960 en presentación de 1mg y se almacenó bajo las condiciones que el proveedor recomienda hasta su uso.

Para la preparación de la solución de agrecanos (AG) se disolvió 1mg de agrecanos liofilizados en 1ml de agua destilada y posteriormente se aforó en un matraz de 25 ml para obtener una concentración de 0.04mg/ml.

5. RECUBRIMIENTO DEL ANDAMIO CON SOLUCIÓN DE AGRECANOS, LAVADO Y SECADO DE LAS MUESTRAS.

Posterior a la polimerización por plasma se colocó el material dentro de cajas porta objetos:

- Se agregaron 0.5 ml de solución (AG) para trozos de $.5 \times .5 \text{ cm}^2$ y $1 \times 1 \text{ cm}^2$.
- 1ml de solución (AG) para trozos de $1 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$.
- Las muestras bañadas en solución (AG) se colocaron en un desecador sin silica por 24 horas.
- Después de 24 horas se retiró sobrenadante, se lavó cada muestra con 3ml de agua destilada por 10 minutos y se pusieron a secar en un desecador a vacío por 24 horas.



Fig. 16. Procedimiento para recubrimiento del material polimerizado con solución de agreganos.

6. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS Y CULTIVO DE CONDROCITOS.

Para la obtención de células de cartílago elástico auricular y cultivo de condrocitos se utilizaron los siguientes reactivos y procedimientos:

➤ *Reactivos:*

- PBS (Phosphate Buffer Saline) con Antibiótico-Antimicótico
- Tripsina 0.05% - EDTA (0.53 mM) en solución Hank's
- Colagenasa Tipo II 2mg/ml en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 0.37% NaHCO₃, suplementado con Antibiótico-Antimicótico
- Medio de cultivo DMEM con 0.37% NaHCO₃, Suero Fetal Bovino al 10% y suplementado con Antibiótico-Antimicótico.

➤ *Procedimiento:*

Biopsia de cartílago articular:

1. Se retiró una biopsia de cartílago auricular utilizando un conejo con las siguientes características:

- ❖ Especie: Conejo New Zealand blanco.
- ❖ Sexo: Macho
- ❖ Edad: 5 meses de vida extrauterina
- ❖ Peso: 4 Kg

2. El conejo se tranquilizó con una inyección intramuscular de Acepromacina (9 mg/Kg) y Ketamina (20 mg/Kg), anestesiando posteriormente con una inyección intravenosa de Pentobarbital Sódico (20 mg/kg).
3. Se tomó la biopsia bajo condiciones asépticas de la oreja del conejo. Obteniendo así una muestra de aproximadamente 1cm², la cual se transportara al laboratorio en un tubo falcon con PBS c/ Antibiótico-Antimicótico para ser procesada.

➤ *Obtención de cultivo primario de Condrocitos*

1. En una campana de flujo laminar y bajo condiciones estériles el cartílago se lavó con PBS para retirar el exceso de sangre y se colocó en un disco de 100mm x 20mm para disgregarlo mecánicamente en trozos de aproximadamente 2 mm los cuales se colocaron en 10ml de la solución disgregadora (Tripsina 0.05% - EDTA (0.53 mM) - solución Hank's) durante 15 minutos en agitación continua a 37°C, una atmósfera al 5% de CO₂ y humedad saturada.

2. Se dejó sedimentar el tejido y se decantó el sobrenadante, agregando 10ml de la solución de Colagenasa tipo II y se mantuvo durante 3 horas en agitación continua a 37°C, atmósfera al 5% de CO₂ y humedad saturada.
3. Una vez disgregado el tejido se colocó en un tubo falcon y se centrifugó durante 10 minutos a 2000 rpm, se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio de cultivo DMEM con 0.37% NaHCO₃, SFB al 10% suplementado con Antibiótico-Antimicótico, se centrifugó a 2000 rpm x 10 minutos.
4. El botón celular se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo para realizar el conteo celular en una cámara Neubauer con colorante vital azul tripano. Se obtuvieron aproximadamente 10x10⁶ células, de las cuales fueron cultivadas en discos de 150 mm x 25 mm a una densidad de 50,000 cel/ml en medio de cultivo DMEM con 0.37% NaHCO₃, SFB al 10% suplementado con Antibiótico-Antimicótico para lograr su proliferación.

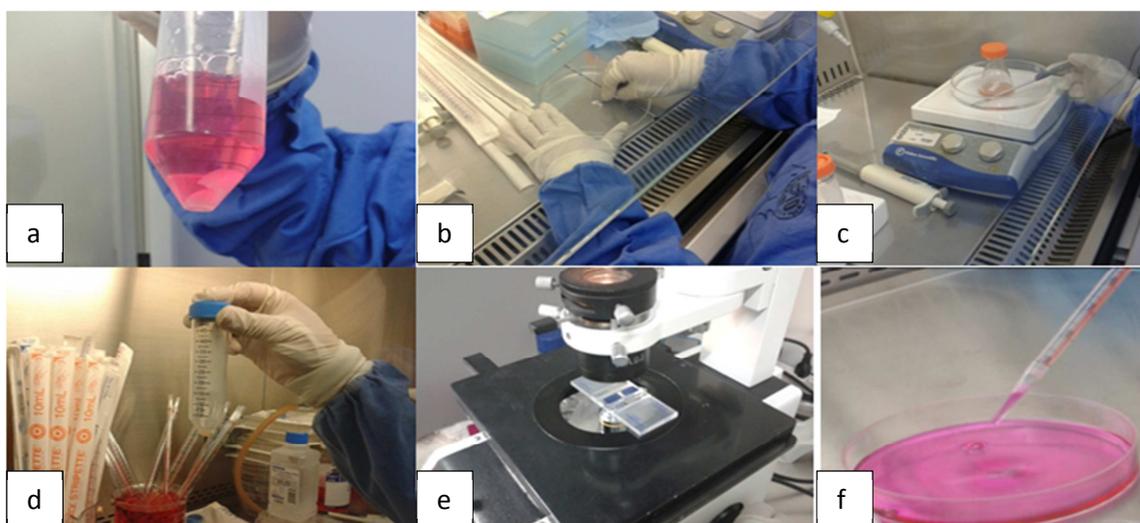


Fig. 17. Obtención de cultivo primario de condrocitos. a) Muestra cartílago auricular en tubo falcon, b) Disgregación mecánica de la muestra, c) Proceso de decantación y agitación continua a temperatura de 35°C. d) Botón celular obtenido después de centrifugar, e) Cámara Neubauer, f) Discos de cultivo con células para expansión celular de condrocitos.

7. PRUEBAS CELULARES.

Se dejó para expansión y proliferación celular el cultivo durante 3 semanas, para obtener una población celular confluyente, lo cual permitió tener suficiente muestra para realizar los experimentos.

Procedimiento In vitro:

1. Se re-suspendieron aproximadamente 1.2x10⁶ células sobre cada uno de los materiales PLA-PCL-PPy-I, PLA-PCL-PPy-I-AG y el control PLGA-PGA.
2. Se cultivaron a una temperatura de 37°C, con 5% de CO₂ y humedad saturada. Para expansión celular sobre las membranas.
3. Se cambió el medio celular cada tercer día durante 7 días.

Procedimiento in vivo:

1. Se hidrataron las membranas de PGA-PLGA, PLA-PCL-PPy-I y PLA-PCL-PPy-I-AG durante 1 hora en medio de cultivo y posteriormente se retiró el medio.
2. Las membranas fueron sumergidas en 600µl (aproximadamente 1.2x10⁶ células) de suspensión celular y fueron colocadas dentro de la incubadora durante 1 hora para su adhesión sobre el material a una temperatura de 37°C, con 5% de CO₂ y humedad saturada.
3. Se cambió el medio celular cada tercer día durante 7 días, para su posterior implantación en el conejo.

8. **IMPLANTACIÓN DE MEMBRANAS CON CÉLULAS AUTÓLOGAS: PRUEBAS IN VIVO.**

1. Se tranquilizó el conejo, con una inyección intramuscular de Acepromacina (5mg/Kg) y Ketamina (20 mg/Kg), anestesiando posteriormente con una inyección intravenosa de Pentobarbital Sódico (40 mg/ml).
2. Se realizó la implante de los materiales con células autólogas en la zona dorsal, bajo condiciones asépticas, realizando una incisión y separando la piel a nivel subcutáneo para la implantación de los materiales.
3. Se colocaron 2 membranas de PLA-PLA-PPy-I, 2 de PLA-PLA-PPy-I-AG, 2 de PGA-PLGA, de aproximadamente 1x3cm, sobre las cuales se había iniciado la proliferación celular durante una semana, previa a su implantación.
4. Se colocó un control de PLA-PLA-PPy-I, uno de PLA-PLA-PPy-I-AG y uno PGA-PLGA sin células.
5. Se suturó la incisión y se aplicó Aluspray® (suspensión cutánea en aerosol presurizado) sobre la herida, que por su capacidad de adherencia asegura una barrera de protección contra la suciedad y los insectos, reduciendo los riesgos de infección además de favorecer la cicatrización.

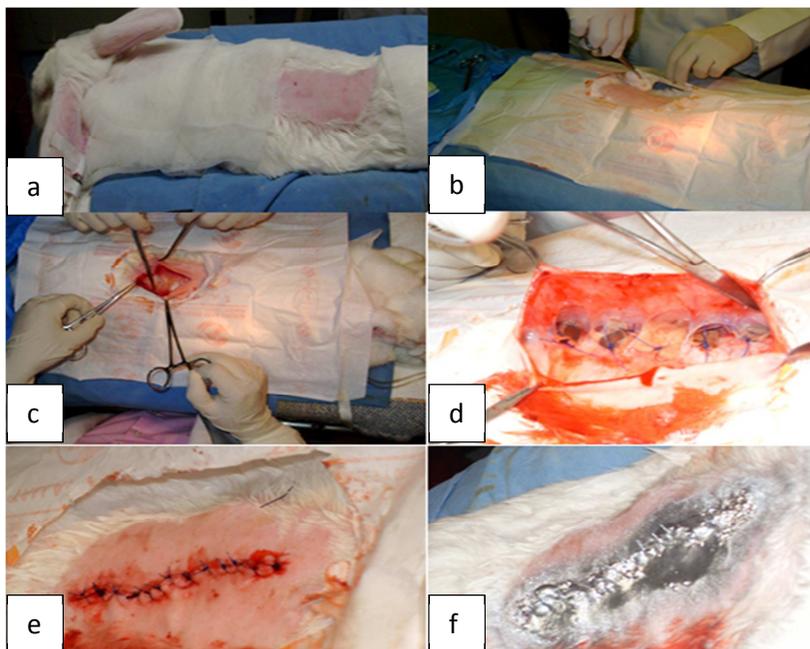


Fig. 18. Implantación de membranas con células y control subcutáneamente.

9. **EXPLANTE DE MEMBRANAS.**

A los 30 días de implantación, se extrajeron los materiales del dorso del conejo siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

1. Se tranquilizó el conejo, con una inyección intramuscular de Acepromacina (5mg/Kg) y Ketamina (20mg/Kg), anestesiando posteriormente con una inyección intravenosa de Pentobarbital Sódico (40mg/ml).
2. Separando la piel de la zona dorsal, se realizó la extracción de los materiales bajo condiciones asépticas.
3. Los materiales se colocaron en tubos falcon con PBS y antimicótico- antibiótico para ser transportadas a hacer las pruebas correspondientes a cada material.

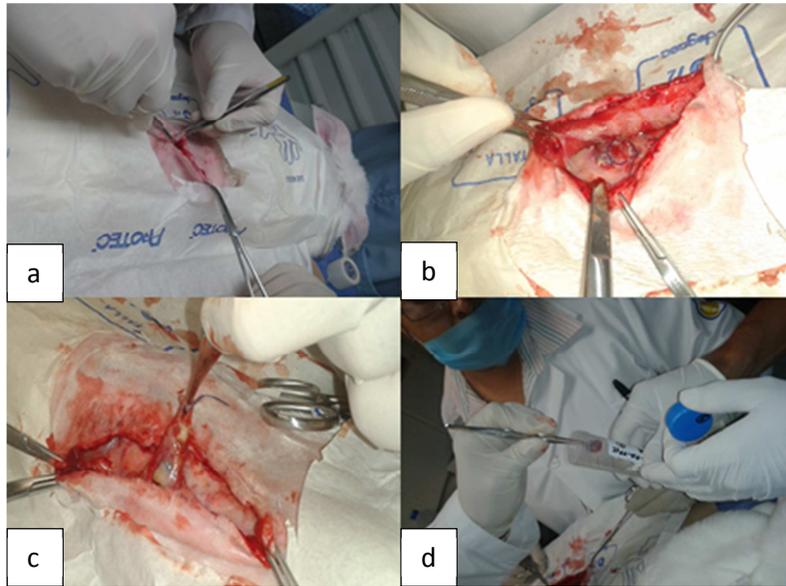


Fig. 19. Extracción de las membranas a los 30 días de cultivo *in vivo*.

10. CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS

La caracterización de las membranas tiene la finalidad de buscar si puede tener un desempeño como andamios en Ingeniería de Tejidos, las variables relevantes para esta función es la composición química, porosidad de la muestra generada por la distribución de las fibras, sus diámetros, sus propiedades mecánicas e interacción celular.

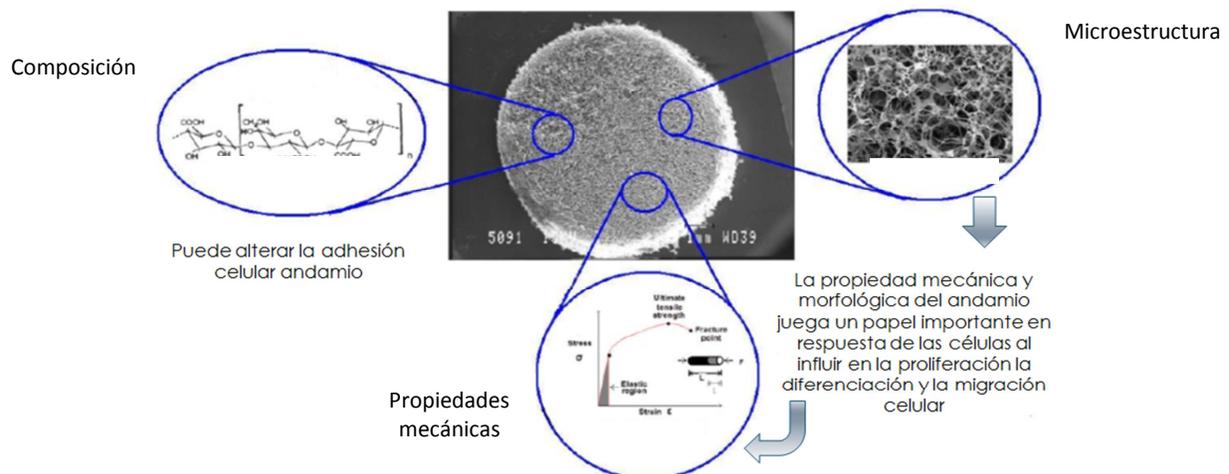


Fig. 20. Puntos a caracterizar de las membranas obtenidas.

ANÁLISIS ELEMENTAL:

- **Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (SEM-EDS):**

Se realizaron utilizando un microscopio JEOL JSM-7600F por retrodispersión de electrones (reflejo de los átomos), a partir de la interacción entre el haz y los átomos, generando una emisión de rayos X que tiene las características del elemento primario, permitiendo un análisis elemental de la energía dispersiva de rayos X o espectroscopia EDS, creando un análisis cuantitativo de la composición elemental presente en la superficie de la muestra. La técnica se utilizó para establecer la presencia de solvente residual.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA:

- **Microscopía Electrónica de Barrido (SEM):**

El análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se realizó utilizando un microscopio marca JEOL JSM-7600F sobre las fibras, explorando la superficie y tomando las imágenes representativas de la muestra.

- **Porosidad:**

Para aplicaciones en ingeniería de tejidos, el andamio debe ser poroso para así permitir la proliferación y diferenciación de las células favoreciendo así la formación de tejido y al mismo tiempo tener una distribución y crecimiento uniformes, además beneficia el transporte de nutrientes.

Para identificar el área de los poros en los materiales generados, se usó del programa de procesamiento de imagen digital de dominio público ImageJ 1.46r. Para lo que fue necesario establecer la escala de la imagen utilizando la distancia en píxeles y una distancia conocida (barra de escala de la imagen por utilizar) colocando la unidad de longitud (nm o μm) correspondiente.

Posteriormente se convirtieron las imágenes obtenidas mediante SEM en binario y, después, haciendo cambios de umbral se establecieron las fibras en blanco y poros en color rojo, como se muestra en la Fig. 21a. Utilizando el comando analizador de partículas se identificaron los bordes de los poros indicando su área y ubicación Fig. 21b.

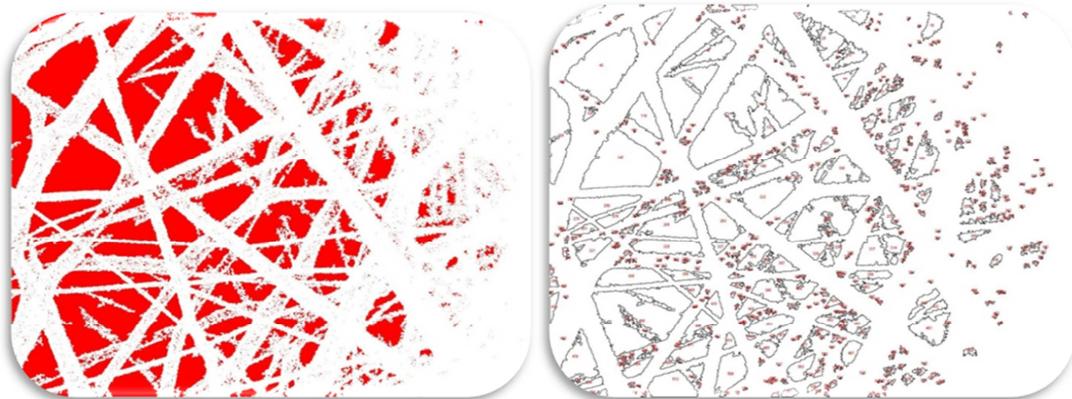


Fig. 21. a) Cambio de umbral: fibras en blanco y poros en rojo, 21. b) Analizador de partículas identificando ubicación y área de los poros.

COMPOSICIÓN QUÍMICA

- **Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier por Reflectancia total atenuada (FTIR-ATR):**

Los infrarrojos se registraron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, Perkin-Elmer de la serie 2000 FT-IR equipado con un accesorio ATR DuraSampIR II™ Smiths Detection con cristal de diamante. Se trabajó a una longitud de onda de 1900 cm^{-1} a 700 cm^{-1} y 32 barridos.

Caracterización mecánica:

Procedimiento ensayos de tracción:

1. Se midió el área transversal de la probeta (ancho x grosor) con un vernier digital
2. Se midió la longitud inicial de la probeta
3. Se colocó la probeta entre las tenazas.
4. Se calibró la fuerza con el peso de la probeta.

5. Se aplicó una velocidad de estiramiento constante (1mm/min), en la dirección de su eje, hasta romperla
6. Se registró la fuerza y alargamiento de la probeta.
7. Se graficó la curva generada del Esfuerzo vs deformación y se calcularon el módulo de Young, cedencia, máximo esfuerzo, ductilidad y tenacidad de cada uno de los materiales.

En la siguiente tabla se indican las condiciones en que se encontraba el material cuando fue sometido al ensayo y el número de muestras para cada uno:

CONDICIÓN	MATERIAL	NÚMERO DE ENSAYOS
Seco	PLA-PCL	9
	PLA-PCL-PPy-I	12
Mojado	PLA-PCL	4
	PLA-PCL-PPy-I	3
Cultivo <i>in vitro</i>	PLA-PCL-PPy-I	1
	PLA-PCL-PPy-I-AG	1
	PGA-PLGA	1
<i>In vivo</i> (Explante a los 30 días)	PLA-PCL-PPy-I	1
	PLA-PCL-PPy-I-AG	1
	PGA-PLGA	1

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA (SEM-EDS):

En la Fig. 22 se puede observar el espectro obtenido de la muestra después del tratamiento en un horno al vacío; se identificaron elementos como carbono y oxígeno, no se encontró presencia de cloro.

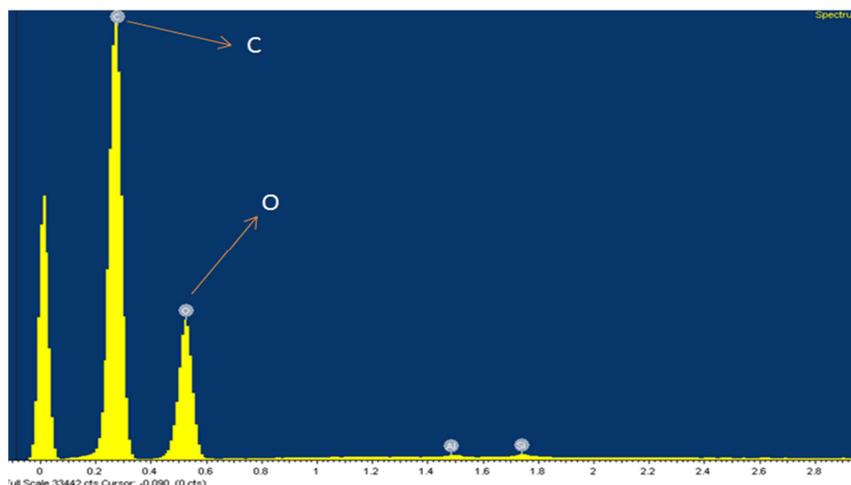


Fig. 22. Espectro SEM-EDS de la muestra. C=carbono, O= oxígeno.

POLIMERIZACIÓN POR PLASMA Y ADHESIÓN DE LA PROTEÍNA AGRECANO SOBRE LA MEMBRANA.

Mediante la polimerización por plasma se modificó la superficie de la membrana electrohilada de PLA-PCL, buscando mejorar su interacción con la matriz. Debido a que después del tratamiento se encuentra una superficie con radicales tales como aminas tanto primarias como secundarias y carbonilos, entre otros, los cuales contribuyen con el anclaje y proliferación celular, además de la absorción de proteínas, ya que inmovilizan biomoléculas (Zuñiga Aguilar, y otros, 2011). De esta forma se aprovecha la superficie modificada, la cual simula la función del ácido hialurónico encargado de enlazar mediante un enlace proteico a los agreganos (Fig. 23).

Por otra parte el tratamiento ayuda a que la velocidad de degradación del andamio sea más lento, ya que actúa como una capa aislante o recubrimiento protectoro. La biocompatibilidad del andamio está relacionada a sus propiedades superficiales, debido a que la interacción biomaterial-tejido es decisivo para su buen funcionamiento.

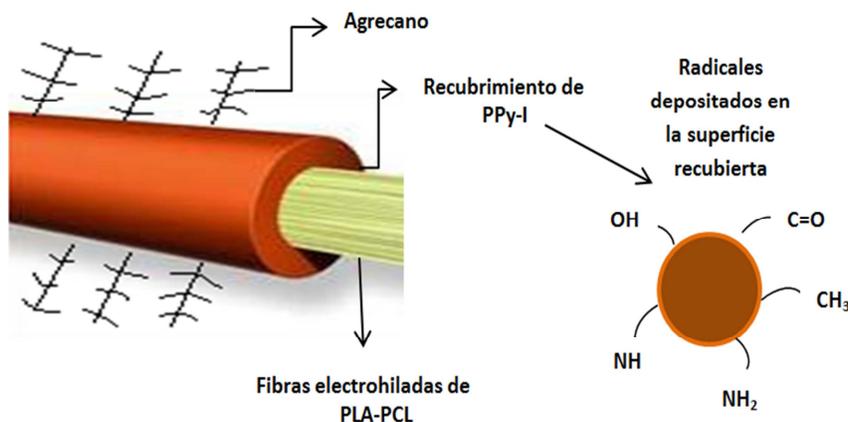


Fig. 23. Representación gráfica del recubrimiento de la fibra con PPy-I y adhesión de la proteína AG sobre ellas, gracias a su diversidad de radicales sobre la superficie.

CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS.

Composición Química.

A continuación se muestran los espectros obtenidos mediante FTIR-ATR sobre los materiales, se realizaron las gráficas y análisis en la asignación de bandas mediante el programa OriginPro® 8.1

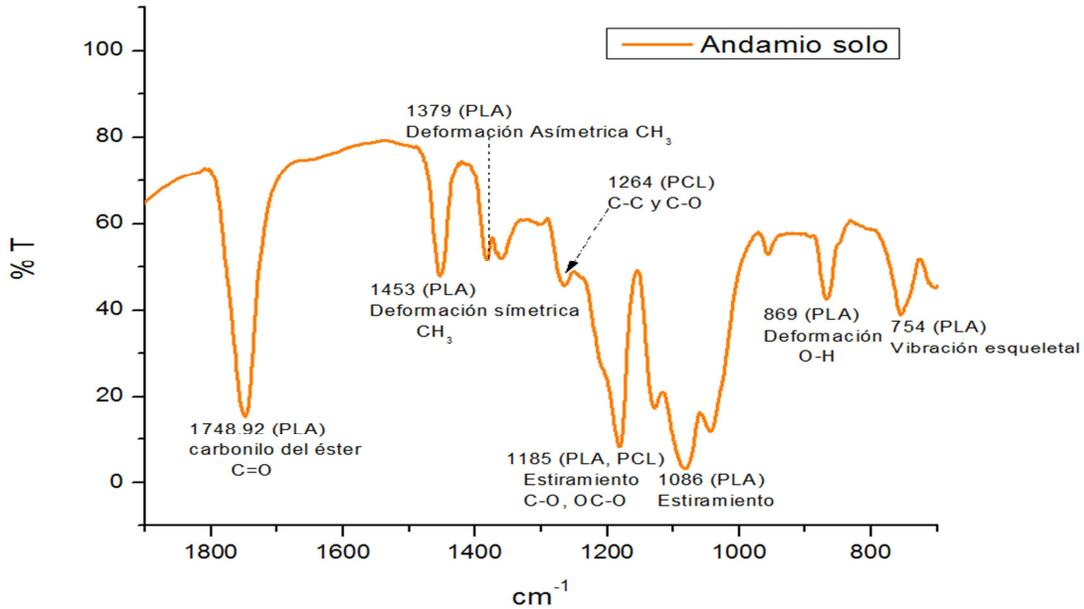


Fig. 24. Espectro FTIR-ATR obtenido del andamio sin recubrimiento superficial.

La Fig. 24 muestra el espectro del andamio de PLA/PCL sin tratamiento superficial en donde se destaca la presencia de enlaces tipo C=O (carbonilo) en 1748.92cm⁻¹ que es parte de la molécula del ácido láctico, en 1264cm⁻¹ se encuentra C-O y C-C que es parte de la molécula de la caprolactona; hay traslapes de información entre la caprolactona y el ácido láctico en 1185 cm⁻¹.

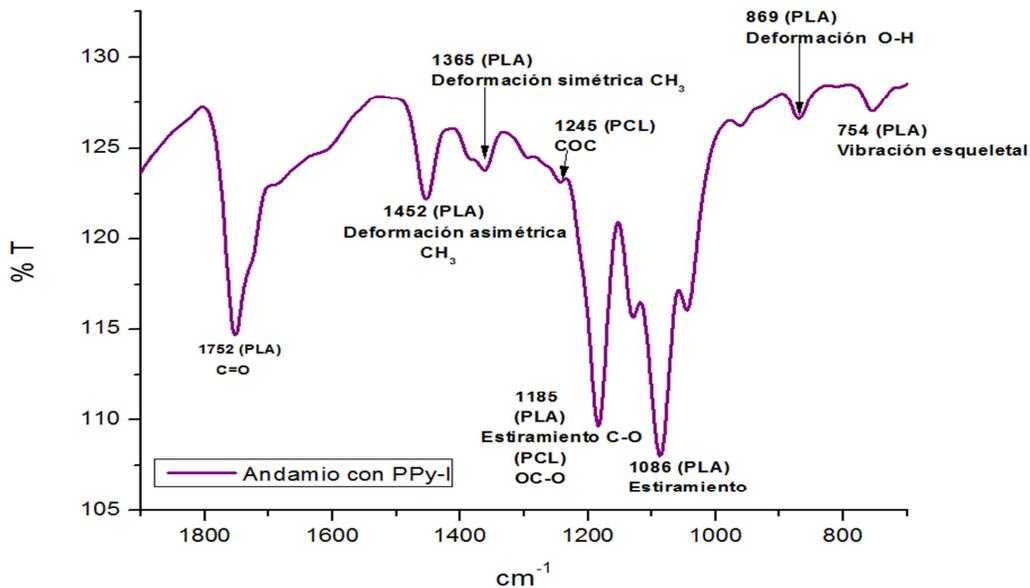


Fig. 25. Espectro FTIR-ATR obtenido del andamio con recubrimiento superficial PPy-I.

Las bandas que se muestran en la Fig. 25 indican la presencia de enlaces tipo C=O en 1752cm^{-1} que forman parte de la molécula ácido láctico. Se encuentran traslapes de información entre la caprolactona y el ácido láctico en 1185cm^{-1} .

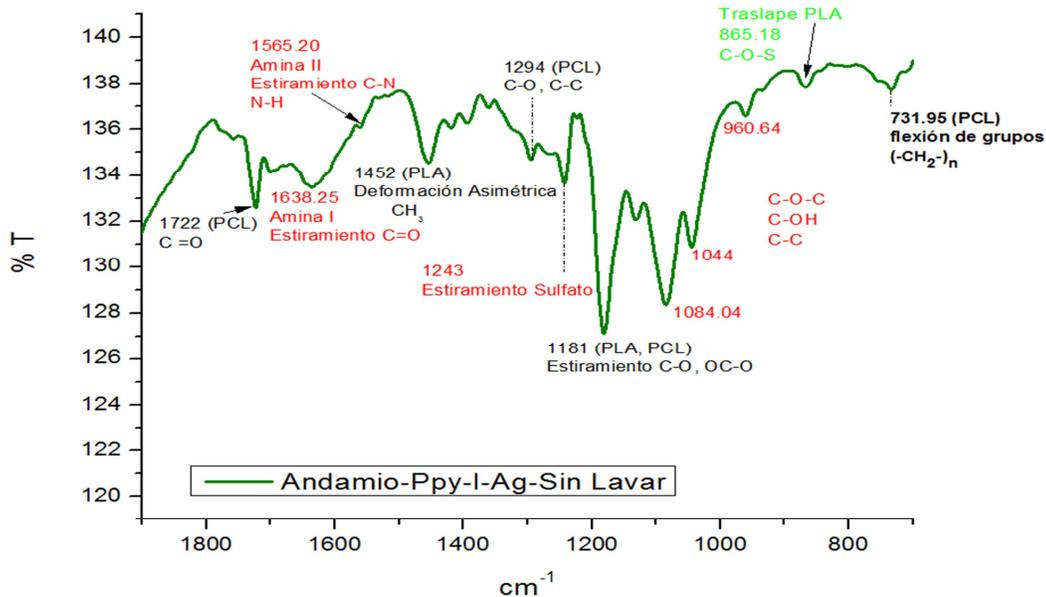


Fig. 26. Espectro FTIR-ATR obtenido del andamio con recubrimiento superficial PPy-I-AG antes de lavar con agua destilada.

Se muestra el espectro del andamio recubierto con PPy-I-AG (Fig. 26) sin lavar con agua destilada, en donde se puede observar picos representativos de la molécula de AG, en 1638.25cm^{-1} se encuentra la Amina I estiramiento del C=O, en 1565.20cm^{-1} Amina II y en 1243cm^{-1} estiramiento del sulfato, entre los picos 960.64 y 1084.04cm^{-1} se encuentra el estiramiento de C-O-S y vibración de anillos C-O-C, C-OH y C-C contenidos en la proteína AG (Camcho, West, Torzilli, & Mendelson, 2000).

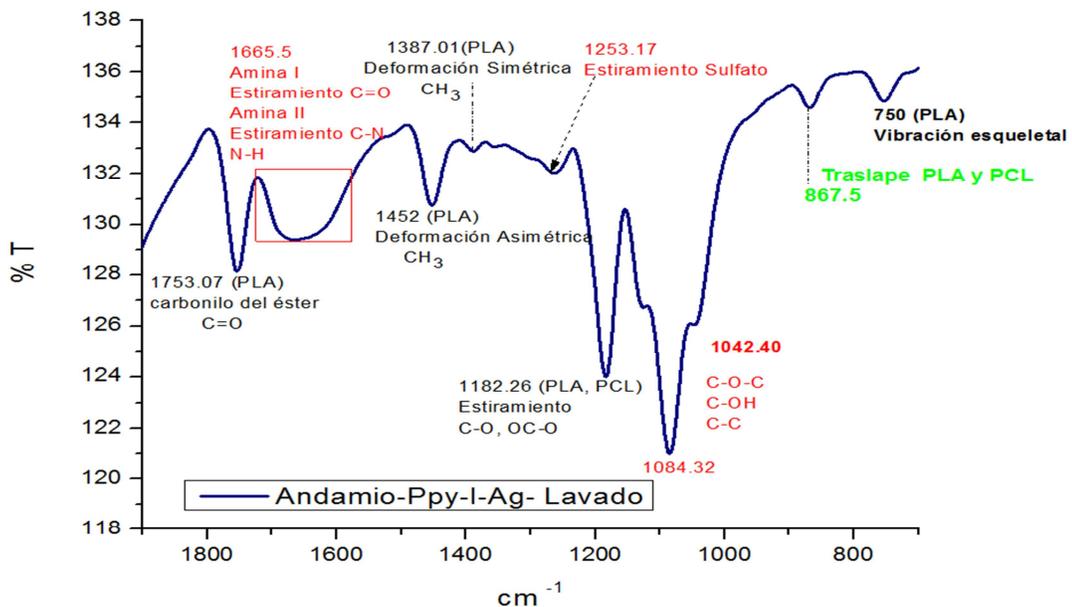


Fig. 27. Espectro FTIR-ATR obtenido del andamio con recubrimiento superficial PPy-I-AG lavado con agua destilada.

En el espectro del andamio recubierto con PPy-I-AG (Fig.27) lavado con agua destilada, se puede observar un pico demasiado ancho en 1665.5cm^{-1} donde se encuentra contenida la Amina I, el estiramiento del C=O y Amina II, en 1253.17cm^{-1} el estiramiento del sulfato, en los picos 960.64 y 1084.04cm^{-1} se encuentra el estiramiento de C-O-S y vibración de anillos C-O-C, C-OH y C-C todos contenidos en la proteína AG (Camcho, West, Torzilli, & Mendelson, 2000).

Es importante observar la presencia de la proteína después del lavado, puesto que pudo haberse perdido gran cantidad o la totalidad de la misma durante el enjuague del material. La polimerización por plasma con PPy modifica la superficie del material proveyéndola de aminas y carbonilos, entre otros radicales, los cuales tiene una gran influencia en la adsorción de proteínas (Zuñiga Aguilar, y otros, 2011), es notable que la proteína AG queda adherida en la superficie al andamio recubierto con el PPy-I, debido a los picos representativos que se muestran en la Fig. 27.

MORFOLOGÍA.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Uno de los factores determinantes del andamio aparte de su biocompatibilidad para su aplicación en la Ingeniería de tejidos, es su topografía de superficie. Para la caracterización de la estructura interna de los andamios, en cuanto a su organización de la red de poros y el tamaño de los mismos se empleó como herramienta al SEM.

A continuación se presentan las imágenes obtenidas por SEM de las membranas generadas mediante electrohilado sin modificación y con modificación superficial y recubrimiento de AG.

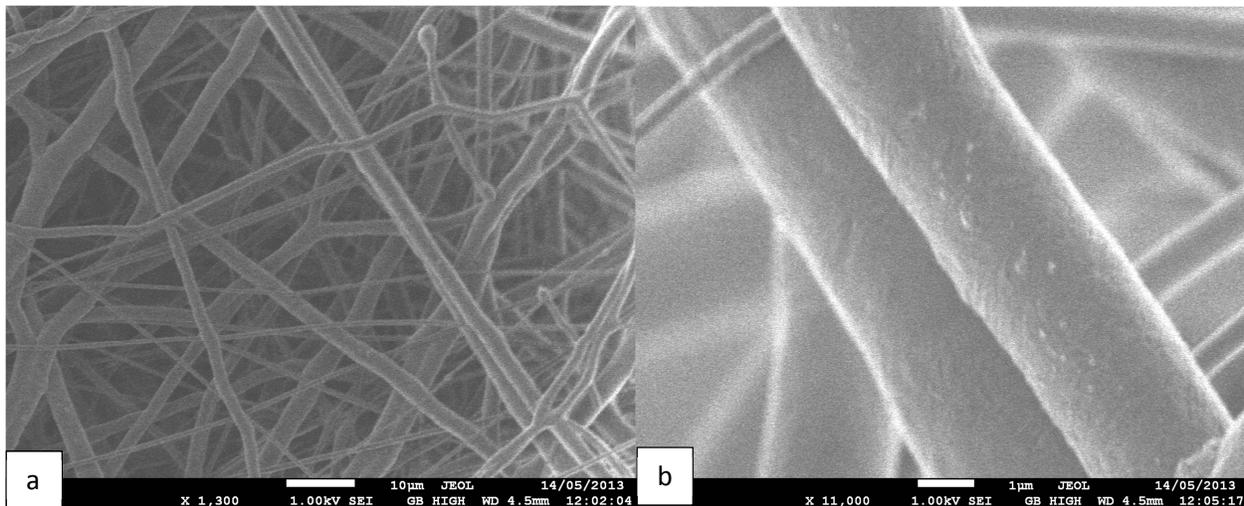


Fig. 28. Imagen SEM de la membrana generada por electrohilado de PLA/PCL sin recubrimiento superficial de PPy-I. a) 1300 X, b) 11000 x.

En la Fig. 28a el material PLA-PCL presentó una morfología con diversos diámetros de fibra, lo que genera poros de diferentes tamaños. En la Fig. 28b se observa rugosidad en la superficie de las fibras, lo cual es beneficioso para un andamio, ya que las células se inclinan por este tipo de superficies, debido a que pueden anclarse y proliferar con mayor facilidad.

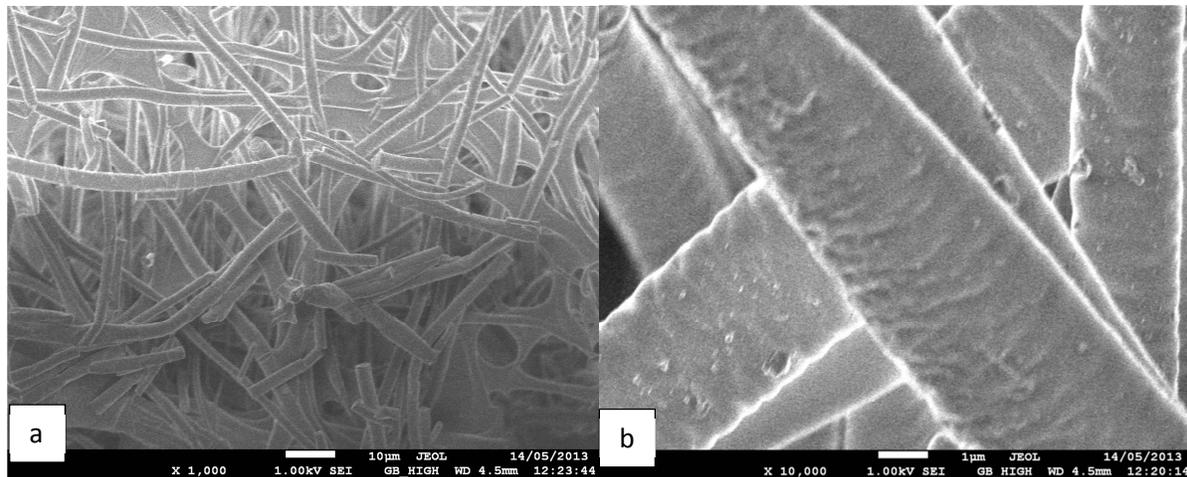


Fig. 29. Imagen SEM de la membrana generada por electrohilado de PLA/PCL con recubrimiento superficial de PPy-I.
a) 1000X, b) 10000 x.

El recubrimiento del andamio (PLA/PCL) con PPy-I, forma una película entre varias fibras, lo que genera una mejor definición de poros, como puede observarse en la Fig. 29a, generando una mejor morfología para el sostén celular, propiciado proliferación celular tanto en 2D (superficie del andamio) como en 3D (interior del andamio). En la Fig. 29b se observa un incremento de la rugosidad en la superficie de las fibras en comparación de la Fig. 28b.

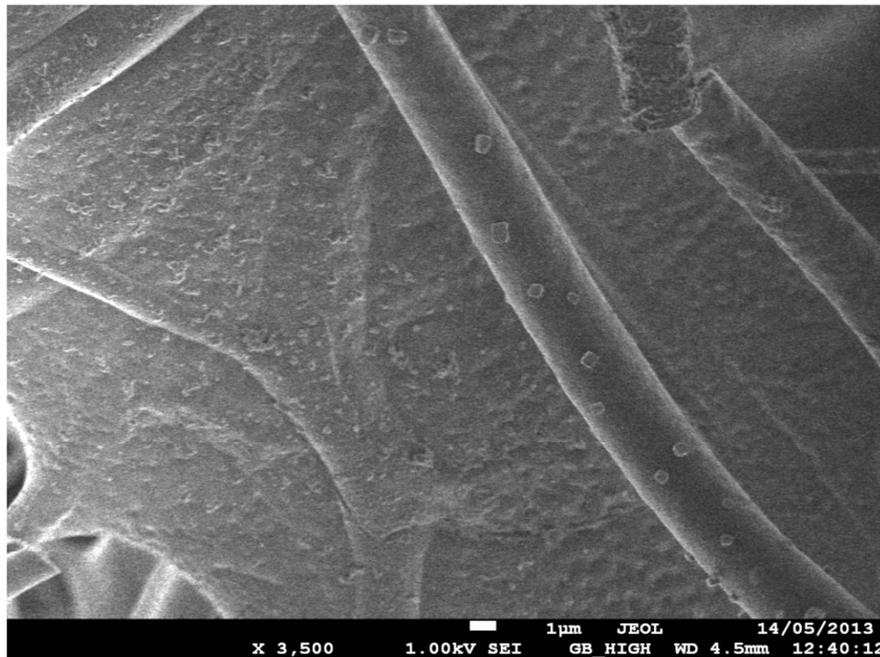


Fig. 30. Imagen SEM de la membrana generada por electrohilado de PLA/PCL con recubrimiento superficial de PPy-I y AG después de ser lavada con agua destilada a 3500X.

La estructura superficial muestra formas muy bien definidas, esto debido a que la forma en que se acomodan el azúcar y los sulfatos, generan formación de cristales, como se observa en la Fig. 30. Esto es conocido como biomineralización, la cual conduce a la formación de cristales inorgánicos con formas ordenadas, refinadas que son regulados por macromoléculas específicas, entre esas macromoléculas, se encuentran los proteoglicanos que no han recibido suficiente atención (Arias, y otros, 2004). El potencial bioactivo de los glicosaminoglicanos juegan un

papel importante en la biomineralización, ya que estas proteínas cargadas negativamente, contienen grupos carboxilo, sulfato y fosfatos que pueden unirse a iones Ca^{+2} , con los cuales podría controlar la nucleación (agrupamiento de átomos en líquido para formar cristales) y crecimiento de cristales (Manjusha, 2011). La proteína puede afectar la mineralización de diferentes maneras, dependiendo de su concentración (Alvarez Lloret, 2008). Se ha reportado la adhesión de cristales minerales, para mejora de las propiedades mecánicas de los tejidos, generados en andamios (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

POROSIDAD.

En el material de PLA-PCL sin tratamiento de PPy-I se encontraron poros de $5\mu m^2$ a $962\mu m^2$ con un promedio de $189\mu m^2$, mientras que para el PLA-PCL-PPy-I y PLA-PCL-PPy-I-AG presentan poros de $5\mu m^2$ a $521\mu m^2$ con un promedio de $100\mu m^2$.

El tamaño promedio del condrocito es entre $30-40\mu m^2$, por lo que los materiales contienen la porosidad necesaria para la suspensión y deposición de las células.

HUMECTACIÓN DE LOS ANDAMIOS PARA CULTIVOS TANTO IN VITRO COMO IN VIVO.

La humectación de las membranas es una preparación del material para la mejor absorción de suspensión celular que se depositará sobre ellas, además de favorecer la afinidad de las células sobre los materiales, puesto que a estas les atrae las superficies hidrofílicas. En la Fig. 31 se puede observar la humectación que tuvieron las membranas de PLA-PCL-PPy-I, PLA-PCL-PPy-I-AG así como la membrana control del PLGA-PGA.



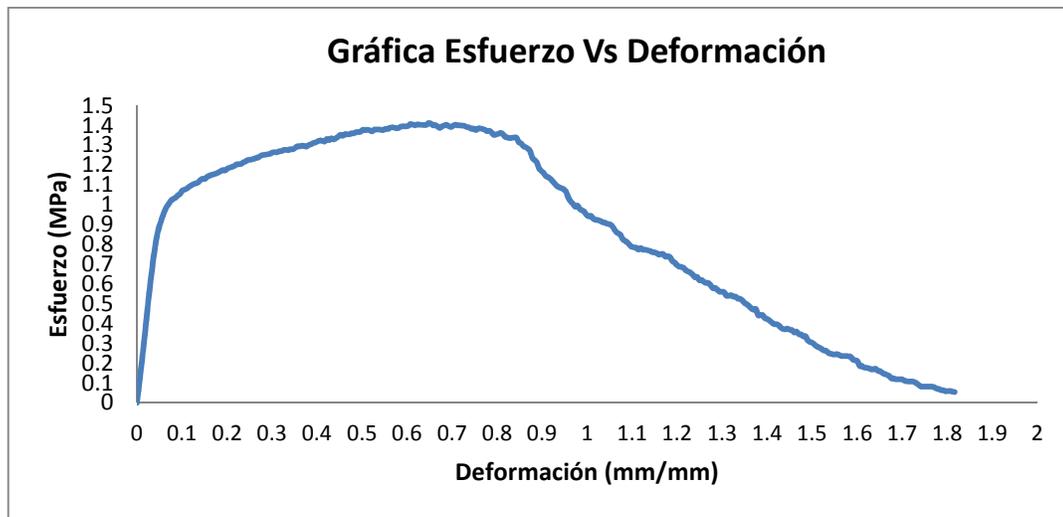
Fig. 31. Humectación de las membranas PLA-PCL-PPy-I, PLA-PCL-PPy-I-AG y PGA-PLGA antes de depositar suspensión celular sobre ella.

PRUEBAS MECÁNICAS.

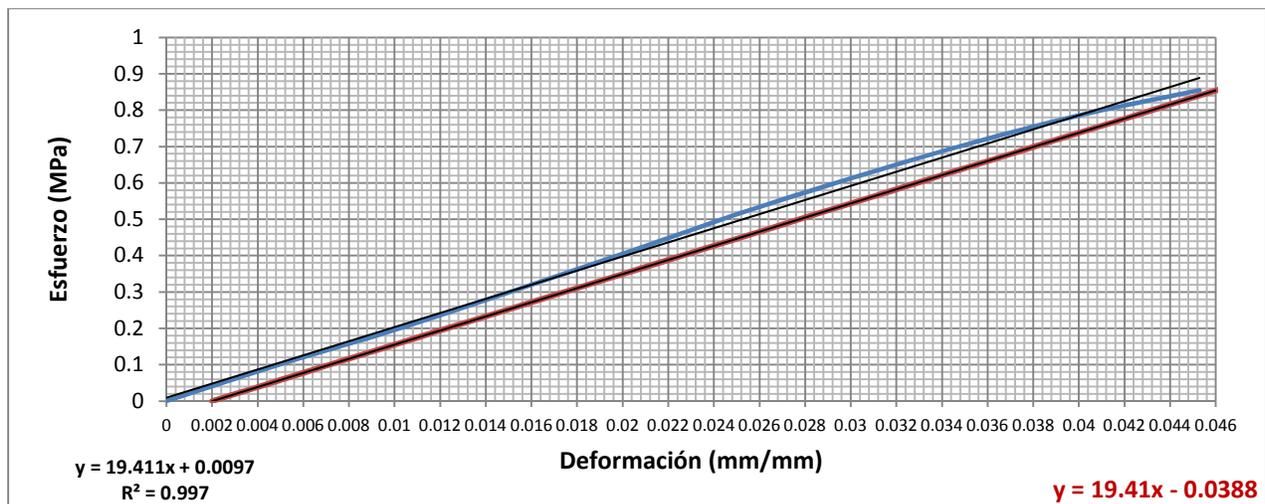
Como parte de la caracterización del material generado, se encuentran sus propiedades mecánicas las cuales describen cualidades específicas del material, que dependen de su composición. La competencia mecánica de los andamios generados, resulta esencial debido al uso clínico que este tendrá.

Se ha reportado que el cartílago hialino tiene un módulo de tracción de 0.2-4.90MPa, resistencia a la rotura de 1-8MPa y un último esfuerzo o máximo esfuerzo 0.15MPa, (Saey Tuan Barnabas, Ekaputra, Hui, & Hutmacher, 2010) un módulo de 4.51 ± 2.78 MPa en la zona superficial, 2.51 ± 1.93 MPa en la zona media (Elliott, Noarmoneva, & Setton, 2002). Por otra parte se reporta que el módulo de tracción en el cartílago humano sano depende de la localización del tejido de unión, variando de 5 a 25MPa (Athanasίου, Darling, Duraine, Hu, & Hary Reddi, 2013).

En la gráfica 1, puede observarse la curva característica de los materiales generados a lo largo del experimento, en donde el material no presentó claramente donde termina su zona elástica y comienza la zona plástica, por lo que se definió un punto correspondiente a una deformación permanente del 0.2% ,el cual es un límite convencional, que se calculó con el punto que pasa por (0.002, 0) y tiene como pendiente al módulo de Young (Gráfica 2), que es la parte más recta que se presenta en la gráfica.



Gráfica 1. Curva Esfuerzo Vs Deformación característica de los materiales generados.



Gráfica 2. Ecuación paralela al módulo de Young que intersecta la curva esfuerzo vs deformación para asignar el valor de la cedencia.

En la tabla 2, se muestran las ecuaciones con las que se obtuvo la recta paralela (cedencia), máximo esfuerzo y la ductilidad, para cada una de las probetas tratadas experimentalmente.

Ecuación recta paralela para cálculo de cedencia		
P(0.002,0)		m= módulo de Young
x	y	
Y-y1=m(x-x1)		
Máximo Esfuerzo		
$\sigma_{max} = \frac{\text{Fuerza máxima}}{\text{área inicial}} = \frac{F_{max}}{A_0} = MPa$		
Ductilidad		
$\%E = \left(\frac{\text{Longitud final} - \text{Longitud inicial}}{\text{Longitud inicial}} \right) * 100$		

Tabla 2. Ecuaciones empleadas para obtener cedencia, máximo esfuerzo y ductilidad.

El módulo de Young, fuerza máxima, área inicial, longitud inicial y final, son datos adquiridos de las gráficas esfuerzo vs deformación generadas por cada probeta.

Para el cálculo de la tenacidad (área bajo la curva), se empleó el programa KaleidaGraph (Synergy Software), el cual se basa en aproximar el valor de la integral de f(x) mediante la utilización de n trapecios igualmente espaciados, en un intervalo [a,b]. (Ver apéndice 1)

A continuación, se exponen los resultados de los ensayos mecánicos a la tracción, donde se muestra la comparación entre los materiales en diferentes condiciones (secos, mojados, con células y con tejido).

Para el PLA-PCL sin PPy-I se realizaron únicamente los ensayos en seco y mojado.

El PLA-PCL-PPy-I se evaluó en seco, mojado, *in vitro* e *in vivo*.

Por otra parte los materiales que contienen la proteína AG, fueron valorados únicamente *in vitro* e *in vivo*, para observar la influencia de los agregados sobre las células y el desarrollo de tejido.

El PGA-PLGA, únicamente fue evaluado tanto *in vitro* como *in vivo*, puesto que es un material comercial, actualmente es utilizado para reparación y regeneración de tejido óseo y cartilaginoso, por lo que fue manejado como control, con respecto a PLA-PCL-PPy-I y PLA-PCL-PPy-I-AG.

El módulo de Young, fluencia o cedencia, máximo esfuerzo y la ductilidad, obtenido de los ensayos mecánicos para cada probeta se exhiben a continuación.

Se realizó una prueba de hipótesis mediante t de student ($n \leq 30$), con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ para conocer si hay diferencia significativa o no en las propiedades mecánicas de los materiales seco sin PPy-I vs. mojado sin PPy-I y seco con PPy-I vs. mojado con PPy-I, bajo la siguiente hipótesis:

$H_0: \mu_0 = \mu_1$ Es la media material seco y la media material mojado son iguales, por lo tanto no existe diferencia significativa.

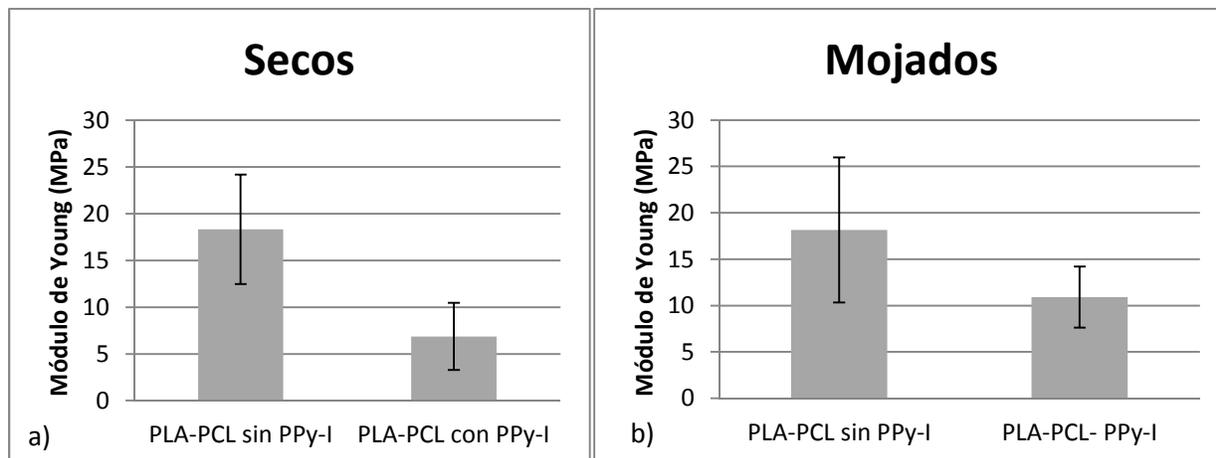
$H_1: \mu_0 \neq \mu_1$ Es la media material seco y la media material mojado son diferentes, por lo tanto existe diferencia significativa.

Módulo:

Los ensayos realizados en los andamios secos (Gráfica 3a) presentaron módulos de Young muy diferentes, debido principalmente a que uno fue sometido al tratamiento superficial de PPy-I y el otro no. Puede observarse que el recubrimiento depositado sobre la superficie del material trae como consecuencia un comportamiento menos elástico reflejándose en una disminución de su módulo, debido a que el PPy-I actúa como una especie de cascarrón, endureciendo las fibras superficiales y una vez que esta se quiebra, se deforma con mayor facilidad.

El PLA-PCL sin PPy-I seco (Gráfica 3a) no presentó diferencias significativas en la medición del módulo cuando el PLA-PCL sin PP-I se encuentra mojado (Gráfica 3b).

Por otro lado el PLA-PCL-PPy-I cuando se encuentra mojado incrementa su módulo ligeramente, debido a que el agua ablando el PPy-I, homogenizando el comportamiento del material, bajando así su incertidumbre en contraste con el PLA-PCL-PPy-I de la Gráfica 3a. La prueba de hipótesis no indica diferencias significativas entre los materiales secos y mojados.

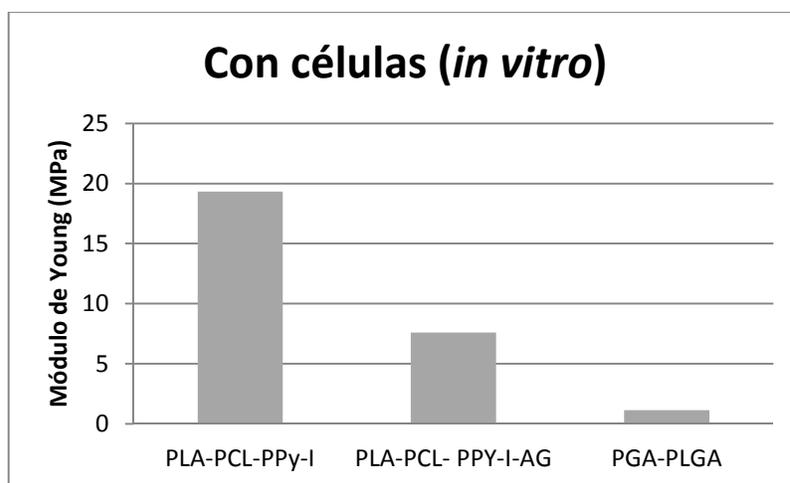


Gráfica 3. Promedio y desviación estándar de los Módulos de Young calculados con los datos obtenidos experimentalmente de los materiales a) secos: PLA-PCL sin PPy-I n=9, PLA-PCL-PPy-I n=12 y b) mojados: PLA-PCL sin PPy-I n=4, PLA-PCL-PPy-I n=3.

El material PLA-PCL-PPy-I recubierto con células (cultivo *in vitro*), mostró un pequeño incremento en su módulo (Gráfica 4) con respecto a los materiales sin células (Gráfica 3a y 3b), el cual parece ser reforzado gracias al depósito de células sobre él.

El PLA-PCL-PPy-I-AG del cultivo *in vitro* cuenta con un módulo parecido al del PLA-PCL-PPy-I cuando se encuentra mojado (Gráfica 3b), por lo que no parece obtener un cambio significativo de su módulo, por influencia de la proteína.

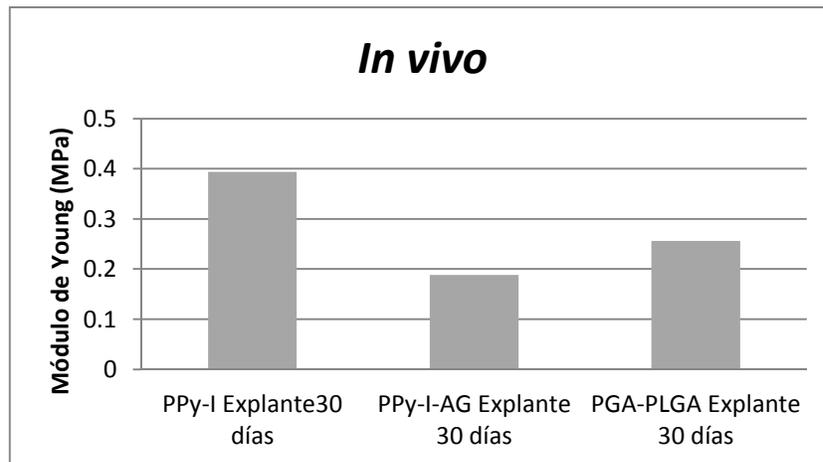
Por otra parte el material control PGA-PLGA fue el que presentó el módulo más bajo de los 3 materiales (1.15 MPa).



Gráfica 4. Módulos de Young calculados con los datos obtenidos experimentalmente de los materiales del cultivo *in vitro*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

La gráfica 5 muestra los módulos obtenidos en los materiales sometidos a cultivo *in vivo*, los cuales indican que para todos los casos esta propiedad disminuye notablemente, esto puede ser explicado con ayuda de la Fig. 32,

en donde se pueden observar 3 fotografías de los materiales, adquiridas durante el ensayo de tracción, en las cuales se puede distinguir como la presencia del polímero base (andamio), comienza a disminuir debido a la biodegradación del mismo, lo que trae como consecuencia, que la medición del módulo no sea directamente en el polímero, si no en la formación de neot Tejido cartilaginoso; es decir que el módulo está siendo medido sobre el tejido en comparación de los que se presentan en las gráficas 3 y 4 que son sobre el polímero sin cultivo *in vivo*. También puede notarse la formación de un cuello en su parte central, que es característico de los materiales elásticos.



Gráfica 5. Módulos de Young calculados con los datos obtenidos experimentalmente del explante a los 30 días de cultivo *in vivo*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

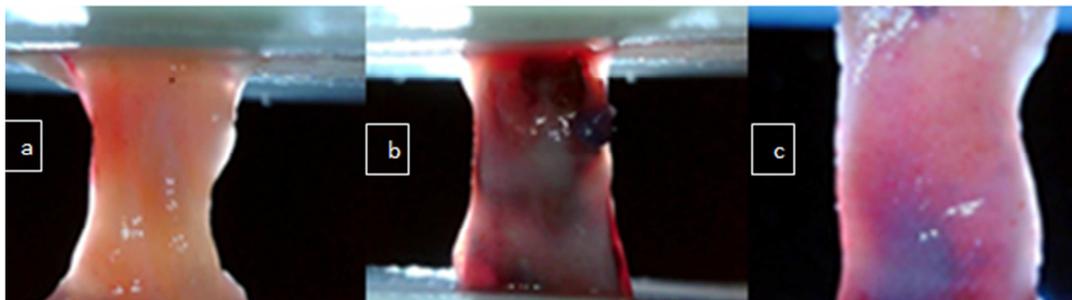


Fig. 32. Deformación característica de un material elástico en los explantes a los 30 días de cultivo *in vivo*. a) PGA-PLGA, b) PLA-PCL-PPy-I, c) PLA-PCL-PPy-I-AG.

De acuerdo a los resultados obtenidos a los 30 días de cultivo *in vivo*, puede indicarse que el PLA-PCL-PPy-I se encuentra dentro de los rangos reportados para el módulo elástico en ensayos de tracción (Saey Tuan Barnabas, Ekaputra, Hui, & Hutmacher, 2010), mientras que los otros 2 materiales se encuentran ligeramente por debajo, sin embargo también se ha reportado que el módulo de Young incrementa con el de tiempo de cultivo *in vivo* (Shuaijun, y otros, 2012), por lo que resulta interesante incrementar el periodo de cultivo *in vivo* de los materiales, para estudiar como madura el cartílago obtenido y sus mejoras en cuanto a las propiedades mecánicas.

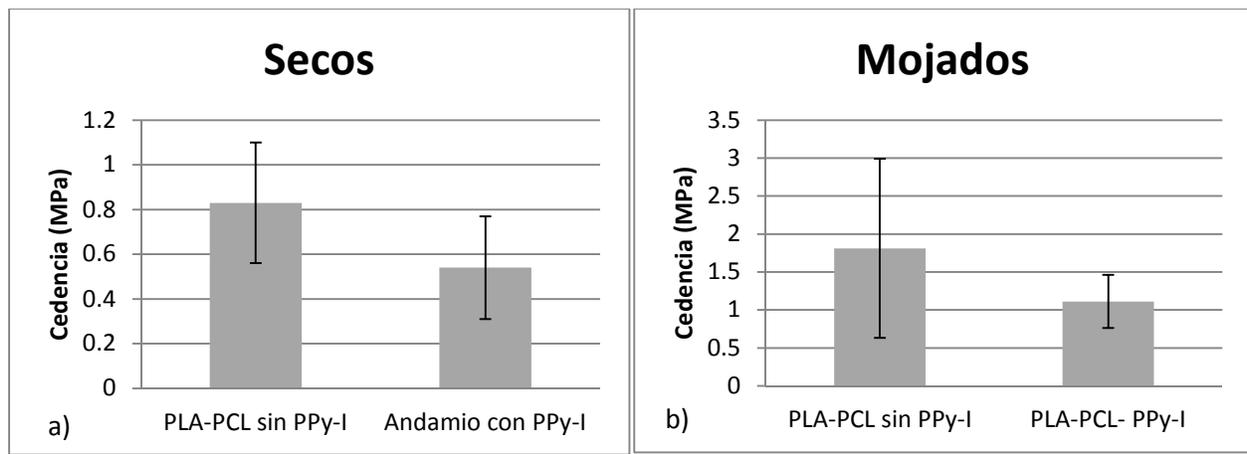
Cedencia:

Se realizaron mediciones para identificar el punto en el cual los materiales se encuentran en la región de transición de zona elástica a zona plástica, esto a consecuencia del deslizamiento que tienen las moléculas unas sobre otras de los materiales, en donde una vez que las moléculas se han desplazado ya no pueden recuperar su posición original, por lo que se convierte en una deformación irreversible.

En la Gráfica 6a, el efecto del PPy-I sobre el material genera una baja oposición a la deformación, debido al “cascaron” formado por el tratamiento, el cual generó que este se quebrara con mayor facilidad, pasando así de la zona elástica a la plástica con mayor rapidez en comparación del PLA-PCL sin tratamiento de PPy-I.

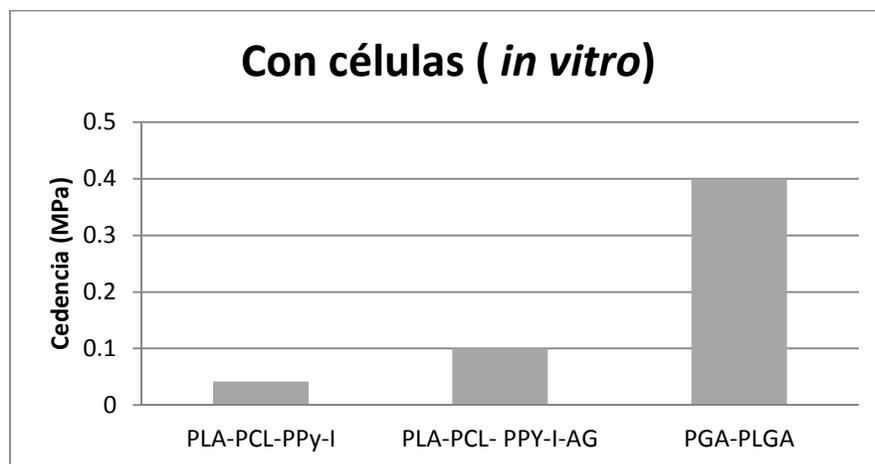
En la Gráfica 6b se puede observar el comportamiento de los materiales cuando estos se encuentran mojados, por una parte el PLA-PCL sin PPy-I aumenta su oposición a la deformación considerablemente sin embargo su incertidumbre también se amplía grandemente, y por otro lado el PLA-PCL-PPy-I incrementa su oposición a la deformación y su incertidumbre se hace más pequeña, esto debido a que el polímero se hincha al entrar en contacto con medios acuosos, adquiriendo mayor plasticidad antes de la falla.

La prueba de hipótesis no indica diferencias significativas entre las Cedencias medidas de los materiales secos vs. mojados, sin y con PPy-I.



Gráfica 6. Promedio y desviación estándar de las Cedencias calculadas con los materiales a) secos: PLA-PCL sin PPy-I n=9, PLA-PCL-PPy-I n=12 y b) mojados: PLA-PCL sin PPy-I n=4, PLA-PCL-PPy-I n=3.

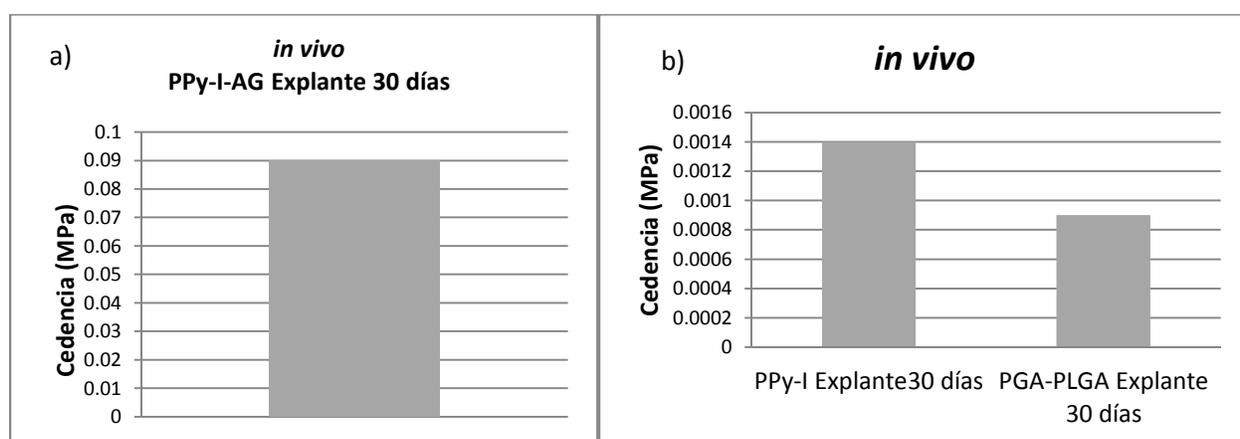
En los materiales recubiertos con células (Gráfica 7), es notable que el PLA-PCL-PPy-I se debilitó, por lo que cede con mayor facilidad en comparación de los secos y mojados (Gráficas 6a y 6b). Por otra parte, el control PGA-PLGA obtiene una alta oposición a la deformación comparado contra los otros materiales, seguido por el PLA-PCL-PPy-I-AG, el cual presenta un cuarto de cedencia comparado con el valor del material control.



Gráfica 7. Cedencias del experimento *in vitro*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

En la gráfica 8a y 8b se observan los valores de cedencia que tomaron los materiales del cultivo *in vivo*, en donde se registró, como los valores para todos los materiales decae, en contraste con los obtenidos del cultivo *in vitro* (gráfica 7). Esto es debido a que el polímero se encuentra degradándose y el tejido es el principal responsable de este comportamiento. En todos los casos se presentó la deformación característica de un material elástico, como se puede observar en las fotografías de la Fig. 34. Además de mostrar que a los 30 días el PGA-PLGA se degradó casi por completo (Fig. 33a), así como el PLA-PCL-PPy-I presenta tejido solo en la superficie del andamio y escasa degradación del polímero (Fig. 33b) y en el PLA-PCL-PPy-I-AG se observa mayor formación del tejido que no solo se forma en la superficie del polímero sino también en el interior de este (Fig. 33c), además de que el polímero base se encuentra en proceso de degradación.

La Gráfica 8a muestra como la oposición a la deformación que se obtuvo del explante en PLA-PCL-PPy-I-AG es la más importante en comparación de los valores que se presentan en la Gráfica 8b, donde se observa un brusco cambio de escala, siendo el material control PGA-PLGA el que presentó la más baja oposición a la deformación de los 3 materiales.



Gráfica 8. Cedencia calculada con los datos obtenidos experimentalmente del explante a los 30 días de cultivo *in vivo*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

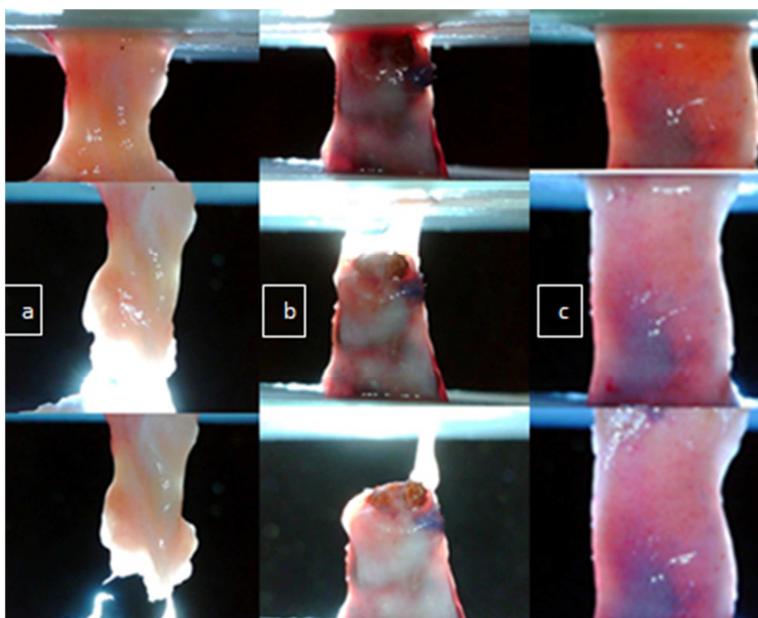


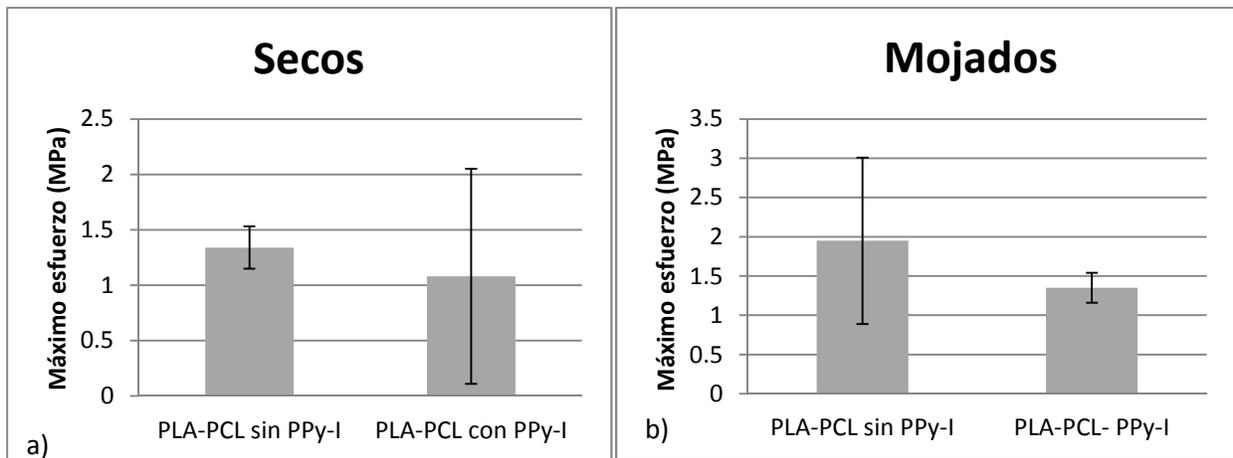
Fig. 33. Fotografías del ensayo de tracción en los explantes a los 30 días de cultivo *in vivo*. a) PGA-PLGA , b) PLA-PCL-PPy-I, c) PLA-PCL-PPy-I-AG.

Máximo Esfuerzo:

Una vez que un material alcanza la zona de cedencia, este sigue deformándose hasta la zona de máxima tensión; cuando llega a este punto la probeta se considera fracturada, en la gráfica 9a se puede observar que el máximo esfuerzo (tensión de rotura) que los materiales secos soportaron es muy parecido, debido a que una vez que la capa protectora del material recubierto con PPy-I se quebró, las fibras del centro, que no contienen el tratamiento actúan igual que las del material que no fueron tratados con PPy-I.

Los materiales mojados (Gráfica 9b) presentan un máximo esfuerzo prácticamente igual al de los secos debido a la gran incertidumbre que se presenta.

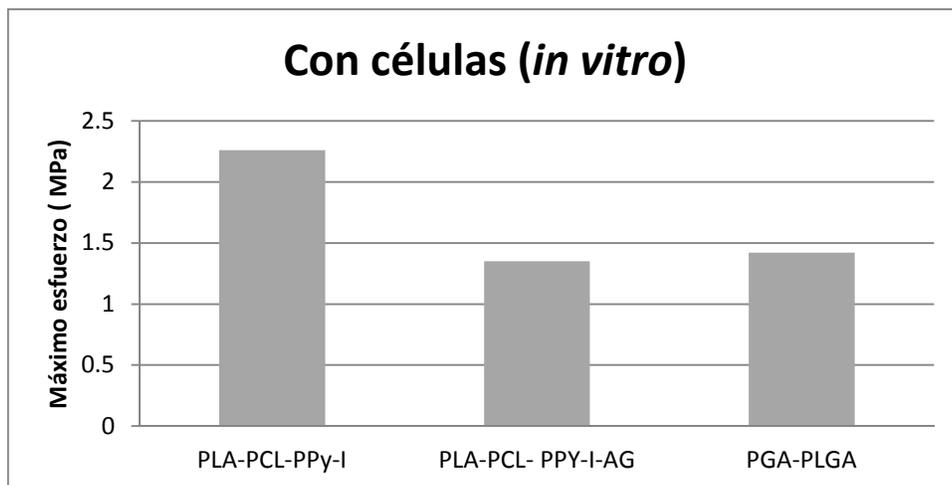
La prueba de hipótesis no indica diferencias significativas entre la ductilidad medida de los materiales secos vs. mojados sin PPy-I pero si se encontró significancia entre los materiales secos vs. mojados con PPy-I.



Gráfica 9. Promedio y desviación estándar de los máximos esfuerzos calculados con los materiales, a) secos: PLA-PCL sin PPy-I n=9, PLA-PCL-PPy-I n=12 y b) mojadas: PLA-PCL sin PPy-I n=4, PLA-PCL-PPy-I n=3.

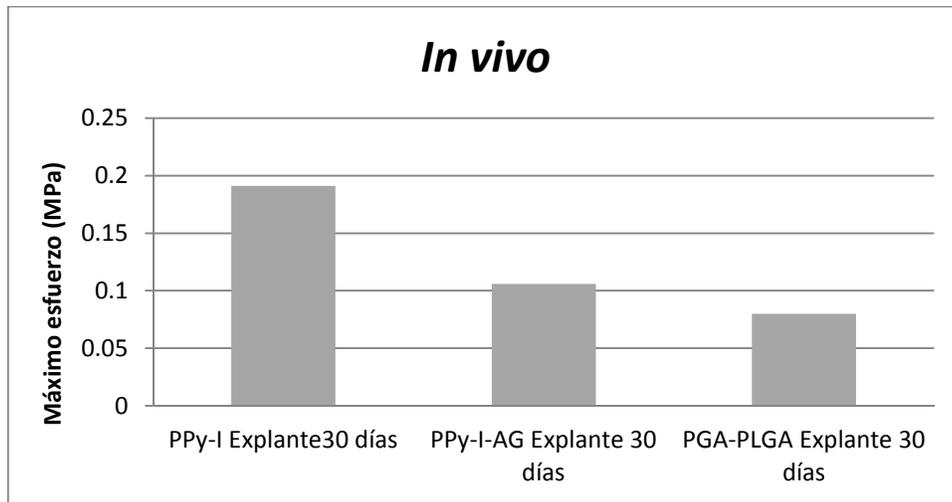
El PLA-PCL-PPy-I y PLA-PCL-PPy-I-AG del cultivo *in vitro* (Gráfica 10), tomaron valores muy parecidos a los de los materiales secos y mojados (Gráfica 9a y 9b), por lo que no se observó gran influencia de las células cultivadas sobre el material.

El control de PGA-PLGA y el PLA-PCL-PPy-I-AG presentaron un máximo esfuerzo muy parecido.



Gráfica 10. Máximos esfuerzos calculados con los materiales *in vitro*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

La gráfica 11 muestra los valores obtenidos para el materiales obtenidos del cultivo in vivo, en donde el control PGA-PLGA y el PLA-PCL-PPy-I-AG quedan por debajo de los valores reportados en la literatura (Saey Tuan Barnabas, Ekaputra, Hui, & Hutmacher, 2010) y el PLA-PCL-PPy-I ligeramente por encima.

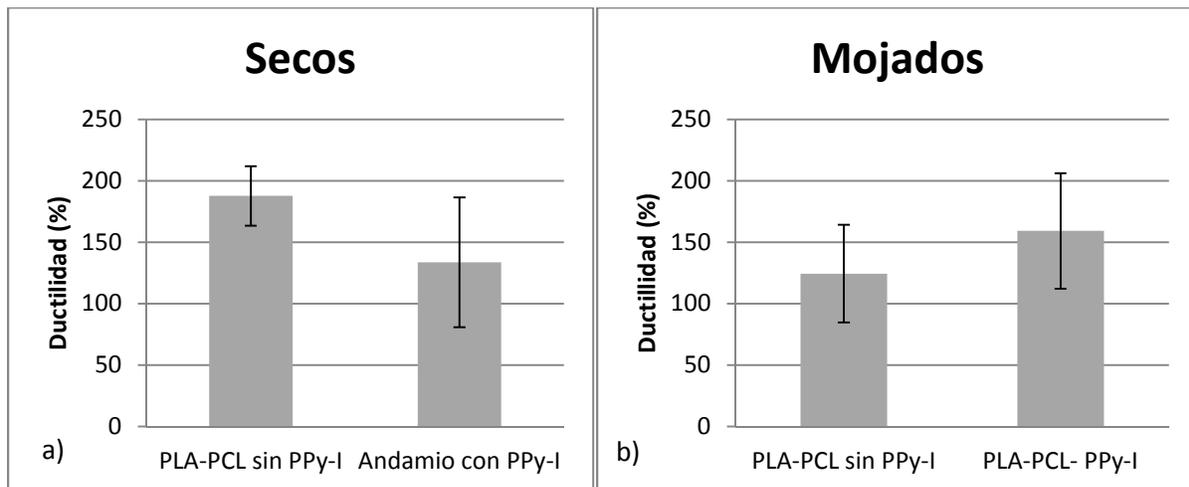


Gráfica 11. Máximo esfuerzo calculado con los datos obtenidos experimentalmente del explante a los 30 días de cultivo *in vivo*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

Ductilidad o máxima extensión a la rotura:

La capacidad de los materiales secos para deformarse antes de fracturarse que se muestran en la gráfica 12a fue relativamente significativa, alcanzándose aproximadamente el 180% de deformación para el PLA-PCL-PPy-I contra 133% de deformación del PLA-PCL-PPy-I, es aquí donde se puede observar que el material con recubrimiento de PPy-I se deforma de manera muy similar al que no contiene el tratamiento de PPy-I, esto ocurre una vez que las fibras más expuestas al tratamiento se quiebran y dejan actuar a las fibras centrales.

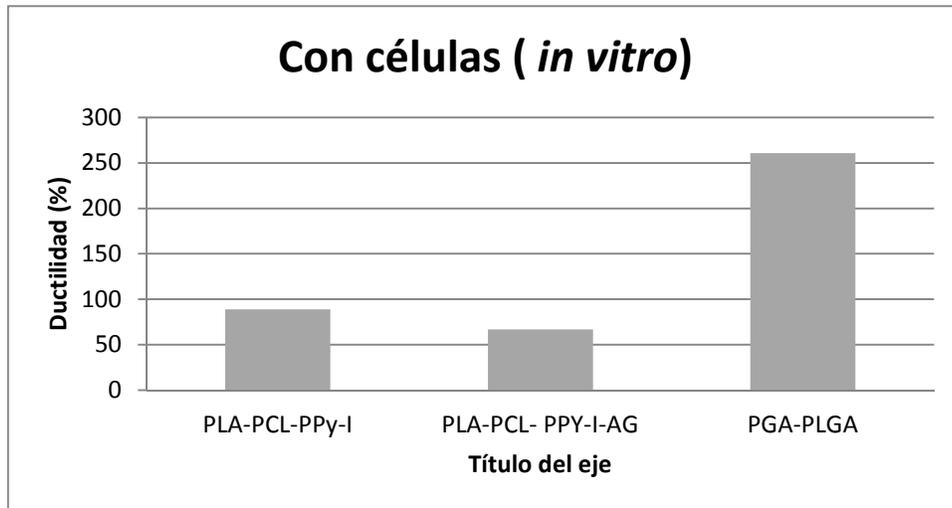
Se nota un cambio de comportamiento estadísticamente no significativo en los materiales cuando se encuentran mojados, sin embargo se muestra que al comparar los materiales secos (Gráfica 12a) contra los mojados (gráfica 12b) se observó una disminución en su porcentaje de deformación de 187.75% a 124% para el PLA-PCL sin PPy-I y un aumento de 133.73% a 159.18% para el que contiene en tratamiento superficial.



Gráfica 12. Promedio y desviación estándar de la ductilidad calculada con los materiales a) secos PLA-PCL sin PPy-I n=9, PLA-PCL-PPy-I n=12. y b) mojado PLA-PCL sin PPy-I n=4, PLA-PCL-PPy-I n=3.

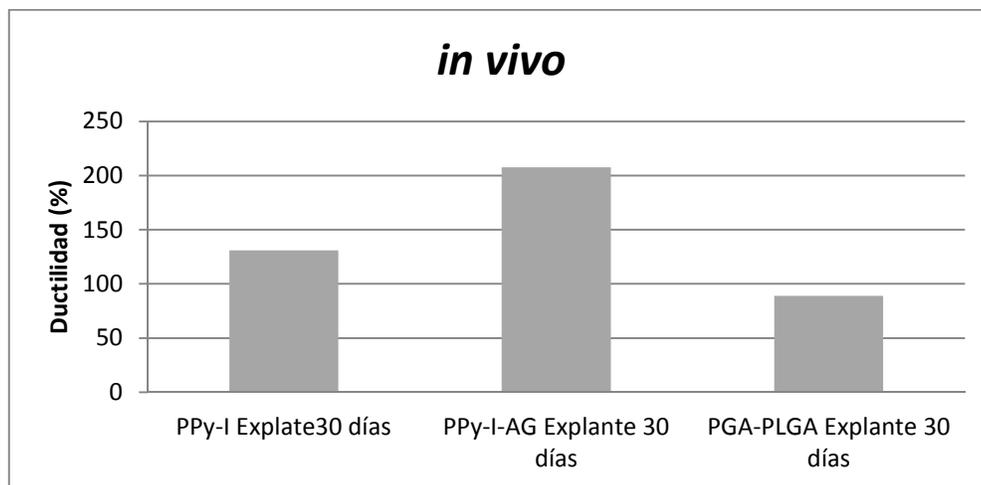
La prueba de hipótesis si indica diferencias significativas entre la ductilidad medida de los materiales secos vs. mojados sin PPy-I pero no se encontró significancia entre los materiales secos vs. mojados con PPy-I.

En el cultivo *in vitro* (Gráfica 13), el material control de PGA-PLGA tuvo una deformación mayor al 250% contra menos del 100% en los otros 2 materiales.



Gráfica 13. Ductilidad calculada con los materiales de cultivo *in vitro*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

La ductilidad de los materiales obtenidos del cultivo *in vivo* (Gráfica 14) comparada con la de los materiales del cultivo *in vitro* (Gráfica 15) se incrementó, como es el caso del PLA-PCL-PPy-I que pasó del 88.9% (Gráfica 13) al 131.02% (Gráfica 14) y para el PLA-PLC-PPy-I-AG pasó del 66.77% (Gráfica 13) al 207.71% (Gráfica 14), mientras que el control de PGA-PLGA disminuyó del 260.69% (Gráfica 13) al 88.9% (Gráfica 14). Por lo que se puede observar un importante incremento de ductilidad en el material que contiene la proteína.



Gráfica 14. Ductilidad calculada con los materiales de cultivo *in vivo*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

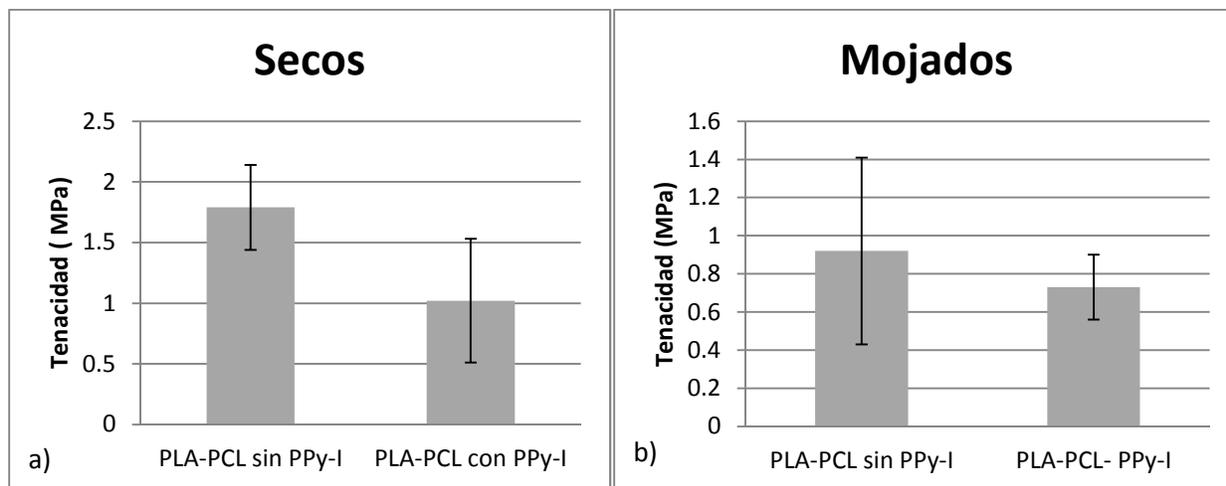
Tenacidad:

En este proceso, la deformación plástica que sufre el material antes de llegar a la falla consume energía, lo que retarda la propagación de la grieta y consigue que el material sea tenaz. Cuando un material es tenaz va a tener un

alto grado de deformación antes de que se rompa, esto es debido a la cantidad de energía que el material puede absorber antes de fallar, en las siguientes gráficas se muestran los valores obtenidos, mediante el cálculo del área bajo la curva para cada uno de los ensayos de tracción en los materiales.

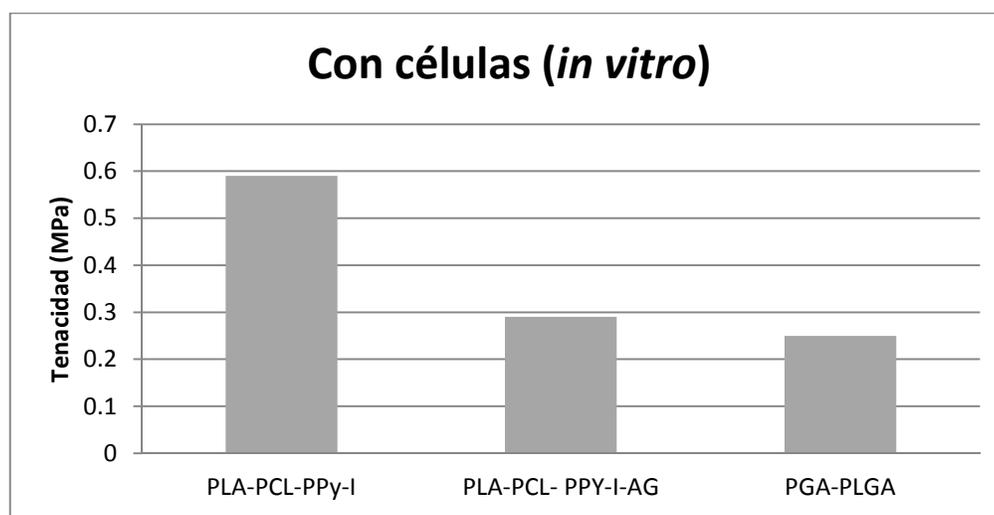
La Gráfica 15a muestra que cuando los materiales se encuentran secos absorben mayor cantidad de energía antes de la fractura en contraste de cuando los materiales se encuentran mojados (Gráfica 15b), en donde la energía que absorbieron antes de fallar es menor.

La prueba de hipótesis si indica diferencias significativas entre la tenacidad medida de los materiales secos vs. mojados sin PPy-I pero no se encontró significancia entre los materiales secos vs. mojados con PPy-I.



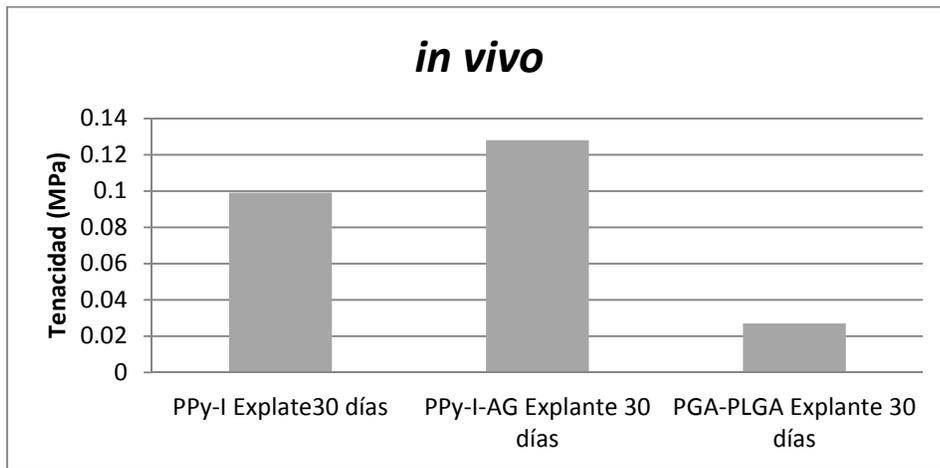
Gráfica 15. Promedio y desviación estándar de la Tenacidad calculada con los materiales, a) secos: PLA-PCL sin PPy-I n=9, PLA-PCL-PPy-I n=12 y b) mojados: PLA-PCL sin PPy-I n=4, PLA-PCL-PPy-I n=3.

El PLA-PCL-PPy-I con cultivo celular, mostró que absorbe una mayor cantidad de energía antes de llegar a la falla (Gráfica16), mientras que el material control PGA-PLGA se exhibe como el menos tenaz o que absorbe una menor cantidad de energía.



Gráfica 16. Tenacidad calculada con los materiales de cultivo *in vitro*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

El material control de PGA-PLGA obtenido del cultivo *in vivo* (Gráfica 17) es el que absorbió menor cantidad de energía antes de la falla, en contraste el PLA-PCL-PPy-I-AG adquiere la propiedad de absorber mayor cantidad de energía, esto quiere decir que el tejido se deforma más que los otros dos previo a la fractura.

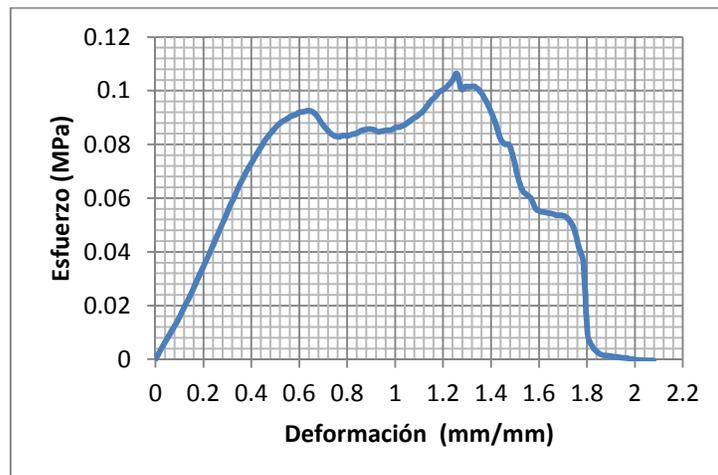


Gráfica 17. Tenacidad calculada con los materiales de cultivo *in vivo*, PLA-PCL-PPy-I n=1, PLA-PCL-PPy-I-AG n=1, PGA-PLGA n=1.

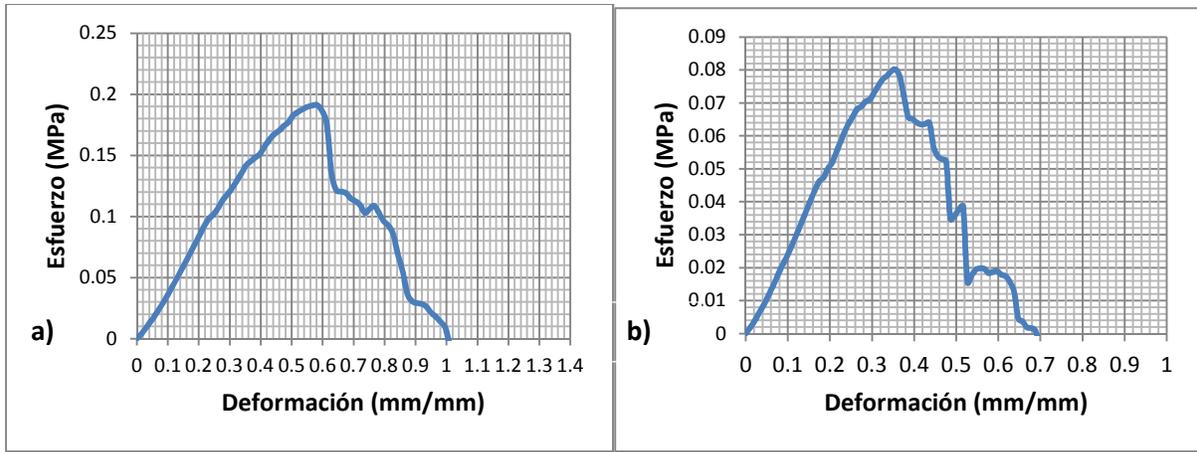
Curvas esfuerzo vs deformación, generadas del cultivo *in vivo*.

Se presentan a continuación las curvas generadas del ensayo a la tracción de los materiales sometidos a cultivo *in vivo*, debido a que el PLA-PCL-PPy-I-AG (Gráfica 18) mostró un comportamiento interesante, en donde puede percibirse una cedencia superior e inferior, observándose una reconstrucción del esfuerzo, en comparación de las otras 2 gráficas de PLA-PCL-PPy-I (Gráfica 19a) y PLGA-PGA (Gráfica 19b), que una vez que este cede ya no se recuperan.

Lo anterior puede ser explicado debido a que el material que contiene la proteína AG, exhibió una distribución uniforme de tejido a lo largo del mismo, lo que generó, que al ser sometido al ensayo de tracción este sea deformado de manera homogénea, mientras que en los otros 2 materiales fallaron en las orillas, debido que el tejido formado sobre ellos no fue uniforme (Fig. 33), por lo que una vez que cede el material ya no se reconstruyo el esfuerzo.



Gráfica 18. Esfuerzo contra la deformación obtenido del explante a 30 días cultivo *in vivo* del andamio PLA-PCL-PPy-I-AG.



Gráfica 19. Esfuerzo contra la deformación obtenido del explante a los 30 días cultivo *in vivo*, a) PLA-PCL-PPy-I , b) PGA-PLGA.

IX. CONCLUSIONES.

A lo largo de este trabajo se construyó un andamio de ácido poliláctico-policaprolactona (PLA-PCL) modificado superficialmente mediante plasma con pirrol y recubrimiento de agreganos, el cual fue comparado con un andamio comercial de ácido poliglicólico - ácido poliláctico-co-glicólico (PGA-PLGA) y uno de poliláctico-policaprolactona-Polipirrol-Iodo (PLA-PCL-PPy-I); este último indicó en un reporte previo, ser un material que presente escasa condrogénesis *in vivo* a los 30 días de su implantación (Ávila Gutiérrez, 2011). Por lo que se agregó la proteína agregano, la cual es un componente importante de la matriz extracelular de cartílago y la falta de esta proteína afecta el acceso a factores de crecimiento que son necesarios para señalización de los condrocitos en desarrollo (Domowicz, Cortes, Henry, & JudiSchwartz, 2009), además de favorecer las propiedades mecánicas del tejido (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

Los resultados obtenidos en cuanto a la composición química de las membranas mediante FTIR-ATR del PLA-PCL-PPy-I-AG confirman la presencia de la proteína AG sobre los andamios, mostrando picos representativos de la misma, aún después de haber sido sometidos a un lavado con agua destilada. Esto gracias a la diversidad de radicales depositados sobre la superficie del material mediante el recubrimiento de PPy-I por plasma, que permitieron la adhesión de la proteína AG sobre el andamio.

La microscopía electrónica de barrido mostró imágenes que denotan rugosidades en las fibras de los materiales y poros de diferentes tamaños, ocasionados por el PPy-I depositado sobre las membranas, proveyendo a las células de un ambiente para proliferar adecuadamente. Por otra parte se mostró la formación de biomineralización a la cual se le atribuye la mejora de las propiedades mecánicas de los tejidos (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

Las propiedades mecánicas de los materiales calculadas en este trabajo, nos dan una idea del comportamiento que los materiales tienen bajo diferentes circunstancias, destacando su actuación *in vivo*; en donde se observó que el PLA-PCL-PPy-I y PLA-PCL-PPy-I-AG presentan valores superiores de cedencia, máximo esfuerzo, ductilidad y tenacidad con respecto a los resultados del material control PGA-PLGA a los 30 días de cultivo *in vivo*. Encontrándose que el andamio de PLA-PCL-PPy-I-AG del cultivo *in vivo*, muestra características mecánicas prometedoras, aun cuando su módulo es el más bajo de los 3 materiales con 0.188MPa, es un valor muy cercano al reportado para ensayos de tracción en cartílago (Saey Tuan Barnabas, Ekaputra, Hui, & Hutmacher, 2010), además de contar con una cedencia de 0.08 MPa, su ductilidad o capacidad de deformación antes de fracturarse fue del 200% y su tenacidad o deformación plástica de 0.128MPa, mucho mayor a la de los otros materiales, por lo que tiene una mayor deformación plástica antes de que sufra la falla, considerándose un material dúctil o no frágil. De acuerdo a los hallazgos, se presume que el andamio de PLA-PCL-PPy-I-AG podría ser utilizado para la regeneración de tejido cartilaginoso.

Los resultados indicaron que en los 3 materiales muestran excelente biocompatibilidad y comienzos de biodegradación *in vivo* a los 30 días.

Cuando los andamios entran en contacto con un medio acuoso comienza la degradación de los polímeros base por hidrólisis, por otra parte los cambios de pH en el medio y la acción enzimática son factores que actúan degradando el biomaterial (Rivera Caballero & Morantes Cárdenas, 2011), siendo algunas causas por las que las propiedades mecánicas en los materiales mojados cambian tanto, así como en el caso del cultivo tanto *in vitro* como *in vivo*.

Es recomendable aumentar el número de experimentos *in vivo*, así como realizar los estudios mecánicos sobre los cultivos *in vivo* a los 3 meses, 6 meses y 1 año, para obtener mayor información de la calidad de cartílago obtenido sobre las membranas; esperando que a largo plazo, los polímeros sean absorbidos obteniendo un cartílago maduro.

X. APÉNDICE.

1. Cálculo de la tenacidad

Para el cálculo de la tenacidad (área bajo la curva) se empleó el programa KaleidaGraph (Synergy Software), el cual se basa en aproximar el valor de la integral de $f(x)$ mediante la utilización de n trapecios igualmente espaciados, en un intervalo $[a,b]$.

$$h = \frac{b - a}{n} \dots \text{subintervalos de la misma longitud}$$

$$a = X_0 \quad b = x_n$$

Área bajo la curva

$$\begin{aligned} \int_a^b f(x) dx &\approx \frac{h}{2} [f(x_0) + f(x_1)] + \frac{h}{2} [f(x_1) + f(x_2)] + \dots + \frac{h}{2} [f(x_{n-1}) + f(x_n)] \\ &\approx \frac{h}{2} [f(x_0) + 2f(x_1) + 2f(x_2) + \dots + 2f(x_{n-1}) + f(x_n)] \\ &\approx \frac{h}{2} \left[f(x_0) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} f(x_0 + (h * i)) + f(x_n) \right] \end{aligned}$$

2. Explante obtenido a los 30 días de cultivo *in vivo*

Puede observarse en la Ilustración A que para los 3 tipos de materiales implantados durante 30 días, generaron tejido cartilaginoso.

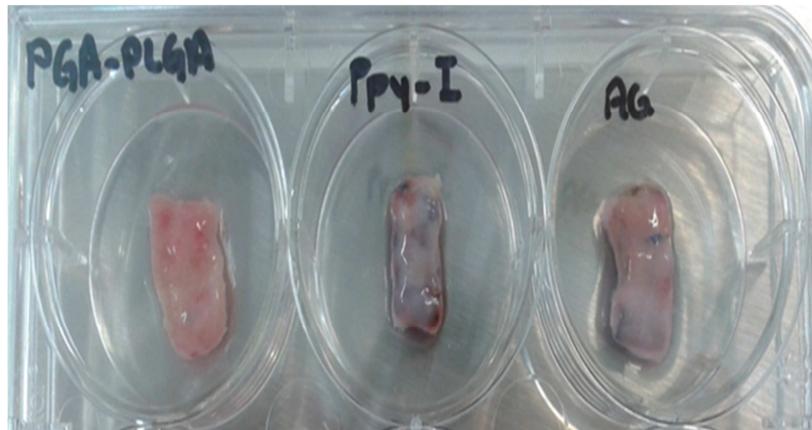


Ilustración A.- Tejido formado sobre las membranas a los 30 días de cultivo *in vivo*.

Se realizaron mediciones del cartílago obtenido *in vivo* con un calibrador digital con el fin de obtener las áreas transversales a utilizar en el ensayo mecánico, en la siguiente tabla se presentan los resultados:

Material	Largo (mm)	Ancho (mm)	Grosor (mm)
PGA-PLGA	19.27	8	8
PLA-PCL-PPy-I	20.2	8.2	3.18
PLA-PCL-PPy-I-AG	22.02	9.97	3.52

Con los datos de la tabla, se calculó el área transversal de los materiales considerando una forma circular en el caso del PGA-PLGA por tener un ancho y grosor iguales. Para PLA-PCL-PPy-I y PLA-PCL-PPy-I-AG se le considero una forma elíptica por tener un ancho y grueso de diferente, a continuación se presentan las fórmulas para el cálculo de dichas áreas:

Área Círculo:

$$A = \pi r^2$$

En donde:

π : es la constante que relaciona el perímetro de una circunferencia con la amplitud de su diámetro.

r : es el radio de la circunferencia.

Sustituyendo los valores en la ecuación:

$$A_{PGA-PLGA} = \pi r^2 = \pi \left(\frac{8}{2}\right)^2 = 50.26 \text{mm}^2$$

Área elipse:

$$A = \pi * r * s$$

En donde:

r: eje mayor

S: eje menor

Sustituyendo los valore en la ecuación:

$$A_{PLA-PCL-PPy-I} = \pi * r * s = \pi * \frac{8.2}{2} * \frac{3.18}{2} = 19.21 \text{mm}^2$$

$$A_{PLA-PCL-PPy-I-AG} = \pi * r * s = \pi * \frac{9.97}{2} * \frac{3.52}{2} = 27.56 \text{mm}^2$$

3. Resultados de los ensayos mecánicos:

Andamio seco sin PPy-I.

n=9

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD
26.91	1.39	1.43	181.62
19.97	0.83	1.41	170.96
22.07	1	1.49	206.57
17.8	0.63	1.41	215.05
9.21	0.56	1.01	143.32
19.97	0.84	1.41	181.62
22.07	1	1.5	170.96
17.79	0.62	1.41	208.65
9.21	0.56	1.01	211.04
MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR			
18.33 ± 5.85	0.83 ± 0.27	1.34 ± 0.19	187.75 ± 24.21

Andamio seco con PPy-I.

n=12

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD
6.18	0.51	1.02	128.96
10.32	0.91	0.98	239.63
9.30	0.90	0.92	145.26
4.3	0.62	1.93	239.22
9.27	0.68	0.87	122.06
2.47	0.33	3.81	135.13
6.40	0.18	0.27	85.97
4.94	0.40	0.59	88.9
9.08	0.37	0.42	99.12

2.83	0.54	0.57	100.89
3.11	0.33	0.35	95.47
14.18	0.74	1.23	124.15
MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR			
6.87 ± 3.60	0.54 ± 0.23	1.08 ± 0.97	133 ± 52.88

Andamio mojadas con agua destilada sin recubrimiento de PPy-I.

n=4

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD
19.11	1	1.13	100.26
13.17	.8	1.18	82.77
28.8	3.36	3.40	168.77
11.49	1.5	2.08	145.76
MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR			
18.14 ± 7.82	1.81 ± 1.18	1.95 ± 1.06	124.39 ± 39.75

Andamio mojadas con agua destilada recubiertas con PPy-I.

n=3

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD
7.12	1	1.22	138.58
12.95	0.83	1.26	125.56
12.68	1.5	1.56	213.41
MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR			
10.92 ± 3.29	1.11 ± 0.35	1.35 ± 0.19	159.18 ± 47.41

Andamio con PPy-I recubierto de células (cultivo in vitro).

n=1

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD	TENACIDAD
19.33	0.042	2.26	88.90	0.59

Andamio con PPY-I-AG recubierto de células (cultivo in vitro).

n=1

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD	TENACIDAD
7.6	0.1	1.35	66.77	0.29

Andamio de PLGA-PGA recubierto de células (cultivo in vitro).

n=1

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD	TENACIDAD
1.15	0.42	1.42	274.15	0.25

Andamio con PPy-I con tejido (cultivo in vivo).

n=1

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD	TENACIDAD
0.394	0.0014	0.191	131.02	0.099

Andamio con PPY-I-AG con tejido (cultivo in vivo)

n=1

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD	TENACIDAD
0.188	0.09	0.106	207.71	0.128

Andamio de PLGA-PGA con tejido (cultivo in vivo).

n=1

MÓDULO (MPa)	CEDENCIA (MPa)	MÁXIMO ESFUERZO (MPa)	DUCTILIDAD	TENACIDAD
0.256	0.0009	0.08	88.9	0.027

BIBLIOGRAFÍA.

- Álvarez, E., Ripoll, P., Restrepo, A., & Forriol, F. (Abr-Jun. de 2010). Revisión de la reparación del cartílago. Posibilidades y resultados. *Revista Trauma*, 21(2), 217-134.
- Alvarez Lloret, P. (2008). *Alteración de la mineralización del hueso debido a la exposición de contaminantes (organoclorado y metales pesados)*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada.
- Anders, S., Schaumburger, J., Schubert, T., Grifka, J., & Behrens. (Oct-Dic. de 2009). Trasplante autólogo de condrocitos guiado por matriz. Técnica mínimamente invasiva. *Tec Quir Ortop Traumatol.*, 18(4), 94-182.
- Arias, J. L., Neira, C. A., Arias, J. I., Escobar, C., Boderó, M., David, M., y otros. (2004). Sulfated polymers in biological mineralization: a plausible source for bio-inspired engineering. *Journal of Materials Chemistry*(14), 2154-2160.
- Atala, A. (Jun. de 2012). "Regenerative medicine strategies". *The Journal of pediatric surgery*, 47(1), 17-28.
- Athanasίου, K., Darling, E., Duraine, G., Hu, J., & Hary Reddi, A. (2013). *Articular cartilage*. Reino Unido: Taylor & Francis Group.
- Ávila Gutiérrez, L. (2011). *Construcción y evaluación de andamios modificados con polipirrol por plasma para crecimiento de células de cartílago*. Proyecto terminal licenciatura en ingeniería biomédica., Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa., México.
- Blanco García, F. J., & Gimeno Lonjas, M. J. (Enero de 2005). Terapia celular para reparar cartílago. *Revista española de traumatología*, 32(1).
- Calderón Arenas, J. M., & Martínez Rincón, H. A. (2012). *Obtención de fibras poliméricas a partir de la técnica de "ELECTROSPINNING" para aplicaciones biomédicas*. Proyecto de Grado, Universidad Autónoma de Occidente, Facultad de Ingeniería, Departamento de automática y electrónica.
- Callén Palacio, J. M. (2009). *Sistemas de estimulación mecánica y caracterización de polímeros para Ingeniería Tisular*. Proyecto final de carrera, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de Telecomunicació de Barcelona, Barcelona.
- Callister, W. D. (2007). *Ciencia e ingeniería de los materiales 1*. Reverté.
- Camcho, N., West, P., Torzilli, P., & Mendelson, R. (2000). FTIR Microscopic Imaging of Collagen and Proteoglycan in Bovine Cartilage. *Biopolymers*, 62(1), 1-8.
- Chung, C., & Burdick, J. A. (2008, Enero). Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(2), 243-262.
- Claire, G., Jeong, & Hollister, S. (May. de 2010). A comparison of the influence of material on in vitro cartilage tissue engineering with PCL, PGS, and POC 3D scaffold architecture seeded with chondrocytes. *Biomaterials*, 31(5), 4304-4312.
- Corona, J. M. (2001). *Polimerización por plasma: Tratamiento superficial y Simulación del plasma*. México, D. F: Universidad Autónoma Metropolitana.

- Couceiro Follente, J., Carpintero Arias, P., & Silva Rivera, M. (2002). "Cultivo de condrocitos". *Revista de ortopedia y Traumatología*, 5, 436-443.
- Deitzel, J., Kleinmeyer, J., Harris, D., & Beck Tan, N. C. (Enero de 2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42(1), 261-272.
- Domowicz, M. S., Cortes, M., Henry, J. G., & JudiSchwartz, N. B. (2009). Aggrecan modulation of growth plate morphogenesis. *Developmental Biology*, 329(2), 242-257.
- Elliott, D., Noarmoneva, D., & Setton, L. (2002). Direct measurement of the Poisson's ratio of human patella cartilage in tension. *Journal of Biomechanical Engineering*, 124(2), 223-228.
- Engelhardt, E.-M., Micol, L. A., Houis, S., Wurm, F. M., Hilborn, J., Hubbell, J. A., y otros. (Jun. de 2011.). A collagen-poly(lactic acid-co-3-caprolactone) hybrid scaffold for bladder tissue regeneration. *Biomaterials*, 32(16), 3969-3976.
- Escobar Ivirico, J. L. (2005). *Síntesis, caracterización y aplicaciones biomédicas de redes de copolímeros basados en poliésteres*. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Espinoza Morales, R., Arce Salinas, C. A., Cajigas Melgoza, J. C., Esquivel Valerio, J. A., Gutiérrez Gómez, J. J., Martínez Hernández, J. L., y otros. (2013). Reunión multidisciplinaria de expertos en diagnóstico y tratamiento de pacientes con osteoartritis. Actualización basada en evidencia. *Medicina Interna de México*, 29(1).
- Falke, G. F., & Atala, A. (2000). Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr (Archivos Argentinos de Pediatría)*, 98(2), 103-115.
- Florent, P. (2006). *Obtención y caracterización de geles para su utilización como andamios en ingeniería de tejidos*. Catalunya España: Universidad Politécnica de Catalunya.
- García Carvajal, Z., Garciadiego Cázares, D., Parra Cid, C., Aguilar Gaytán, R., & Castro Carmona, J. S. (2013). *Cartilage Tissue Engineering: The Role of Extracellular Matrix (ECM) and Novel Strategies*.
- Recuperado el 15 de Enero de 2014, de <http://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering/cartilage-tissue-engineering-the-role-of-extracellular-matrix-ecm-and-novel-strategies>.
- Garciadiego Cázares, D. (May-Agosto de 2012). El desarrollo del esqueleto y la osteoartritis. *Investigación en discapacidad*, 1(1), 7-17.
- Goro Ebihara, M. S. (Mayo de 2012). "Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model". *Biomaterials*, 33(15), 3846-3851.
- Hardingham, T. E. (1998). *Cartilage:Aggrecan- Link Protein-Hyaluronan Aggregates*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2013, de <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA05/HA05E.html>
- Landínez Parra, N. S., Garzón Alvarado, D. A., & Cardozo de Martínez, C. A. (Ene-Mar. de 2010). Aproximación al cultivo de condrocitos en la Universidad Nacional de Colombia. Reporte técnico". *Revista Cubana de investigaciones Biomedicas*, 29(1).

- Landínez Parra, N. S., Venegas Acosta, J. C., & Garzón Alvarado, D. A. (2008). Regulación molecular del cartílago articular en función de las cargas mecánicas y el proceso osteoartrósico: una revisión teórica. *Revista Cubana de Ortopedia y Traumatología*, 22(2).
- Manjusha, K. (2011). *Isolation and characterization of glycosaminoglycans and a study of its bioactive potential in two commercially important species of cephalopods, Loligo duvaucei and Sepia pharaonis*. Tesis Doctoral, School of Industrial Fisheries, Cochin University of Science & Technology, India.
- Martin Hernández, C. (2002). *“Estudio mecánico, histológico e histomorfométrico del regenerado de cartílago a partir de injertos de periostio invertido”*. Tesis Doctoral. España: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Mederos Pérez, I., & Marrero González, M. C. (4 de Agosto de 2000). *“Tejido cartilaginoso”*. Recuperado el 2013, de Revista Electrónica "Archivo Médico de Camagüey: <http://www.amc.sld.cu/amc/2000/v4n2/332.htm>
- Mizuno, M., Kobayashi, S., Takebe, T., Kan, H., Yabuki, Y., Matsuzaki, T., y otros. (16 de Sep de 2013). *Reconstruction of joint hyaline cartilage by autologous progenitor cells derived from ear elastic cartilage*. Obtenido de Stem Cells: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.1529/abstract>
- Morales Villescusa, A. (2010). *“Identificación de patrones de viabilidad y de expresión génica en condrocitos articulares humanos para su utilización en ingeniería tisular”*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Facultad de medicina, España. .
- Morales, J., Osorio, C., Montiel, R., Vázquez, H., Olayo, R., Olayo, M., y otros. (2008). Autoensamble de capas de polímeros iónicos sobre polietileno funcionalizado por plasma de pirrol. *Superficies y vacío*, 21(3), 1-4.
- Navarro Toro, M. E. (2005). *Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea*. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya, España.
- Ochi, M., Uchio, Y., Kawasaki, K., Wakitani, S., & Iw, J. (Mayo de 2002). Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *The journal of bone and joint surgery*, 84B(4), 571-578.
- Olayo, R., Ríos, C., Salgado ceballos, H., Cruz, G., Olayo, M. G., Alcaraz Zubeldia, M., y otros. (2008). Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *Journal of materials science: Material in medicine*, 19(2), 817-826.
- Pelegay Salas, C. (2012). *Caracterización de biomateriales compuestos para su uso en ingeniería de tejidos*. Proyecto fin de carrera, Universidad de Zaragoza, Escuela de Ingeniería y Arquitectura, Zaragoza , España.
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A., & Chiellini, E. (Abril de 2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, 35(4), 403-440.
- Ramos , B. (2011). *Generalidades sobre polimeros*. Recuperado el 6 de Octubre de 2013, de http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:uWCK_ZDeME0J:upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/4536/3/Anexo%2520%2520B.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx
- Rivera Caballero, G. A., & Morantes Cárdenas, C. J. (2011). *Evaluación del deterioro de un polímero sellante de juntas de motor en un ambiente con mezclas de bioetanol-gasolina*. Tesis Licenciatura, Universidad de Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas, Bucaramanga, Colombia.

- Rosales Ibéñez, R. (2008). "Aislamiento y control de calidad microanalítico para ingeniería tisular de los condrocitos del tejido cartilaginoso hialino y fibroso". Tesis doctoral. Universidad de Granada., España.
- Roughley, P. J. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *European Cell and Materials*, 12, 91-101.
- Saey Tuan Barnabas, H., Ekaputra, A., Hui, J., & Hutmacher, D. (2010). An electrospun polycaprolactone–collagen membrane for the resurfacing of cartilage defects. *Polymer International*, 59(6), 808-817.
- Sánchez Martínez, A. H. (2012). *Estudio in-vitro de la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales, procedentes de médula ósea humana, sobre biomateriales de colágeno*. Universidade Da Coruña, España.
- Sandino, C., Ginebra, M. P., Plandell, J. A., & Lacroix, D. (2011). Reconstrucción computacional de andamios para ingeniería de tejidos. *Biomecánica*, 19(1), 25-34.
- Shabani, I., Haddadi-Asl, V., Seyedjafari, E., & Soleimani, M. (Jun. de 2012). Cellular infiltration on nanofibrous scaffolds using a modified electrospinning technique. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43(1), 50-54.
- Shuaijun, J., Lie, L., Weimin, P., Guolin, M., Chunguang, D., Laquan, Z., y otros. (2012). Oriented cartilage extracellular matrix-derived scaffold for. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(5), 647-653.
- Steinert, A., Ghivizzani, S. C., Rethwilm, A., Tuan, R. S., Evans, H., & Nöth, U. (Jun de 2007). Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis research & Therapy*, 9(3), 213.
- Stephen D. Waldman, D. C. (2007). Multi-axial mechanical stimulation of tissue engineered cartilage: Review. *European cell and materials*, 13, 66-75.
- Stryer Lubert, B. J. (2007). Bioquímica, 6a Edición. En B. J. Stryer Lubert, *Bioquímica*, Barcelona, España: Reverté, S.A., 312-313.
- Tanaka, Y., Yamaoka, H., Nishizawa, S., Nagata, S., & Ogasawara, T. (Jun. de 2010). "The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage". *Biomaterials*, 31(16), 4506-4516.
- Trujillo Martín, E. (1998). *Transportadores de sodio del condrocito humano y sus modificaciones en el cartilago enfermo*". Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna, España.
- Vergara Camacho, F., & Martinez Cervantes, N. (2008). *Apuntes de cedencia de los materiales II*. Apuntes Ingeniería Mecánica, ESIME-IPN, Ciencias de materiales.
- Vinatier, C., Bouffi, C., Merceron, C., Gordeladze, J., Brondello, J. M., Jorgensen, C., y otros. (2009). Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 4(4), 318-329.
- Wang, W., Li, B., Li, Y., Jiang, Y., Ouyang, H., & Gao, C. (Ago. de 2010). In vivo restoration of full- thickness cartilage defects by poly(lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes. *Biomaterials*, 31(23), 5953-5965.

Yingying, Z., Yang, F., Liu, K., Shen, H., Zhu, Y., Zhang, W., y otros. (Abril de 2012). The impact of PLGA scaffold orientation on in vitro cartilage regeneration. *Biomaterials*, 33(10), 2926-2935.

Yoko Tanaka, H. Y. (Jun. 2010). "The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage". *Biomaterials*, vol. 31(16), 4506-4516.

Young, D. S. (2006). *Hyaluronic acid-based nanofibers via electrospinning*. EUA: Universidad estatal de Carolina del Norte.

Zapata, N. M., Zuluaga, N. J., Betancur, S. N., & López, L. E. (2007). Cultivo de tejido cartilaginoso articular: acercamiento conceptual. *Revista Escuela Ingeniería de Antioquia* (8), 117-129.

Zuñiga Aguilar, E., Godínez, R., Morales , M., Cifuentes, F., Ramírez Fernández, O., Morales, J., y otros. (2011). Crecimiento de células nerviosas motoras sobre material modificado superficialmente por plasma. *V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2011*, Habana,Cuba, 33, 120-123