



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

**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
BIOLÓGICA DE MATRICES COMPUESTAS
DE ÁCIDO POLILÁCTICO-HIDROXIAPATITA
CUBIERTAS CON POLIPIRROL PARA SU USO
COMO ANDAMIOS EN TEJIDO ÓSEO**

**TESIS QUE PRESENTA
MARÍA GUADALUPE FLORES SÁNCHEZ
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOMÉDICA**

ASESOR: DR. ROBERTO OLAYO GONZÁLEZ

JURADO EVALUADOR:

| | |
|-----------------------------------------------|-----------------|
| PRESIDENTE: DR. ROBERTO OLAYO GONZÁLEZ | UAM-I |
| SECRETARIO: DR. RAÚL MONTIEL CAMPOS | UAM-I |
| VOCAL: DR. ROGELIO JASSO VICTORIA | INER-ICV |

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 2012

COLABORADORES

DR. JUAN MORALES CORONA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITNA UNIDAD IZTAPALAPA

DRA. ATLÁNTIDA RAYA RIVERA HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”

BIOL. RAQUEL GONZÁLEZ PÉREZ HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por la formación brindada.

Al laboratorio de Polímeros de la UAM-I, por las facilidades prestadas en la realización de esta tesis.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF), por el apoyo financiero a través del proyecto PIUTE 10-63, ICyT-DF 276/2010.

Al Dr. Roberto Olayo González de la Universidad Autónoma Metropolitana, por el tiempo dedicado a la dirección y asesoría durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan Morales Corona del laboratorio de Polímeros UAM-I, por su ayuda en el cubrimiento de matrices poliméricas mediante Polimerización por Plasma.

A la Dra. Atlántida Raya Rivera y a la Bióloga Raquel González Pérez del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, por su valiosa cooperación en el Cultivo Celular in vitro de células óseas sobre matrices sintéticas así como su análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

DEDICATORIA

Al Alfarero de mi vida, por todo cuanto ha hecho en ella.

A mis padres y hermanos, por su cariño y apoyo incondicional.

A Moisés y a Emi, por su amor y comprensión.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESÚMEN | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| CAPÍTULO 1 | 16 |
| MARCO TEÓRICO | 16 |
| 1.1 Tejido Óseo | 16 |
| 1.2 Matriz Ósea | 17 |
| 1.3 Células Óseas | 18 |
| 1.3.1 <i>Osteoblastos</i> | 18 |
| 1.3.2 <i>Osteoclastos</i> | 19 |
| 1.3.3 <i>Osteocitos</i> | 19 |
| 1.4 Biomateriales | 20 |
| 1.5 Biomateriales cerámicos | 22 |
| 1.5.1 <i>Hidroxiapatita (HA)</i> | 24 |
| 1.5.2 <i>Aplicaciones de la Hidroxiapatita</i> | 26 |
| 1.5.3 <i>Uso de recubrimientos de Hidroxiapatita en prótesis</i> | 27 |
| 1.6 Biomateriales poliméricos biodegradables | 28 |
| 1.6.1 <i>Clasificación</i> | 30 |
| 1.6.2 <i>Ácido Poliláctico</i> | 31 |
| 1.7 Biomateriales compuestos | 33 |
| 1.8 Biocompositos como matrices tridimensionales en Ingeniería de Tejidos | 34 |
| 1.8.1 <i>Antecedentes</i> | 36 |
| 1.9 Técnica de Electrohilado (Electrospinning) | 38 |
| 1.9.1 <i>Aplicaciones del proceso de Electrohilado</i> | 40 |
| 1.10 Polímeros Conductores | 41 |
| 1.10.1 <i>Aspectos Generales</i> | 41 |
| 1.10.2 <i>Polipirrol</i> | 42 |
| 1.11 Técnica de Polimerización por Plasma | 43 |
| 1.12 Técnicas de Caracterización | 44 |
| 1.12.1 <i>Microscopía Óptica</i> | 45 |
| 1.12.2 <i>Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i> | 46 |
| 1.13 Caracterización Biológica del material (Cultivo Celular) | 49 |
| 1.13.1 <i>Crecimiento celular en cultivo</i> | 49 |
| 1.13.2 <i>Pases de un cultivo celular</i> | 50 |

| | | |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.13.3 | <i>Fases de un cultivo celular</i> | 50 |
| 1.13.4 | <i>Condiciones de cultivo</i> | 51 |
| 1.13.5 | <i>Medios de cultivo celular</i> | 52 |
| CAPÍTULO 2 | | 54 |
| ANTECEDENTES DE APLICACIONES BIOMÉDICAS | | 54 |
| 2.1 | Patologías del Tejido Óseo | 55 |
| 2.2 | Osteosarcoma | 56 |
| 2.3 | Alternativas en la reparación ósea que han sido utilizadas | 58 |
| CAPÍTULO 3 | | 62 |
| JUSTIFICACIÓN | | 62 |
| CAPÍTULO 4 | | 63 |
| HIPÓTESIS | | 63 |
| CAPÍTULO 5 | | 63 |
| OBJETIVOS | | 63 |
| 5.1 | Objetivo General | 63 |
| 5.2 | Objetivos Específicos | 63 |
| CAPÍTULO 6 | | 64 |
| DESARROLLO EXPERIMENTAL | | 64 |
| 6.1 | Preparación de la solución para el electrohilado | 64 |
| 6.2 | Aplicación de la Técnica de Electrohilado | 66 |
| 6.3 | Elección de las matrices para cultivo celular | 71 |
| 6.4 | Aplicación de polimerización por plasma a las matrices obtenidas | 71 |
| 6.5 | Caracterización morfológica de las matrices | 76 |
| 6.6 | Microscopía Óptica (MO) | 76 |
| 6.6.1 | <i>Microscopía Óptica de Matrices cubiertas con Polipirrol</i> | 79 |
| 6.7 | Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) | 80 |
| 6.7.1 | <i>SEM de Matrices cubiertas con Polipirrol</i> | 84 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.8 Caracterización Biológica de las Matrices | 89 |
| 6.8.1 <i>Cultivo Celular</i> | 89 |
| <i>Toma de biopsia ósea</i> | 89 |
| <i>Obtención de cultivo primario de células óseas (osteocitos)</i> | 90 |
| <i>Diferenciación de CTM hacia el linaje osteogénico</i> | 92 |
| <i>Siembra de osteocitos sobre las matrices de PLA-HA</i> | 93 |
| | |
| 6.10 Caracterización Morfológica de las matrices con osteocitos (MO y SEM) | 95 |
| | |
| CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 105 |
| | |
| TRABAJO FUTURO | 108 |
| | |
| ANEXO A | 110 |
| | |
| REFERENCIAS | 114 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 1 Tejido Óseo. | 16 |
| Fig. 2 Tejido Óseo. | 17 |
| Fig. 3 Matriz Ósea. | 18 |
| Fig. 4 Representación de las células óseas. | 19 |
| Fig. 5 Estructura de una HA. | 25 |
| Fig. 6 Estructura cristalina de la Hidroxiapatita. | 26 |
| Fig. 7 Clasificación de polímeros biodegradables. | 30 |
| Fig. 8 Métodos de síntesis para la obtención de alto peso molecular. | 32 |
| Fig. 9 Proceso de electrohilado (Electrospinning). | 39 |
| Fig. 10 Estructura del Polipirrol. | 43 |
| Fig. 11 Representación esquemática de la columna de un microscopio electrónico de barrido. | 47 |
| Fig. 12 Ruta crítica para la fabricación de biomateriales para su empleo en implantes. | 60 |
| Fig. 13 Sistema de Electrohilado utilizado para la formación de matrices de PLA e HA. | 67 |
| Fig. 14 Sistema de electrohilado (Electrospinning). | 68 |
| Fig. 15 Matrices de PLA e HA mediante la técnica de Electrohilado. | 70 |
| Fig. 16 Polimerización por Plasma. | 72 |
| Fig. 17 Reactor. | 73 |
| Fig. 18 Experimento de polimerización. | 74 |
| Fig. 19 Matrices cubiertas con Polipirrol. | 75 |
| Fig. 20 Microscopio Óptico modelo DMLP Leica. | 77 |
| Fig. 21 Microscopía Óptica de las muestras más representativas. | 78 |
| Fig. 22 Microscopía Óptica de Matrices cubiertas con Polipirrol. | 79 |
| Fig. 23 Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-7600F. | 80 |
| Fig. 24 Preparación del fragmento de PLA-HA antes del análisis mediante SEM | 81 |
| Fig. 25 Microscopía Electrónica de Barrido de M1 (1.2g PLA 40ml sol.) y M2 (1.2g PLA 0.3g HA 10ml sol.) | 82 |
| Fig. 26 Microscopía Electrónica de Barrido de M3 (1.8g PLA 0.3g HA 10ml sol), M5 (1.2g PLA 0.1g HA 20ml sol.), M6 (1.8g PLA 0.1g HA 30ml sol.) y M8 (1.8g PLA 0.2g HA 80ml sol.) | 83 |
| Fig. 27 M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol. | 85 |
| Fig. 28 PLA1.8g-HA0.4g 20ml sol. Cubierta con PPy . | 86 |
| Fig. 29 M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol. | 87 |
| Fig. 30 M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol. Cubierta con PPy sol. | 88 |
| Fig. 31 Laboratorio de Cultivo Celular Hospital Infantil de México Federico Gómez. | 89 |
| Fig. 32 Figura. Obtención de cultivo primario de células óseas | 91 |
| Fig. 33 Diferenciación de CTM hacia el linaje osteogénico a partir del cuarto pase (4P). | 92 |
| Fig. 34 Microscopía Óptica del Cultivo de Osteocitos. | 93 |
| Fig. 35 Siembra de osteocitos sobre las matrices de PLA-HA. | 94 |
| Fig. 36 Cultivo celular en las matrices para los días: a) día 3 b) día 7 c) día 14. | 95 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Fig. 37 a) Fijación de la muestra con glutaldehído b) Deshidratación con alcoholes graduales c) Equipo de punto crítico d) Celda del equipo de punto crítico. _____ | 96 |
| Fig. 38 SEM de la matriz M9 original (PLA 1.8g-HA 0.4g) a distintos aumentos. _____ | 97 |
| Fig. 39 SEM de la matriz M10 original (PLA 1.8g-HA1g cubierta con PPy) a distintos aumentos. _____ | 98 |
| Fig. 40 Continuación de SEM de las matriz M10 original (PLA 1.8g-HA1g con PPy) a distintos aumentos. _____ | 99 |
| Fig. 41 SEM de M9 en medio de cultivo al tercer día a distintos aumentos. _____ | 99 |
| Fig. 42 SEM de M10 en medio de cultivo al tercer día a distintos aumentos. _____ | 100 |
| Fig. 43 SEM de M9 con osteocitos al día 3. _____ | 101 |
| Fig. 44 SEM de M10 con osteocitos al día 3. _____ | 102 |
| Fig. 45 SEM de M10 con osteocitos al día 14. _____ | 103 |
| Fig. 46 SEM de M10 con osteocitos al día 14. _____ | 104 |
| Fig. 47 M2 12% p/v PLA 3% p/v HA 10ml sol. _____ | 105 |
| Fig. 48 a) Tornillo fijo a los extremos del fémur de un conejo b) Tornillo cubierto con PLA-HA _____ | 108 |
| Fig. 49 Barreno en hueso de conejo para introducción de biomaterial de PLA-HA _____ | 109 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 1. Medios de Cultivo Estándar. | 52 |
| Tabla 2. Cantidades de PLA-HA utilizadas. | 65 |
| Tabla 3. Concentraciones de PLA, HA y condiciones de depósito. | 66 |
| Tabla 4. Concentraciones de PLA, HA y condiciones de depósito. | 71 |
| Tabla 6. Concentraciones iniciales de PLA-HA. | 105 |
| Tabla 7. Condiciones finales de PLA-HA. | 106 |
| Tabla 8. Condiciones de las matrices. | 106 |

RESÚMEN

Este trabajo hace énfasis en la necesidad de producir un material para injerto óseo; cabe señalar que un injerto óseo es una cirugía para colocar hueso nuevo o sustitutos óseos dentro de los espacios ubicados alrededor de un hueso roto o de defectos óseos para ayudar a reparar alguna deficiencia ósea debida a algún trauma o tipo de patología como el osteosarcoma. Dado que la ingeniería de tejidos es una alternativa para generar tejido óseo sintético proporcionando al paciente una recuperación funcional y teniendo como reto la sustitución o reparación de tejido óseo ya que éste posee importantes funciones biomecánicas, se fabricaron matrices tridimensionales de Ácido Poliláctico que es un polímero biodegradable y relativamente costeable que tiene una amplia gama de aplicaciones y la Hidroxiapatita, una cerámica resistente que constituye la mayor parte inorgánica del hueso, ambos materiales poseen biocompatibilidad la cual está íntimamente ligada con sus propiedades de superficie. Estos materiales combinados, dieron muy buenos resultados al utilizarlos para construir matrices porosas, ya que favorecieron la integración de células óseas, además de ser biocompatibles y biodegradables.

Se utilizó la técnica de Electrohilado para generar matrices continuas con diámetros en la escala nano y micrométrica. Con esta técnica se pudo controlar las principales variables y parámetros, tales como el diámetro de las fibras en la matriz, su morfología, el voltaje aplicado, lo cual depende del tipo de polímero que se va a usar entre algunas otras condiciones ambientales del proceso como (la humedad y temperatura. Es muy importante destacar que la cantidad de polímero y de cerámica que se utilizaron también pudieron ser variadas. Para sintetizar las películas de Polipirrol y modificar las propiedades de superficie de las matrices de Ácido Poliláctico e Hidroxiapatita, se utilizó la técnica de Polimerización por Plasma. Se usó Polipirrol debido a que es un polímero que posee conductividad eléctrica y estimulación celular, por lo que es de gran ventaja en la proliferación celular. Para caracterizar la morfología de dichas matrices, se utilizó Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), obteniéndose muy buenos resultados en cuanto al tamaño de los poros los cuales resultan adecuados para la proliferación de células óseas. Las matrices presentaron resistencia y flexibilidad, lo que ayudará a darles la forma que más convenga dependiendo del tipo de injerto o sustituto que se requiera.

Para evaluar la respuesta biológica de las matrices de Ácido Poliláctico e Hidroxiapatita cubiertas con Polipirrol, se hizo cultivo celular in vitro mediante un protocolo ya establecido, en el cual se manejaron las condiciones apropiadas para realizar cultivo de células óseas (osteocitos, osteoblastos y osteoclastos), dando como resultado una buena adhesión y proliferación celular en las matrices de PLA-HA cubiertas con Polipirrol.

INTRODUCCIÓN

El objetivo principal en el manejo de los tumores óseos, es la extirpación completa del tumor; sin embargo, uno de los grandes retos en ortopedia es ofrecer al paciente una buena calidad de vida manteniendo funcionalidad en la extremidad dañada.

En la década de los 70's surgieron los procedimientos de conservación de las extremidades de pacientes con osteosarcoma, como resultado del advenimiento de esquemas quimioterapéuticos más efectivos, nuevas técnicas quirúrgicas y la ingeniería biomédica (Grimer RJ., 1999); por lo que, actualmente en muchas instituciones de Estados Unidos y Europa la conservación de las extremidades es el tratamiento estándar cuando hay tumores óseos (Cara J., 1994).

La elección del tipo de tratamiento (amputación versus reconstrucción) depende de diversos factores como la edad del paciente, la localización del tumor, de la existencia de compromiso de estructuras neurovasculares y de la presencia o ausencia de fractura patológica antes o durante la inducción de la quimioterapia neoadyuvante (Marinaa N., 2004).

La endoprótesis metálica es un replazo manufacturado para el hueso afectado, generalmente construida de acero inoxidable o titanio (Janes H, 2002), una opción que a su vez provee estabilidad inmediata al paciente. Este tipo de replazo se utiliza en pacientes mayores de ocho años por la inmadurez esquelética de los niños antes de esta edad (Mejía A., 2002). Se ha demostrado que el replazo de hueso con prótesis tiene más ventajas que otras alternativas de reconstrucción, incluyendo la preservación de la marcha, la recuperación funcional y la movilización (Kawai A., 1999), lo cual repercute en una mejor calidad de vida, por un estado emocional más favorable.

Aunque la colocación de endoprótesis se ha convertido en el tratamiento estándar para los pacientes con osteosarcoma, su uso con lleva ciertas complicaciones algunas veces inevitables como las infecciones, la fatiga del implante, fallas mecánicas, desgaste de los materiales o la pérdida de la prótesis (Malawer M. y Cols., 1995).

Durante la década de los 60's se publicaron los primeros estudios sobre las lesiones provocadas por la presencia de un implante, época en la cual hizo su aparición el término biocompatibilidad para definir el grado de tolerancia del material del implante por parte de la materia viva. La determinación de la biocompatibilidad para cada aplicación específica y para cada sistema

formado por material y el medio biológico con el que estará en contacto, requiere la realización de una serie de ensayos de acuerdo con protocolos preestablecidos y del posterior análisis estadístico de los resultados obtenidos.

El daño total o parcial de tejido y la pérdida de la función de un órgano se encuentran entre los problemas más graves y costosos de la salud humana. Inicialmente, esos problemas se han abordado mediante el trasplante de órganos y tejidos alogénicos; sin embargo, esta opción se ve limitada por la baja disponibilidad de donantes (Lane J.,1986). Como consecuencia, cada año muere un gran número de pacientes en listas de espera y, más grave aún, muchos otros no llegan siquiera a integrarlas.

La creciente necesidad de órganos ha llevado a los investigadores a plantear la posibilidad de utilizar células y materiales de diversa naturaleza para la reconstrucción de órganos y tejidos, para dar así nacimiento a una disciplina conocida hoy como Ingeniería de Tejidos, la cual se define como el uso de los principios y métodos de la ingeniería, la biología y la bioquímica orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos de los mamíferos, y el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener y/o mejorar su función.

En vista de los resultados prometedores reportados en la literatura y de la urgente necesidad de terapias que ayuden a la recuperación de lesiones en el tejido óseo causadas por trauma, osteonecrosis, tumores y enfermedades congénitas y degenerativas, se considera de gran importancia realizar una revisión de los conceptos básicos de la Ingeniería de Tejidos (Hardingham T., 2002).

La Ingeniería de Tejidos entendida como la investigación en el campo de reconstrucción de órganos y tejidos, influyó en la aplicación de las técnicas de síntesis y caracterización de las propiedades estructurales y de superficie de los materiales, considerando el análisis de las respuestas de estos materiales cuando son sometidos a pruebas biológicas como en el caso de cultivo celular.

Es también importante describir los tipos de injertos que desde algunas décadas comenzaron a utilizarse para reconstruir algún defecto óseo. Los injertos de hueso pueden ser:

Injertos Autólogos: El material óseo para el injerto es obtenido del mismo paciente.

Aloinjertos: El material óseo es tomado de otro individuo de la misma especie pero de diferente genotipo.

Xenoinjertos: Son obtenidos de individuos de diferente especie.

Cuando se presenta el problema de sustituir una sección ósea de gran tamaño, en principio se ha optado por utilizar injertos autólogos, sin embargo, la generación de tejido óseo sintético es considerada una alternativa en la solución de problemas relacionados con el sitio donador y las limitantes del tamaño del defecto.

La reconstrucción de defectos de tamaño pequeño a moderado es técnicamente factible, y algunos de los conceptos actualmente desarrollados pueden presentar alternativas a los injertos autólogos para ciertas condiciones clínicas. La reconstrucción de defectos de gran volumen sigue siendo un reto para el cual la Ingeniería de Tejidos ofrece alternativas como el desarrollo y manipulación de matrices tridimensionales (*scaffolds*), las células y los factores de crecimiento y diferenciación (Langer R., 1993).

Las matrices tridimensionales son dispositivos que proporcionan a las células el soporte necesario para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas y las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica y, además, definen la arquitectura del tejido (Kim B. S, 2000).

En base a lo anterior, el presente trabajo constituye el inicio de una línea de investigación en vías de aplicación clínica en un futuro no muy lejano, en el cual se utiliza la técnica de Electrohilado para producir matrices porosas de un material compuesto de una cerámica y de un polímero que para este trabajo fue Hidroxiapatita y Ácido Poliláctico, respectivamente. Para regenerar o sustituir tejido óseo resulta una gran ventaja la utilización de este tipo de materiales, dadas las características propias de la parte cerámica y la parte polimérica. Cabe señalar que la técnica de Electrohilado responde de manera exitosa ante la producción de matrices formadas por fibras de distintos diámetros, que al sobreponerse forman un entre-mallado con una porosidad que permite

la circulación de fluidos nutrientes, induciendo la actividad celular y por lo tanto el crecimiento de estas células, soportadas por dichas matrices.

Con el propósito de que las células de tejido interactúen con dichas matrices de manera activa, la superficie de éstas últimas se modifican con Polipirrol que es un polímero con buena conductividad eléctrica lo cual permite que las células se adhieran y proliferen con facilidad en las matrices producidas. El recubrimiento de las matrices se realiza mediante la técnica de Polimerización por Plasma.

Generar un material de Hidroxiapatita y Ácido Poliláctico cubierto con Polipirrol es de gran interés para ser utilizado como injerto en un futuro debido a que tiene las características necesarias para generar proliferación de células óseas sin generar reacciones secundarias en el paciente ya que dichos materiales se encuentran muy bien caracterizados y son biocompatibles (Wenguo Cui, 2010).

Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

La interdisciplinariedad de este trabajo obliga a la descripción de diversos temas que son fundamentales para la comprensión del proceso que se tiene que realizar para alcanzar el objetivo principal. Inicialmente se describe la conformación del tejido óseo y los biomateriales que han sido utilizados para generar tejido óseo sintético, haciendo énfasis en los polímeros y cerámicas para fabricar un material compuesto que es el tipo de material que mejor responde a las necesidades que requiere este tipo de tejido. Además, se describe la Técnica de Electrohilado y la Técnica de Polimerización por Plasma; la primera es la que se utiliza en este proyecto para fabricar matrices porosas y la segunda se usa para modificar las propiedades de superficie de dichas matrices. Finalmente se describen las Técnicas utilizadas para caracterizar la morfología del material final, mediante Microscopía Óptica, Microscopía Electrónica de Barrido y desde el punto de vista biológico el Cultivo Celular.

1.1 Tejido Óseo

El tejido óseo es un material natural que mantiene una rigidez y resistencia elevadas con un peso mínimo. Se puede decir que la fase mineral del hueso le confiere su resistencia a la compresión y cizalladura, mientras que el colágeno le proporciona resistencia a la tracción.

El tejido óseo está constituido principalmente por una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Estas células, aunque constituyen menos del 2% del volumen total de hueso, son las más importantes en el desarrollo y regeneración del tejido óseo a través de la actividad que llevan a cabo.

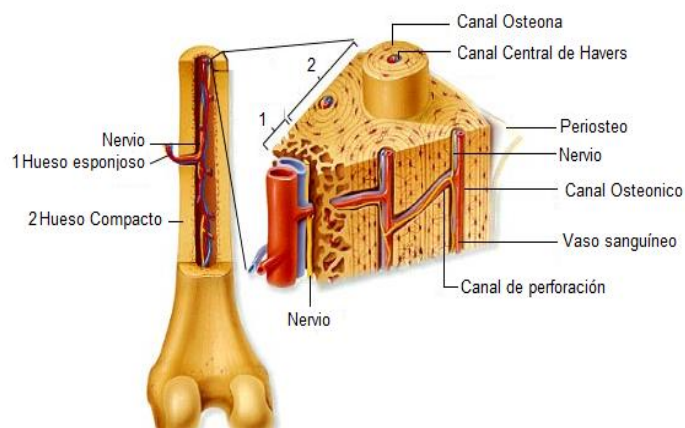


Fig. 1 Tejido Óseo.

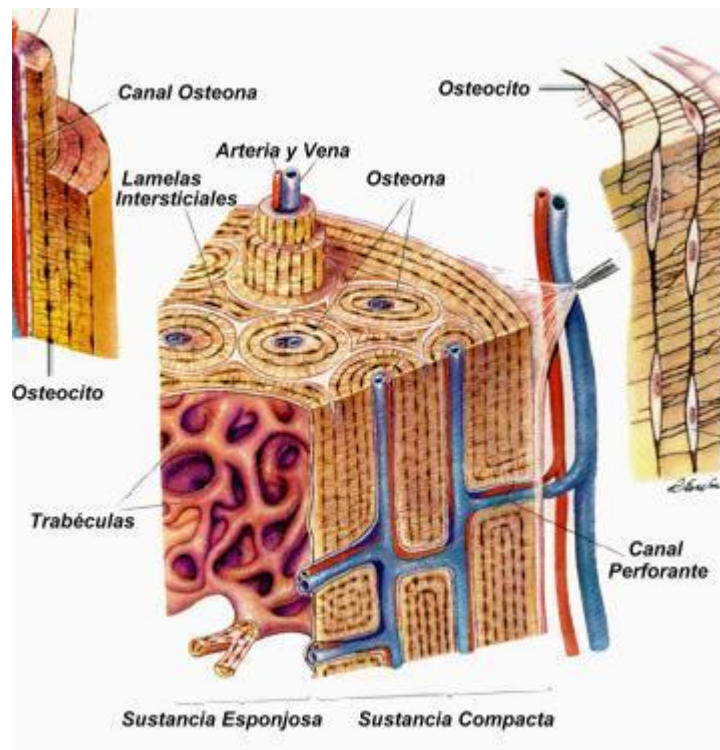


Fig. 2 Tejido Óseo.

1.2 Matriz Ósea

La matriz del tejido óseo se caracteriza por estar mineralizada. Ésta, es metabólicamente activa y se halla formada en un 65% de fase mineral y un 35% de fase orgánica. Aproximadamente el 90% de la fase orgánica se halla constituida por fibras de colágeno tipo I, mientras que el 10% restante lo componen una serie de proteínas no estructurales de menor tamaño, entre las que se encuentran la osteocalcina, la osteonectina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. La fase inorgánica está compuesta mayoritariamente por cristales de Hidroxiapatita (HA) y carbonato de calcio. Las fibras de colágeno se encuentran entre estos cristales para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia.

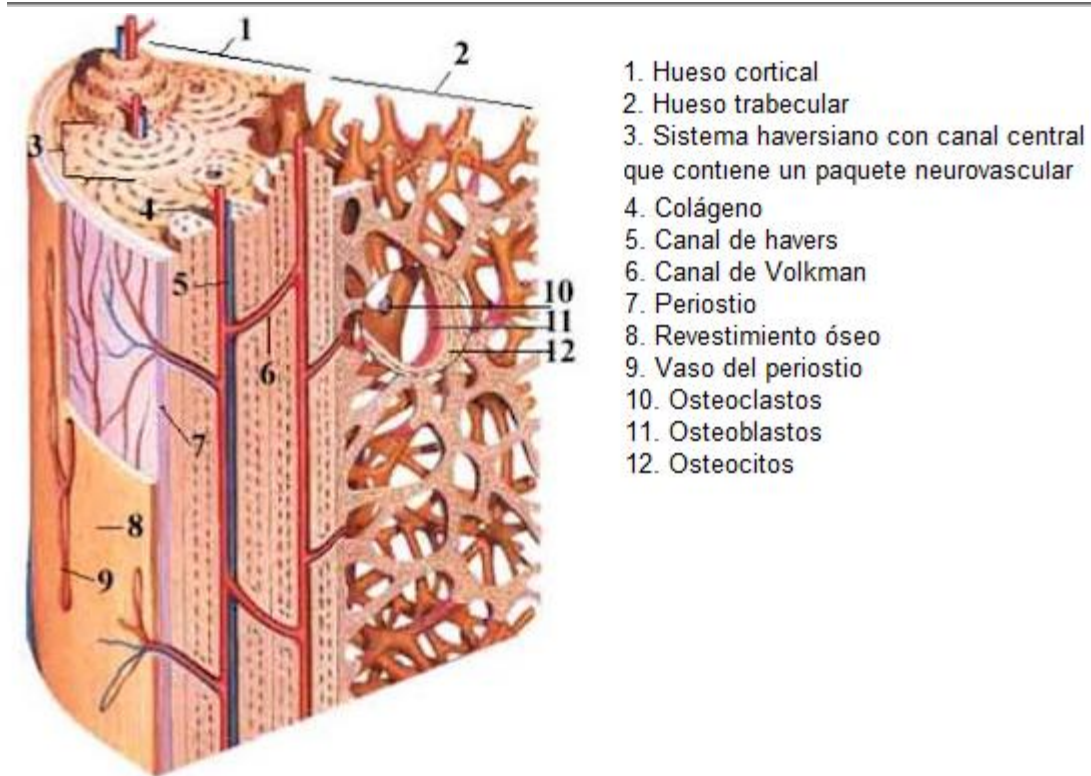


Fig. 3 Matriz Ósea.

1.3 Células Óseas

Para comprender cuál será la función de las matrices producidas en este trabajo, fue de gran importancia estudiar las principales características de las células que conforman el tejido óseo ya que también juegan un papel importante al momento de que se realiza cultivo celular in vitro.

1.3.1 *Osteoblastos*

Son las células del hueso que ayudan a sintetizar la parte orgánica de la matriz ósea, ésta se encuentra formada por colágeno tipo I, proteoglicanos, proteínas implicadas en la adhesión celular, osteocalcina y factores de crecimiento; los osteoblastos también controlan el depósito de las sales minerales y regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos, así, en conjunto, ambos tipos celulares son importantes en la remodelación ósea y en la homeostasis del calcio.

1.3.2 *Osteoclastos*

Son las células encargadas de la absorción ósea; después de que producen ácidos y enzimas lisosomales en una zona de remodelado óseo, se desplazan a través de la superficie del hueso para absorber en otro lugar y luego desaparecen por proceso de apoptosis. (Conjunto de reacciones químicas encaminadas a producir la muerte de una célula de un organismo pluricelular de manera controlada).

1.3.3 *Osteocitos*

Los osteoblastos que se diferencian en su totalidad y quedan sumergidos en la matriz ósea mineralizada se convierten en osteocitos, alrededor del 10-20% de los osteoblastos.

Los osteocitos tienen una morfología que varía de acuerdo a su edad y su destino final es cuando son absorbidos por los osteoclastos. Según investigaciones, se dice que los osteocitos son muy importantes en el metabolismo óseo ya que funcionan como mecanosensores y activadores locales de remodelado.

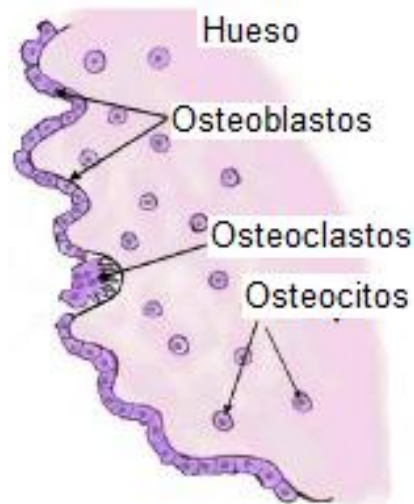


Fig. 4 Representación de las células óseas.

1.4 Biomateriales

Un biomaterial es aquel que tiene las características para interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido u órgano (Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials, Segunda Conferencia para el Consenso de definiciones en Biomateriales Reino Unido 1992) (Gil H., 2008).

Un área de interés particular para la ingeniería de tejidos es el desarrollo de materiales que contribuyan en los procesos de regeneración ósea ya que en todo el mundo diariamente se presentan problemas debido a algún trauma o patológicos los cuales implican el daño del tejido óseo.

En un inicio, los implantes óseos solo se aplicaban para soportar los esfuerzos mecánicos que originalmente soportaba el tejido dañado considerando además que dicho implante no causara alguna reacción de rechazo por parte del organismo. Con mucha frecuencia se han utilizado aceros inoxidable y aleaciones de titanio para fijar huesos fracturados; sin embargo, estos tienen el inconveniente de que requieren intervenciones quirúrgicas para su extracción luego del tratamiento, lo que implica mayores costos y potencializa la infección. Además, todo material que se inserta en un tejido vivo provoca una respuesta, aunque sea mínima por parte de este.

En las últimas décadas se han desarrollado biomateriales con el objeto de satisfacer necesidades en diferentes aplicaciones clínicas. Autores como (Ikada D., 2006), (Meyer U., 2009) y (Barrere G., 2008), describen que los materiales para implantes óseos deben observar diversas propiedades; una de ellas es la *biocompatibilidad*, esta permite que dichos materiales se integren al organismo receptor sin que haya efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmune. Por su parte, la *biodegradabilidad* debe considerarse a tasas que sean lo más cercanas posibles a las tasas de formación de nuevo hueso y por el hecho de que el tejido óseo debe soportar cargas, entonces también es necesario considerar la *resistencia y compatibilidad mecánica del implante*, de acuerdo a la posición del tejido óseo que reemplaza.

Se señala que las propiedades mecánicas como el módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción, a la fractura, a la fatiga y el porcentaje de elongación, entre otros, debieran ser cercanas a las del tejido que se reemplaza; esto no ocurre de manera estricta ya que la actividad de un hueso y otro harán la diferencia, pero de manera general se ha de considerar la existencia de compatibilidad mecánica para evitar la osteopenia que se asocia al uso de implantes óseos o "stress shielding". En los huesos, la *osteoinductividad* permite promover la fijación de la formación de células específicas del tejido óseo al reclutar células madre mesenquimales y

osteoprogenitoras para que posteriormente proliferen y se diferencien hacia la línea osteogénica; por su parte, la *osteoconductividad* ayuda en el soporte estructural, en la formación y crecimiento de nuevo hueso. Esta propiedad se combina con la biodegradabilidad puesto que el material del implante debe ser reabsorbido para dar espacio al nuevo tejido que inicialmente ayudó a soportar. La *radiolucidez* es otra propiedad que se toma en cuenta porque dicha propiedad permite que el material pueda diferenciarse radiográficamente con respecto al tejido donde se implantó, de tal manera que se observe periódicamente lo que está sucediendo al interior.

Como se mencionó al principio de la introducción, la Ingeniería de Tejidos influyó sobre las técnicas para caracterizar la estructura y la superficie de los materiales, con el objeto de correlacionarlos con las respuestas biológicas observadas.

Atendiendo a la naturaleza del material artificial con el que se fabrica un implante, se puede establecer una clasificación en materiales:

1) Cerámicos

2) Metálicos

3) Poliméricos

4) Materiales Compuestos.

A continuación, se hace énfasis en la descripción de los materiales cerámicos y poliméricos, dado que fueron los que se usaron como precursores en la fabricación de biocompositos, en función de que se ha reportado que presentan las mejores propiedades para la fabricación de tejido óseo sintético (Wenguo Cui.,2010).

1.5 Biomateriales cerámicos

Los Los *cerámicos* son materiales inorgánicos formados por elementos metálicos y no metálicos unidos principalmente por enlaces iónicos y enlaces covalentes, los cuales tienen gran estabilidad química frente al oxígeno, el agua, los medios ácidos, alcalinos y salinos, y los solventes orgánicos. Son muy resistentes al desgaste y generalmente se comportan como buenos aislantes térmicos y eléctricos. Todas estas propiedades son ventajosas para su aplicación como biomateriales. Los materiales cerámicos han adquirido recientemente una gran importancia como candidatos para la fabricación de implantes. Los principales dentro de esta categoría son la alúmina (monocristal de óxido de aluminio), el carbón pirolítico, la Hidroxiapatita (fosfato de calcio hidratado) y los vitrocerámicos basados en dióxido de silicio (SiO_2) – óxido de calcio (CaO) – óxido de sodio (Na_2O) – pentaóxido de fosfato (P_2O_5) y algunos en dióxido de magnesio MgO y óxido de potasio K_2O .

Las cerámicas a base de fosfatos de calcio son los biomateriales más parecidos al componente mineral del tejido óseo, presentan una buena biocompatibilidad, capacidad de osteointegración y en algunos casos de osteoinducción. Sin embargo, su aplicación en áreas que deben soportar cargas representa un problema no resuelto, dado que son rígidas y quebradizas. De acuerdo con las características de la respuesta que generan en el tejido circundante, se pueden clasificar en tres grandes grupos:

Cerámicas bioinertes. Poseen una elevada estabilidad *in vivo*, gran resistencia mecánica y óptima biocompatibilidad. Tienen una influencia nula o muy pequeña en el tejido óseo aledaño.

Cerámicas bioactivas. Tienen propiedades osteoconductoras y enlazan directamente con el hueso vivo. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son inferiores a las de las cerámicas bioinertes. A este grupo pertenecen los vidrios bioactivos y las cerámicas de fosfatos de calcio.

Cerámicas biorreabsorbibles. Luego de su implantación son progresivamente reemplazadas por tejido óseo neoformado. Para ello debe existir una adecuada correlación entre las velocidades de reabsorción del biomaterial y de regeneración del hueso. En este grupo se puede clasificar los cementos de fosfatos de calcio.

La adhesión de las biocerámicas al tejido óseo ocurre de diversas maneras; la morfológica se produce por crecimiento óseo en las irregularidades de la superficie del biomaterial, como ocurre con las cerámicas cristalinas inertes, especialmente la alúmina; la biológica se genera por colonización del material gracias al crecimiento óseo, como sucede con las cerámicas porosas

inertes, especialmente la Hidroxiapatita coralina; la adhesión bioactiva se origina por enlaces químicos entre el tejido óseo y el biomaterial, como es el caso de las cerámicas cristalinas bioactivas, tales como los vidrios bioactivos y vitrocerámicas y finalmente, la adhesión sustitutiva es la que se produce por la sustitución progresiva del material por hueso neoformado, como ocurre con las cerámicas porosas bioactivas, principalmente los fosfatos y sulfatos cálcicos. Los cementos de fosfatos de calcio desarrollan este tipo de fijación.

Las primeras cerámicas que fueron utilizadas en aplicaciones médicas, la alúmina y la zirconia, son dos prototipos de cerámicas inertes, por lo que fueron elegidas para su utilización en implantes.

El empleo de cerámicas especialmente diseñadas para reproducir diferentes funciones de los organismos vivos, es una de las más revolucionarias tendencias de las pasadas cuatro décadas en la evolución de estos materiales.

El comportamiento de la superficie de las biocerámicas es un factor clave en la respuesta del implante. Por eso su caracterización es imprescindible. Cuanto mayor superficie específica y porosidad (alrededor de 400 micras para hueso trabecular y 150 micras en hueso compacto), mayor reactividad y, por tanto, cinética más rápida en la respuesta. Por otro lado, las células tienen claras preferencias por la forma de la superficie y su terminación: lisa o rugosa.

Los cementos de fosfatos de calcio presentan como característica destacada su capacidad de reabsorción (activa o pasiva), dependiendo de la participación o no de la actividad celular. La reabsorción activa de los biomateriales es mediada por la acción celular, como ocurre con los cementos que dan como producto final Hidroxiapatita deficiente en calcio que es degradada por los osteoclastos (células reductoras de hueso). La reabsorción pasiva se produce cuando el material es inestable en los fluidos orgánicos, como ocurre con el sulfato de calcio, de hecho, los cementos que dan como producto final fosfato dicálcico dihidratado experimentan este tipo de reabsorción. Los cementos de Hidroxiapatita precipitada son osteointegrados en el tejido óseo pero no son reabsorbidos, por lo que su comportamiento biológico es similar al de las cerámicas de Hidroxiapatita formulada en gránulos.

El primer cemento basado en fosfatos de calcio fue desarrollado por Brown y Chow en 1983 y se encuentra constituido por fosfato tetracálcico (TTCP) y fosfato dicálcico dihidratado o hidrógeno fosfato de calcio (DCPA). Es el biomaterial perteneciente a este grupo que cuenta con mayor número de estudios experimentales relativos a su comportamiento biológico.

El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la Hidroxiapatita (HA), por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos, presenta buenas propiedades como biomaterial, tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso.

La perspectiva de usos clínicos de las biocerámicas en la implantación del hueso y la sustitución del tejido fino implica requisitos determinantes en lo que concierne a confiabilidad y a robustez de materiales. Se ha sugerido una técnica para realzar las características mecánicas de las biocerámicas basada en fosfato tricálcico alfa (α -TCP) α -Ca₃(PO₄). Varios tipos de prueba mecánica, incluyendo el análisis compresivo de la deformación, han probado que las biocerámicas más robustas se pueden fabricar a partir de alfa α -TCP y el 1% quitosán donde la cinética de transformación en experimentos es considerada para definir la mejor selección de los cocientes de la sustancia y de los términos de la estabilización. Es esencial aumentar la capacidad de deformación, carga y anisotropía de las cerámicas, si es que se desea su empleo en hueso cortical. Una forma de hacerlo es añadir un polímero biocompatible como componente precursor. (Okumura M., 1991).

1.5.1 Hidroxiapatita (HA)

La La Hidroxiapatita Ca_{10-x}(PO₄)_x(HPO₄)_{6-x}(OH)_{2-x} con 0<x<1 (Figura 5), es el principal componente inorgánico del hueso de los vertebrados; también la encontramos en la dentina y el esmalte dental (Boskey A., 1997). Este fosfato de calcio, que se puede obtener de forma sintética, presenta características de biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad; tales propiedades hacen al material muy práctico para usos médico, de ahí el gran interés que este trabajo tiene en ella.

El estudio de la HA se ha realizado desde hace varias décadas; Ivanova propuso su estructura cristalina a partir del análisis de un monocristal (Ikanova T., 2001). Este fosfato cristaliza en el sistema hexagonal, grupo de simetría P63/m, con valores de red a=b=9,432Å y c=6,88 Å (Figura 2). El carácter iónico de la HA la hace una cerámica dura, refractaria, con punto de fusión mayor que 1500°C. Además, este carácter iónico le proporciona la capacidad de la sustitución parcial o completa de iones de la red por otros de tamaño similar (PO₄³⁻ por H PO₄²⁻, Ca²⁺ por K⁺ o Mg²⁺, OH⁻ por F⁻, Cl⁻, Br⁻) (Williams R.) y le proporciona su propiedad de insolubilidad. La relación ideal Ca/P es 10:6 (1,6667), su densidad calculada es de 3,219 g/cm³ y sus propiedades mecánicas varían de acuerdo con el proceso de manufactura; la HA policristalina tiene un módulo elástico alto que va de 40-117 Gpa (Parks. J., 1992).

Una HA apropiada para cualquier aplicación específica debe controlar su composición, las impurezas, morfología, cristalinidad, tamaño del cristal y de las partículas. Las variaciones pequeñas en las anteriores características ocasionan diferentes comportamientos del material implantado (Ratner B., 1996), tanto en su bioactividad y rango de disolución como en su reabsorción (Fulmer M., 2002).

El método más común para la obtención de HA es el de precipitación, con el que se obtienen cantidades apreciables del material de forma económica y fácilmente reproducible; sin embargo, este trabajo sugiere el uso de Hidroxiapatita sintética Sigma-Aldrich debido a su composición y a que se han obtenido resultados favorecedores en su implantación in vivo, los cuales demuestran ausencia de toxicidad local o sistémica, además su uso es mucho más barato si se compara con aquellos materiales únicamente metálicos como el titanio que se han utilizado en prótesis, generando así una alternativa para aquellos pacientes que requieran de la sustitución o regeneración de tejido óseo. Además, al realizar las primeras pruebas en el sistema de electrohilado no presentó ningún problema (Rodríguez L., 2000).

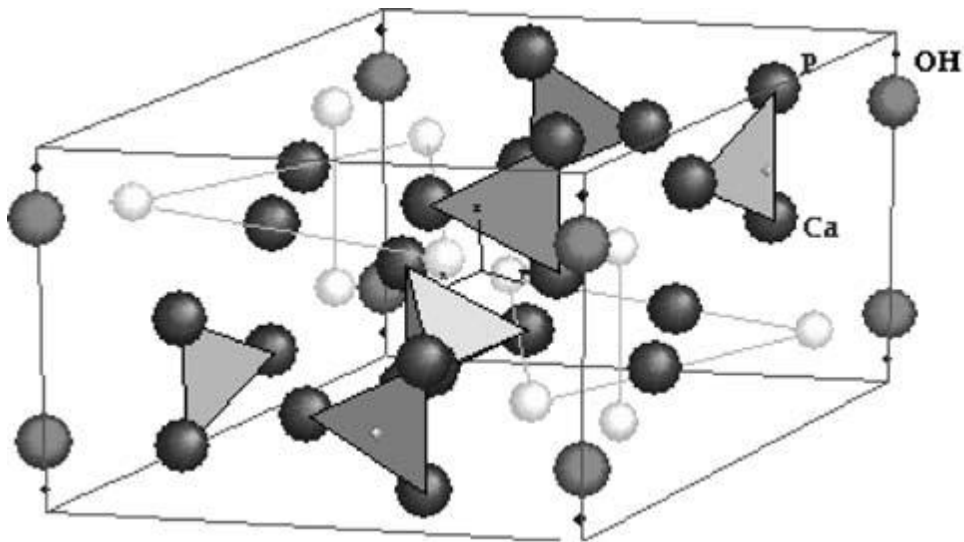


Fig. 5 Estructura de una HA.

$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$.(Rodríguez L., 2000).

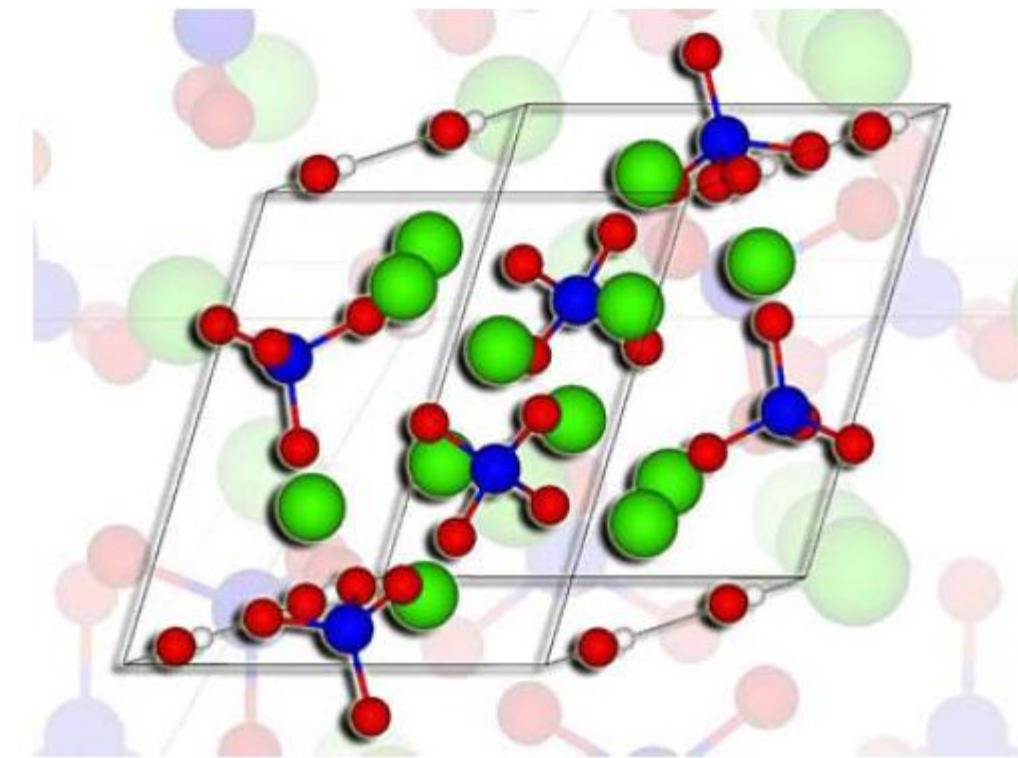


Fig. 6 Estructura cristalina de la Hidroxiapatita.

1.5.2 Aplicaciones de la Hidroxiapatita

La HA es una forma de fosfato que tiene una gran cantidad de aplicaciones tales como la separación y la purificación de proteínas y los implantes de hueso. Para cada una de estas aplicaciones, el uso de materias primas de calcio es optimizado especificando las propiedades físicas y químicas tales como la geometría, la dimensión, la densidad, el tamaño de poro, la fuerza mecánica, la pureza y la fase química del material.

La Hidroxiapatita es un compuesto cristalino integrado por tres moléculas de fosfato de calcio y de una molécula de hidróxido de calcio. El concentrado de la Hidroxiapatita es la matriz de calcio de la proteína encontrada en el hueso sin procesar. Esta sustancia natural contiene aproximadamente 14% la proteína del colágeno y 4% de otras proteínas y aminoácidos pequeños como hidroxiprolina, glicina y ácido glutámico. El calcio abarca entre el 24-30% de la matriz de la Hidroxiapatita y junto con varios minerales como el zinc, potasio, silicio, manganeso, hierro forma un conjunto biodisponible activo de calcio.

Se ha realizado una investigación muy grande en la ciencia de materiales y además, las cirugías ortopédicas comunes ahora exigen una cantidad grande de sustitutos bioactivos de hueso con una variedad de respuestas osteogénicas. En el sistema del fosfato de calcio, la Hidroxiapatita y el

fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ son excelentes materiales bioactivos convenientes para el prótesis duro del tejido fino.

La Hidroxiapatita suele utilizarse de dos maneras: como recubrimiento y como relleno. Los recubrimientos de Hidroxiapatita a menudo se aplican a los implantes metálicos (con mayor frecuencia de titanio/aleaciones de titanio y acero inoxidable) para alterar las propiedades de la superficie. De esta manera, el cuerpo considera el tipo de material de Hidroxiapatita que puede aceptar. Hasta la fecha, el único método aceptado comercialmente de la aplicación de recubrimientos de Hidroxiapatita a implantes metálicos es la pulverización por plasma.

Por su parte, los rellenos de Hidroxiapatita pueden ser empleados como polvos, o bloques porosos para rellenar defectos óseos o vacíos. Estos pueden surgir cuando una gran parte de los huesos han tenido que ser retirados (por ejemplo, cáncer de hueso) o cuando el aumento de hueso es necesario (por ejemplo, reconstrucciones maxilofaciales o aplicaciones dentales). El relleno óseo proporcionará una alternativa para restaurar estructuras óseas y reducir el tiempo de curación en comparación con situaciones en las que no se utiliza relleno óseo.

1.5.3 Uso de recubrimientos de Hidroxiapatita en prótesis

Diversos estudios sobre el uso de recubrimientos de Hidroxiapatita muestran éxito clínico de los implantes de titanio recubiertos con esta cerámica. Además se han realizado comparaciones de implantes recubiertos con Hidroxiapatita con otros sin recubrir y se comprobó que la velocidad y la eficacia de la unión entre el hueso y el implante se mejoran considerablemente cuando existe un recubrimiento bioactivo, esta es otra de las razones por las que en este proyecto se considera trabajar con Hidroxiapatita.

Un estudio hecho por Cook et al., comparó implantes de titanio poroso frente a otros recubiertos de Hidroxiapatita, y se demostró que en los primeros a pesar de que existía un crecimiento óseo hacia el interior de los poros, se formaba una fina capa fibrosa entre el metal y el hueso mientras que en los recubiertos con Hidroxiapatita existía una capa de hueso en contacto directo con el recubrimiento (Cook S., 1988).

El primer uso ortopédico de una prótesis recubierta fue en el hospital de St. Thomas de Londres en 1981. La prótesis total de cadera Furlong recubierta con Hidroxiapatita (JRI Ltd, Londres, Reino Unido) apareció en el mercado en 1985. Geesink en 1986 implantó la prótesis Omnifit (Stryker Howmedica Osteonics, Allendale, New Jersey), y en ese mismo año el grupo de Artros comenzó el uso del sistema Landos (Landager, Chaumont, France). La prótesis de cadera de ABG (Stryker

Howmedica Osteonics) surgió en 1988. Desde entonces, la mayoría de los fabricantes de implantes ortopédicos han desarrollado diferentes prótesis recubiertas de HA especialmente para la cadera y rodilla.

Los primeros resultados de prótesis fueron muy buenos pero surgieron dudas sobre la posible laminación del recubrimiento que pudiera provocar un aflojamiento aséptico de la prótesis y desgaste por tercer cuerpo de las superficies de carga por partículas de Hidroxiapatita desprendidas del recubrimiento, pero a pesar de eso, estos recubrimientos con Hidroxiapatita siguen siendo utilizados.

Recientemente se han publicado varios estudios de reemplazos de cadera recubiertas con Hidroxiapatita donde se demostró que efectivamente hay éxito al recubrir el vástago porque presentó una buena fijación al hueso. (Vidalain J.P 2004, Robertson A., 2005).

No solo se han hecho recubrimientos de HA en prótesis de cadera, ya que (Cross y Parish, 2005) estudiaron su aplicación en una serie de reemplazos total de rodilla con resultados exitosos a mediano plazo; también (Levy y Copeland, 2006) han divulgado excelentes resultados de los recubrimientos en sustituciones de hombro, donde el recubrimiento de Hidroxiapatita favoreció la fijación externa.

1.6 Biomateriales poliméricos biodegradables

Los *polímeros sintéticos bioabsorbibles* son macromoléculas compuestas por la unión de múltiples unidades repetidas, los monómeros, los que a su vez están formados por átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y, ocasionalmente, sílice y azufre.

Existen dos tipos de polímeros que tienen utilidad en cirugía del aparato locomotor:

Homopolímeros. Constituidos por monómeros idénticos.

Copolímeros. Conformados por la combinación de dos monómeros diferentes.

Se definen como aquellos materiales biocompatibles que se degradan luego de su implantación en productos no tóxicos, los que son eliminados o metabolizados en el organismo. Además, los polímeros biodegradables permiten la transferencia gradual de la carga mecánica desde el implante sintético al tejido natural, con el propósito de optimizar la regeneración y remodelación tisular.

Los biomateriales poliméricos presentan una amplia variedad de aplicaciones, debido a que pueden ser sintetizados con muchas formas diferentes y a que tienen una importante similitud con diversos componentes de los tejidos orgánicos como el colágeno. De hecho, los polímeros ostentan interesantes propiedades entre las que destaca su gran flexibilidad de diseño, que permite adecuar su composición y estructura a necesidades específicas. Además, son biodegradables, es decir, sufren hidrólisis en contacto con los medios fisiológicos.

En las aplicaciones para la sustitución ósea se propone que actúen como un molde tridimensional sobre el cual pueden proliferar los osteoblastos (células productoras de hueso), depositando matriz ósea extracelular mientras el polímero es degradado paulatinamente. Son varios los sistemas poliméricos que se investigan para su posible aplicación en la regeneración ósea, entre los que se pueden citar a los poli--hidroxiésteres, la polidioxanona, el polipropilénfumarato, el polietilenglicol, los poliortoésteres, los poli anhídridos y los poliuretanos.

1.6.1 Clasificación

La figura 7 muestra un tipo de clasificación los polímeros biodegradables, esta se basa en dos grupos y cuatro familias diferentes.

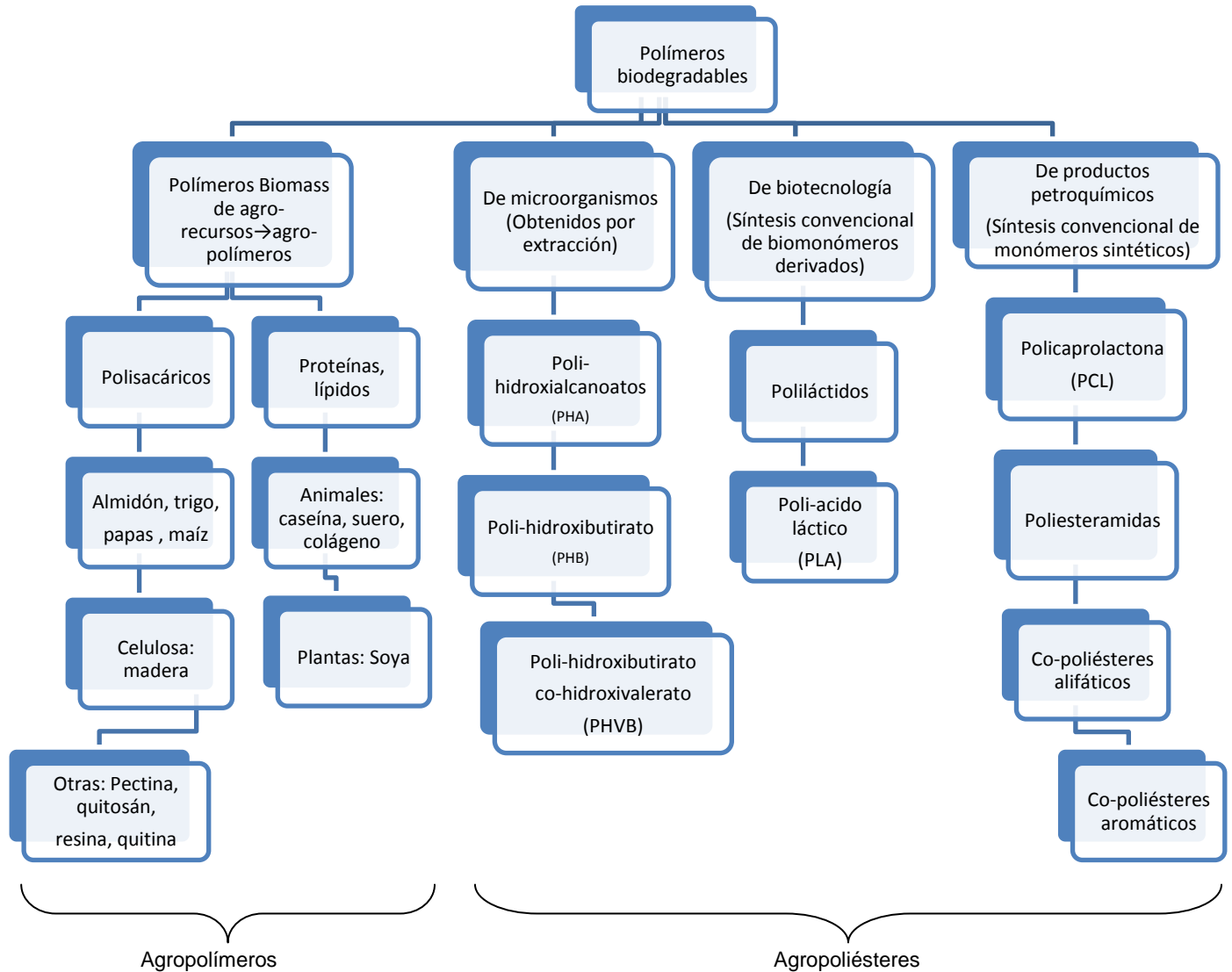


Fig. 7 Clasificación de polímeros biodegradables.

(Avérous L., 2008).

Los principales grupos son: (i) los agro-polímeros (polisacáridos, proteínas, etc.) y (ii) los biopoliésteres (biodegradable poliésteres) como el Ácido Poliláctico (PLA), polihidroxicanoatos (PHA), hidrocarburos aromáticos y alifáticos copoliésteres (Avérous L., 2008).

El PLA (contrario a lo reportado en la literatura) es insoluble en acetilnitrilo.

1.6.2 *Ácido Poliláctico*

En el caso de los polímeros reabsorbibles las investigaciones se centran en los derivados del ácido poliglicólico (PGA) y del Ácido Poliláctico (PLA). El primer uso de los mismos se reportó en 1960 con el desarrollo de las suturas biodegradables.

Los polímeros biodegradables muestran una amplia gama de propiedades y ahora pueden competir con los no biodegradables como termoplásticos. Entre estos biopoliésteres, el Ácido Poliláctico (PLA) es en la actualidad uno de los biopolímeros más prometedores. PLA ha sido objeto de una abundante literatura con varias revisiones y capítulos de libros, sobre todo durante la última década. El PLA puede ser procesado con un gran número de técnicas. Esta comercialmente disponible con una producción a gran escala. Tiene un precio razonable y algunas propiedades notables por ejemplo, la capacidad de producción de PLA de Cargill (EE.UU.) en 2006 fue de 140 kt por año a 2.5 euros por kg (Okumura M., 1991). Otras compañías, como Mitsui Chemical (LACEA-Japón), Treofan (Países Bajos), Galáctica (Bélgica), Shimadzu Corporation (Japón), producen cantidades más pequeñas (Groot K., 1980, Pat C.,1990).

Algunos de ellos sólo se centran en el mercado biomédico como Boeringher Ingelheim (Alemania), Purac (Holanda) o Physis (Francia), debido a que las limitaciones de este mercado son muy específicas. Sin embargo, según diversas fuentes, el consumo de PLA en 2006 fue de sólo alrededor de 60 000 toneladas por año y actualmente, alrededor del 30% de ácido láctico es utilizado para la producción de PLA. Por lo tanto, este biopolímero presenta un alto potencial para el desarrollo (Valencia H. y Morales C).

El PLA pertenece a la familia de los poliésteres alifáticos comúnmente hechos a partir de hidroxiácidos, que también incluyen por ejemplo, ácido poliglicólico (PGA). Es uno de los pocos polímeros en los que la estructura estereoquímica puede modificarse por polimerización de una mezcla controlada de l y d isómeros (figura 8) para obtener alto peso molecular y polímeros amorfos o semicristalinos.

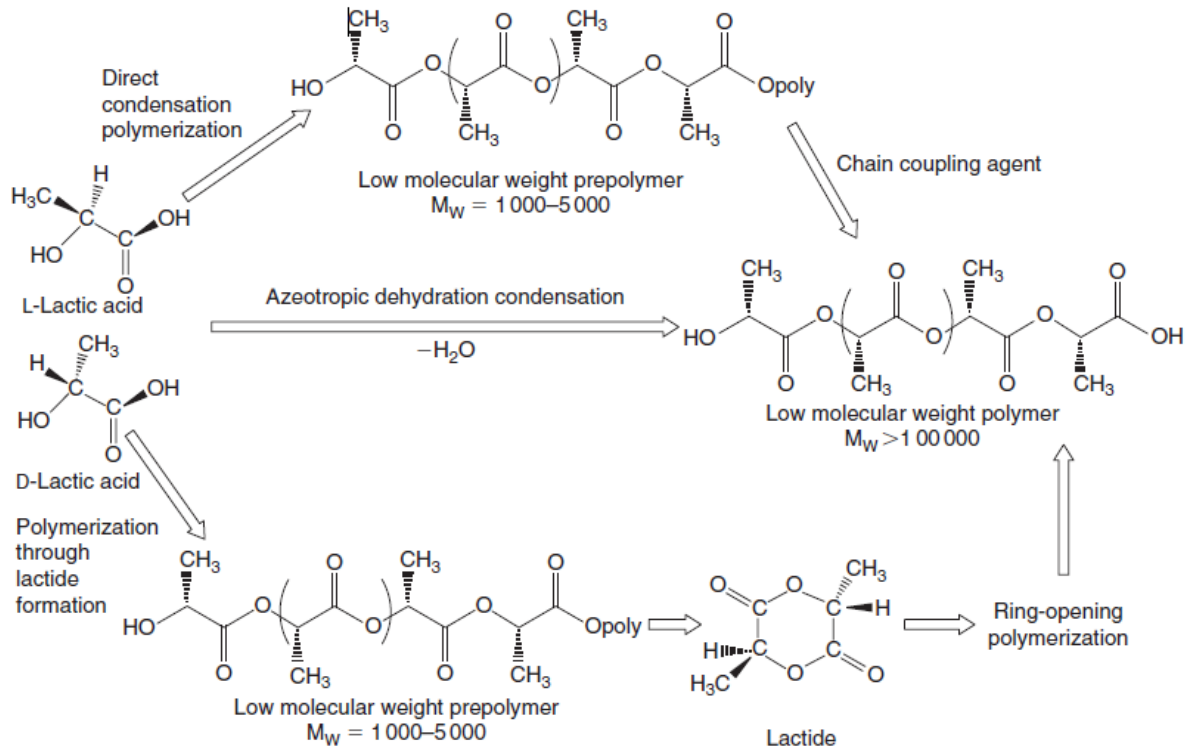


Fig. 8 Métodos de síntesis para la obtención de alto peso molecular.

(Averous L., 2008).

Las propiedades pueden ser modificadas a través de la variación de los isómeros (l/d ratio) y homo y (d, l) copolímeros de contenidos relativos. Además, el PLA puede ser adaptado por la participación de plastificantes o añadiendo otros biopolímeros, cargas, etc.

El PLA es considerado biodegradable y biocompatible ya que no genera reacciones tóxicas en contacto con los tejidos vivos por lo cual se ha utilizado en aplicaciones biomédicas como implantes, suturas, encapsulación de fármacos, etc.).

Este polímero puede ser degradado de forma abiótica (es decir, mediante hidrólisis de enlace simple sin la presencia de enzimas para catalizar). Durante el proceso de biodegradación, y sólo en un segundo paso, las enzimas degradan los oligómeros residuales hasta el final de la mineralización, lo cual se conoce como degradación biótica.

Mientras que los monómeros básicos (ácido láctico) se produce a partir de recursos renovables (carbohidratos) por fermentación, el desarrollo de PLA ha ido en aumento a nivel mundial y se ha clasificado como un material amigable con el medio ambiente.

El PLA de peso molecular elevado es un polímero brillante con propiedades similares a las del poliéster. El PLA amorfo es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, como el tetrahidrofurano (THF), disolventes clorados, benceno y dioxano (Hartmann M., 1998). De hecho estudios de solubilidad hechos por Cargill en el USDA-ARS-NCAUR muestran que el PLA es soluble también en benceno, cloroformo, 1,4-dioxano, y THF. El disolvente más apropiado encontrado hasta el momento es 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP).

1.7 Biomateriales compuestos

Tanto los biomateriales cerámicos como los poliméricos pueden combinarse para constituir materiales compuestos, los que permiten la obtención de implantes que reúnen las mejores características biológicas y mecánicas de los materiales de origen para su empleo como sustitutivos óseos ventajosos.

El factible empleo de reconocidos biomateriales que pueden aportar un andamiaje seguro para diversos factores bioactivos hace posible sumar a las propiedades osteoconductoras de los primeros, la capacidad de osteoinducción de los segundos. A esto se agrega, más recientemente, la posibilidad de asociar biomateriales con células osteoformadoras cultivadas que pueden ser capaces de otorgar un verdadero aporte osteogénico para la reparación de los defectos óseos.

Cuando se piensa en reparar una parte del esqueleto, podrían existir dos posibilidades, reemplazar la parte dañada, o sustituirla regenerando el hueso. Este planteamiento hace pensar en un campo de investigación muy importante, dirigido a conseguir biocompositos basados en fosfatos de calcio, que tengan buena resistencia mecánica y que puedan conducir a la regeneración de hueso. Podría pensarse en reforzar las biocerámicas ya conocidas, por ejemplo, con una matriz polimérica a través de la síntesis de biocompositos que mejoren los pobres aspectos mecánicos de las cerámicas y profundizar en el estudio del mecanismo de formación del hueso natural para buscar las condiciones de síntesis que permitan obtener en el laboratorio biomateriales compuestos orgánico-inorgánico con propiedades mecánicas aceptables.

Existen diversos compositos a partir de mezclas bifásicas de fosfatos de calcio para su aplicación como la parte mineral de sustitutos óseos. Así, se han preparado sustitutos óseos basados en mezclas entre Hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico β -TCP que evolucionan, bajo condiciones fisiológicas, a nano-apatitas carbonatadas. Estas reacciones están basadas en equilibrios entre la fase más estable, Hidroxiapatita, y la más reabsorbible, en este caso β -TCP, que dan lugar a una mezcla que sufre una progresiva disolución en el cuerpo humano, sirviendo como semilla de

formación de nuevo hueso y aportando iones Ca^{2+} y PO_{43-} al medio local. Este material se puede utilizar conformado en piezas, en forma de recubrimientos o inyecciones.

Sin embargo, los mejores resultados que se han observado son para matrices formados a partir de una matriz polimérica que contiene partículas cerámicas. Por un lado, el polímero brindará propiedades de elasticidad y anisotropía, mientras que la parte cerámica aportará la componente de fuerza en carga.

Un área que se encuentra en desarrollo es la *ingeniería de tejidos*. Dicha área de investigación se encarga de tomar células de un paciente y sembrarlas un andamio o matriz (natural o sintético), aplicar los estímulos apropiados (producto químico, biológico, mecánico y eléctrico) en la producción de tejido fino nuevo. Dicha combinación material-células se cultiva en un biorreactor y se implanta para ayudar a restaurar la función en el paciente. El andamio es un substrato tridimensional y sirve como plantilla para la regeneración del tejido fino. Los matrices ideales deben tener una química superficial apropiada y microestructuras para facilitar el la adaptación celular, la proliferación y la diferenciación. La investigación en esta área ha sido intensa en los últimos 10 años, sobre todo en el uso de biocompositos y en la fabricación de estructuras bidimensionales y tridimensionales, generando así ediciones importantes relacionadas con el diseño y el desarrollo de matrices de polímeros biodegradables. Las características mecánicas y la biocompatibilidad de biopolímeros comúnmente usados se analizan para hallar las ventajas que pueden ofrecer, así como la viabilidad de la fabricación. La fabricación del andamio, incluyendo tamaño del poro y distribución, y sus efectos sobre el crecimiento de las células se siguen investigando. El andamio debe ofrecer una estructura jerárquica que varíe escalas excesivas de longitud similar a 400 micras (para hueso trabecular) (Ichikawa F., Kobayashi M., 1995).

En las últimas décadas se han desarrollado y empleado materiales como Hidroxiapatita (HA), compuestos de coral-colágena, coral natural, cerámicos a base de carbonato de calcio y combinaciones de colágena en una amplia variedad de tratamientos terapéuticos. Las funciones de estos materiales dentro del hueso son básicamente dos: 1) servir como estructura o matriz para las células indiferenciadas, y 2) incrementar el potencial osteogénico de diversos factores de crecimiento, los cuales a su vez inducen la proliferación de células indiferenciadas y su diferenciación en células osteoblásticas.

1.8 Biocompositos como matrices tridimensionales en Ingeniería de Tejidos

Son estructuras que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas y las señales biológicas requeridas para la

conservación de la expresión génica específica y, además, definen la arquitectura del tejido (Kim B., Baez C, 2000).

Las células interactúan con estos dispositivos de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento, mientras que sintetizan su propia matriz extracelular (MEC), que proporciona un ambiente y arquitectura específicos del tejido, y sirve como reservorio de agua, nutrientes, citocinas y factores de crecimiento, entre otros (Kuboki Y. 1998, Agrawal C. 2001).

Las matrices tridimensionales deben satisfacer ciertos criterios:

1) Biocompatibilidad. Esto es, que permitan la integración adecuada al tejido que se hospeda sin presentar efectos tóxicos (genotóxicos o citotóxicos) o causar respuesta inmune.

2) Porosidad. Deben tener poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes y gases y para la extracción de desechos metabólicos como resultado de la actividad celular, lo cual es fundamental en el hueso, debido a sus características metabólicas, ya que se esperan altas tasas de transferencia de masa, incluso cuando se realizan procesos in vitro.

3) Tamaño del poro. El tamaño ideal del poro para estas matrices varía entre 200 y 900 μm (Shieh S., 2005).

4) Propiedades de la superficie. Tanto las químicas como topográficas pueden controlar y afectar la adhesión y proliferación celular; las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material. Las propiedades topográficas son fundamentales para la osteoconducción, que es el proceso mediante el cual las células osteogénicas migran a la superficie de la matriz tridimensional a través de un coágulo de fibrina, que se establece después de implantado el material.

5) Osteoinductividad. Es el proceso mediante el cual las células madre y osteoprogenitoras son reclutadas en el sitio de regeneración ósea y estimuladas para diferenciarse hacia la línea osteogénica (Salgado A., 2004).

6) Propiedades mecánicas. Depende del lugar de implantación y de las fuerzas mecánicas a las que se verá expuesto el implante.

7) Biodegradabilidad. Para la fabricación de las matrices se deben utilizar materiales que tengan tasas de absorción que igualen a las de formación ósea, de tal manera que, para cuando la lesión esté totalmente regenerada, la matriz tridimensional se haya degradado totalmente (Almirall A., 2004).

(Hasegawa y Cols., 2006) comprobaron que la velocidad de degradación de los implantes se relaciona con el sitio en donde es implantado, pues las cargas mecánicas que debe soportar el tejido influyen en la cantidad formada de este.

En la última década, se ha reportado la fabricación de matrices porosas mediante diferentes técnicas, que permiten el procesamiento de materiales metálicos, cerámicos (Hidroxiapatita, fosfato tricálcico) y poliméricos, de origen natural (colágeno, ácido hialurónico, fibrinógeno, quitosán) o sintético (policarbonatos, polímeros de Ácido Poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) (Shieh S., 2005).

De acuerdo con lo anterior, el reto de este proyecto es construir tejido óseo in vitro en matrices compuestas de PLA e HA, con la diferencia de que las matrices están cubiertas con un polímero (Polipirrol) que actúa como estimulador celular y contribuye en la adhesión celular debido a que presenta buenas propiedades de conductividad eléctrica.

1.8.1 Antecedentes

A continuación se describen de manera general algunos de los estudios realizados por varios investigadores que tienen que ver con la generación de matrices porosas.

(Adachi y Cols., 2006) en su estudio proponen que para el cumplimiento de los requisitos de diseño, la elección del material de las matrices y su microestructura es muy importante. La resistencia mecánica y la permeabilidad están en función de estas y otras variables. La microestructura también afecta el proceso de regeneración ósea a lo largo del tiempo. Es por esto que analiza la matriz a nivel de microescala (una celda cúbica porosa) para proponer una estructura metodológica para el diseño de matrices con aplicaciones clínicas.

(Sanz-Herrera y Cols., 2009) modelaron in-silico el efecto que el porcentaje de porosidad, tamaño del poro, rigidez inicial del material y cantidad de células cultivadas tienen en el módulo de elasticidad, cinética de remodelado y crecimiento de tejido dentro de una matriz. Mostraron que el porcentaje de porosidad es un factor que afecta de manera importante los procesos de flujo en la matriz así como las propiedades mecánicas del mismo. Porosidades del 75 al 90 % muestran ser las mejores para facilitar la proliferación celular. El tamaño del poro afecta los procesos de velocidad de migración celular. También es importante incitar la difusión de nutrientes y evacuación de desechos del metabolismo celular. Se encuentra que poros de más de 100 μm son recomendables. También se concluye que la rigidez del material afecta los procesos de remodelación ósea pues zonas con poca deformación muestran reabsorción.

(Ruimerman y Cols., 2009) Hacen una revisión de las teorías sobre adaptación ósea. Muestran que en general todas las teorías propuestas mencionan que la densidad ósea varía por la acción de variables de tipo mecánico debido a la aplicación de cargas externas. Afirman que algunos de los mecanismos o factores más relevantes del proceso de remodelación ya fueron identificados

pero aun falta trabajo por realizar pues los modelos existentes dejan de lado aspectos importantes desde el punto de vista biológico.

(Galbusera y Cols., 2009) presenta el modelado numérico del comportamiento de una matriz de Hidroxiapatita portadora de fármacos. El implante fue probado in-silico en diferentes posiciones dentro de un fémur humano. Se comprobó la resistencia mecánica (según el criterio de falla de Tsai-Wu para materiales cerámicos) y la máxima porosidad de la matriz para la cual no ocurre la falla. Se probó el riesgo de desmineralización por blindaje de esfuerzo (en inglés: stress-shielding) y se modeló la cinética de liberación de drogas.

El desarrollo de matrices de Hidroxiapatita para su aplicación en ingeniería de tejido óseo ha dado muy buenos resultados. (Qiu et al., 1999) fabricaron dos matrices de Hidroxiapatita de diferente arquitectura interna y las evaluaron in vivo. Ambas matrices mostraron regeneración ósea en las primeras cinco semanas y se halló que el hueso penetró todos los canales de la matriz.

La Hidroxiapatita también ha sido utilizada en matrices compuestas para mejorar la biocompatibilidad y la osteointegración. (Guobao Wei y Peter X. Ma., 2003) crearon matrices compuestas de HA y obtuvieron buenas propiedades mecánicas; con este proceso se mejoró la distribución celular dentro de la matriz, debido a la introducción de Hidroxiapatita osteoconductiva.

De la misma manera, (H.W. Kim et al., 2005) crearon matrices compuestas de gel e Hidroxiapatita y encontraron mejores respuestas celulares que las halladas con las matrices de gel puro. (Sang-Soo Kim et al., 2006) demostraron que con matrices hechas de Hidroxiapatita y Ácido Poliláctico-Glicólico (PLGA) se incrementa la formación de hueso, debido a la presencia de Hidroxiapatita en la superficie de la matriz, lo cual permitió un contacto directo con las células trasplantadas y estimuló la proliferación celular y la diferenciación osteogénica.

(López et al., 2003) crearon matrices de HA porosa con el agente Zea mays y obtuvieron porosidades grandes (>85%) y densidades altas (3,11 g/cm³), aunque propiedades mecánicas bajas.

(Rincón M. y cols., 2007) diseñaron y construyeron matrices macroporosas de Hidroxiapatita sintética por moldeado manual. Dichas matrices presentaron diámetros de poro entre 300-500 µm, adecuado para el crecimiento celular, y algunos microporos de ~2 µm. La densidad de las muestras porosas estuvo entre 1,48 g/cm³ y 1,77 g/cm³ y la porosidad entre 35,85% y 45,61%. Las propiedades mecánicas de las matrices mostraron resistencias y módulos de elasticidad muy bajos, con respecto al hueso esponjoso.

Estos son algunos de los trabajos que tienen similitud con este proyecto; describen de manera general lo que se ha realizado para formar matrices porosas que contengan Hidroxiapatita, se destaca por ejemplo, que los poros mayores a $100\mu\text{m}$ son los idóneos para proliferación celular, además de que la porosidad se debe presentar en un porcentaje también considerable ($>80\%$). Aunque en este proyecto no se hace énfasis de manera profunda en las propiedades mecánicas del material, es importante considerarlo para aplicarlo en un futuro, de ahí que también se radique el interés en aquellos trabajos que aportan ideas en este sentido.

1.9 Técnica de Electrohilado (Electrospinning)

En este trabajo se usará el proceso de Electrohilado para sintetizar los biocompositos, este proceso fue descubierto por Formhals en 1934 en el cual se utiliza un alto voltaje de 10KV a 30KV para crear un campo eléctrico fuerte capaz de atraer partículas eléctricamente cargadas de una solución o fluido polimérico, de alta densidad molecular que en este caso se compone de PLA, HA y un buen solvente del polímero, desde una aguja inyectora hacia una superficie metálica colectora en donde se solidifica formando micro y nanofibras de polímeros o de algún otro material con diámetros alrededor de 50 nanómetros y hasta algunas micras, y de longitudes variables. Los materiales que se utilizan en esta técnica son principalmente polímeros porque estos tienen las propiedades físicas y químicas para formar fibras que sean resistentes, elásticas y duraderas. Los polímeros son dieléctricos, que en presencia de un campo eléctrico pueden considerarse como un arreglo de dipolos eléctricos microscópicos compuestos por cargas positivas y negativas cuyos centros no coinciden perfectamente. Se mantienen en su lugar por acción de fuerzas atómicas y moleculares, y solo pueden cambiar su posición ligeramente en respuesta a fuertes campos eléctricos externos. Son llamadas cargas ligadas, las cuales pueden ser tratadas como cualquier otra fuente de campo electrostático, en contraposición a cargas libres que determinan la conductividad en otro material "conductor". En particular en este trabajo se le denomina Co-electrohilado dado que la solución precursora está formada por un polímero con partículas inmersas en él. La Figura 9 muestra el sistema de Electrohilado que se empleará en este proyecto.

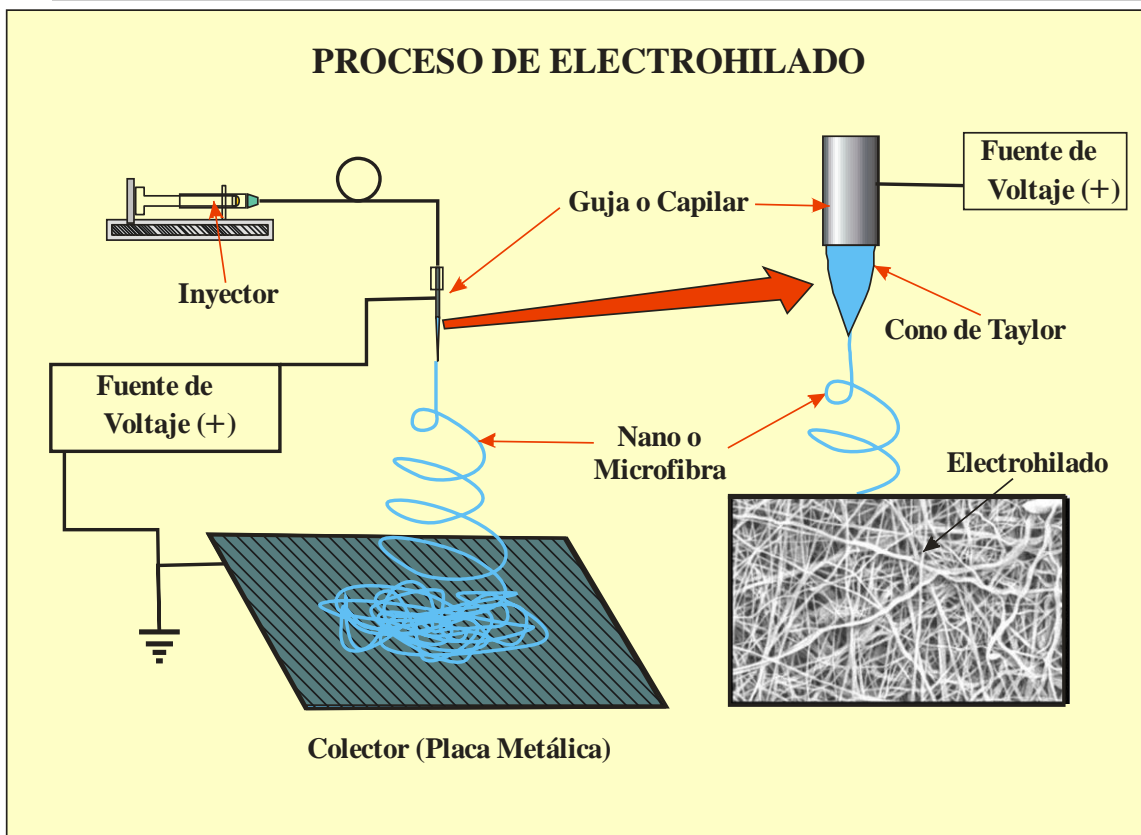


Fig. 9 Proceso de electrohilado (Electrospinning).

Los factores que afectan la morfología de las fibras en este método son:

- Viscosidad de la solución
- Conductividad del polímero
- Solvente
- Temperatura de la solución
- Presencia de sales en la solución
- Presión de vapor de la solución
- Forma del colector
- Distancia inyector-colector
- El voltaje aplicado
- Diámetro del inyector
- Temperatura ambiente
- Humedad

(Fong y cols., 2001) explican que el proceso de Electrohilado se produce conectando un alto voltaje entre el extremo una aguja (+) y un colector (-) que generalmente es una placa metálica, el campo eléctrico induce una carga positiva a la solución que vence a la tensión superficial y forma un chorro o "jet" que se proyecta hacia el colector, por efecto de la atracción del campo eléctrico creado entre la aguja y el colector. La distancia entre la aguja y el colector es del orden de 15 a 30 cm, dependiendo del alto voltaje aplicado (20 a 50 KV). En el trayecto de la aguja al colector la solución pierde el solvente secándose y formando una fibra que se deposita al azar, en el colector. Dependiendo de las condiciones y parámetros del proceso, las dimensiones de los diámetros de las fibras se encuentran en la escala de las micro o nano-fibras. Estos colectores pueden ser de diferente forma, estáticos placas, discos, o móviles como cilindros, discos, y barras metálicas giratorias.)

Recientes investigaciones reportan la posibilidad de obtener nanofibras por electrohilado a partir de mezclas poliméricas con nanopartículas incorporadas, mencionan además que dichas mezclas tienen potencial como refuerzo en materiales compuestos (Jia et al, 2006, Wang et al 2006).

Según Ramakrishna, la aplicación del proceso de electrohilado es ventajosa, comparada con otros porque se puede desarrollar a escala de laboratorio, con potencial proyección a nivel industrial, posee repetibilidad y control de la dimensión de las fibras, aunque indica que una desventaja del proceso es la inestabilidad del haz proyectado y la ineficiencia del mismo. El control del haz y la eficiencia del proceso son factores importantes cuando se pretende implementar un proceso continuo (Ramakrishna et al., 2005).

Los polímeros más utilizados en la técnica de Electrohilado son el acetato de celulosa, nylon 6.6, poliuretano, poliacrilonitrilo, polivinil-alcohol, y Ácido Poliláctico, todos ellos en solución; mientras que el polietileno, polipropileno y nylon 12 han sido utilizados como fundidos.

1.9.1 Aplicaciones del proceso de Electrohilado

Este método es utilizado en la industria automotriz, en la industria textil, en la agricultura, en métodos de filtrado, en materiales de protección, etc. En este trabajo el interés particularmente se enfoca a las aplicaciones médicas en las cuales las fibras que se diseñan tienen una importante participación en ingeniería de tejidos, materiales para implante, liberación de drogas, vendaje para heridas además de que se utilizan como componentes artificiales de órganos y materiales de sutura.

Otras de las ventajas de la Técnica de Electrohilado es que tiene un costo de operación relativamente bajo, utiliza poca energía y las fibras pueden ser orientadas según se requiera.

Las características prometedoras del proceso de Electrohilado, fue una de las razones por las que se utilizó dicho proceso, para producir nano o microfibras, además de que para este estudio,

permite la dispersión de partículas de Hidroxiapatita, lo cual enriquece la morfología de las fibras y las características químicas de las matrices obtenidas para poder utilizarlas como andamios en el cultivo de células óseas.

1.10 Polímeros Conductores

En los últimos diez años, el desarrollo de polímeros orgánicos con la capacidad de conducir corriente eléctrica presenta un alto potencial para sus aplicaciones tanto a nivel científico como tecnológico.

Este concepto nuevo sobre los polímeros, ha concertado a científicos de diferentes áreas a trabajar hacia un objetivo común: controlar las propiedades eléctricas y mecánicas de estos materiales, resultando el campo de los polímeros conductores altamente interdisciplinario.

El premio nobel de Química 2000 fue otorgado a los Dres. H Shirakawa (Instituto de Tecnología de Tokio, Japón), A. Heeger (Universidad de California) y A. MacDiarmid (Universidad de Pensilvania) por el descubrimiento y desarrollo de polímeros sintéticos conductores de la electricidad.

Este importante logro, se inicia como parte de las investigaciones de los conductores eléctricos orgánicos y en 1977, Shirakawa, MacDiarmid y Heeger descubren que la oxidación parcial con yodo u otros reactivos transforman la película de poliacetileno a 109 veces más conductor que el original. Este proceso de transformación se denomina dopaje, por analogía al dopaje en semiconductores. Dicha denominación es correcta en que el aumento en conductividad se observa cuando el material toma muy pequeñas cantidades de ciertas especies químicas, sin embargo, un mejor entendimiento de la naturaleza de los procesos de dopaje en $(CH)_x$ (en los polímeros) ha indicado que este concepto es diferente en relación al dopaje de un semiconductor clásico.

1.10.1 Aspectos Generales

Los polímeros electrónicamente conductores son estructuras conjugadas, en las cuales la cadena carbonada del polímero consiste de enlaces alternados sencillos y dobles o triples. En estos polímeros la distancia entre los átomos de carbono no son iguales, lo cual conduce a disminuir la energía de los electrones p, comparado a sus niveles en otros compuestos con estas distancias iguales.

Los polímeros que no presentan una cadena extensamente conjugada pero mantienen propiedades de transferencia electrónica activa electroquímicamente son a menudo denominados polímeros redox (Roth S., 1989). Estos polímeros muestran una conducción electrónica inducida por dopaje reversible en intervalos angostos de potencial; la diferencia esencial entre estos dos tipos de materiales se basa en el proceso que controla la transferencia de carga. En los sistemas electrónicamente conductores la transferencia electrónica depende en mayor grado del campo eléctrico y la relación potencial vs corriente comprende amplias regiones de potencial. En el caso de polímeros redox, la transferencia electrónica se refiere a conducción redox, que depende del proceso difusional (Krause L., 1989).

A continuación se presentan los métodos de síntesis de polímeros: (Fernández, 2003).

1. Por síntesis directa (el método fue desarrollado por Sirakawa en 1971). La pared interna de un recipiente de vidrio se recubre con un catalizador Ziegler-Natta. El paso de una corriente de acetileno da lugar a una película brillante de poliacetileno.
2. Por oxidación química del monómero. En una disolución monomérica se añade un oxidante cuyo potencial corresponda al potencial de oxidación del monómero: sales de Fe^{3+} en disoluciones de pirrol. Se forma un precipitado negro de Polipirrol. La presencia de otras sales mejora las propiedades del polímero al favorecer su oxidación reversible.
3. Por oxidación electroquímica. Análoga a la oxidación química. Ahora el proceso es heterogéneo y se produce sobre el ánodo de una célula electroquímica que contiene un disolvente y una sal. Esta permite el paso de corriente y favorece la oxidación del polímero.
4. Por oxidación en plasma. La generación de un plasma inicia la polimerización en la superficie sobre la que se proyecta.
5. A partir de precursores: Un polímero precursor, generalmente soluble, es aplicado en la superficie deseada. Por calentamiento se descompone dando una molécula gaseosa y un polímero conductor insoluble.
6. Otros métodos: Pirólisis parcial de polímeros no conductores, polimerizaciones fotoiniciadas, polimerizaciones por condensación, etc.

1.10.2 Polipirrol

Entre los polímeros más investigados desde 1980, se presentan el Polipirrol, politiofeno y polianilina.

El presente trabajo pone énfasis en el Polipirrol (PPy) ya se considera un polímero semiconductor con capacidad para aplicaciones tecnológicas por su buena conductividad eléctrica y estabilidad térmica (Cowie, 1991). Una de las características más importantes de éste, es que su conductividad puede ser modificada en presencia de otros elementos o compuestos en su estructura, como dopantes químicos, implantes iónicos, otros polímeros, etc. Las propiedades eléctricas del PPy se han estudiado en función de la temperatura, dopantes, o humedad relativa.

El Polipirrol posee una distribución de dobles enlaces C = C alternándose con enlaces carbono-carbono sencillos a lo largo de la cadena (Figura 10).

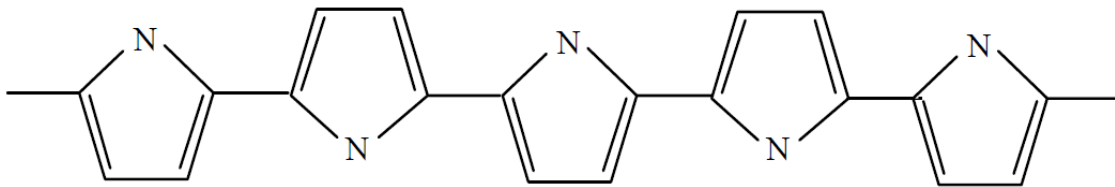


Fig. 10 Estructura del Polipirrol.

(Férrandez O., 2003).

1.11 Técnica de Polimerización por Plasma

La técnica de polimerización por plasma ha demostrado ser un método muy eficaz para sintetizar películas delgadas de polímeros con interesantes propiedades químicas, físicas, eléctricas y mecánicas (Beck F. y Oberst M., 1990).

Entre los objetivos de la polimerización por plasma está el hecho de producir películas muy delgadas, de 500 Å a 1µm, altamente homogéneas y adherentes a sustratos como vidrio, superficies metálicas, polímeros convencionales y membranas de muchos tipos. Estas estructuras tienen propiedades específicas en comparación con los polímeros clásicos y por lo tanto, durable y resistentes al envejecimiento, oxidación, reducción, etc., además, pueden ser modificadas mediante la adición de grupos funcionales.

El proceso de Polimerización por Plasma se debe a la existencia de reacciones moleculares donde se generan radicales libres, iones y moléculas más pequeñas por el rompimiento de enlaces, a este proceso sigue la formación de nuevos enlaces y la producción de moléculas de mayor tamaño, que junto con las condiciones eléctricas y termodinámicas dan lugar a lo que se conoce como Polimerización por Plasma.

El tipo de elementos químicos participantes en dicha reacción y la energía transferida, son los que condicionan las características que tienen estas reacciones y a su vez los compuestos químicos resultantes; cabe mencionar que la temperatura que se maneja en reacciones moleculares es relativamente baja $T < 105$ K, lo cual representa una gran ventaja porque los materiales a

polimerizar no sufren degradación. En esta técnica, es de gran importancia la elección del monómero con el cual se realizará el recubrimiento, para este caso se usó el Polipirrol junto con Yodo ya que éste último funciona como un dopante y se enlaza con las unidades que están repetidas dentro de la cadena del polímero (PPy).

Generalmente se utiliza un campo eléctrico para producir y acelerar mayor cantidad iones y electrones, los cuales a su vez son acelerados hasta generar descargas de resplandor y por consiguiente lo que se conoce como plasma.

La transferencia de energía eléctrica producida por el campo eléctrico hacia el plasma es en forma resistiva, esto quiere decir que se introducen dos electrodos en el reactor, de manera que estén en contacto con el gas ionizado, el cual actúa como resistencia para que pase la corriente eléctrica de un electrodo a otro debido a la acumulación de cargas en éstos últimos.

Casi todos los compuestos orgánicos pueden polimerizarse bajo condiciones adecuadas de descargas de resplandor o plasma, de las cuales dependerá si los polímeros resultantes son una película o polvo. Dicha polimerización puede dar inicio en la fase gaseosa y extenderse en las superficies cercanas.

La ventaja que tiene la polimerización por plasma es que cuando se producen recubrimientos en forma de película, ésta puede ser tan delgada como se necesite y modificar solo la superficie sin afectar la estructura del resto del material.

En este trabajo se utiliza la técnica de polimerización por plasma para sintetizar películas de Polipirrol, (polímero que ha sido muy utilizado por sus propiedades como semiconductor) y así modificar la superficie de las matrices hechas a base de PLA e HA. Se ha probado que controlando el tiempo de reacción y la presión, se obtienen polímeros más lineales, lo que se vería reflejado como una ventaja en la proliferación de las células generadoras de tejido óseo (osteoblastos) considerando además que el Polipirrol es un estimulador de crecimiento celular.

1.12 Técnicas de Caracterización

Existen diversas técnicas empleadas en general para la caracterización de materiales y biomateriales. La selección de dichas técnicas depende de la información que se desee obtener. En el presente trabajo se emplea Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), las cuales proporcionan la morfología de la superficie de las matrices, observándose la distribución y orientación de las fibrillas y al mismo tiempo la integración de las partículas de HA a la matriz. A continuación se describen los conceptos básicos de estas técnicas, no obstante, en el Anexo A se presentan las especificaciones del Microscopio Óptico DLMP marca Leica y del Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-7600F de la UAM-I y que fueron utilizados en este trabajo.

1.12.1 *Microscopía Óptica*

Es bien conocido el uso de la Microscopía Óptica en una gran cantidad de aplicaciones, en este trabajo se pone énfasis en la observación de la morfología de las matrices construidas y por supuesto en el cultivo celular. (Como primera aproximación, la observación a simple vista da una idea de si se están obteniendo los resultados esperados.

Desde el punto de vista de los detalles de construcción, existen diferentes tipos de microscopios; sin embargo su funcionamiento radica en los mismos principios fundamentales.

El microscopio óptico está constituido por dos sistemas básicos:

- I. El sistema óptico para la ampliación de la imagen.
- II. El sistema de iluminación para facilitar la visibilidad del objeto a observar.

Sistema Óptico

La amplificación en un microscopio óptico se obtiene con un sistema de lentes. El lente más cercano al objeto a observar se llama “objetivo” y el más cercano al ojo, ocular. La ampliación total es el producto de los aumentos del “ocular”, multiplicados por los del objetivo.

El lente objetivo está hecho a base de una combinación de lentes cóncavos y convexos. Las lentes son fabricadas con diferentes tipos de cristal, para corregir las diversas aberraciones cromáticas y esféricas.

Hay microscopios simples y microscopios compuestos. El simple se compone tan solo por un ocular y un objetivo mientras que el compuesto está normalmente equipado con tres lentes objetivo, para ir progresivamente incrementando el aumento; estos lentes son llamados “objetivo de bajo poder” (10x), “objetivo de alto poder en seco” (40x) y “objetivo de inmersión en aceite” (95-100x). Cuando se incrementa el aumento, la distancia focal varía; entre más pequeña sea dicha distancia, más cerca está la lente del objetivo que se está observando. Estas lentes objetivo se encuentran fijadas a una pieza rotatoria llamada “revólver”, que permite rotarlas sobre un mismo eje (Herman B., 1993).

Para poner en foco al objetivo sobre el objeto a observar, el microscopio cuenta con dos tornillos, uno macrométrico que mueve el tubo del microscopio hasta una distancia vertical que acerca el objeto a un enfoque aproximado, este es el que se encarga de un ajuste grueso. El ajuste fino se hace con el tornillo micrométrico que mueve lentamente el tubo hasta lograr el enfoque preciso.

Existen microscopios compuestos con condensador, que es un sistema de lentes que une los haces de luz y los concentra sobre el objeto. Este diafragma comúnmente tiene un diafragma iris que regula la cantidad de luz que pasa hacia el objeto que se está observando.

El microscopio óptico tiene un límite resolución de cerca de 200 nm ($0.2 \mu\text{m}$). Este límite se debe a la longitud de onda de la luz ($0.4\text{-}0.7 \mu\text{m}$). De ser el caso, las células observadas bajo el microscopio óptico pueden estar vivas o fijadas y teñidas.

El microscopio óptico es un instrumento cuyos sistemas funcionan con mecanismos de precisión delicados, que requieren de cuidados y mantenimiento permanentes, por ello es necesario tener el instrumento en un lugar donde no existen temperatura y humedad alta.

Sistema de iluminación

Este sistema se compone de un espejo simple o de una fuente de luz incorporada. Si el microscopio tiene únicamente un espejo, éste debe acomodarse de tal manera que refleje la luz de una fuente externa y la proyecte hacia el sistema óptico, lo que permitirá iluminar el objeto que se está observando. Esto se debe a que el espejo está montado en una pieza que permite girarlo en todos los sentidos.

Es de gran importancia rectificar el sistema de iluminación, Köhler menciona algunas.

- Campo visual uniformemente iluminado.
- Observación de una imagen brillante, pero sin reflejos que causen deslumbramiento.

Protección del material que se está observando

1.12.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (Figura 11), SEM (Scanning Electron Microscopy), es un instrumento diseñado para estudiar, en alta resolución, la morfología de los sólidos. Presenta mayores ventajas que el microscopio óptico, debido a la utilización de un mayor número de señales que provienen de la interacción de los electrones con los sólidos y que nos permiten obtener mayor información sobre, por ejemplo, la orientación cristalina, la estructura magnética o el potencial eléctrico del material en observación.

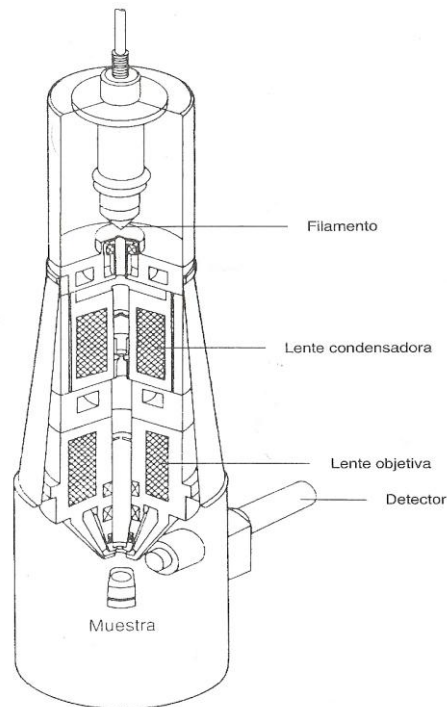


Fig. 11 Representación esquemática de la columna de un microscopio electrónico de barrido.

En un microscopio electrónico de barrido se distinguen principalmente un cañón de electrones con un filamento emisor, un sistema de lentes electromagnéticas que focaliza y reduce el haz de electrones proveniente del filamento. Un sistema de barrido que hace recorrer sobre la superficie de la muestra al haz de electrones una vez que está focalizado. Un método para colectar y amplificar los electrones emitidos y transformarlo en una señal eléctrica y un sistema de vacío que mantenga una presión menor a 10^{-5} torr. Las diversas señales eléctricas provenientes de los detectores se descargan para obtener imágenes, fotografías, composición química de elementos, etc.

La Microscopía Electrónica de Barrido, se fundamenta en que un haz de electrones adecuadamente acelerados interactúan con la muestra en un entorno de vacío extremo (superior a 10^{-5} Torrs). En este caso, el haz no atraviesa la muestra, por lo que pueden observarse las superficies de los fragmentos enteros y no es necesario hacer secciones ultrafinas.

Dentro del cañón de electrones, un “pincel” electrónico hace un rastreo por la superficie de la muestra, chocando el haz con cada parte de la misma y obteniéndose una serie de diferentes señales. Éstas con captadas por detectores, amplificadas y transmitidas a una pantalla de televisión, donde se expresan en términos de variación luminosa (esto después de haber pasado por un escintilador y un tubo de Braun). Entonces, la imagen resultante, en blanco y negro, se

registra fotográficamente o se digitaliza en una computadora. Las señales que se generan y que tienen mayor interés son:

Electrones secundarios (arrancados de la muestra por el haz primario): los cuales dan información sobre las capas más superficiales de la muestra, originando la imagen propia y característica del SEM, con mucha profundidad de foco y un aspecto completamente tridimensional.

Electrones retrodispersados (electrones del haz primario que rebotan en la muestra): su cantidad depende del número atómico de los componentes de la muestra y proporcionan una imagen con expresión química o de composición que puede plasmarse en una gráfica.

Las interacciones entre el haz y la muestra también producen rayos X característicos para cada uno de los elementos presentes en la muestra, lo que proporciona al SEM una capacidad analítica muy importante. La magnificación de este tipo de aparatos está entre 10-300 000 x, y los niveles de resolución que pueden obtenerse de la superficie del objeto oscilan entre 0.6 y 6nm.

Las muestras pueden ser preparadas fácilmente, especialmente las muestras eléctricamente conductoras. Las muestras conductoras son limpiadas y pegadas a un pequeño porta muestras de aluminio, usando para ello un pegamento conductor. Para materiales no conductores las muestras pueden ser observadas a muy bajo voltaje de aceleración, de manera que la emisión de electrones pueda ser balanceada por el número de electrones del haz electrónico. Es más recomendable cubrir la muestra con alguna película delgada de un elemento conductor, como oro o carbono.

Algunas ventajas del SEM son:

- La brillantez de la imagen no disminuye con la amplificación.
- No hay rotación de la imagen al incrementar la amplificación.
- Las fotografías se toman en forma externa al sistema de vacío del microscopio, lo cual elimina las posibles contaminaciones producidas por la desgasificación de la película fotográfica.

Se le pueden conectar varios sistemas de análisis fácilmente, sin la necesidad de modificar el diseño del equipo.

1.13 Caracterización Biológica del material (Cultivo Celular)

Generalmente, la caracterización biológica de algún material se realiza mediante cultivo celular y se analiza por Microscopía Electrónica de Barrido.

El cultivo celular es un proceso en el cual las células son capaces de continuar desarrollándose cuando han sido extraídas del tejido original al cual pertenecían, eso siempre y cuando se tengan las condiciones apropiadas, nutrientes y factores de crecimiento necesarios.

Existen dos tipos de cultivo, uno es el llamado *cultivo in vitro* el cual se lleva a cabo en un recipiente externo al animal y el *cultivo in vivo* que da lugar dentro de algún ser vivo; en ambos casos, las células que intervienen son consideradas como unidades independientes, éstas pueden ser genéticamente idénticas, es decir que forman una población homogénea, o pueden ser genéticamente distintas formando una población heterogénea (Butler M., 2004).

Los cultivos celulares presentan ciertas ventajas, por ejemplo, se obtiene una buena reproducibilidad de los resultados primordialmente en aquellos que tienen poblaciones homogéneas, además, debido a las diversas investigaciones que se realizan con los cultivos celulares, los laboratorios en donde practican con animales han establecido varios procedimientos toxicológicos que son más baratos en cultivos celulares que en ensayos con animales. Además, existen protocolos bien establecidos en los cuales se extraen únicamente las células de interés, lo cual garantiza la inexistencia de contaminantes como virus o bacterias.

No obstante, también hay desaciertos ya que si un cultivo celular se mantiene por un periodo largo de tiempo, las células pueden cambiar sus características originales debido a que van adaptándose a distintos nutrientes y condiciones.

1.13.1 Crecimiento celular en cultivo

Algunas células son obtenidas de una colección de cultivos o mediante su aislamiento del tejido al cual pertenecen. Para que la célula se pueda reproducir es necesario que quede anclada a un sustrato (caja petri en este caso). La interacción entre la membrana celular y la superficie de crecimiento envuelve interacciones tipo Van der Waals o electrostáticas donde la adhesión celular tiene lugar mediante cationes divalentes (Ca^{2+}) y diversas proteínas básicas formando una capa entre la célula y el sustrato.

Las células tienen un límite de crecimiento en el que pasado un cierto tiempo, entran en una fase de envejecimiento y no crecen más. Este límite depende de los nutrientes que hay en el medio, la presencia de sustancias tóxicas provenientes del metabolismo de las células y para ello es

recomendable cambiar el medio de cultivo cada dos días aunque se tenga una mayor densidad celular.

1.13.2 Pases de un cultivo celular

Los pasos que se realizan en un cultivo celular deben tener una nomenclatura para poder distinguir los procesos que han tenido lugar sobre ellos.

Cultivo primario. Es aquel cuyas células proceden directamente del tejido animal y son añadidos al medio de cultivo. Cuando las células de este tipo de cultivo ya no son capaces de crecer más, debe realizarse un nuevo cultivo celular y para ello se traspasan algunas células al nuevo medio, esta acción es conocida como pase y el nuevo cultivo se llama **cultivo secundario**. A cada pase que se realiza se le asigna un número de pase.

Es importante realizar el primer pase al día siguiente e inocular las células cuando la densidad es tan alta que impide su crecimiento, además la temperatura debe ser 310°K y el pH de 7,4.

Debido a que las células están ancladas a la base del recipiente en el que se encuentran, es necesario despegarlas mediante tripsinización. La tripsina es una enzima proteolítica que descompone las cadenas que funcionan como enlace entre el sustrato y la célula, esta enzima se añade por un tiempo no muy corto para limpiar las células en el recipiente de cultivo pero el tiempo tampoco debe ser muy largo porque la tripsina puede dañar a las células. La tripsina tiene un mayor efecto cuando no existe Calcio o Magnesio en el medio celular (Butler M., 2004).

1.13.3 Fases de un cultivo celular

Fase inicial. En esta fase no existe un crecimiento de células aparente debido a que apenas se da la formación de los factores de crecimiento, los cuales son necesarios para poder alcanzar la concentración celular, de lo contrario, el crecimiento celular no se lleva a cabo. El tiempo que dura esta fase depende del medio de cultivo, de la concentración inicial celular y del estado de las células; si la densidad de células inicial es menor, el tiempo de formación de los factores de crecimiento es mayor

Fase de crecimiento. Durante este período las células aumentan de manera exponencial, como lo expresa la siguiente ecuación:

$$N = N_0 \times 2^X$$

Donde N es la concentración final de células, N_0 es la concentración inicial celular y X es el número de generaciones de crecimiento celular.

Fase estacionaria. Esta fase se da cuando no hay un crecimiento celular mayor por lo cual la velocidad de muerte celular es igual a la velocidad de crecimiento celular. Aunque no crecen, las células continúan siendo activas metabólicamente

El crecimiento celular se puede ver limitado por diversos factores:

- a) Los nutrientes han sido reducidos a un nivel tal que actúan como inhibidores de crecimiento celular.
- b) Existencia de acumulación de productos procedentes del metabolismo que actúan como inhibidores de crecimiento celular.
- c) Las mismas células forman una capa que cubre la superficie de crecimiento.

Fase de deterioro: Esta fase tiene lugar como consecuencia de la muerte celular. Existen dos posibles mecanismos de la muerte celular:

Apoptosis: Es conocida como suicidio celular ya que es una muerte programada donde la célula al morir empaqueta su contenido evitando así que se produzca una respuesta inflamatoria. De esta manera son fácilmente englobadas vía fagocitosis por lo que sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente.

Necrosis: comprende un estado irreversible de la célula la cual no es capaz de mantener la integridad de la membrana plasmática de manera que se hincha y revienta derramando todo su contenido, posiblemente dañino, por todo el espacio intercelular. Como consecuencia se crea la respuesta inflamatoria.

El principal problema que se en cultivos celulares es la contaminación debido a que éstos son susceptibles a la presencia de bacterias.

1.13.4 Condiciones de cultivo

En cuanto a temperatura, las mejores condiciones se establecen cuando ésta es de 310 °K pero si llega a ser menor lo único que ocurre es que la velocidad de crecimiento disminuye sin llegar a dañar a las células. Si la temperatura es mayor a 312 °K las células son destruidas.

En el caso del pH, este debe ser de 7,4 mantenido por el tampón bicarbonato-CO₂ el cual es el principal proceso que opera en la sangre en vivo. Por ello, los protocolos de ensayos de cultivo describen que la atmosfera de la incubadora es rica en CO₂. Así pues, el bicarbonato presente en el medio cuya concentración normalmente es de 24mM se mantiene en equilibrio con el CO₂ presente en la fase gaseosa siendo su porcentaje de un 5%. No obstante para asegurar el buen mantenimiento del pH del cultivo suele ponerse un 10% de CO₂ en la fase gaseosa. Además de esto debe de tenerse en cuenta el medio que se utiliza a la hora de sumergir las células ya que dependiendo del medio dicho porcentaje variará (Butler M., 2004).

1.13.5 Medios de cultivo celular

Las células son cultivadas en un medio líquido de química compleja útil para soportar el crecimiento de diferentes generaciones. Hay algunos medios de formulación estándar que han sido desarrollados para el crecimiento particular de determinados tipos de células (tabla 1).

Tabla 1. Medios de Cultivo Estándar.

| Medio de Cultivo | Descripción |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BME | Originalmente diseñado para células de rata L y Hela. |
| EMEM | Usado por una gran variedad de líneas celulares. |
| DMEM | Modificación de Dulbecco, tiene hasta cuatro veces más la concentración de aminoácidos y vitaminas que presenta el medio de cultivo BME. |
| GMEM | Es una modificación de Glasgow, tiene hasta cuatro veces más la concentración de aminoácidos y vitaminas que presenta el medio de cultivo BME. |
| RPM1 1640 | Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute, usado para cultivo de linfocitos e hibridomas. |
| Leibovitz | Usado para el crecimiento de fibroblastos en ausencia de una atmósfera rica en CO ₂ . |
| Ham's F12 191 | Tiene una composición compleja (61 componentes) y es usado por una gran variedad de líneas celulares. Puede ser utilizado para crecimiento celular sin suero. |

Los componentes de un medio de cultivo típico son: carbohidratos (disminuyen la producción del ácido láctico y estabilizan el pH del cultivo); aminoácidos (fuente precursora para la síntesis de proteínas); sales; suero (promueve el crecimiento celular); antibióticos (reducen el riesgo de contaminación de cultivos de poco tiempo de vida) y bicarbonato (para mantener el pH entre 6,9 y 7,4 mediante el tampón bicarbonato-CO₂), este último tiene la desventaja de que debido a su presencia, el medio se convierte en alcalino muy rápidamente al ser extraído de la incubadora.

Para evitar este efecto o disminuir su acción se añade un tampón orgánico conocido como HEPES ($pK_a=7,3$ a $37\text{ }^\circ\text{C}$) a una concentración de 10-20 mM. Existen otro tipos de tampones orgánicos también útiles como son el MES ($pK_a = 6,5$) y CHES ($pK_a = 9,5$). El HEPES es el mejor de ellos para cultivos celulares ya que las células pueden crecer sin la presencia de una atmosfera enriquecida con CO_2 .

A bajas concentraciones hay vitaminas y hormonas que son utilizadas como co-factores metabólicos. El rojo fenol es añadido normalmente como un indicador de pH ya que es muy sensible a las pequeñas variaciones del medio que tienen lugar alrededor de las condiciones optimas de crecimiento celular. A bajos pH el rojo fenol cambia a naranja (pH 7) o amarillo (pH 6,5). Una contaminación bacteriana es normalmente indicada por una variación de rojo a amarillo (Butler M., 2004).

Capítulo 2

ANTECEDENTES DE APLICACIONES BIOMÉDICAS

El paso inicial del desarrollo de las nuevas disciplinas de la ciencia e ingeniería de materiales sucedió en la década del 50, con el uso de procedimientos empíricos para adaptar materiales convencionales a aplicaciones biomédicas. Sin embargo el uso de materiales no biológicos en medicina es muy anterior a la década del 50. Sus primeros antecedentes documentables se remontan 3000 años a.C., en el antiguo Egipto. También durante las civilizaciones clásicas de Grecia y Roma (siglo VII a.C. a siglo IV d.C.) se usaron materiales no biológicos, en particular, metales y otros materiales naturales para el tratamiento de heridas y de algunas enfermedades.

Durante la Edad Media fueron utilizados biomateriales no metálicos, mientras que su desarrollo se aceleró a principios de este siglo con el descubrimiento de materiales para fabricar hilos de sutura capaces de ser degradados y absorbidos por el organismo. Sin embargo, la investigación sistemática y planificada de los materiales útiles para la fabricación de prótesis e implantes surge después de la segunda Guerra Mundial como consecuencia del avance del conocimiento en ciencia y tecnología de materiales. Un factor que impulsó fuertemente el desarrollo de materiales implantables durante este siglo fue el enorme aumento de su demanda producida por la necesidad de rehabilitar a millones de inválidos de guerra.

Durante la década del 60 se publicaron los primeros estudios sobre las lesiones provocadas por la presencia de un implante, e hizo su aparición el término biocompatibilidad para definir el grado de tolerancia del material por parte de la materia viva. La determinación de la biocompatibilidad para cada aplicación específica y para cada sistema formado por material y el medio biológico con el que estará en contacto, requiere la realización de una serie de ensayos de acuerdo con protocolos preestablecidos y del posterior análisis estadístico de los resultados obtenidos.

A finales de los años 60, los ingenieros ingresaron en los laboratorios de clínica médica, quirúrgica y dental, y sus contribuciones comenzaron a aparecer en la literatura biomédica. El primer simposio de Biomateriales que se celebró en la Universidad de Clemson (del estado de Carolina del Sur en los EE.UU.), en 1969, marca el punto de partida de la necesaria integración de las disciplinas complementarias a la ingeniería y a la medicina para el desarrollo de materiales biomédicos. La influencia del ingreso de la ingeniería al campo de los biomateriales se evidenció en la aplicación de técnicas para caracterizar la estructura y la superficie de los materiales, a los efectos de correlacionarlos con las respuestas biológicas observadas. También, con la

incorporación de los materiales cerámicos para el reemplazo de partes óseas y con el desarrollo de materiales compuestos.

La comunidad científica que desarrollaba tareas en este campo se agrupó en diversas sociedades, tales como la Sociedad de Biomateriales (EE.UU) fundada en 1974 y la Sociedad Europea de Biomateriales.

En 1978 se efectuó el primer Congreso Internacional sobre Biomateriales. Desde entonces se produjo un crecimiento notable en el número de trabajos presentados y en el número y nivel de los recursos humanos formados en el área y por supuesto, en el interés para generar materiales que sustituyan el tejido óseo.

En el siguiente punto se describen las patologías más frecuentes que han dado pauta a que desde hace ya muchos años y hasta la actualidad muchas líneas de investigación, entre ellas la Ingeniería de Tejidos, continúen en la búsqueda de materiales que mejoren la calidad de vida de aquellos pacientes que son afectados por estas enfermedades.

2.1 Patologías del Tejido Óseo

Se estima que el número de pacientes con diversas patologías ortopédicas y traumatológicas aumentará de aproximadamente 1.7 millones, en 1990, a 6.3 millones en el año 2050. La ONU reporta que una de cada dos mujeres y uno de cada cuatro hombres, con más de 50 años, eventualmente sufrirán de algún tipo de enfermedad ósea (osteoporosis, hipofosfatasa, fracturas etc.) (Kim B., 2000). A nivel mundial se estima que se gastan alrededor de 800 millones anuales de dólares en implantes óseos en la realización de unas 42 millones de cirugías óseas alrededor del mundo (Organización Mundial de la Salud OMS).

Sin duda, las cifras que indican los niveles de incidencia de la osteoporosis son fuertes: afecta a un tercio de las mujeres de entre 60 y 70 años mundialmente, y a dos tercios de mujeres mayores de 80 años, lo que suma a alrededor de 200 millones en todo el mundo (OMS). Pero, además de ella, hay otras enfermedades, extendidas y con gravedad variable, que afectan al metabolismo del esqueleto en su totalidad o a parte de sus componentes. Son las que profesionalmente se conocen como osteopatías metabólicas o afecciones de los huesos.

Otras enfermedades que afectan al hueso por algún trastorno de su metabolismo son: enfermedad de Paget, raquitismo y osteomalacia (tiene las mismas causas y características del raquitismo pero se presenta en el adulto) osteogénesis imperfecta, displasia fibrosa, hiperparatiroidismo

primario, osteodistrofia renal. Es por ello que actualmente los investigadores se basan en la Ingeniería de Tejidos para hacer frente a este tipo de problemas que afectan a diario a millones de personas alrededor del mundo (Chungara, 2000).

2.2 Osteosarcoma

Otra de las patologías que se presentan como uno de los problemas a resolver es el osteosarcoma, un tumor óseo maligno que se origina en las células óseas y se asienta principalmente sobre la metáfisis de los huesos largos, en especial el extremo distal del fémur, el extremo proximal de la tibia y el extremo proximal del húmero. Aproximadamente el 50% de los casos se originan en el área alrededor de la rodilla y menos del 10% presenta osteosarcoma en la pelvis (Cara J., 1994).

El osteosarcoma se diagnostica anualmente en aproximadamente 400 sujetos menores de 20 años en Estados Unidos (Cortés R., 2011). En los adolescentes, es el tercer tipo más común de cáncer después de las leucemias y los linfomas. En México (2002) se reporta que de los niños y adolescentes derechohabientes del IMSS el 74% de los casos fueron identificados con un tumor óseo presentando osteosarcoma y que los tumores óseos constituyen la séptima causa de muerte por cáncer (Hoffer F., 2002).

La mayoría de los pacientes con osteosarcoma presentan dolor, aumento de temperatura y de volumen en la región afectada y el rango de movilidad de las articulaciones disminuye. En la década de los 70's surgieron los procedimientos para que las extremidades de los pacientes con osteosarcoma se preservaran, por ejemplo, esquemas quimioterapéuticos más efectivos, nuevas técnicas quirúrgicas y la ingeniería biomédica; por lo que, actualmente en muchas instituciones de Estados Unidos y Europa la conservación de las extremidades es el tratamiento estándar cuando hay tumores óseos (Enneking W., 1993).

La elección del tipo de cirugía (amputación versus reconstrucción) depende de la edad del paciente, la localización del tumor, de la existencia de compromiso de las estructuras neurovasculares y de la presencia o ausencia de fractura patológica antes o durante la inducción de la quimioterapia neoadyuvante. Para lograr la reconstrucción del miembro afectado hay básicamente tres opciones (Marinna N., 2004):

1. Autoinjerto de hueso: Representa el estándar de oro de los injertos óseos. Pueden ser de hueso esponjoso, corticales no vascularizados como el de la pelvis o corticales vascularizados como el de la fíbula. Si la extensión del defecto es pequeña, en la mayoría de los casos estos autoinjertos funcionan bien (Pierz K., 2001). El material óseo para el injerto es obtenido del mismo paciente. El sitio donante se selecciona de acuerdo con el volumen del defecto (Baar A., 2006). Tienen propiedades osteogénicas (células osteoblásticas derivadas de la médula ósea y células preosteoblásticas precursoras), osteoconductoras (proteínas no colágenas de la matriz ósea, incluyendo factores de crecimiento) y osteoconductoras (mineral óseo y colágeno). Hay histocompatibilidad total y ningún riesgo de transmisión de enfermedades.

Ofrecen, además, soporte estructural a implantes colocados y termina convirtiéndose en estructuras mecánicas eficientes capaces de soportar cargas debido a la sustitución progresiva por hueso. Su principal inconveniente es la insuficiente cantidad de injerto, riesgo de morbilidad postquirúrgica significativa en la zona donadora de hasta 30%: infección, dolor, hemorragia, debilidad muscular y lesión neurológica (Gazdag AR., 1995). También implica mayor tiempo quirúrgico, pérdida sanguínea y un costo adicional.

2. Aloinjerto de hueso estructural: El material óseo es tomado de otro individuo de la misma especie pero de diferente genotipo, puede ser intercalar u osteoarticular. Se obtiene de cadáveres, se almacena y procesa en bancos de tejidos. Su ventaja es que se elimina el sitio donante en el paciente, se disminuye el tiempo quirúrgico y de anestesia y se presenta menor pérdida sanguínea durante la cirugía. Existen varios tipos de aloinjertos óseos: congelado-desechado (liofilizado) y hueso desmineralizado-congelado-desechado (Gazdag AR., 1995).

El aloinjerto se comporta como una estructura que permitirá el crecimiento de nuevo hueso a partir del reemplazo gradual que sufre el injerto por el hueso huésped. Este proceso se da por proliferación subperióstica y endocondral. Al no poseer células vivas la formación ósea es lenta y se pierde volumen apreciable si se compara con el injerto autólogo. Se emplean fundamentalmente para soportar cargas mecánicas y resistir fallos en zonas donde hace falta soporte estructural. Tienen propiedades osteoconductoras.

La principal complicación que presentan estos tipos de injerto es la dificultad para incorporarlos al hueso del paciente y la facilidad con la que se puede producir una fractura, además de las infecciones que presentan los pacientes después de la cirugía siendo en 10 a 15% de los casos.

Endoprótesis metálica: Es un reemplazo manufacturado para el hueso afectado, generalmente de acero inoxidable o titanio; esta alternativa confiere estabilidad inmediata al paciente, aunque cabe mencionar que solo pacientes mayores de 8 años pueden hacer uso de ésta prótesis debido a la inmadurez esquelética de personas antes de esta edad. La principal complicación de este procedimiento son las infecciones que suelen presentarse hasta en el 35% de los casos (Mejía A., 2002).

Aunque la colocación de endoprótesis se ha convertido en el tratamiento estándar para los pacientes con osteosarcoma, su uso conlleva ciertas complicaciones como infecciones, fatiga del implante, fallas mecánicas, desgaste de los materiales implicado o pérdida de la prótesis. Debido a ello los injertos autólogos son aún considerados como la alternativa estándar para la reconstrucción de defectos óseos de gran tamaño (Malawer M., 1995).

Actualmente cerca del 60% de los implantes colocados son de tipo autógrafo, el 30% de tipo alógrafo y solo alrededor del 10% de los injertos empleados son substitutos sintéticos.

El desarrollo de nuevos Biomateriales tiene como una de sus tareas principales ofrecer alternativas en la reparación ósea que permitan acelerar la reparación del segmento y por tanto incidan en beneficio del paciente. La búsqueda del substituto óseo perfecto, sea polímero, cerámico o composito no ha terminado dado que son muchas las causas que participan en la restauración de las propiedades físicas, biomecánicas, fisicoquímicas y biológicas de este tejido, sobre todo a largo plazo.

El desarrollo racional de un dispositivo o pieza implantable debe tener en cuenta los requerimientos de la aplicación y adoptar criterios racionales para la selección o diseño y desarrollo de los materiales. Debe considerar tanto las capacidades del material para adquirir de manera reproducible la forma que debe tener la pieza final, así como su biocompatibilidad y bioestabilidad.

2.3 Alternativas en la reparación ósea que han sido utilizadas

Existe una gran cantidad de trabajos que se han enfocado a resolver los problemas que tienen que ver con el daño en el tejido óseo. Con el objeto de mostrar lo que se ha hecho al respecto y los materiales que se han utilizado, se describen de manera breve algunas de estas investigaciones:

Trécant en 1994 diseñó un estudio que mostró como aunque los implantes de fosfato de calcio tienen bajas propiedades mecánicas al momento de colocarse en el organismo, posteriormente mejoran sus propiedades debido al crecimiento de tejido óseo y gracias a la formación de colágeno y apatita biológica (Trécant M., 1994).

Si bien diferentes tipos de fosfatos de calcio o variaciones de la HA pueden tener diferentes grados de biodegradabilidad, Kitsugi y Cols., mostraron que no hay cambios significativos en las propiedades osteoinductivas del material (Kitsugi T., 1995).

En 1996 Zongjian y Cols., realizaron implantes en distintos animales y demostraron que la Hidroxiapatita y fosfato de calcio pueden generar procesos de ontogénesis aun cuando el implante no se coloque en tejido óseo, sino de manera intramuscular o subcutánea. La velocidad y forma de la generación de tejido varía según sea el tipo de animal. En perros se mostró el crecimiento de tejido vascular conectivo a los 15 días, alojamiento de células mesenquimales a los 30, generación de matriz ósea a los 45 días y remodelado del tejido óseo a los 60 días (Zongjian, 1996).

La reactividad en la superficie del implante fue estudiada por Ducheyne y Qiu pues afecta la fijación, proliferación, diferenciación y mineralización de las células del tejido óseo (Qiu Q., 1999).

Cerroni y Cols., llevaron a cabo estudios con Hidroxiapatitas sintéticas y expusieron cómo se generaba el tejido óseo en los poros de la cerámica sintética (Cerroni G., 2002).

En 1999, Shikinami realizó compuestos de HA y Ácido Poliláctico conformados por presión y luego maquinados. Los materiales obtenidos mostraron propiedades mecánicas cercanas a las del hueso cortical además de reabsorbibilidad, bioactividad y osteoconductividad (Shikinami Y., 1999).

En 2004 Ignjatovic y Uskokovic desarrollaron compuestos de HA y Ácido poliláctico que conformaron por presión en caliente. Al variar la presión del proceso se obtuvo diferentes grados de porosidad en los materiales que se implantaron en ratones, con buena biocompatibilidad y adhesión del tejido al implante (Ignjatovic N., 2004).

Los efectos de los procesos de esterilización de Ácido Poliláctico fueron estudiados por Weir y Cols. pues cambios en la cristalinidad y el peso molecular que se generan por los procesos de este tipo alteran de manera importante las propiedades mecánicas del material polimérico (Weir NA., 2004).

Este trabajo se enfoca al desarrollo de Biomateriales compósitos que substituyan tejido óseo de secciones largas de hueso. La Figura 12 muestra la ruta crítica empleada en la fabricación de un biomaterial.

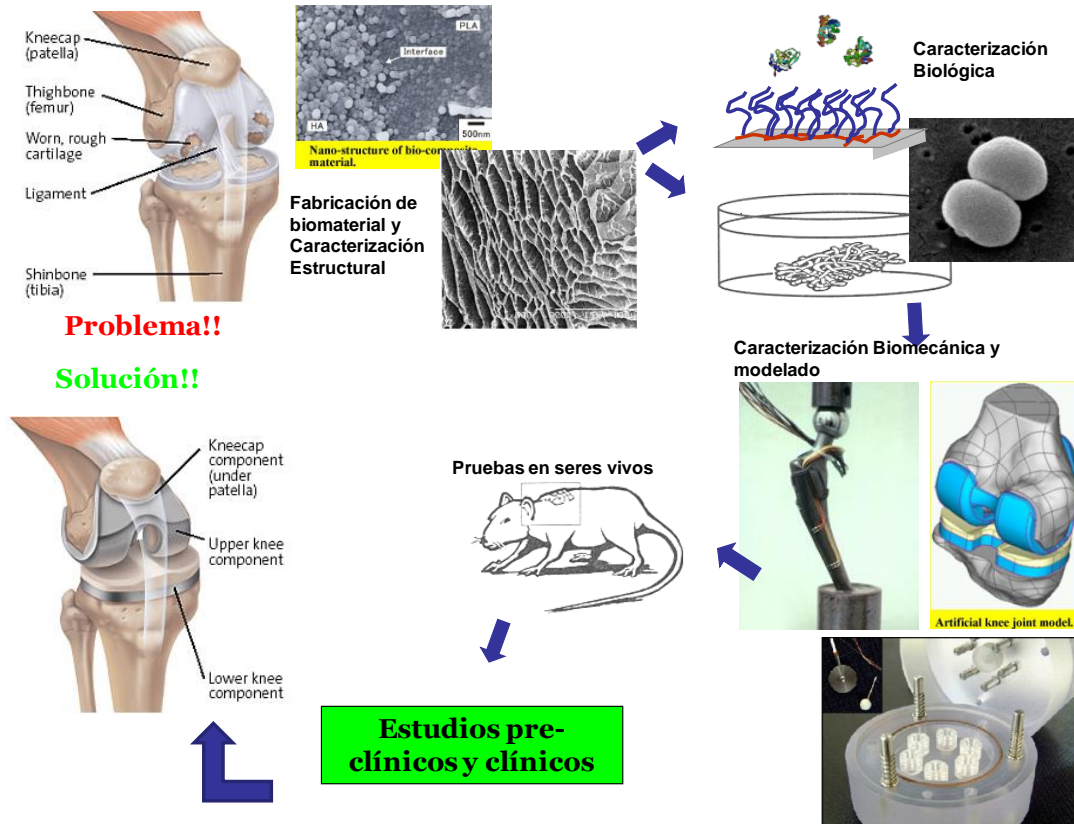


Fig. 12 Ruta crítica para la fabricación de biomateriales para su empleo en implantes.

El presente trabajo se enfoca no solo al procesamiento y caracterización estructural de Biomateriales hechos a base de la técnica Electrohilado y recubiertos por polimerización por plasma, sino además a la caracterización biológica y migración celular sobre los mismos. Para la fabricación de andamios ó estructuras de soportes celulares se propone el empleo de Hidroxiapatita (HA) (como ya se dijo antes), uno de los principales componentes de la parte cerámica del hueso) y de dos polímeros que se ha comprobado que son biocompatibles y biodegradables como el Ácido Poliláctico (PLA).

Una vez obtenidos dichos materiales y a fin de caracterizarlos biológicamente se hará un cultivo in vitro de células generadoras de hueso nuevo (osteoblastos) en las matrices compuestas de PLA e HA.

La implementación del cultivo de osteoblasto *in vitro* se llevará a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con colaboración de la Dra. Atlántida Raya Rivera.

Capítulo 3

JUSTIFICACIÓN

Los materiales que se utilizan en este trabajo son el Ácido Poliláctico, el cual como hemos dicho, es un polímero biodegradable que tiene diversas aplicaciones en el campo de la medicina y la Hidroxiapatita que es un mineral y representa el mayor porcentaje de la parte cerámica del tejido óseo. Ambos materiales se usan en conjunto para generar una matriz polimérica que contenga nano o microfibras poliméricas y partículas cerámicas, con esto se busca que el polímero brinde propiedades de elasticidad y anisotropía, mientras que la cerámica proporcione la componente de fuerza en carga. El uso de estos materiales representa una ventaja ya que por el hecho de ser biocompatibles se pueden utilizar sin ningún problema de generación de reacciones de toxicidad.

Como se mencionó en la Introducción, en este trabajo se empleó el proceso de Electrohilado, usando el Acido Poliláctico para producir las matrices porosas, dado que este polímero en solución se puede hilar con cierta facilidad en fibras de diferentes diámetros, permitiendo formar un mallado con partículas de Hidroxiapatita dispersas en éste.

En la introducción también se mencionó que una vez formado el material compuesto, este se cubre con Polipirrol el cual se sabe que es un polímero capaz de colaborar en la adhesión de las células al material, además de ser un estimulador de crecimiento celular en diferentes sistemas celulares (Jae Y., 2009).

El cubrimiento del material compuesto con Polipirrol se realiza mediante la técnica de Polimerización por Plasma, la cual ha sido muy eficiente para producir y recubrir con películas los substratos, modificando las propiedades superficiales de nuestro material compuesto. La ventaja al utilizar esta técnica es que la generación de las películas se puede realizar en medios alternativos de reacción de monómeros en fase gaseosa lo cual resulta muy sencillo porque no requiere de un sistema complicado con temperaturas y densidades de plasma considerablemente altas (Boonchoat P., 2010).

Capítulo 4

HIPÓTESIS

Se propone un estudio bajo la Hipótesis de que matrices fabricadas con de fibras de Ácido Poliláctico, con partículas de Hidroxiapatita dispersas en éstas y recubiertas por Plasma con películas de Polipirrol; funcionan como soportes para la proliferación celular del periosteo, cultivado *in vitro*, para considerar que la presencia del nuevo tejido regenerado, será similar al tejido natural que potencialmente se pretende regenerar o restaurar.

Capítulo 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Obtener tejido óseo *in vitro* en matrices compuestas de PLA-HA, producidas la técnica de Electrohilado y cubiertas con Polipirrol mediante la técnica de Polimerización por Plasma.

5.2 Objetivos Específicos

Diseño y obtención de matrices celulares de PLA-HA, mediante la técnica de Electrohilado.

- Recubrir con Polipirrol las matrices obtenidas, por medio de la Técnica de polimerización por plasma.
- Caracterización estructural y morfológica de matrices de PLA-HA, mediante Microscopía Electrónica de Barrido.
- Uso de matrices de PLA-HA, para realizar el cultivo de osteocitos *in vitro*.
- Caracterización de la proliferación celular de osteocitos en matrices de PLA-HA, mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Capítulo 6

DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 Preparación de la solución para el electrohilado

Para hacer la solución se utilizaron como solutos Ácido Poliláctico de alto peso molecular e Hidroxiapatita ($\text{Ca}_5\text{OH}_{13}\text{P}_3$) de Sigma-Aldrich y como solvente Cloroformo (CHCl_3) ya que es uno de los mejores para disolver Ácido Poliláctico (Garlotta D., 2002).

La preparación de la solución para el electrohilado no es trivial ya que se tuvieron que realizar varias pruebas antes de establecer las cantidades de solvente y soluto que respondían de mejor manera al momento de aplicar dicha solución en la técnica de Electrohilado, lo que se buscó es obtener una solución conductora y que tuviera una viscosidad tal que el campo eléctrico aplicado pudiera estirarla sin romperla hacia el electrodo negativo manteniendo una continuidad en el hilado; finalmente, se encontró una mezcla en proporción de 10ml de solvente, 90% cloroformo (9ml) y 10% etanol (1ml); una vez hallada la mezcla, se disuelve PLA mediante agitación suave por 5 horas a temperatura ambiente, obteniéndose una solución adecuada para el proceso de electrohilado.

La adición de etanol a la solución ayuda a mejorar la homogenización del hilado haciendo que la morfología de las fibras varíen simultáneamente, es decir, la función del etanol consiste en disminuir la calidad del solvente (en este caso el Cloroformo), lográndose así que el polímero no se enrede, sino que se mantenga parcialmente expandido de tal manera que cuando se aplica la Técnica de Electrohilado, el Ácido Poliláctico con partículas de Hidroxiapatita dispersas en él, experimenta un estiramiento, formando fibras de diámetro muy pequeño, que se proyectan hacia el electrodo negativo; esto se debe además a que el etanol también aumenta la polarización de la solución y permite un secado más rápido. (Zhong-Hua Q., 2011)

Las cantidades de PLA que se utilizaron con buenos resultados fueron de 1.2gr y 1.8gr, éstas fueron establecidas bajo varias pruebas antes realizadas ya que al trabajar con mayor cantidad de HA, fue necesario también incrementar la cantidad de PLA (en intervalos de 0.1gr) hasta lograr una solución que pudiera hilarse con facilidad.

Lo anterior implica que se inició con 1.2gr de PLA, incrementándose la cantidad de HA de 0.0 gr hasta 0.4 gr, electrohilándose cada una de estas proporciones de HA en la solución, con las cuales se obtuvo buenos resultados en la producción de nano y micro-fibras; hasta el momento de agregar 0.5gr de HA, a la solución, ésta no pudo ser hilada con facilidad, por lo que se optó por incrementar también la cantidad de polímero nuevamente en intervalos de 0.1gr. Como se observa en la Tabla 2, la solución no dio buenos resultados desde 1.2gr hasta 1.7gr con 0.5gr de HA; fue hasta que se incrementó a 1.8gr de PLA que otra vez pudo hilarse dicha solución, por lo cual también se incrementó la HA hasta 1gr ya que era importante incrementar la cantidad de cerámica para analizar posteriormente si esto beneficiaba en el cultivo celular.

Tabla 2. Cantidades de PLA-HA utilizadas.

| PLA(g) | HA(g) | Hilado |
|--------|-------|--------|
| 1.2 | 0 | ✓ |
| 1.2 | 0.1 | ✓ |
| 1.2 | 0.2 | ✓ |
| 1.2 | 0.3 | ✓ |
| 1.2 | 0.4 | ✓ |
| 1.2 | 0.5 | x |
| 1.3 | 0.5 | x |
| 1.4 | 0.5 | x |
| 1.5 | 0.5 | x |
| 1.6 | 0.5 | x |
| 1.7 | 0.5 | x |
| 1.8 | 0.5 | ✓ |
| 1.8 | 0.6 | ✓ |
| 1.8 | 0.7 | ✓ |
| 1.8 | 0.8 | ✓ |
| 1.8 | 0.9 | ✓ |
| 1.8 | 1 | ✓ |

La tabla 3 muestra algunas de las soluciones empleadas en la síntesis de las matrices de PLA-HA así como de las condiciones de depósito (electrohilado en el colector); cabe señalar que debido a que no se tuvo problemas al hilar 1.8g de PLA con hasta 1g de HA (M10) , también se preparó una solución con 1.8g de PLA con 0.4g de HA (M9) que fue la cantidad máxima que se pudo agregar a 1.2g de PLA, esto con el propósito de hacer comparaciones entre ambas, tomando en cuenta que solo diferían en cantidad de HA, que finalmente representaba en las muestras obtenidas, un porcentaje de HA del 18.1% (M9) y 35.7% (M10).

Tabla 3. Concentraciones de PLA, HA y condiciones de depósito.

| Muestra | Concentración de Sólidos (CS) | | | Volumen | | Voltaje (KV) |
|------------|-------------------------------|------------|-------------|-------------------|-------------|-----------------|
| | PLA(g) | HA(g) | (g/ml) | Inyectado (ml) | %HA | |
| M1 | 1.2 | 0 | 0.12 | 40 | 0 | 30 |
| M2 | 1.2 | 0.3 | 0.15 | 10 | 20 | 30 |
| M3 | 1.8 | 0.3 | 0.21 | 10 | 14.2 | 30 |
| M4 | 1.2 | 0.3 | 0.15 | 20 | 20 | 30 |
| M5 | 1.2 | 0.1 | 0.13 | 20 | 7.6 | 30 |
| M6 | 1.8 | 0.1 | 0.19 | 30 | 5.2 | 30 |
| M7 | 1.8 | 0.3 | 0.21 | 40 | 14.2 | 30 |
| M8 | 1.8 | 0.2 | 0.2 | 80 | 10 | 30 |
| M9 | 1.8 | 0.4 | 0.22 | 20 | 18.1 | 30 |
| M10 | 1.8 | 1 | 0.28 | 20 | 35.7 | 30 |

La concentración de sólidos se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$CS = \frac{PLA(g) + HA(g)}{10ml}$$

*10ml hace referencia a la cantidad total de solvente que se tiene en la solución.

Cabe señalar que el porcentaje de HA se halló con respecto a la cantidad de polímero en la solución de la siguiente manera:

$$\%HA = \frac{HA(g)}{PLA(g) + HA(g)} \times 100$$

6.2 Aplicación de la Técnica de Electrohilado

La Figura 13 muestra el sistema de electrohilado de la UAM-I que se empleó para la fabricación de matrices porosas.



Fig. 13 Sistema de Electrohilado utilizado para la formación de matrices de PLA e HA.

Este se compone de un sistema de inyección en el cual se aplica la solución polimérica, las velocidades a las que se inyecta dicha solución varían según se requiera; para este caso fue de 22ml/hr; se utilizaron distintos diámetros de agujas según la cantidad de HA inyectada, así, para inyectar cantidades de entre 0.1gr y 0.4gr de HA se utilizó una aguja 21G x 1" (0.8mm diam x 25mm largo), mientras que para cantidades de entre 0.5gr y 1gr se utilizó una aguja 18G x 1/2" (1.2mm diam x 38mm largo). La aguja funciona como electrodo positivo y es conectada a una fuente de alto voltaje que va de 0-30KV y posee una corriente de salida de 330 μ A.

El sistema colector se compone de un cilindro conductor de acero inoxidable de 5cm de diámetro y 10cm de altura, el cual se conecta a tierra y funciona como electrodo negativo; dicho cilindro tiene movimiento de rotación y de traslación de tal manera que las fibras hiladas se coloquen en toda su superficie (Figura 14).

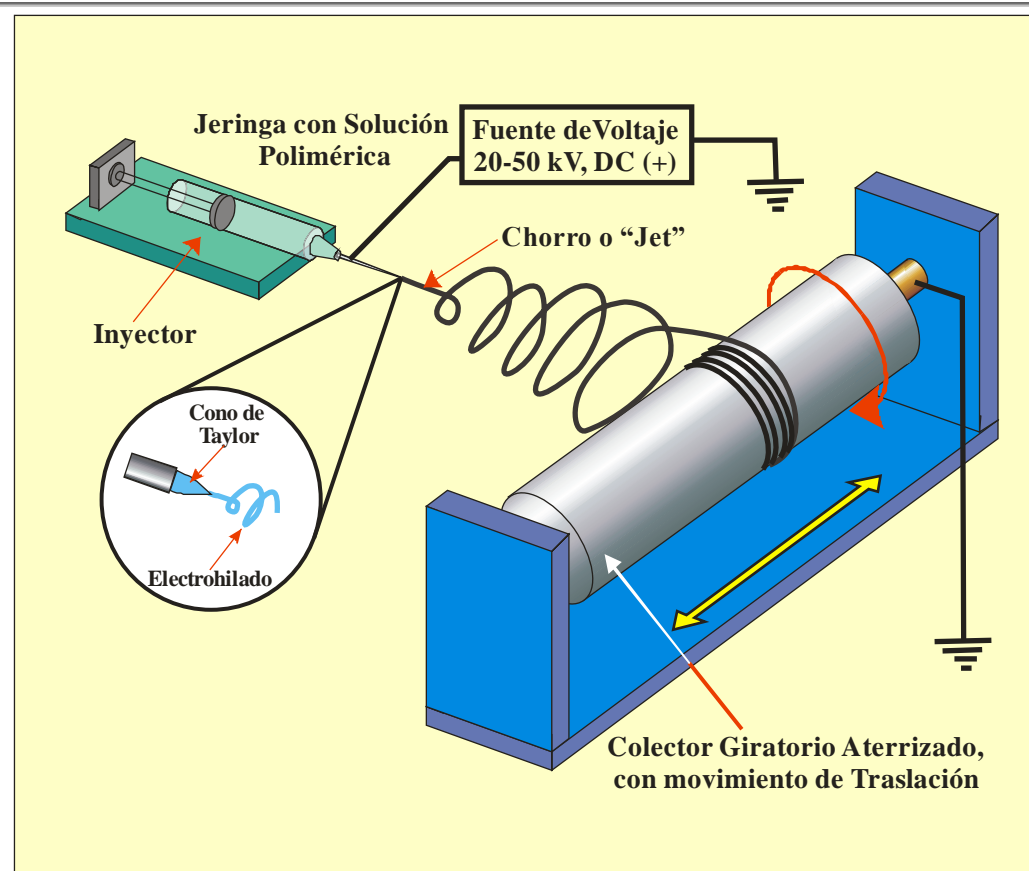


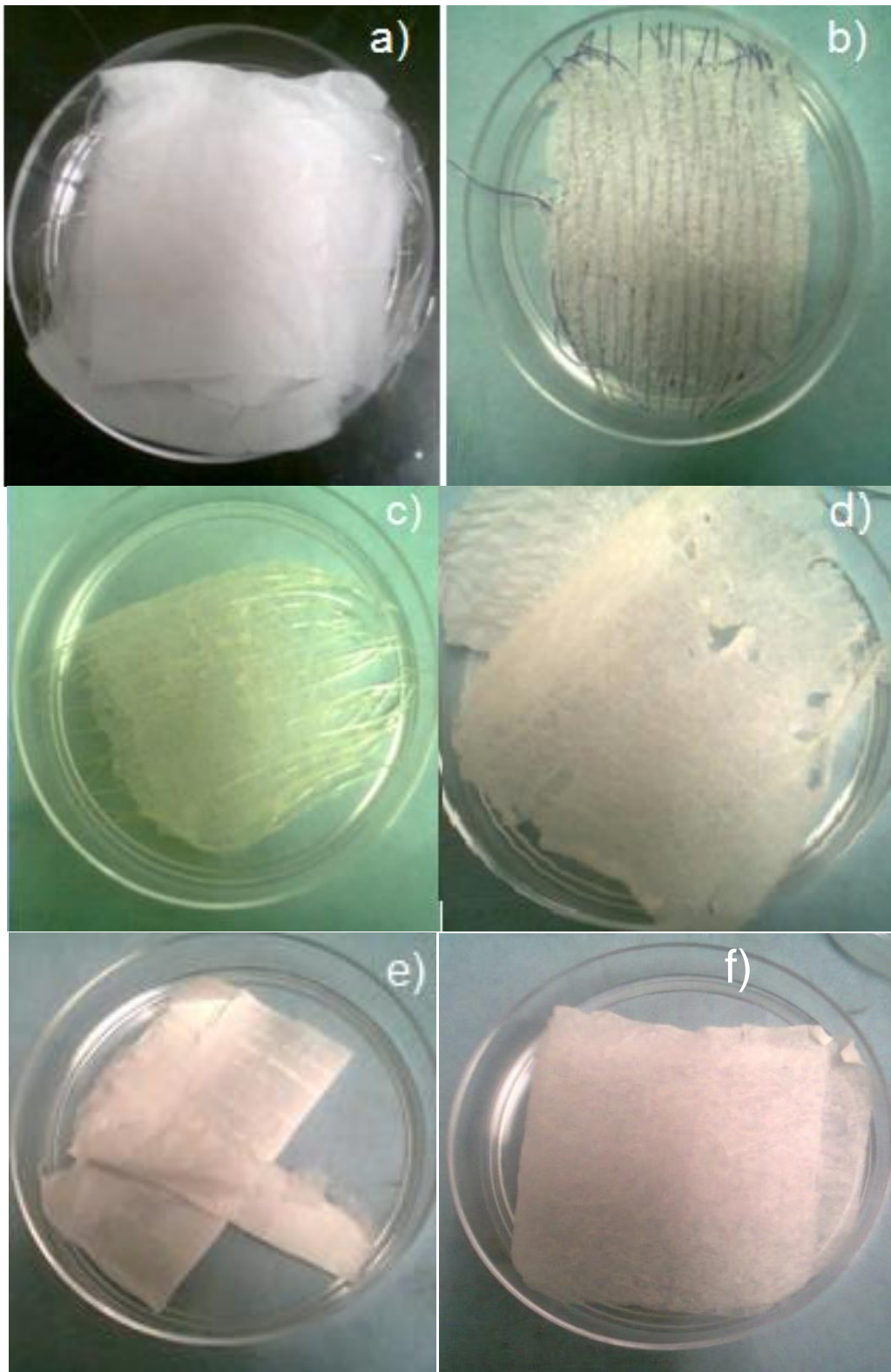
Fig. 14 Sistema de electrohilado (Electrospinning).

Cuando se aplica un campo eléctrico ambos electrodos, la solución polimérica es transportada del electrodo positivo (aguja) al negativo (cilindro), esto se debe a que el campo eléctrico actúa sobre la solución hasta romper la tensión superficial y formar el cono de Taylor; una vez formado el cono, entonces la solución es dirigida como jet y depositada en forma de fibras en el colector.

La distancia entre electrodos fue de 10cm, suficiente para que el solvente contenido en la solución se evaporara y las fibras llegaran total o parcialmente secas al colector. La evaporación del solvente también se debió a la presencia del etanol.

Una vez generadas las matrices, éstas son retiradas del colector y deben secarse a vacío a 42°C durante 3 días, para asegurarse de que el solvente se evapore por completo y no perjudique en el cultivo celular puesto que dicho solvente es cloroformo y es tóxico.

Después las matrices son colocadas en caja petri y guardadas hasta el momento del análisis, como lo muestra la Figura 15; los hilos que se observan en algunas de las matrices (morados o transparentes), se deben a que estos hilos son colocados en todo el cilindro para sostén de las fibras.



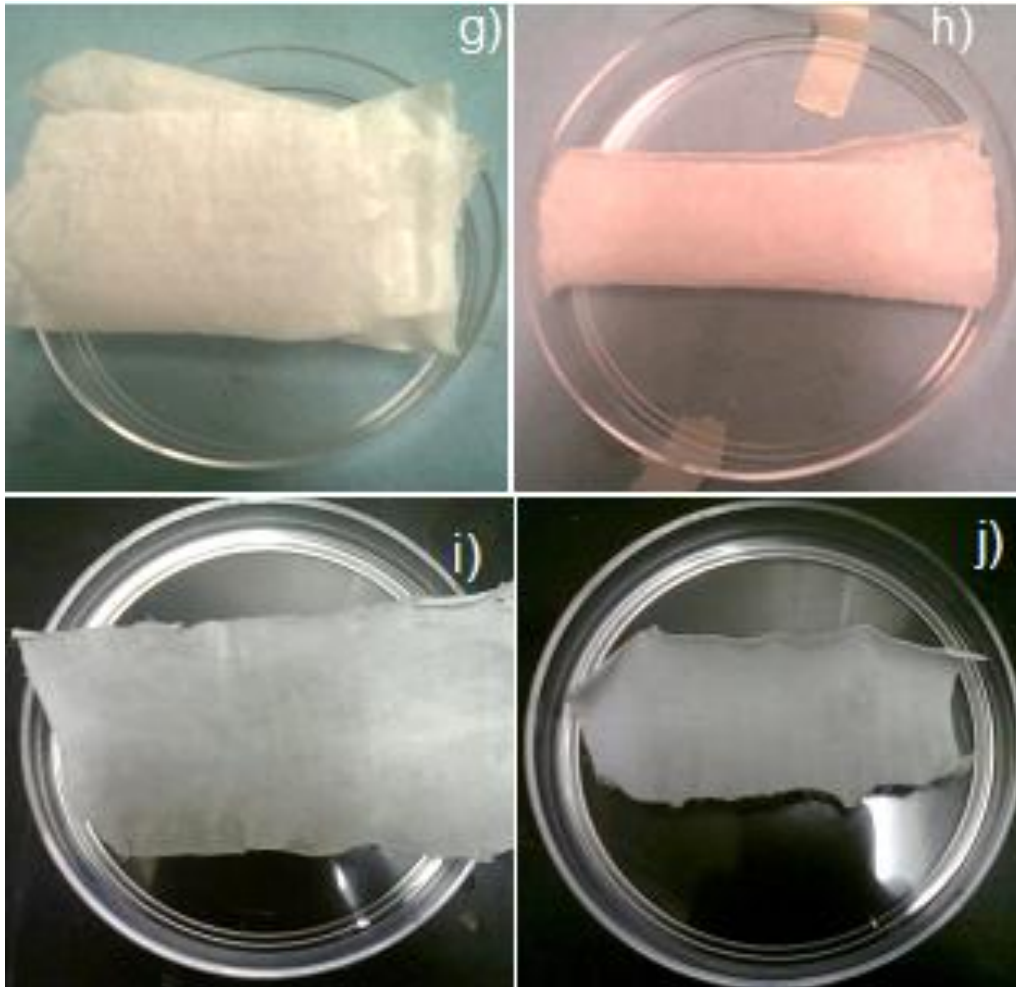


Fig. 15 Matrices de PLA e HA mediante la técnica de Electrohilado.

a) M1 1.2g PLA 40ml sol. b) M2 1.2g PLA 0.3g HA 10ml sol. c) M3 1.8g PLA 0.3g HA 10ml sol. d) M4 1.2g PLA 0.3g HA 20ml sol. e) M5 1.2g PLA 0.1g HA 20ml sol. f) M6 1.8g PLA 0.1g HA 30ml sol. g) M7 1.8g PLA 0.3g HA 40ml sol. h) M8 1.8g PLA 0.2g HA 80ml sol. i) M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol. j) M10 1.8g PLA 1g HA 20ml sol.

Como se puede observar en las figuras anteriores, aquellas matrices que poseen porcentajes bajos de HA o que carecen de ella (0% y 1%) como en el caso de M1, M5 y M6 presentan una morfología más homogénea mientras que las que poseen mayor cantidad de HA (3%) como en M2, M3, M4 y M7 presentan una morfología con agregados precisamente de HA, esto se observa mejor en M2 y M3; cabe señalar que mientras mayor es la cantidad de solución que se inyecta, la matriz obtenida presenta una morfología más cerrada debido a que se van sobreponiendo las fibras en el transcurso del Electrohilado, como en M8 que está compuesta por 80ml de solución.

Otro aspecto importante es que mientras más Hidroxiapatita contienen, las matrices van adquiriendo una consistencia más dura pero manejable, y no frágil debido a la presencia del Ácido Poliláctico, lo cual representa una ventaja ya que se puede manipular dicha matrices como mejor convenga e incluso darles alguna forma si así conviene.

6.3 Elección de las matrices para cultivo celular

Como se mencionó, en la aplicación de la técnica de Electrohilado se intentó hilar mayor cantidad de HA tanto con 1.2g de PLA como con 1.8g de PLA, dando un mejor resultado ésta última por lo que se optó por hacer matrices con 0.4g de HA y 1g de HA ambas con 1.8g de PLA, (tabla 4):

Tabla 4. Concentraciones de PLA, HA y condiciones de depósito.

| Muestra | Concentración de Sólidos (CS) | | | Volumen | Voltaje | |
|------------|-------------------------------|------------|-------------|-----------|-------------|-----------|
| | PLA(g) | HA(g) | (g/ml) | (ml) | %HA | (KV) |
| M1 | 1.2 | 0 | 0.12 | 40 | 0 | 30 |
| M2 | 1.2 | 0.3 | 0.15 | 10 | 20 | 30 |
| M3 | 1.8 | 0.3 | 0.21 | 10 | 14.2 | 30 |
| M4 | 1.2 | 0.3 | 0.15 | 20 | 20 | 30 |
| M5 | 1.2 | 0.1 | 0.13 | 20 | 7.6 | 30 |
| M6 | 1.8 | 0.1 | 0.19 | 30 | 5.2 | 30 |
| M7 | 1.8 | 0.3 | 0.21 | 40 | 14.2 | 30 |
| M8 | 1.8 | 0.2 | 0.2 | 80 | 10 | 30 |
| M9 | 1.8 | 0.4 | 0.22 | 20 | 18.1 | 30 |
| M10 | 1.8 | 1 | 0.28 | 20 | 35.7 | 30 |

Tal como se observa, el porcentaje de Hidroxiapatita que se tiene es bastante considerable por lo que dichas muestras se tomaron como base para realizar cultivo in vitro y realizar comparaciones entre ambas ya que M10 contiene casi el doble en porcentaje de HA con respecto a M9.

6.4 Aplicación de polimerización por plasma a las matrices obtenidas

En este trabajo se utilizó la técnica de polimerización por plasma para sintetizar películas de Polipirrol y así modificar la superficie de las matrices de PLA-HA con el objeto de facilitar la adhesión de las células óseas. El uso de Polipirrol se debe a que éste es un estimulador de crecimiento celular.

El sistema de polimerización por plasma consiste en una bomba de vacío, la presión que se genera en el reactor se mide en torrs mediante un barómetro digital. Se tiene también un generador de potencia, en el cual se establece la potencia de trabajo (Figura 16).



Fig. 16 Polimerización por Plasma.

a) Bomba de vacío; b) Barómetro digital; c) Generador de potencia.

Como se muestra en la Figura 17, el reactor de polimerización por plasma consiste en un tubo de vidrio (Pyrex), con longitud de 25cm, diámetro exterior de 9cm y un grosor de las paredes de 0.7cm. En cada extremo del tubo se coloca una tapa de acero inoxidable con dos salidas. Las tapas tienen un agujero en medio para insertar electrodos de acero inoxidable (uno a cada lado) que consisten en una barra cilíndrica y una placa plana circular de 6 cm, los electrodos se conectan al generador de potencia, uno a la terminal positiva y otro a la negativa de tal manera que se genere un campo eléctrico entre ambos.

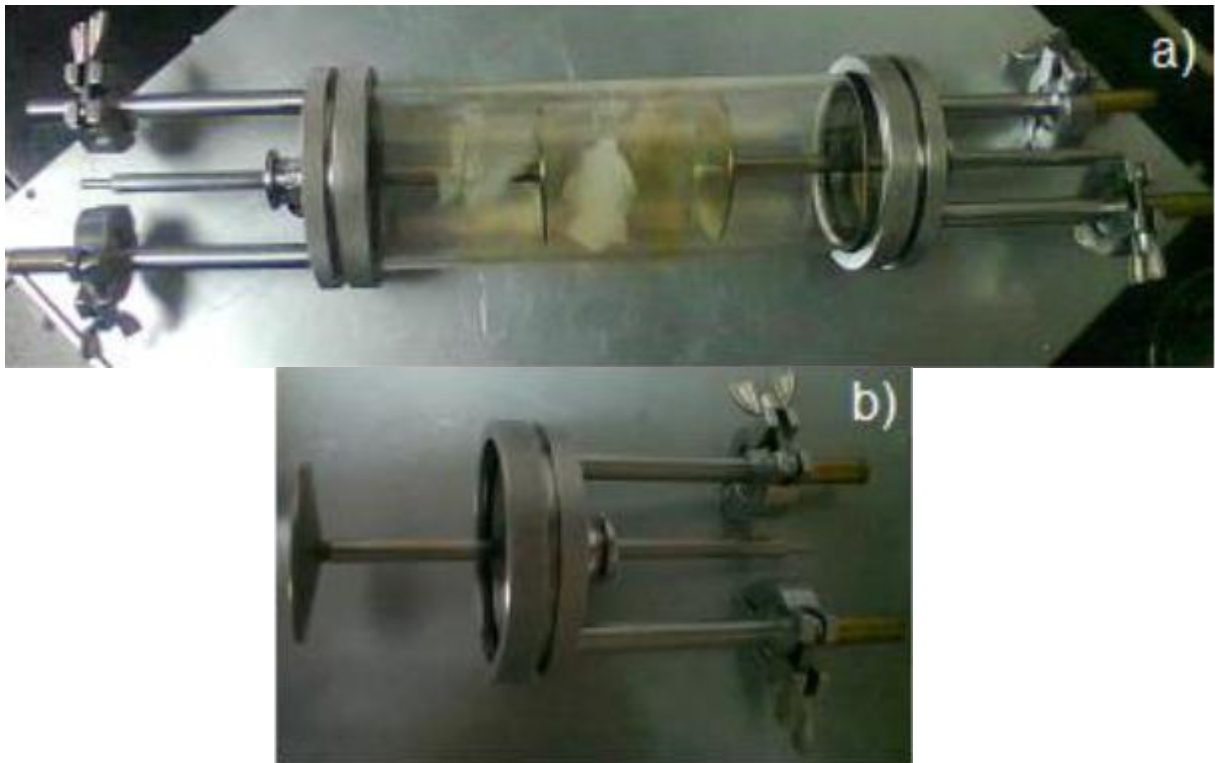


Fig. 17 Reactor.

a) Reactor b) Tapa del reactor con el electrodo insertado en el centro.

Durante la polimerización la separación entre los electrodos fue aproximadamente 10 cm (Figura 18). El polipirrol utilizado fue Sigma-Aldrich. Las matrices de PLA-HA fueron colocadas en el centro del reactor; cabe señalar que antes que comience la polimerización, el reactor es purgado por diez minutos para remover impurezas.

Se tienen además, dos válvulas conectadas al reactor una para la introducción de polipirrol y otra para introducir yodo, éste último se utilizó debido a que se ha reportado (Vázquez M., 2004) su uso como dopante en este tipo de reacción debido a que los iones N^+ del polipirrol tienden a unirse con los iones I^- del yodo; la válvula del pirrol se mantiene abierta durante los 30 minutos que dura el experimento mientras que la válvula del yodo se abre a los 6 minutos y se cierra a los 10 para nuevamente abrirla a los 16 minutos y cerrarla a los 20. En los últimos diez minutos solo el conducto de pirrol se mantiene abierto, el hecho de que se deje escapar el yodo solo por algún intervalo de tiempo es debido a que no se quiere que las matrices queden totalmente cubiertas por yodo, sino que se busca que resulten cubiertas mayormente por polipirrol pero es necesario usar yodo por su capacidad de dopaje al actuar con el polipirrol.

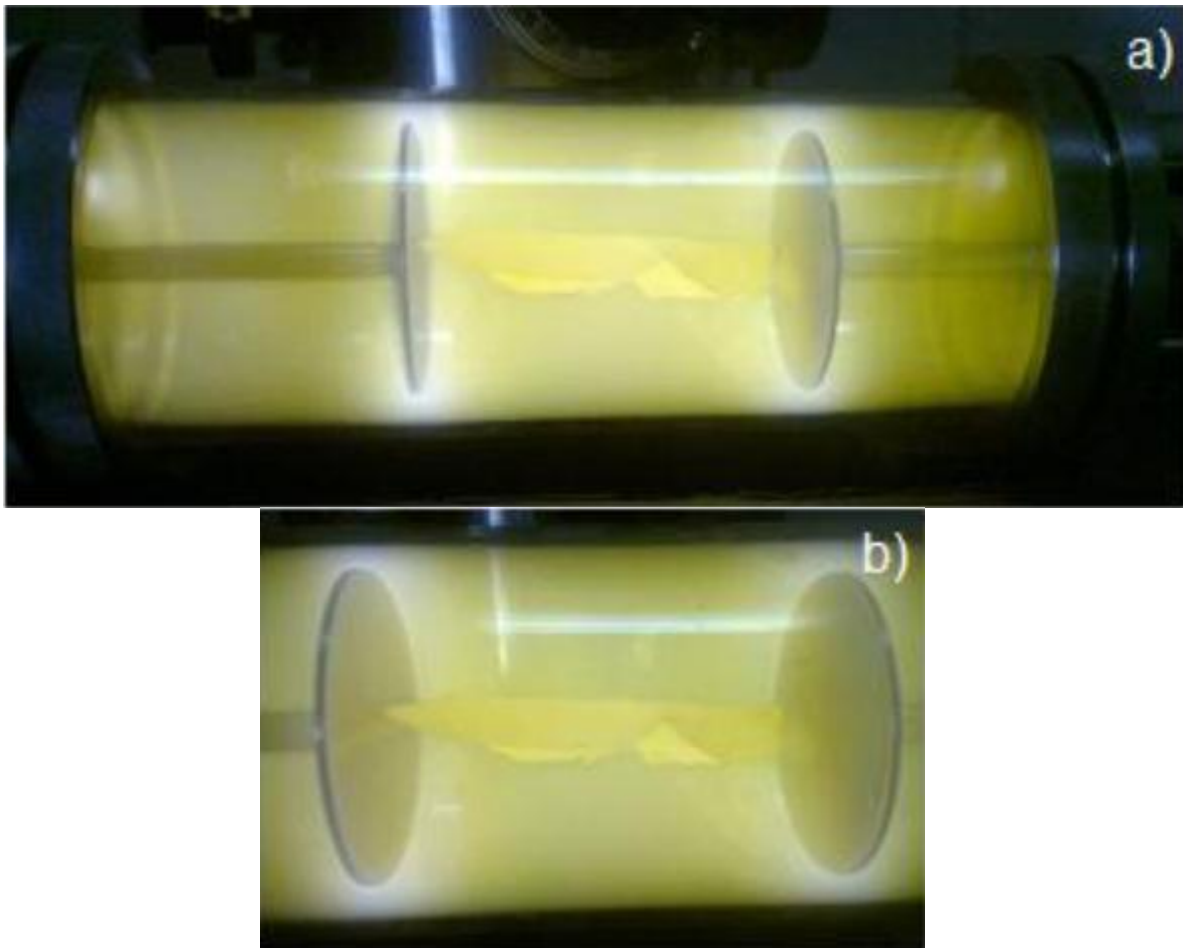


Fig. 18 Experimento de polimerización.

a) Colocación de la muestra entre los electrodos b) La separación de los electrodos es de 10cm.

La polimerización por plasma se realizó bajo las siguientes condiciones:

- ◆ Frecuencia: 13MHz
- ◆ Potencia: 20W
- ◆ Presión: 1.5×10^{-2} Torrs
- ◆ Voltaje: 680V
- ◆ Temperatura: 365°K
- ◆ Tiempo de aplicación: 30min

Una vez realizada la polimerización, las matrices resultaron como se observan en la Figura 19, con color café debido al Yodo y con una textura flexible, lo que facilitó su manipulación al momento de realizar el cultivo in vitro evitando que se quiebren. El tiempo de polimerización fue de 30 min debido a que en un inicio se había establecido que fuera de 1hr pero las matrices resultaban extremadamente duras, lo cual impedía su manipulación; esto ocurre debido a que si el tiempo es muy grande, la capa de polipirrol es cada vez más gruesa, lo cual influye en sus propiedades mecánicas disminuyendo la calidad en la textura. Se buscó un tiempo en el cual se obtuvieran las propiedades químicas deseadas, es decir, que el polipirrol cubriera la matriz y que ésta tuviera una dureza tal que pudiera manipularse según se requiriera; el tiempo que cubrió las necesidades a este trabajo fue de 30 min. Claro que también la presencia del Acido Poliláctico tuvo que ver ya que proporcionó cierta elasticidad; por su parte la HA aporta dureza y resistencia. Las propiedades del Polímero (PLA) y de la cerámica (HA) en conjunto dieron como resultado matrices aptas para ser manipuladas y darles forma si es que así se requiere porque no son frágiles, es decir, quebradizas, esto hace la diferencia entre aquellos biomateriales que son solo poliméricos los cuales se pueden manipular pero no son resistentes o los cerámicos que son resistentes pero son frágiles, es decir, se rompen con facilidad.

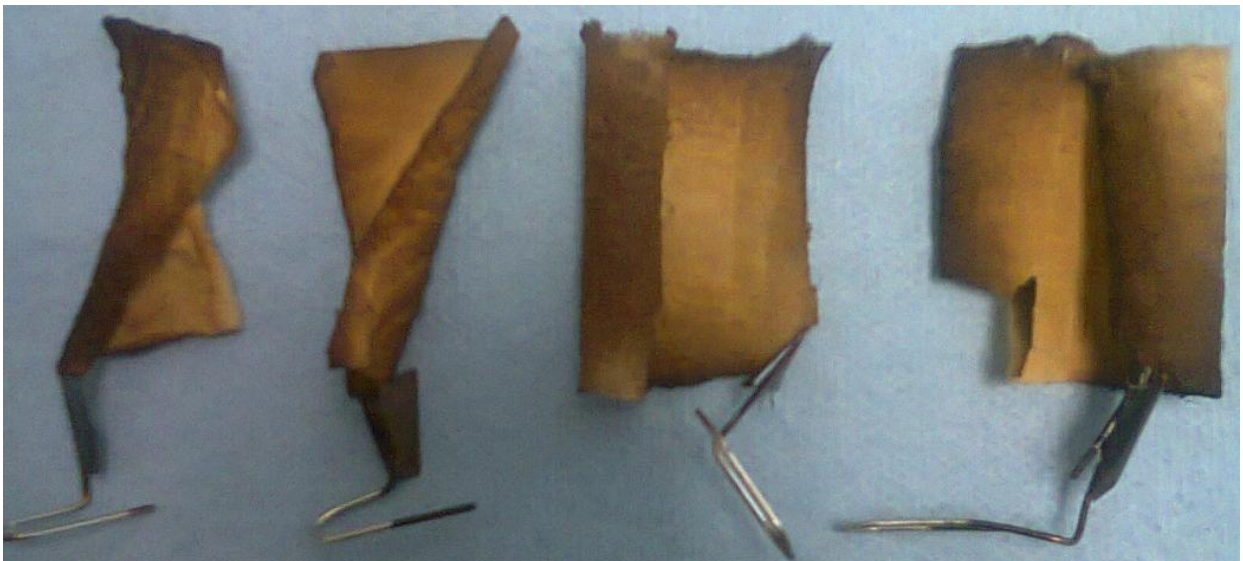


Fig. 19 Matrices cubiertas con Polipirrol.

6.5 Caracterización morfológica de las matrices

La caracterización de las matrices se basó principalmente en la búsqueda de las mejores condiciones de éstas para su aplicación en Ingeniería de Tejidos, para ello se consideró la porosidad generada por la distribución de las fibras dentro de dichas matrices y sus diámetros, su biodegradación e interacción celular.

Para caracterizar morfológicamente las matrices se utilizó Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM); para caracterizar biológicamente las matrices se hizo Cultivo Celular.

6.6 Microscopía Óptica (MO)

El análisis de microscopía óptica se realizó con un Microscopio Óptico modelo DMLP marca Leica del laboratorio de Polímeros de la UAM-I (Figura 20); esto, con el fin de hacer comparaciones entre las muestras, cabe mencionar que se utilizó una cámara digital para la obtención electrónica de las imágenes con el objeto de obtenerlas en formato electrónico.

Para la obtención de las imágenes primero se colocó el portaobjetos en la platina, con la superficie donde está el objeto a observar hacia arriba. Luego se centró lo más posible la sección que sería examinada, moviendo los tornillos que desplazan el carro en los dos ejes horizontales. Posteriormente se ajustó el sistema de iluminación para que llegara a la muestra la apropiada cantidad de luz. Una vez hecho esto, entonces se giraron las lentes con el revólver para visualizar al aumento que se requiere (100X, 200X, 500X), esto se realizó con cuidado de no bajar el ocular excesivamente ya que se puede romper el portaobjetos y dañarse el lente objetivo, fue importante también enfocar lentamente con el tornillo micrométrico, hasta que la imagen quede perfectamente en foco.



Fig. 20 Microscopio Óptico modelo DMLP Leica.

Las muestras fueron analizadas a 200X; la Figura 21 exhibe las muestras más representativas de este trabajo; se puede ver por ejemplo que M3, M4 y M6 presentan agregados de Hidroxiapatita a diferencia de M1 que sólo contiene PLA. También se observa que cuanto mayor es la solución inyectada, la morfología de la matriz es más cerrada además de que efectivamente se forman fibras de distintos diámetros.

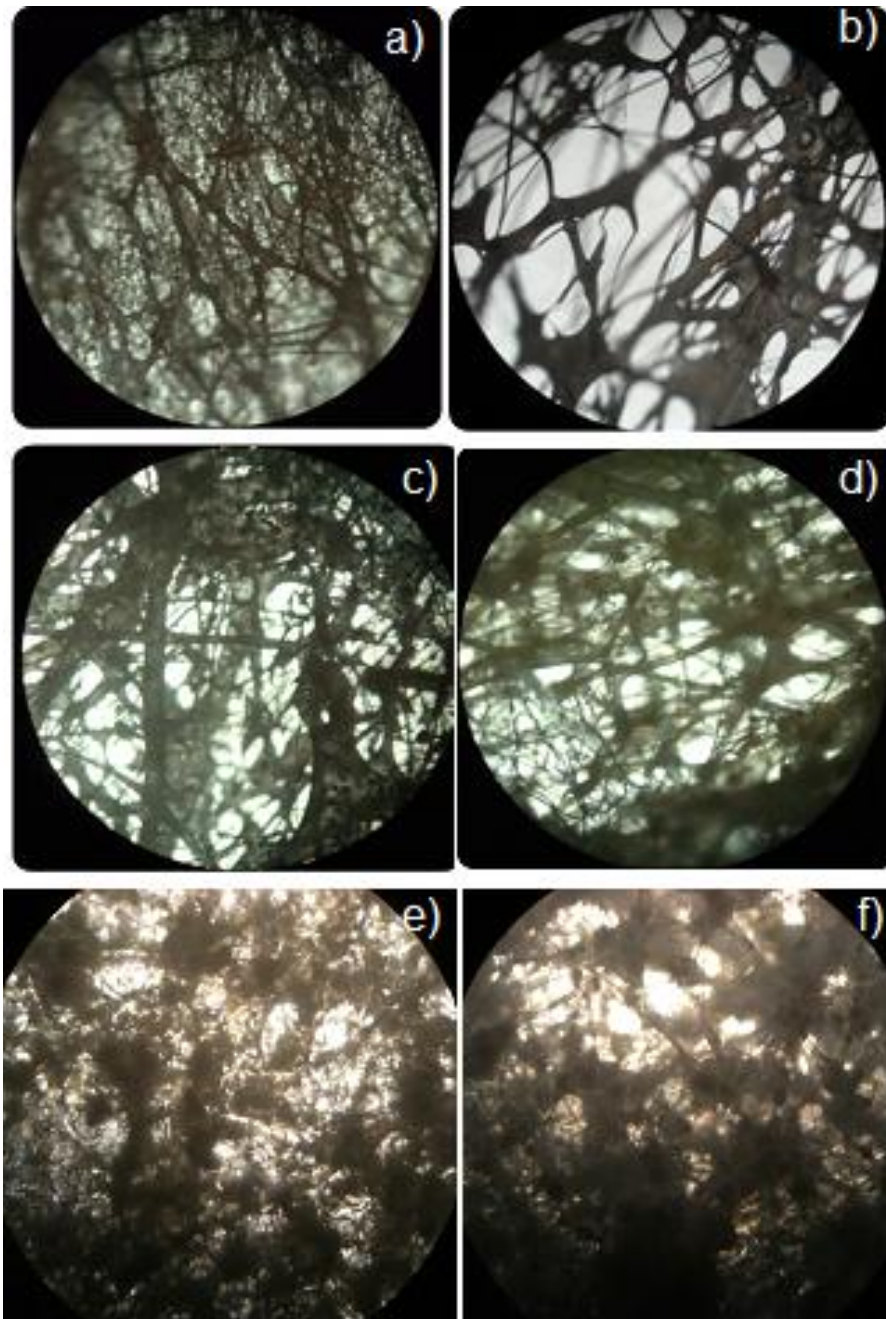


Fig. 21 Microscopía Óptica de las muestras más representativas.

- a) M1 1.2g PLA 40ml sol. b) M3 1.8g PLA 0.3g HA 10ml sol. c) M6 1.8g PLA 0.1g HA 30ml sol.
d) M8 1.8g PLA 0.2g HA 80ml sol. e) M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol. f) M10 1.8g PLA 1g HA
20ml sol.

Como se señaló, se realizaron matrices con distintas cantidades de Hidroxiapatita, desde 0.1g hasta 1g con el objeto de obtener matrices que fueran ricas en este mineral y en base a que la HA representa el 60% de la parte orgánica del hueso; por lo que, al aumentar el contenido de HA en las matrices se buscó tener una similitud con las propiedades del hueso natural.

El mayor porcentaje de HA que se pudo aplicar mediante Electrospinning fue 35.7% correspondiente a M10 ya que al aplicar un porcentaje mayor ya no se obtenían fibras sino grumos o plastas de solución.

6.6.1 Microscopía Óptica de Matrices cubiertas con Polipirrol

M9 y M10 fueron las matrices elegidas para realizar cultivo celular in vitro, por el porcentaje de HA contenido en ellas, (18.1% y 35.7%) respectivamente; el hecho de que una contiene casi el doble que la otra fue un aspecto que se consideró para hacer comparación entre ellas. A continuación se muestran M9 y M10 cubiertas con polipirrol a 500X (Figura 22).

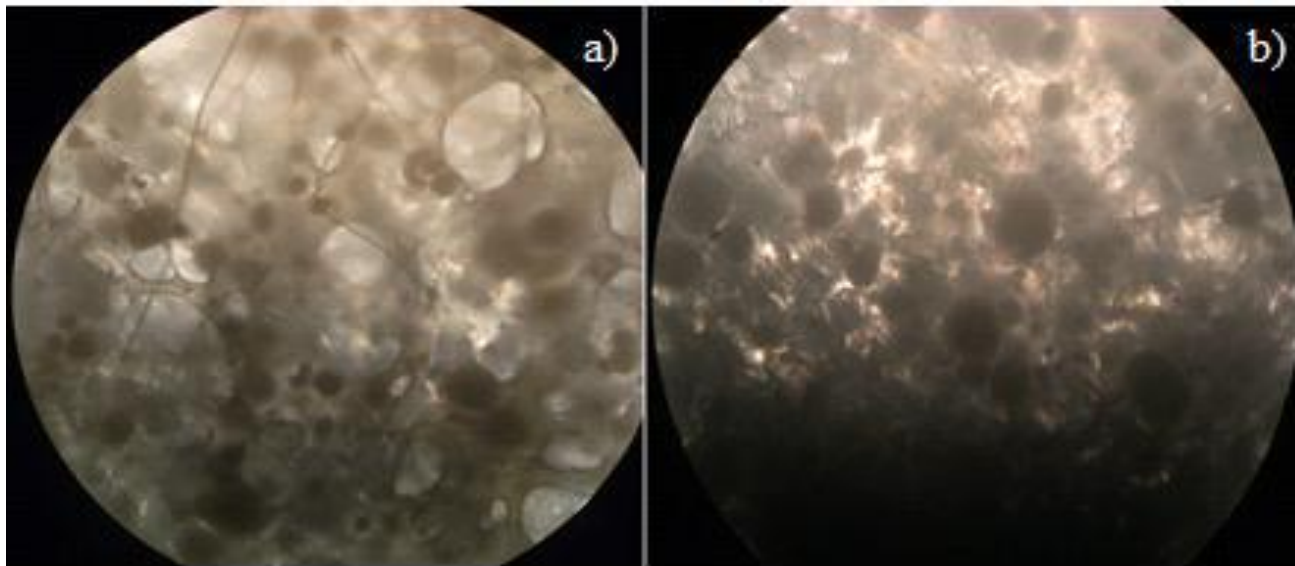


Fig. 22 Microscopía Óptica de Matrices cubiertas con Polipirrol.

a) M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol. b) M10 1.8g PLA 1g HA 20ml sol.

Se observa una morfología distinta y más lisa que las muestras que no están cubiertas con Polipirrol y en M10 es muy notoria la diferencia entre porcentajes de HA con respecto a M9. Es de gran ventaja que aun con la presencia del Polipirrol, la Hidroxiapatita continúa dispersa en las muestras, así, se logró una modificación superficial que ayudó en el momento de realizar el cultivo in vitro sin perder las propiedades químicas que inicialmente contenían cada una de las matrices.

6.7 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El análisis mediante SEM para observar la morfología de las matrices (anteriormente mostradas en la Figura 13) a mayores aumentos y con mayor resolución; se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo JEOL JSM-7600F de la UAM-I (Figura 23).

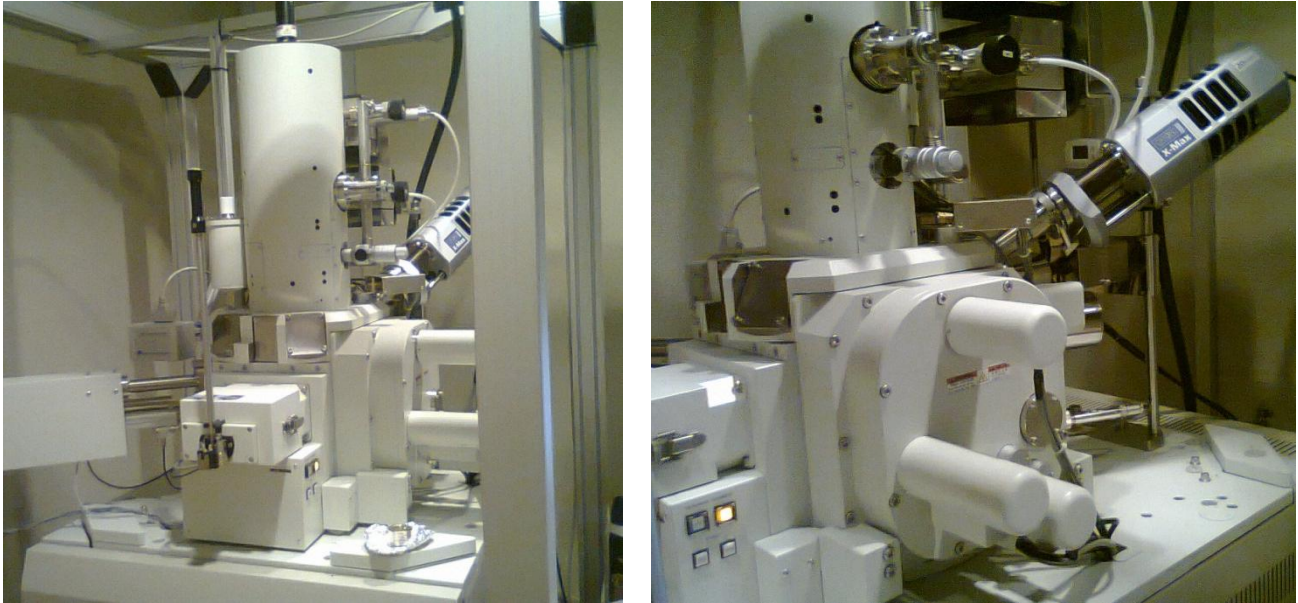


Fig. 23 Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-7600F.

Las muestras se prepararon mediante la técnica de sputtering en la cual se tomaron fragmentos de 0.5 cm^2 de cada una de éstas y después se pegaron a un pequeño porta muestras de aluminio (Figura 24), usando para ello un pegamento conductor, después se colocaron en el porta-muestras del microscopio electrónico para comenzar con el análisis, después se recubrieron con oro (aproximadamente 10 nm ya que las matrices no son conductoras) y se generó una diferencia de potencial a partir de una pulverización catódica a alto vacío e intercambiando partículas de oxígeno por argón.



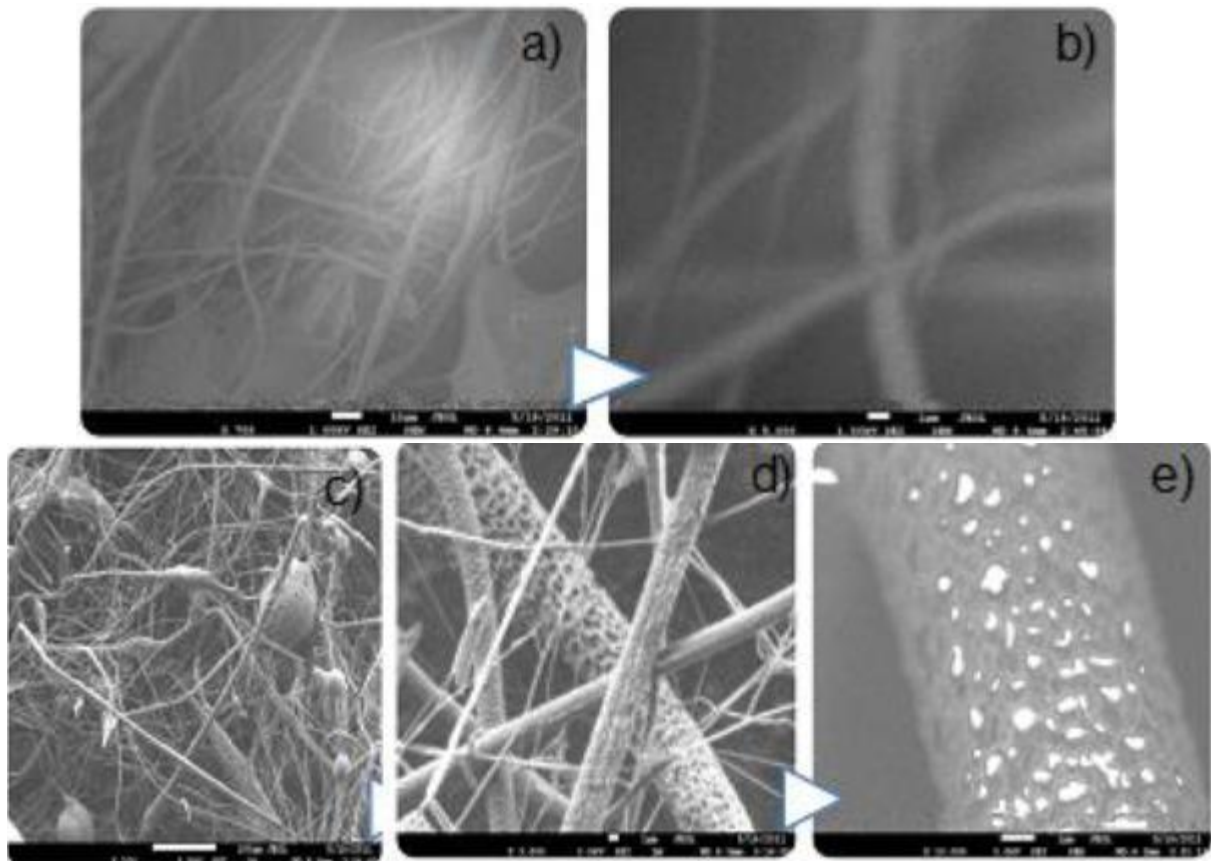
Fig. 24 Preparación del fragmento de PLA-HA antes del análisis mediante SEM

El análisis consiste en un barrido de la muestra, seleccionando fotografías de las ventanas que mejor representan el comportamiento repetitivo de toda la muestra, esto por supuesto, al aumento que mejor convenga.

Estas muestras pudieron ser observadas a un voltaje de aceleración relativamente bajo $\approx 3\text{KV}$, de manera que la emisión de electrones pueda ser balanceada por el número de electrones del haz electrónico.

Las matrices fueron analizadas a distintos aumentos como se muestra en la Figura 25, y una vez más como era de esperarse M1 que no posee HA, presenta una morfología más homogénea y “lisa”, a diferencia de M2 por ejemplo, que presenta morfologías “rugosas”, debido precisamente a los agregados de HA.

No obstante, se puede observar que M2 presenta algunos grumos dentro de las fibras, lo cual no es significativo ya que la mayor parte de las matrices contienen fibras continuas, lo que quiere decir que la técnica de Electrohilado resultó favorable al generar fibras de Ácido Poliláctico con partículas de Hidroxiapatita dispersas. En M2, el inciso c da una aproximación de diámetro de la fibra de 9μ , esta misma fibra es un zoom de la fibra más grande que se puede observar en el inciso b, lo cual significa que efectivamente se generaron fibras incluso menores de 1μ .



**Fig. 25 Microscopía Electrónica de Barrido de M1 (1.2g PLA 40ml sol.) y M2 (1.2g PLA 0.3g HA 10ml sol.)
a) M1 (700x 10µm) b) M1 (5000x 1µm) c) M2 (200x 100µm) d) M2 (3000x 1µm) e) M2 (10000x 1µm).**

En la Figura 26, se muestra la Microscopía Electrónica de Barrido de M3, M5, M6 y M8, como puede verse, sus morfologías son muy peculiares debidas a la presencia de partículas de HA en la composición de las matrices ya sea en aquellas con menor cantidad de solución como en M3 y M5 (con tan solo 10ml y M6 con 30ml de solución) o en aquellas que tienen mayor cantidad de solución como M8 con 80ml de solución inyectada.

Un aspecto importante es que los agregados de HA se hallan principalmente en aquellas fibras cuyo diámetro es mayor; estos diámetros van en su mayoría, desde 800nm hasta 10µm aproximadamente y se presentan poros de diversos tamaños, lo cual es importante porque esto permitió el paso de nutrientes y factores de crecimiento cuando se realizó el cultivo in vitro, además, se presentaron poros con el tamaño suficientemente grande para permitir el movimiento de los osteoblastos dentro de estas matrices (>10µm).

Se puede observar (utilizando la escala que viene en cada una de las fotografías) que aunque la mayoría de las fibras van de 1µm a 10µm de diámetro, aproximadamente, existen también hasta de 50µm como en M3 b), o incluso de 900µ como en M5 b), así que esto también resulta interesante porque contamos con matrices ricas en fibras con diámetros muy variados.

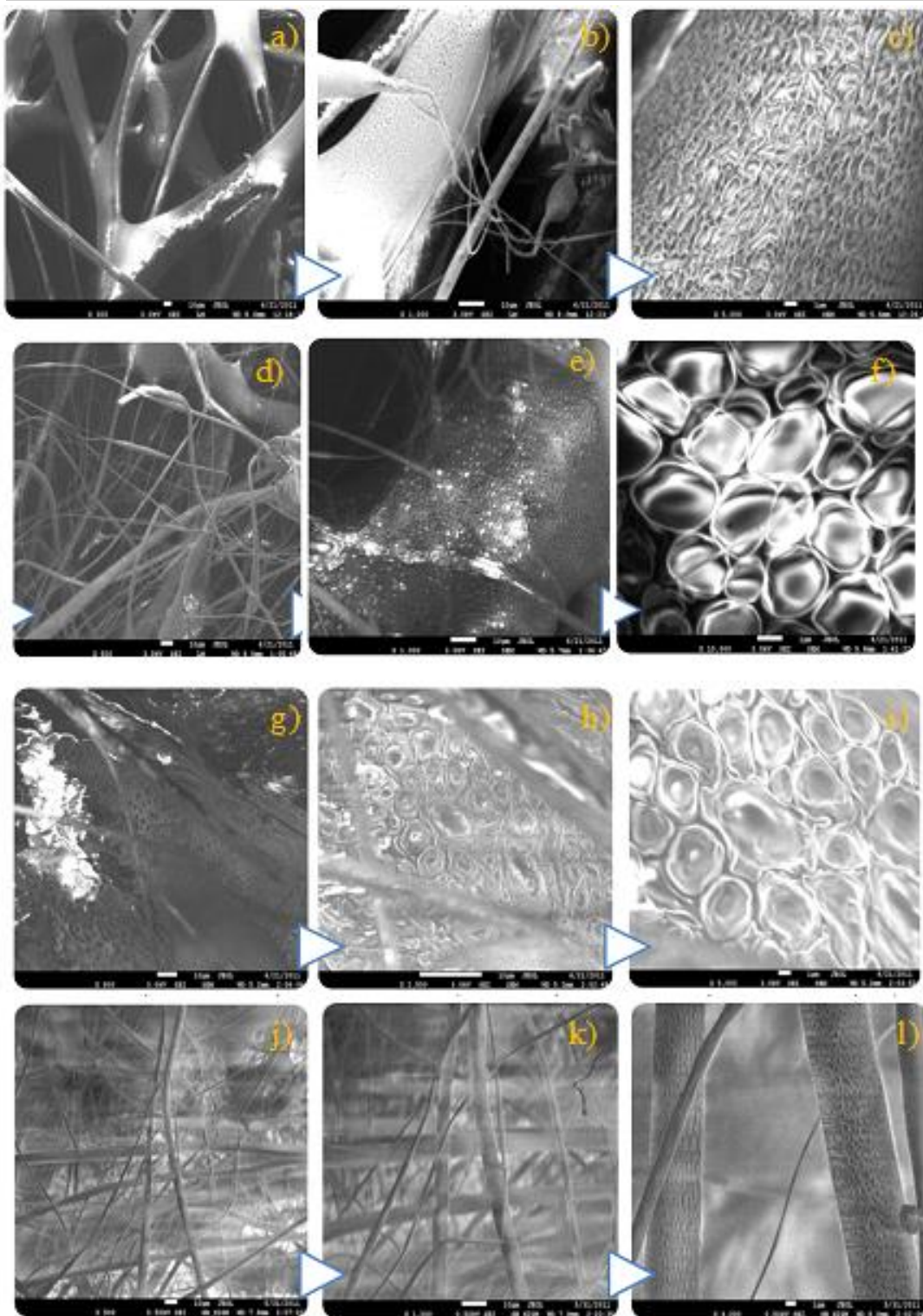


Fig. 26 Microscopía Electrónica de Barrido de M3 (1.8g PLA 0.3g HA 10ml sol), M5 (1.2g PLA 0.1g HA 20ml sol.), M6 (1.8g PLA 0.1g HA 30ml sol.) y M8 (1.8g PLA 0.2g HA 80ml sol.)

a) M3 (300x 10μm) b) M3 (1000x 1μm) c) M3 (5000x 1μm) d) M5 (200x 100μm) e) M5 (3000x 1μm) f) M5 (10000x 1μm) g) M6 (100x 10μm) h) M6 (2500x 10μm) i) M6 (5000x 1μm) j) M8 (500x 10μm) k) M8 (1000x 10μm) l) M8 (4000x 1μm).

6.7.1 SEM de Matrices cubiertas con Polipirrol

A continuación se muestra el análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido de M9 y M10 recordando que son las matrices de interés.

Primeramente se muestra M9 (18.1% HA) sin polipirrol (figura 27); se observan fibras de distintos diámetros (entre 1 μ m y 10 μ m aproximadamente), aunque hay algunas otras con diámetros mucho mayores, es importante observar como las fibras son continuas y se unen unas con otras como en e), dando forma a la matriz; y poros de distintos tamaños como en c) que se observa una cavidad de hasta 50 μ m. Por otra parte, nuevamente se pueden apreciar las estructuras rugosas debido a la HA presente como en d),e) y f). Se comprueba una vez más que la técnica de Electrohilado arrojó buenos resultados con estas concentraciones de polímero (PLA) y cerámica (HA).

Después, se observa M9 cubierta con Polipirrol (figura 28); en a) y b) no es muy fácil distinguir la existencia de polipirrol en la matriz, sin embargo, las fibras siguen apareciendo igualmente con diámetros diferentes y también porosidades; la superficie de esta matriz se nota un tanto más lisa a diferencia de la que no contiene polipirrol como lo muestra c) y d) donde también se aprecia cierto brillo como si dicha matriz se hubiera pulido; y las partes donde se halla HA dispersa parecieran estar bien definidas e incluso hasta con cierta profundidad como en d) y f), el pulido se puede apreciar muy bien en estas dos últimas.

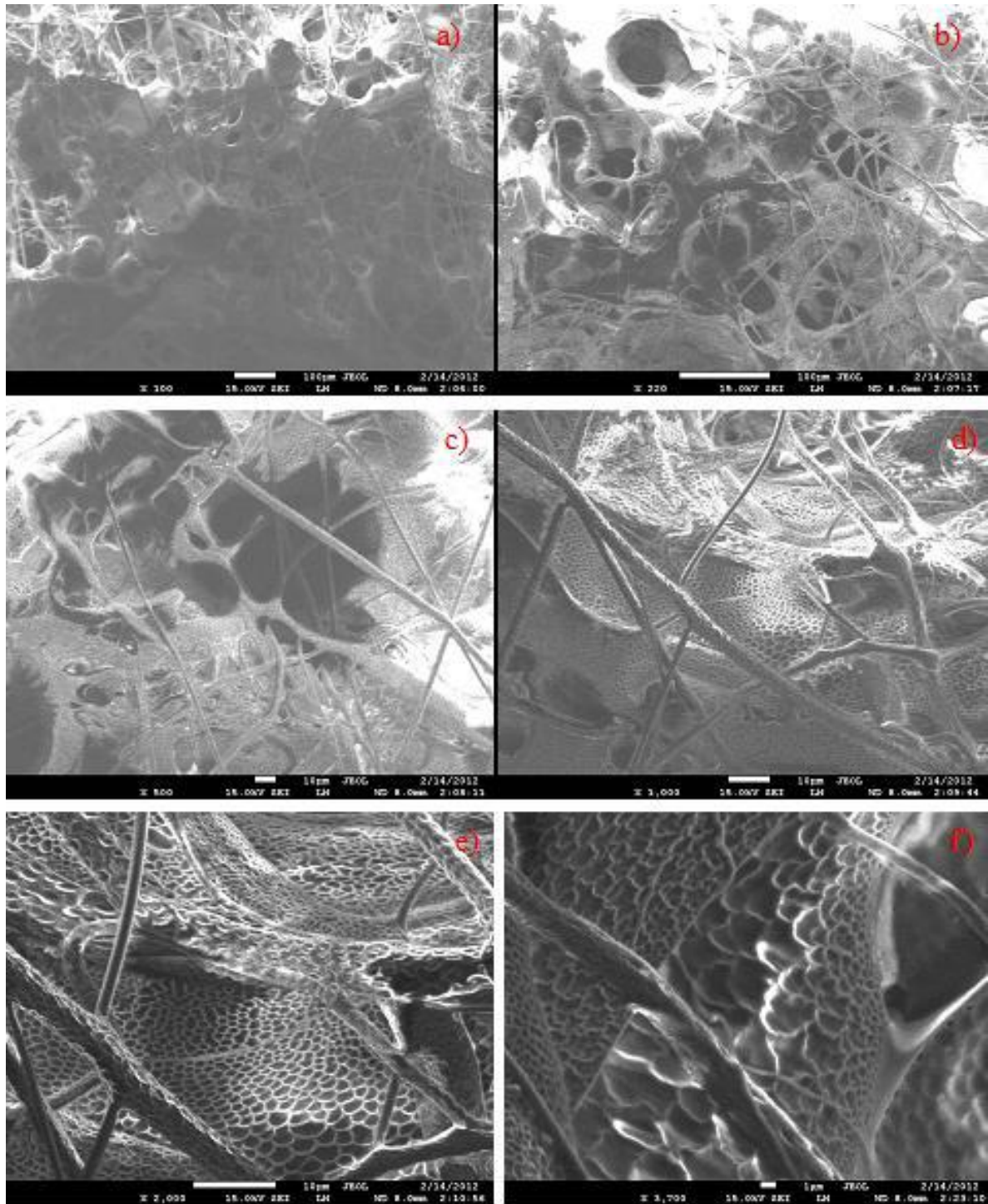


Fig. 27 M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol.

a) 100x ,100 μ m b) 220x, 100 μ m c)500x, 10 μ m d)1000x, 10 μ m e)2000x, 10 μ m f)3700x, 1 μ m.

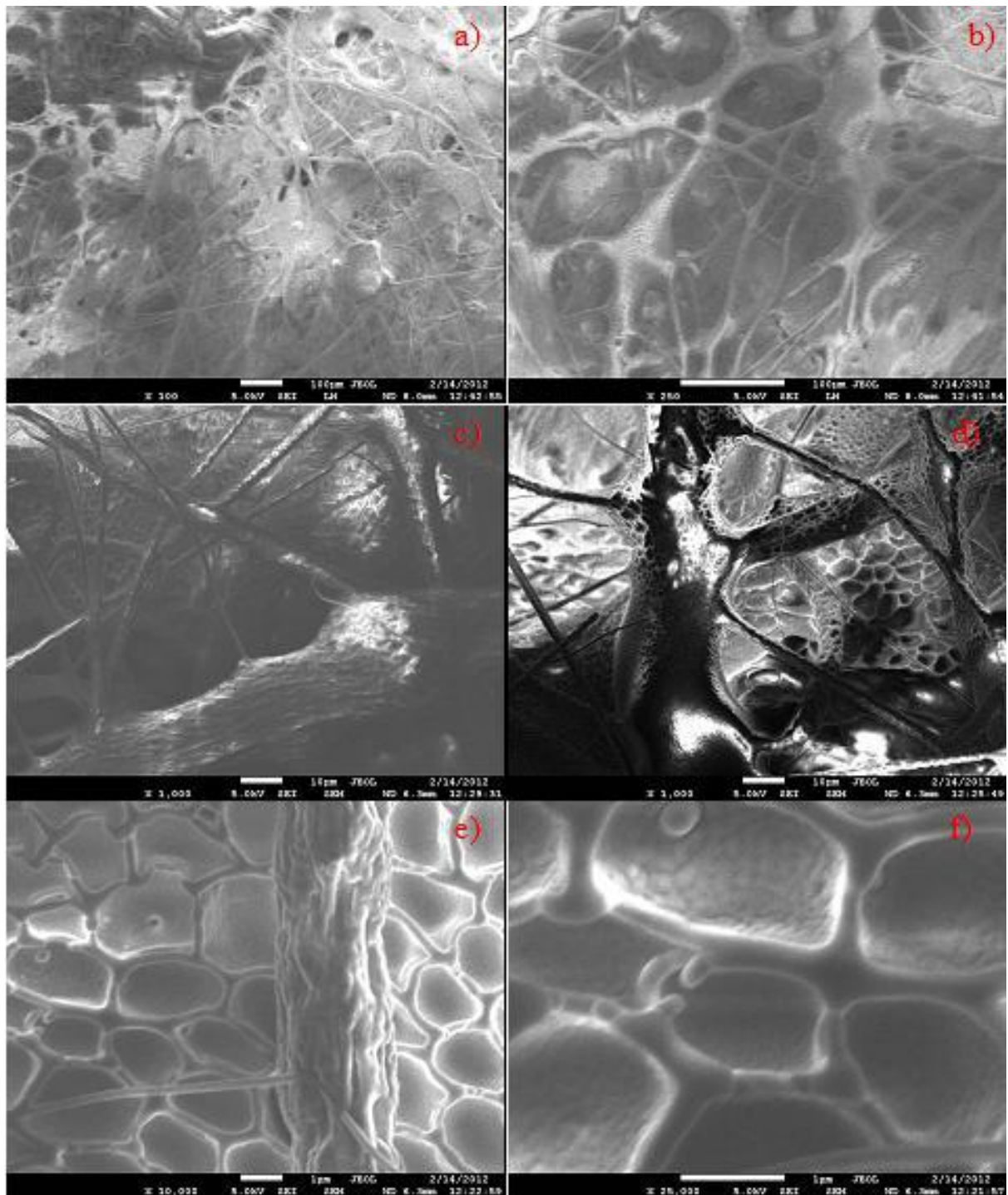


Fig. 28 PLA1.8g-HA0.4g 20ml sol. Cubierta con PPy .

a) 100x ,100µm b) 250x, 100µm c) 1000x, 10µm d) 1000x, 10µm e) 10000x, 1µm f) 25000x, 1µm.

Ahora se muestra M10 (35.7% HA) sin polipirrol (figura 29); en esta matriz se aprecia una morfología muy similar a M9 sin polipirrol, una vez más aparecen las fibras de forma continua y con diámetros y poros de tamaños distintos y en d) se nota en menor manera, la morfología rugosa de las fibras que tienen HA dispersa en su superficie.

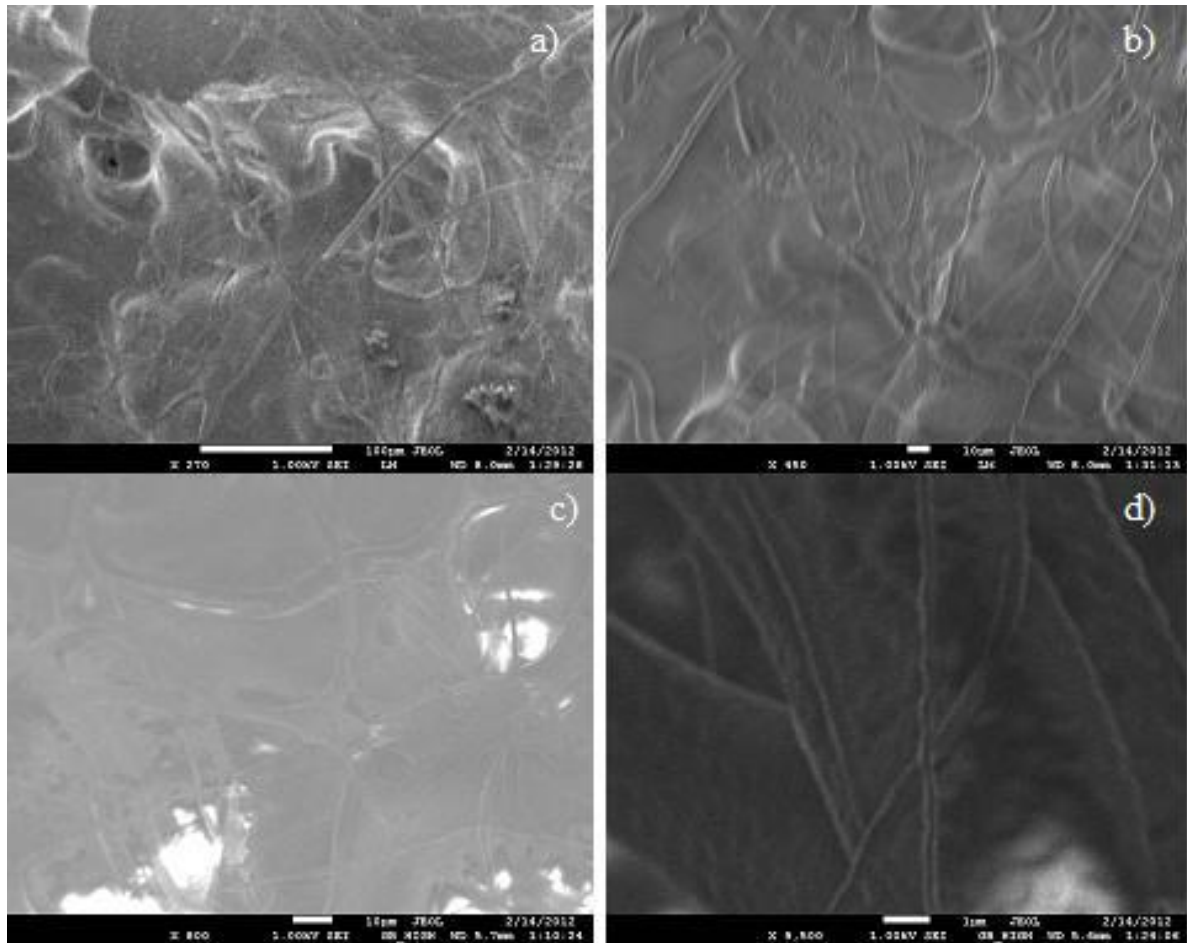


Fig. 29 M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol.

Cubierta con PPy sol. a) 270x ,100µm b) 450x, 10µm c) 800x, 10µm d) 9500x, 10µm.

En la Figura 30, se presenta el análisis SEM para la muestra M10 con polipirrol; en esta figura, se observa de mejor manera la presencia de algunos grumos en a) y b) pero es mayor la cantidad de fibras formadas, por lo que no es un aspecto que no debiera perjudicar al momento de realizar el cultivo in vitro. En c) y d) vemos que muchas de las fibras tienen diámetros de $\approx 10\mu\text{m}$ con la superficie brillante y pulida de cierta forma por la presencia de polipirrol. Cabe señalar que

morfológicamente la presencia del polipirrol se pudo notar porque las matrices se tornan más brillosas, pero químicamente debe haber un cambio en ellas, lo que se pudo apreciar de mejor manera en el cultivo de células óseas in vitro.

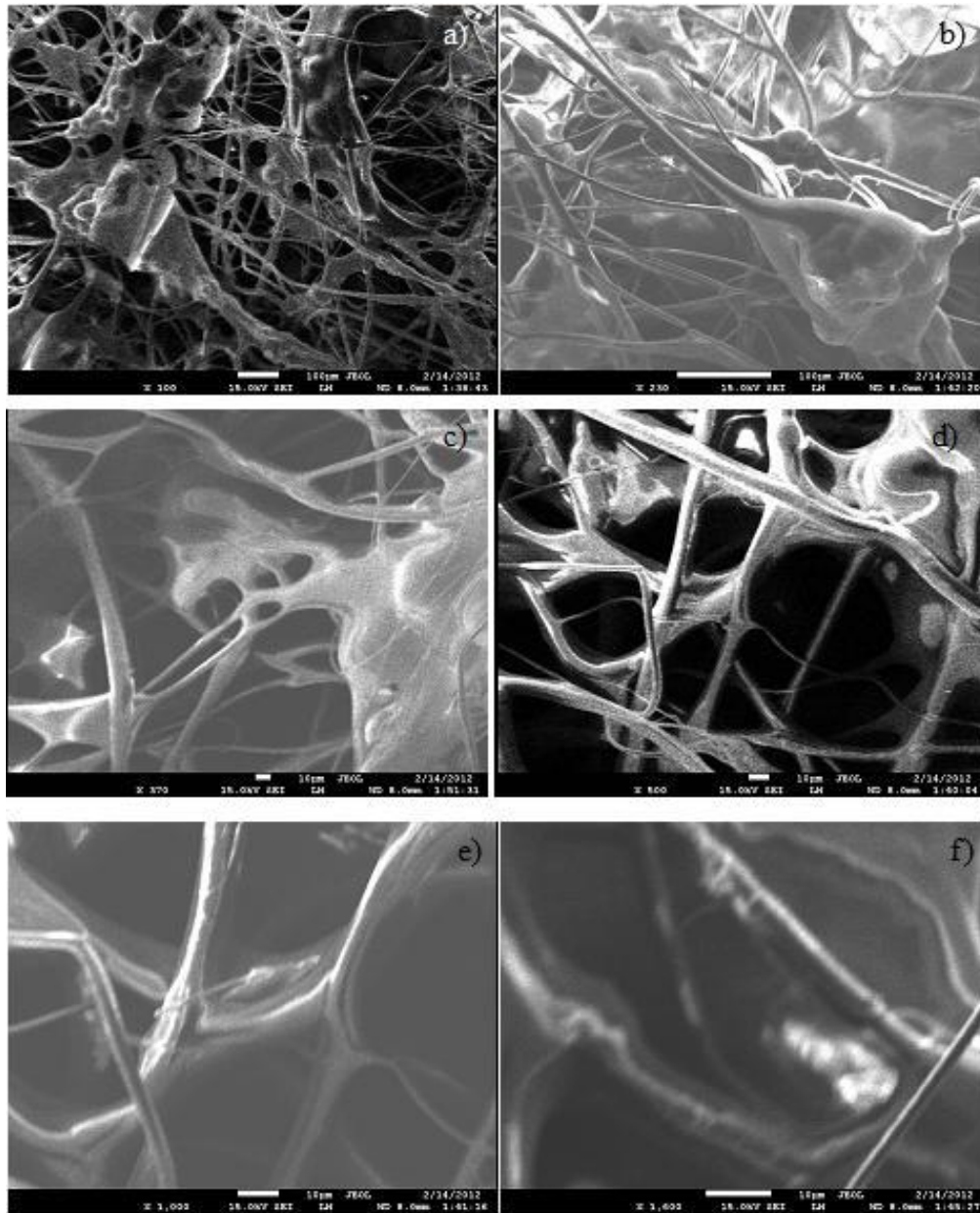


Fig. 30 M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol. Cubierta con PPy sol.

a)100x,100µm b) 230x, 100 µm c) 370x, 10µm d) 500x, 10µm e) 1000x, 10 µm f) 1600x, 10µm.

6.8 Caracterización Biológica de las Matrices

6.8.1 Cultivo Celular

La caracterización biológica de las matrices se realizó mediante cultivo celular, su implementación, se llevó a cabo utilizando equipo proporcionado por el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con asesoría de la Dra. Atlántida Raya Rivera.



Fig. 31 Laboratorio de Cultivo Celular Hospital Infantil de México Federico Gómez.

El experimento básico fue el siguiente:

Toma de biopsia ósea

Para la obtención de las células óseas, se utilizaron los siguientes reactivos:

1. PBS (Phosphate Buffer Saline) con antibiótico-antimicótico.
2. Tripsina 0.05%- EDTA (0.53mM) en solución Hank's
3. Colagenasa Tipo II 2mg/ml en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 0.37% NAHCO₃, suplementado con antibiótico-antimicótico.

4. Medio de cultivo DMEM con 0.37% NAHCO, Suero Fetal Bovino al 10% suplementado con antibiótico-antimicótico.

El proceso consiste primeramente en tomar una biopsia de la pata delantera de un conejo macho de 2 meses de vida extrauterina, especie New Zeland blanco de 2.2 Kg de peso.

Para ello fue necesario tranquilizar al conejo con una inyección intramuscular de Acepromacina (5 mg/Kg) y Ketamina (20mg/Kg); después se anestesió con una inyección intravenosa de Pentobarbital Sódico (40mg/Kg), para establecer esta última concentración se diluyó el Pentobarbital con agua, (1.39ml Pentobarbital, 50% H₂O y 50% anestésico). Luego se anestesió localmente con Xilocaína. Se tomó la biopsia (bajo las debidas condiciones de asepsia y antisepsia) haciendo un rasurado.

Posteriormente se procede a realizar una incisión con bisturí bard/Parker No. 3, hoja No. 15 y la disección se hizo teniendo cuidado de no lesionar estructuras anatómicas.

Para el procedimiento quirúrgico primero se colocó la guía quirúrgica y se extrajo la medula ósea de huesos largos (Tibia y Fémur) la cual fue transportada al laboratorio de Ingeniería de Tejidos en un tubo falcon en solución Hanks para ser procesada.

El defecto se cerró con sutura reabsorbible de vicril 5-0 ceros en puntos simples; se hizo una desinfección de la zona con Isodine y se administró antibiótico trans-operatorio y en los 3 días post-operatorios.

Obtención de cultivo primario de células óseas (osteocitos)

Se realizaron los siguientes pasos para la obtención de los cultivos primarios de Células Troncales Mesenquimales (CTM):

- El tejido se colocó en un tubo de 50 ml y se disgregó mecánicamente agregándole 10 ml de medio de cultivo, se hizo pasar en repetidas ocasiones a través de pipetas pasteur de calibre decreciente hasta obtener una suspensión celular homogénea.

- Se realizó la separación de células mononucleares por gradiente de densidad utilizando una solución con Ficoll (Nycoprep 1.077 g/ml), en un tubo falcon se colocaron 6 ml Nycoprep y encima 12 ml de la suspensión celular, se centrifugó a 800rpm durante 25 min y posteriormente se

recuperaron las células mononucleares de la interfase Nycoprep-medio de cultivo, es decir se formó un botón celular al fondo del tubo falcon.

- Se retiró el sobrenadante y el botón celular se re-suspendió en medio de cultivo D-MEM con 0.37% NaHCO₃, SFB al 10% suplementado con antibiótico-antimicótico y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.

- El botón celular se re-suspendió en 2ml de medio de cultivo para realizar el conteo celular en una cámara Neubauer con el colorante vital azul tripano.

- Las células mononucleares se sembraron en cajas de cultivo multipozos de una densidad de 2.2×10^6 cel/caja, se mantuvieron en incubación en medio α -MEM al 85% suplementado con SFB inactivado al 15% y Antibióticos- Antimicóticos al 1% por 72 hr dentro de una incubadora con una atmosfera de CO₂ al 5%, una temperatura de 37°C y humedad saturada (Figura 32).

- Transcurridas las 72 hr de cultivo se retiró el medio agotado por medio fresco y las células adheridas se mantuvieron en incubación bajo las mismas condiciones descritas anteriormente hasta el cuarto pase celular en donde se obtuvieron CTM's en forma de uso.



Fig. 32 Figura. Obtención de cultivo primario de células óseas

- a) Recuperación de células por centrifugado a 800 rpm durante 25 min b) Cámara de Neubauer c) Siembra de células mononucleares en cajas de cultivo multipozos.

Diferenciación de CTM hacia el linaje osteogénico

El proceso de diferenciación osteogénica se inicio a partir del cuarto pase Celular (Figura 33), las células con apariencia fibroblastoide fueron estimuladas adicionando los siguiente suplementos al medio de cultivo: Dexametasona (100nM), β -Glicerolfosfato (10 mM) y Acido Ascórbico (0.2 mM). Los cultivos semantuvieron durante 3 semanas en incubación cambiando el medio agotadopor medio fresco cada 3-4 días.

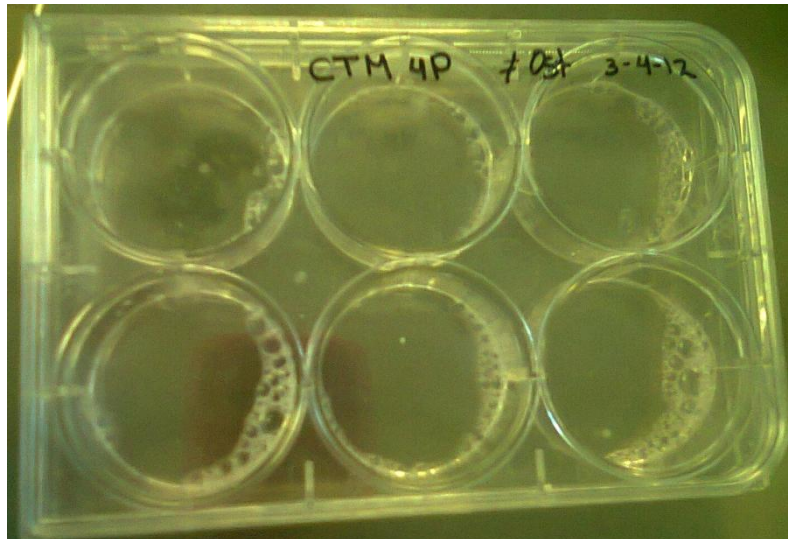


Fig. 33 Diferenciación de CTM hacia el linaje osteogénico a partir del cuarto pase (4P).

La figura 34 es una fotografía de cultivo celular sobre la superficie de una caja petri a tan solo 3 días, en esta se muestra claramente la presencia de los osteocitos distribuidos en toda la superficie. La imagen fue obtenida mediante Microscopía Óptica a 20x.

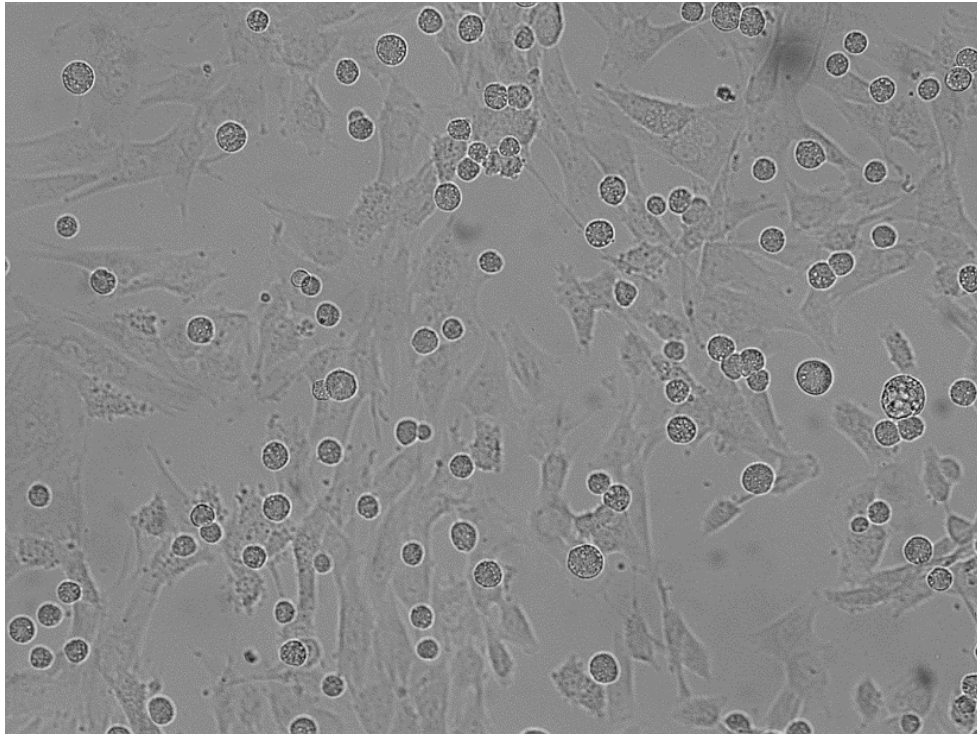


Fig. 34 Microscopia Óptica del Cultivo de Osteocitos.

6.9 Evaluaciones celulares de las matrices

A partir de una biopsia de médula ósea, se obtuvo cultivo primario, iniciando la expansión con 2.2×10^6 células, cultivadas en cajas petri a una densidad de aproximadamente 27,500 cel/ml en medio de cultivo DMEM con 0.37% NaHCO_3 , SFB al 10% suplementado con antibiótico-antimicótico durante 3 semanas.

Siembra de osteocitos sobre las matrices de PLA-HA

Las células diferenciadas a osteocitos se sembraron sobre matrices de 0.5cm^2 de PLA 1.8g – HA0.4g y PLA1.8g–HA1g cubiertas con polipirrol bajo condiciones de cultivo estándar en medio de cultivo osteogénico durante 24 horas, posteriormente se cambió el medio agotado por medio fresco y se mantuvieron en incubación hasta el día de hacer las evaluaciones correspondientes. Las células se cultivaron a una temperatura de 37°C , con 5% de CO_2 y humedad saturada (Figura 35).



Fig. 35 Siembra de osteocitos sobre las matrices de PLA-HA.

Las matrices M9 () y M10 () fueron utilizadas para evaluar la distribución celular mediante SEM de la siguiente manera:

- a) Primero fueron observadas sin medio de cultivo ni osteocitos (para observar distribución original)
- b) Al tercer día se evaluaron en medio de cultivo pero sin osteocitos (control negativo), esto para asegurarse que las matrices no fueron degradadas una vez introducidas en el medio de cultivo.
- c) Se evaluaron las matrices el día 3 y 14 después de haber sembrado las células óseas sobre las éstas, cambiando el medio de cultivo cada 3 días para evitar contaminación o presencia de hongos, bacterias, etc. (Figura 36) Cabe señalar que se eligieron el día 3 y 14 para percibir cambios significativos en el cultivo.

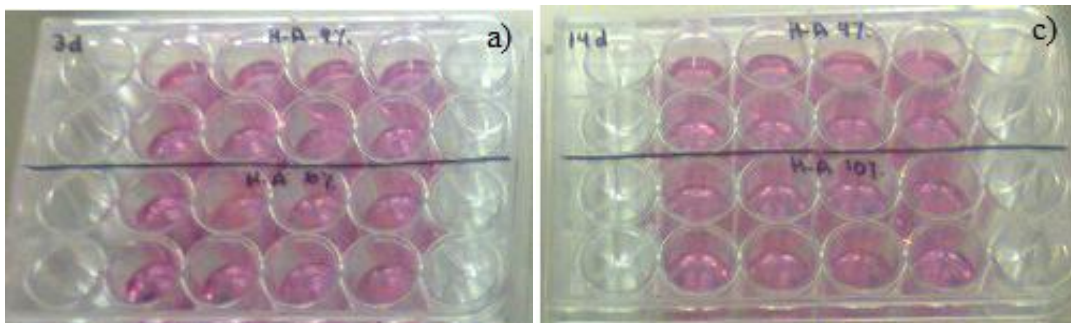


Fig. 36 Cultivo celular en las matrices para los días: a) día 3 b) día 7 c) día 14.

6.10 Caracterización Morfológica de las matrices con osteocitos (MO y SEM)

Para caracterizar morfológicamente las matrices en las cuales se sembraron osteocitos se utilizó Microscopía Electrónica de Barrido, en este caso se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido marca Phillips XL30 del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Antes de observar las muestras biológicas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), fue necesario preparar la muestra, para ello se realizó lo siguiente:

- a. Lavar las muestras con PBS c/antibiótico-antimicótico y fijarlas con glutaldehído al 2.5 % para SEM durante 30 minutos.
- b. Retirar el fijador y lavar nuevamente dos veces con PBS c/antibiótico-antimicótico.
- c. Iniciar el proceso de deshidratación con alcoholes graduales, adicionando alcohol al 50% y dejar reposar durante 5 minutos para posteriormente retirar.
- d. Repetir el proceso anterior pero esta vez con alcohol al 60%, 70%, 80%, 90% y alcohol absoluto, todos estos con intervalos de 5 minutos.
- e. Colocar las muestras en el equipo de punto crítico (Figura 37) en una celda y bajar la temperatura a -15°C , inyectando CO_2 a la muestra y retirarlo después, este proceso se repitió 3 veces para desecar la muestra.
- f. Finalmente se calentó la celda a 42°C y luego se retiró la muestra.



Fig. 37 a) Fijación de la muestra con glutaldehído b) Deshidratación con alcoholes graduales c) Equipo de punto crítico d) Celda del equipo de punto crítico.

A continuación se muestran las figuras correspondientes a las matrices M9 y M10 y sin medio de cultivo ni osteocitos, es decir, se presenta la distribución original de las mismas.

La figura 38 muestra la matriz M9 (PLA 1.8g-HA0.4g) a varios aumentos, en la cual se pueden ver la distribución de fibras que en su mayoría son de PLA de distintos diámetros, cabe aclarar que son fibras de PLA porque no presentan rugosidad, característica específica de las fibras que contienen Hidroxiapatita; aunque se aprecia la presencia de Hidroxiapatita en las zonas blanquizcas, es mucho menor la cantidad de HA comparada con la matriz M10 que se presenta en la figura 39.

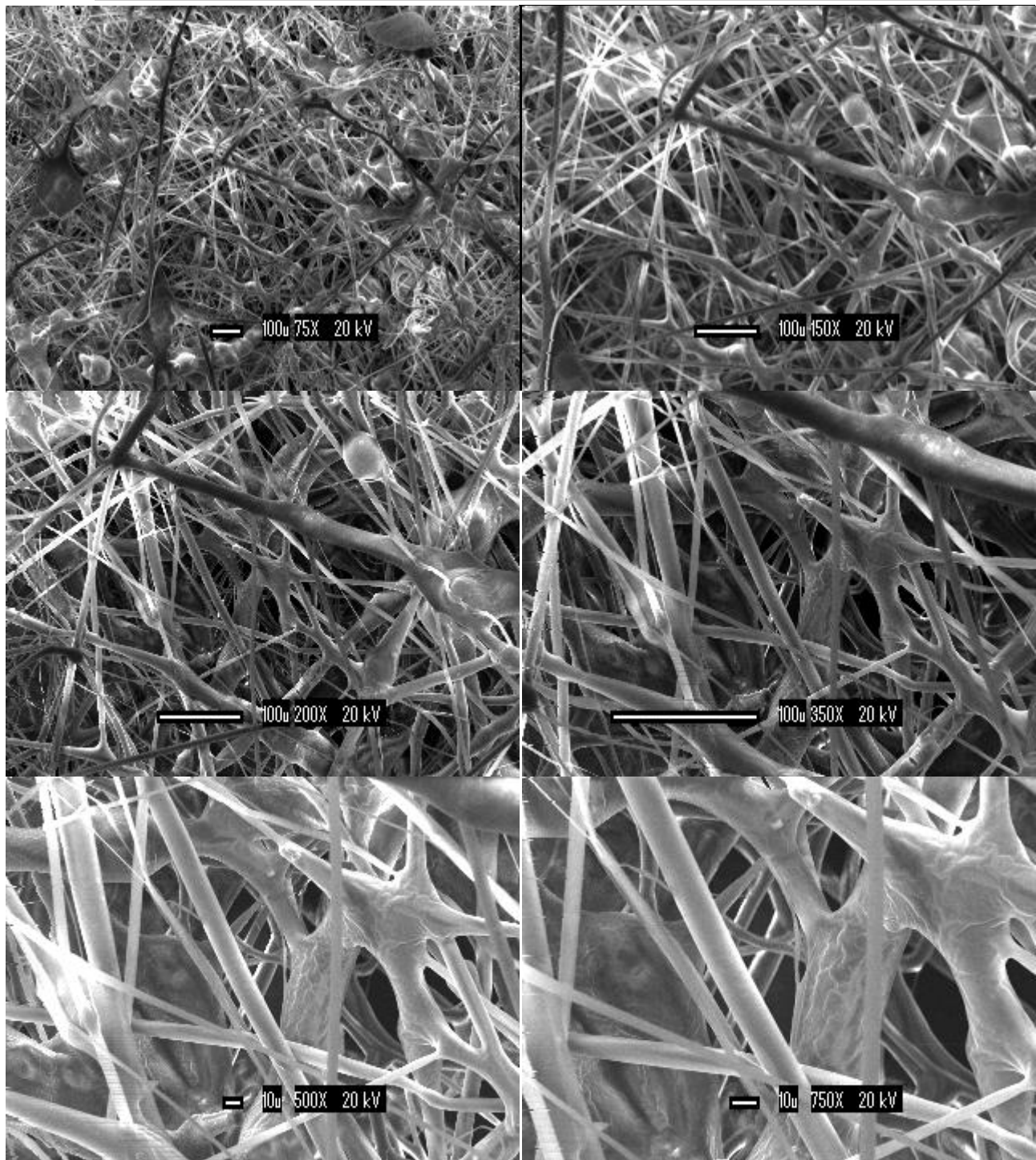


Fig. 38 SEM de la matriz M9 original (PLA 1.8g-HA 0.4g) a distintos aumentos.

La figura 39 muestra la matriz M9 (PLA 1.8g-HA1g), en la cual se pueden ver claramente los agregados de Hidroxiapatita y la distribución de fibras de distintos diámetros con morfología rugosa, también se aprecian fibras de PLA que son más delgadas y lisas.

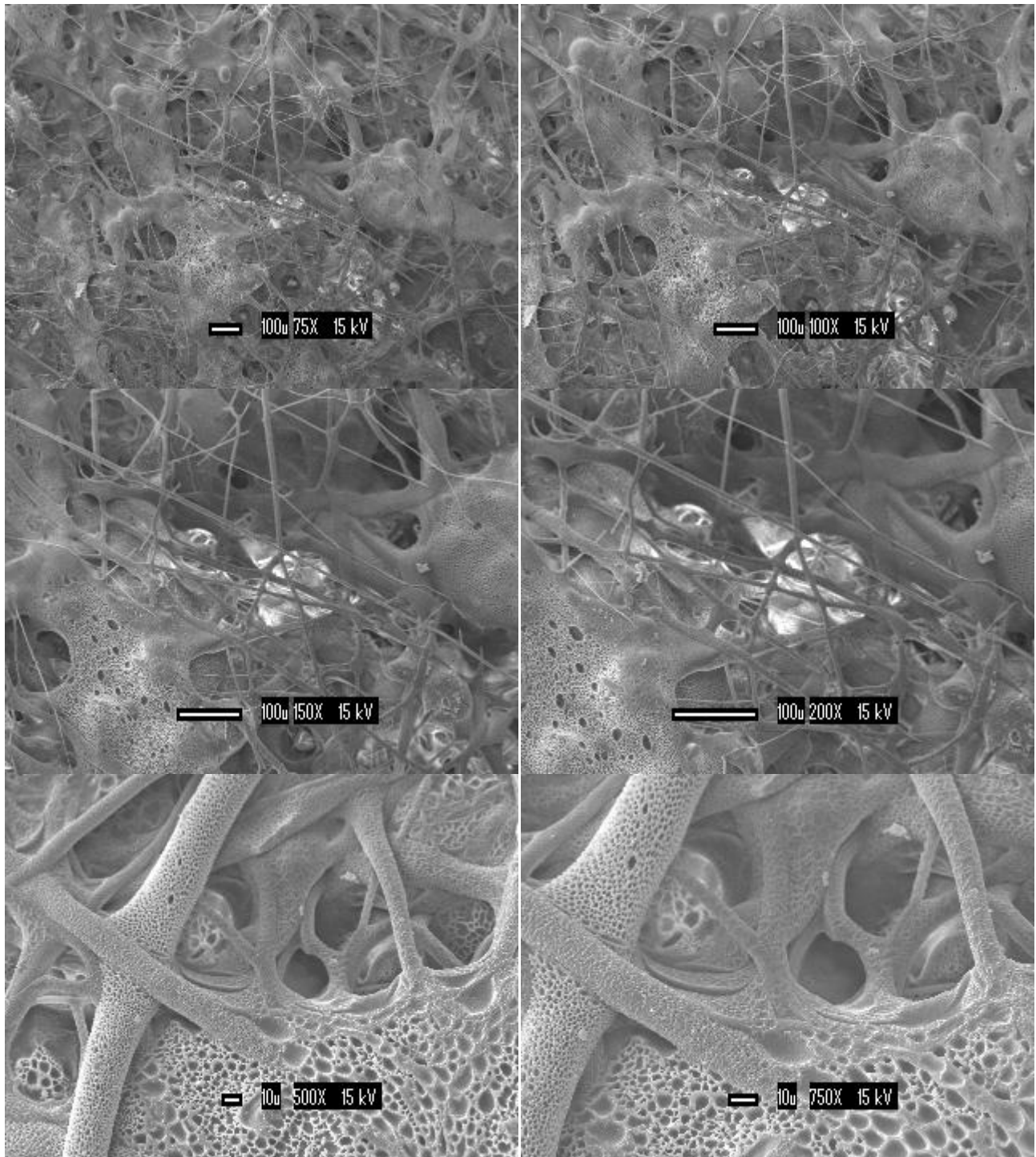


Fig. 39 SEM de la matriz M10 original (PLA 1.8g-HA1g cubierta con PPy) a distintos aumentos.

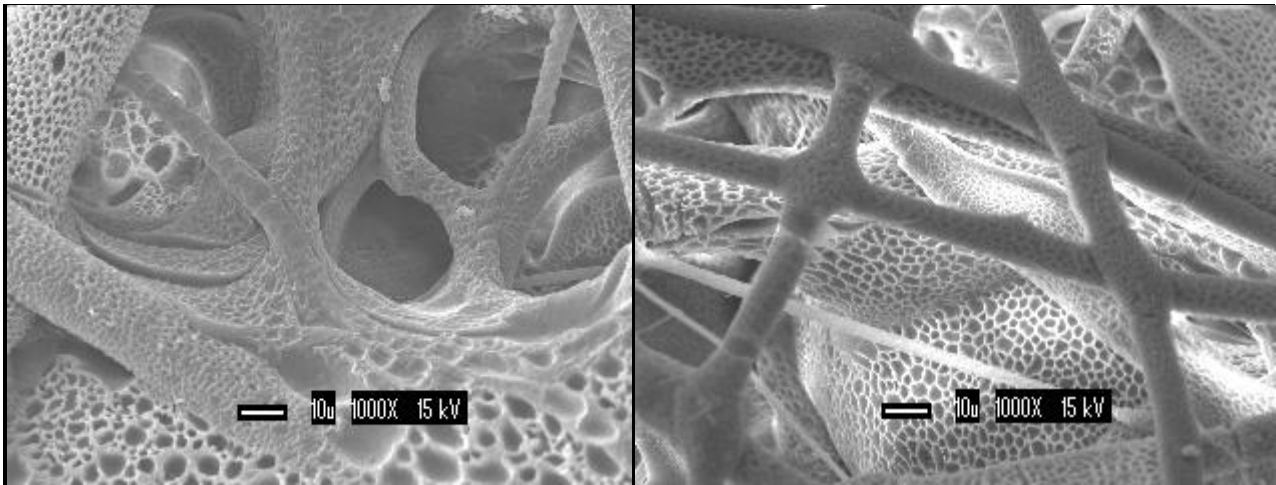


Fig. 40 Continuación de SEM de las matriz M10 original (PLA 1.8g-HA1g con PPy) a distintos aumentos.

A continuación se muestran las figuras correspondientes a las matrices M9 y M10 cubiertas con polipirrol sin osteocitos, esto solo para observar que dichas matrices no se degradaron transcurridos los 3 días después de ser colocadas en medio de cultivo ya que las fibras mantienen la morfología original y no se observan fracturas significativas en las mismas con excepción de M10 (7500X) en la cual se observan mínimas fracturas en las fibras de PLA.

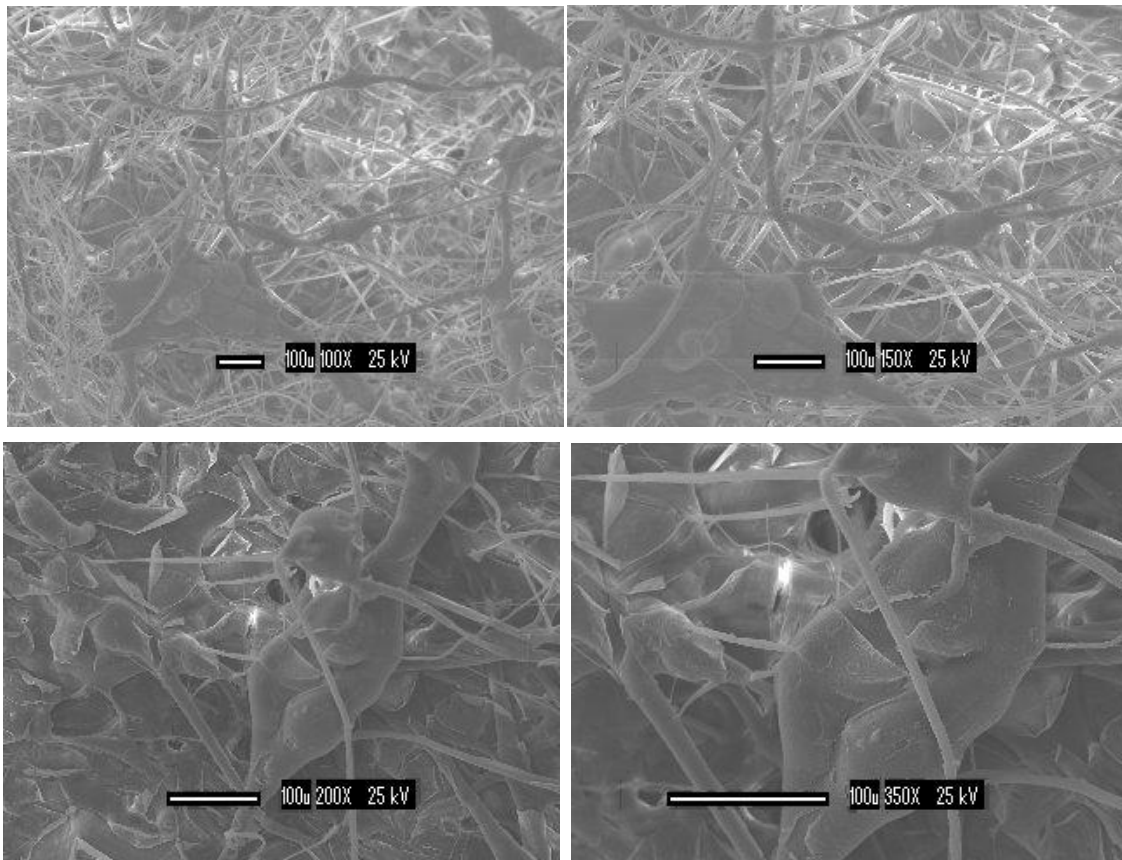


Fig. 41 SEM de M9 en medio de cultivo al tercer día a distintos aumentos.

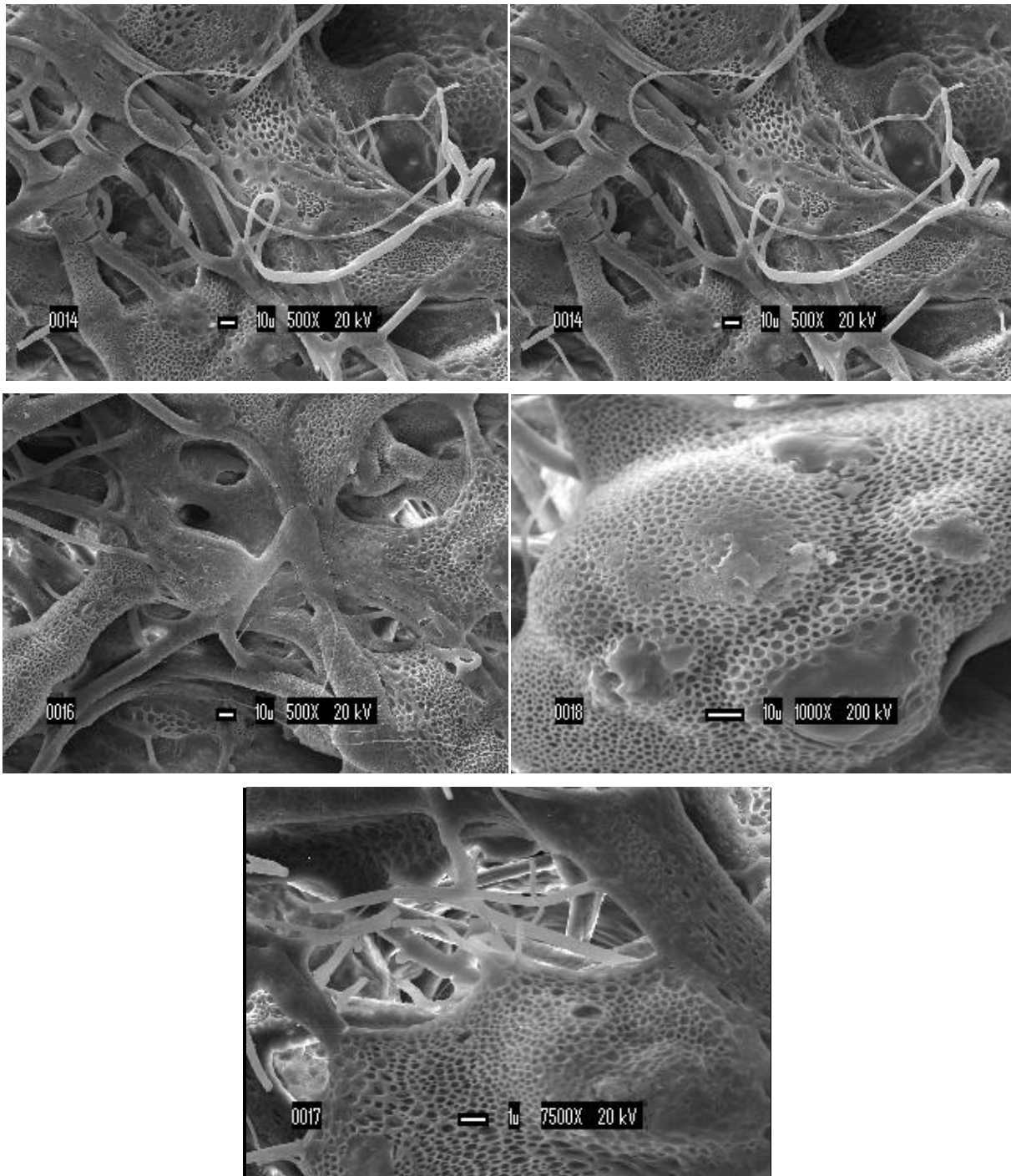


Fig. 42 SEM de M10 en medio de cultivo al tercer día a distintos aumentos.

La figura 43 muestra M9 y M10 con osteocitos cultivadas in vitro durante 3 días; se puede observar que las células adheridas se encuentran principalmente en las fibras de Hidroxiapatita que son las más gruesas, se ve claramente la presencia de los osteocitos que aparecen en un

tono más claro y presentan forma “redonda”, lo que quiere decir que a este tiempo el experimento se mantuvo sin contaminación y las células se adhirieron correctamente a las fibras.

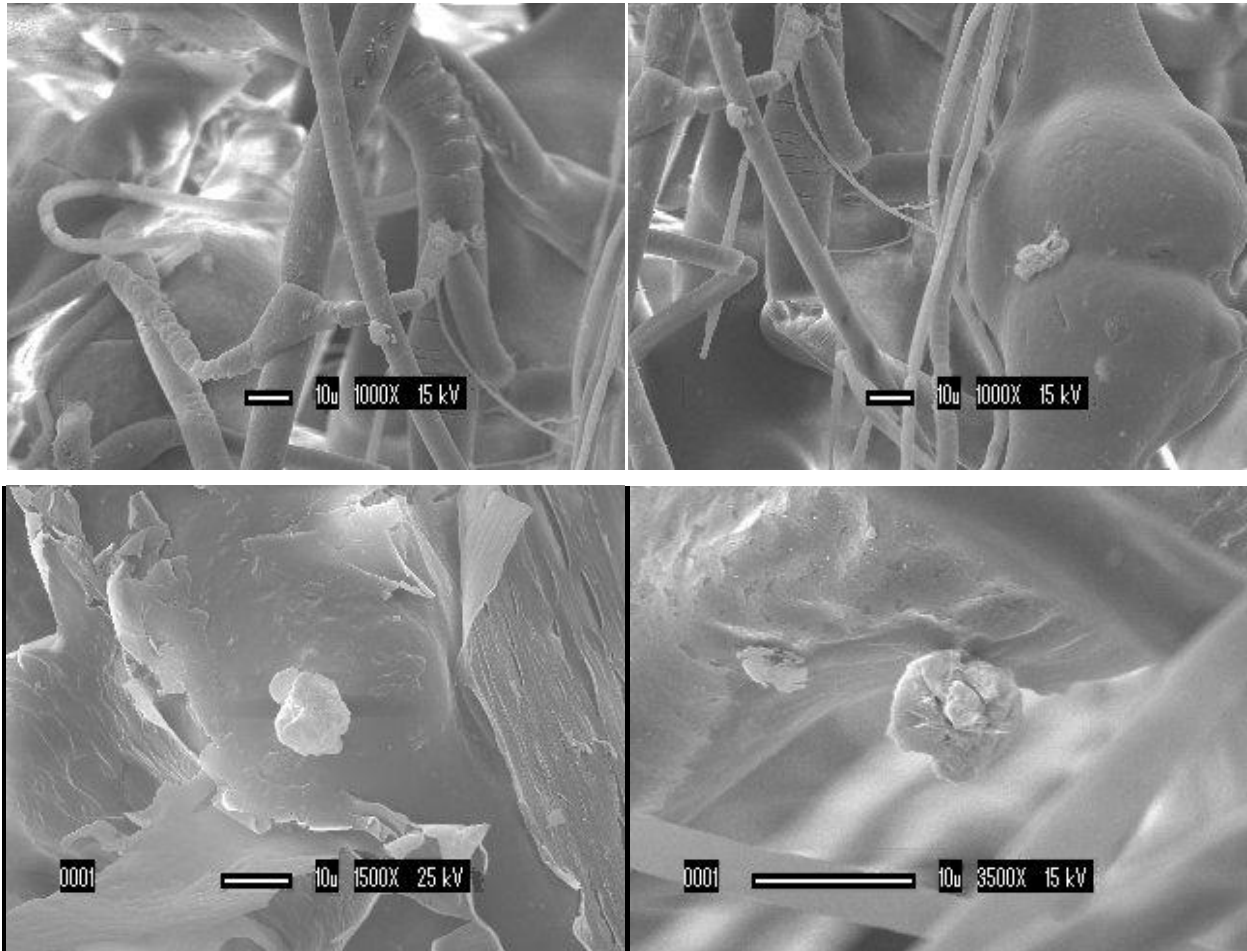


Fig. 43 SEM de M9 con osteocitos al día 3.

La figura 44 muestra M10 con osteocitos cultivadas in vitro durante 3 días; se puede observar que las células adheridas se encuentran principalmente en las zonas donde está la Hidroxiapatita (zonas rugosas) y no sobre las fibras de PLA, en esta matriz aparecen más células que en M9 pero aún son pocas debido al tiempo de cultivo.

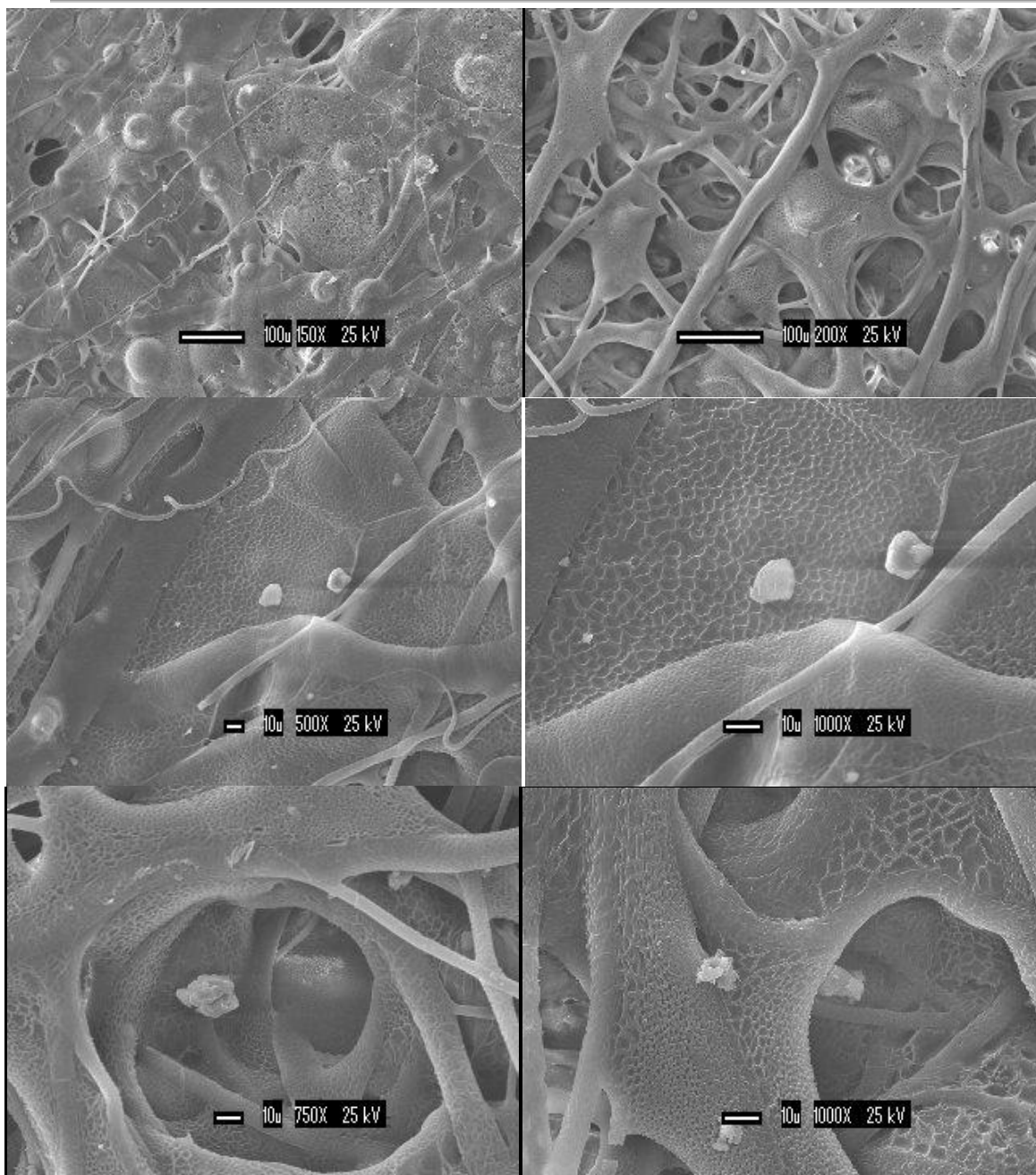


Fig. 44 SEM de M10 con osteocitos al día 3.

La figura 45 muestra M9 con osteocitos cultivadas in vitro durante 14 días; en la cual se observan aglomerados que corresponden a las células junto con el material (zonas blanquizcas) y aparecen también algunas fibras (1500x) pero son menos que en los días iniciales, lo que quiere decir que mientras hay proliferación celular, también el material sufre una degradación, lo cual es normal ya que tanto la Hidroxiapatita como el Acido Poliláctico son biodegradables.

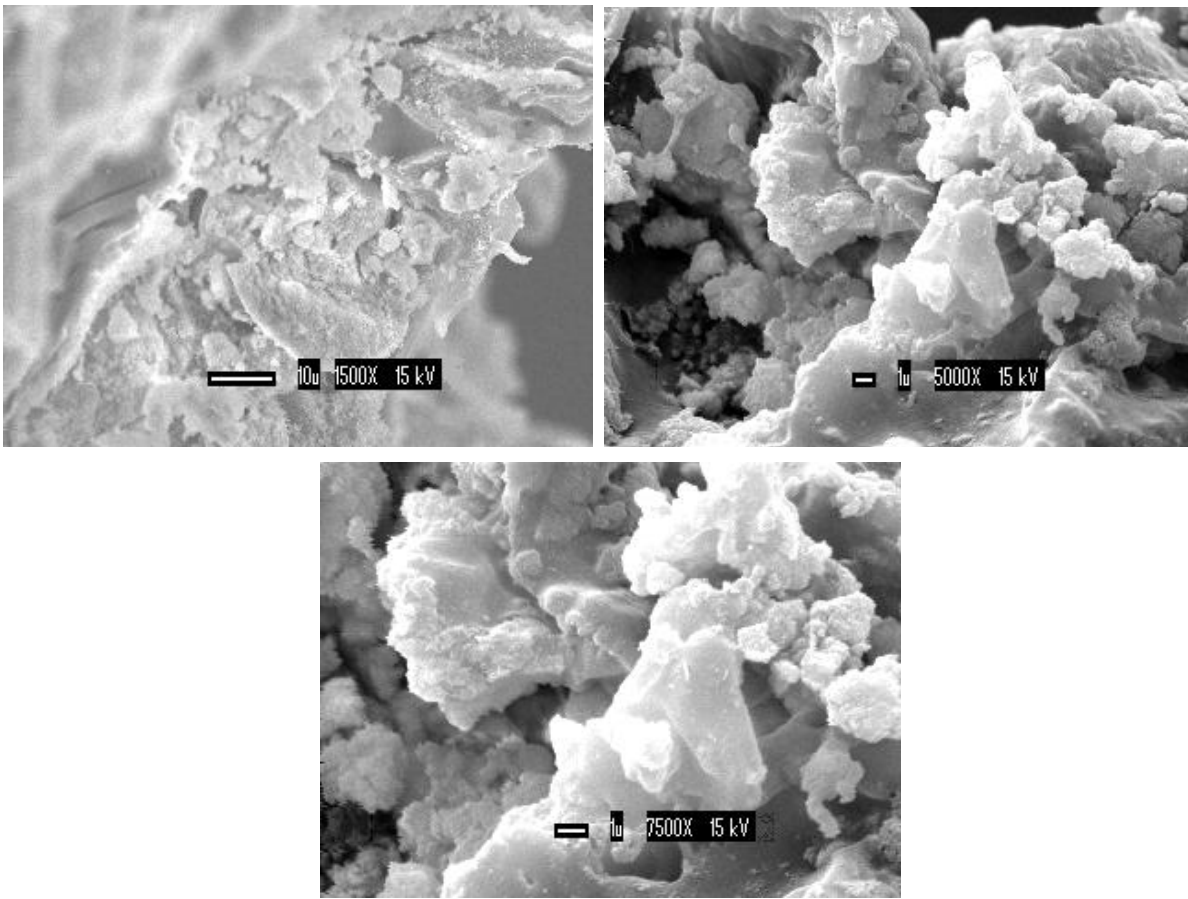


Fig. 45 SEM de M10 con osteocitos al día 14.

Finalmente la figura 46 muestra M10 con osteocitos cultivadas in vitro durante 14 días; se puede observar que las células adheridas se encuentran principalmente en las zonas donde está la Hidroxiapatita y no sobre las fibras de PLA, nuevamente aparecen aglomerados de osteocitos, en esta figura se observa mejor el crecimiento celular debido a que los aumentos no son tan grandes como en M9 (Figura 45).

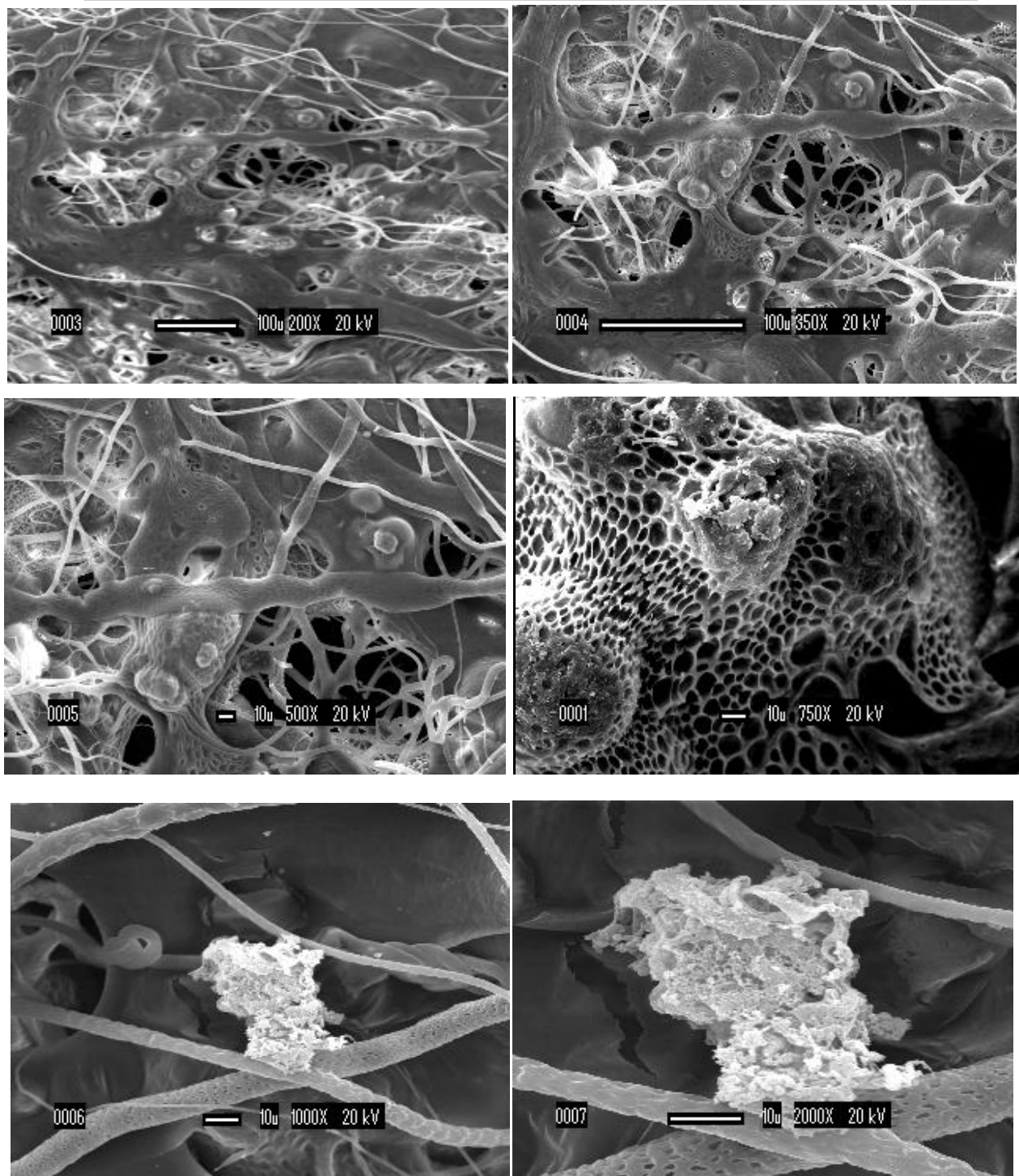


Fig. 46 SEM de M10 con osteocitos al día 14.

CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo confirma que la técnica de Electrospinning produce matrices porosas formadas por fibras de diámetros muy variados, desde 800nm hasta 10 μ m, incluso algunas fibras resultaron con diámetros de hasta 50 μ m; se obtuvieron buenos resultados al inyectar soluciones de PLA-HA, lo cual es de gran relevancia porque la HA se dispersó en gran parte de la superficie de las matrices que la contenían. Al inicio se comenzó inyectando bajo las siguientes condiciones de depósito (tabla 6).

Tabla 5. Concentraciones iniciales de PLA-HA

| PLA(g) | HA(g) |
|--------|-------|
| 1.2 | 0 |
| 1.2 | 0.1 |
| 1.2 | 0.2 |
| 1.2 | 0.3 |
| 1.2 | 0.4 |

Como puede observarse se utilizaron 1.2g de PLA dado que su hilado de manera independiente dio muy buenos resultados. Cuando se agregó HA al PLA, primero se añadió etanol que funciona como cosolvente, es decir, permite que al agregar la HA no se pierda continuidad en los hilos al momento de inyectar la solución; sin embargo, se llega al punto en el cual si se agrega demasiada HA al polímero, este se satura y lo que se obtiene es una solución demasiado espesa y difícil de hilar o en el mejor de los casos, se forman hilos pero también existe la presencia de una gran cantidad de grumos como en la matriz 2 (figura 42).

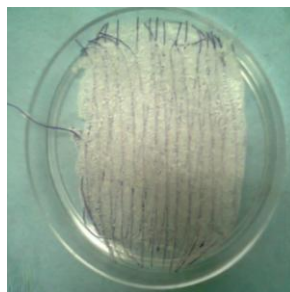


Fig. 47 M2 12% p/v PLA 3% p/v HA 10ml sol.

Se concluye que para 1.2g de PLA, se hiló muy bien con hasta 0.4g de HA. Debido a que se buscó hilar con cantidades mayores de HA, es entonces que también se aumentó la cantidad de PLA, y se halló que hasta que se tenían 1.8g de PLA, el hilado funcionaba correctamente (tabla 7).

Tabla 6. Condiciones finales de PLA-HA.

| PLA(g) | HA(g) |
|--------|-------|
| 1.8 | 0.5 |
| 1.8 | 0.6 |
| 1.8 | 0.7 |
| 1.8 | 0.8 |
| 1.8 | 0.9 |
| 1.8 | 1 |

Y de manera similar, 1.8g de PLA junto con el cosolvente, permiten agregar hasta 1g de HA a la solución para que pueda ser inyectada obteniendo hilos continuos y lo más homogéneo posibles. Otro aspecto importante es el diámetro de la aguja, que fue distinto al trabajar con 1.2g y 1.8g.

La tabla 8 muestra las condiciones de depósito para 1.8g de PLA con 0.4g y 1g de HA respectivamente, siendo esta última la mayor cantidad que se pudo hilar, lo cual arrojó como resultado un porcentaje de HA de 18.1% y 35.7% que son bastante considerables para ser el inicio de un proyecto en el que se quiere generar tejido óseo sintético.

Tabla 7. Condiciones de las matrices

| Muestra | Concentración | | Volumen | | | |
|------------|---------------|-------|---------|-----------|---------|------|
| | Sólidos | | de | Inyectado | Voltaje | |
| | PLA(g) | HA(g) | (g/ml) | (ml) | %HA | (KV) |
| M9 | 1.8 | 0.4 | 0.22 | 20 | 18.1 | 30 |
| M10 | 1.8 | 1 | 0.28 | 20 | 35.7 | 30 |

La técnica de electrohilado dio buenos resultados al hilar soluciones de Ácido Poliláctico con Hidroxiapatita, obteniéndose matrices con morfologías homogéneas con hilos continuos y con pocos grumos. El tamaño de poro de dichas matrices fue de micras, lo cual es aceptable para la proliferación de osteocitos. Como se esperaba, se pudieron combinar las propiedades del Ácido Poliláctico con las de la Hidroxiapatita, dando como resultado matrices resistentes pero no frágiles. La biocompatibilidad de ambos componentes y la presencia de Polipirrol en éstas

permitieron utilizar las matrices para cultivar células óseas in vitro, consiguiendo buena adhesión y proliferación celular.

La versatilidad de esta técnica demuestra que es fácil controlar las condiciones de depósito con las que se quiera trabajar, ya que se puede modificar el voltaje entre los electrodos, el tipo y cantidad de solución que se quiere inyectar, la distancia entre los electrodos, el diámetro de la aguja, la velocidad de rotación del colector, etc., factores que son críticos al momento de hilar una solución, por ejemplo, el hecho de poder variar la cantidad de HA como se requiera, es una gran ventaja ya que da pauta para la producción de un biomaterial que ofrezca una alternativa para la reparación de tejido óseo, ya que se cuenta con la parte polimérica que provee cierta elasticidad al material y la parte cerámica que influye en la dureza del material y además representa la parte inorgánica que debe poseer dicho material cuando se tiene como objetivo generar tejido óseo sintético.

Por su parte, la técnica de Polimerización por Plasma definitivamente modificó las propiedades superficiales de las matrices tanto morfológica como químicamente, recordando que el polímero base en esta reacción fue el polipirrol, esto se pudo observar primero porque dichas matrices presentaron una textura dura pero maleable de manera que se pudieron manipular con facilidad; además, químicamente se demuestra que la presencia de polipirrol en dichas matrices estimuló el crecimiento de y adhesión de células óseas en las mismas. Otro aspecto importante es que estos materiales son biocompatibles, lo cual se reflejó en la ausencia de toxicidad en el cultivo celular.

TRABAJO FUTURO

Debido a que se obtuvieron buenos resultados en la proliferación celular in vitro dentro de las matrices de PLA e HA, se procederá a utilizar piezas como las que aparecen en la figura 48 , son tornillos que presentan un tamaño similar al fémur de un conejo, esto con la finalidad de revestir dichos tornillos con las matrices de PLA e HA cubiertas con polipirrol e insertarlos en conejo y observar si hay proliferación celular y a su vez regeneración de tejido óseo in vivo, es decir, se construirá neot Tejido óseo en conejo considerando dos aspectos básicos: promover la oseointegración entre el material implantado y el tejido natural y realizar una fijación mecánicamente funcional.



**Fig. 48 a) Tornillo fijo a los extremos del fémur de un conejo b) Tornillo cubierto con PLA-HA
c) Tornillo cubierto con PLA-HA polimerizado por Plasma**

Un aspecto importante es que también se insertarán las matrices sin el tornillo, para lo cual será necesario hacer un pequeño barreno (Ejemplo: Figura 49) en hueso de conejo y evaluarlo durante algún tiempo mediante estudios histomorfológicos, esto con el objeto de observar si el material se adhiere al hueso natural y si hay formación de tejido óseo que ayude a reconstruir el defecto.



Fig. 49 Barreno en hueso de conejo para introducción de biomaterial de PLA-HA

Transcurrido el tiempo habrá que extraer el material y evaluarlo mecánicamente, esto debido a que el propósito es reparar segmentos de hueso largo y que están expuestos a cargas considerables.

Dicha evaluación consistirá en emplear fuerzas centradas de tensión y compresión de tipo normal y de cizallamiento cada una, siendo la fuerza normal aquella fuerza por unidad de área que actúa perpendicularmente al área en cuestión; mientras que la fuerza de cizallamiento es la fuerza por unidad de área que actúa paralela al área en cuestión. Por supuesto, estas pruebas también se harán en hueso de conejo para realizar comparaciones entre las características mecánicas del hueso natural y del biomaterial propuesto con ayuda de curvas tensión-deformación que a su vez darán idea de si el material es candidato a ser implantado o necesita ser modificado.

ANEXO A

JSM-7600F Microscopio Electrónico de Barrido

El JSM-7600F es un Estado de la técnica térmica FE-SEM que combina con éxito la imagen de resolución ultra alta con funcionalidad analítica optimizada. Además, el JSM-7600F incorpora una cámara para muestra grande. Esta cámara de diseño exclusivo que adapta un espécimen de 200 mm de diámetro, está optimizada para una gran variedad de detectores de electrones secundarios, electrones retrodispersados, EDS, WDS, EBSD, CL, etc.



Características

- Ultra alta resolución comparable a la de cátodo frío FE-SEM.
- En-lente térmica FEG.
- Ángulo de abertura del objetivo de control que optimiza automáticamente el tamaño del punto, tanto en las corrientes altas y bajas como para el análisis y la creación de imágenes.
- Sonda de alta corriente de hasta 200 nA (a 15 kV) para diversos fines analíticos (WDS, EDS, EBSD, CL, etc)
- Diseño R-filtro que permite la mezcla seleccionable por el usuario, de imágenes de electrones secundarios y de electrones retrodispersados.
- El modo de haz suave para obtener imágenes de la parte superior de la superficie, el deterioro del haz reducido y la supresión de carga.

Diseño ecológico para la conservación de la energía.

7600F JSM-Especificaciones

| | | | |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| SEI resolución | 1.5 nm (1 kV) en el modo de GB, 1.0 nm (15 kV) | | |
| Aumento | 25 a 1.000.000 x (impreso como 120 mm x 90 mm micrografía) | | |
| Tensión de aceleración | 0,1 a 30 kV | | |
| Corriente de haz | 1 pA a 200 nA a 15 kV | | |
| Ángulo de apertura del control de la lente | Integrado | | |
| Detector | Detectores de superior e inferior | | |
| Filtro de Energía | Nueva R-filtro | | |
| Haz suave | Integrado | | |
| Las imágenes digitales | 1280 x 960, 2.560 x 1.920, 5.120 x 3.840 | | |
| Muestra cámara de intercambio | Un solo paso de carga / descarga | | |
| Platina | Eucentrico, 5 ejes motor | | |
| Tipo | IA | II | III |
| XY | 70 mm x 50 mm | 110 mm x 80 mm | 140 mm x 80 mm |
| Inclinar | -5 A 70 ° | -5 A 70 ° | -5 A 70 ° |
| Rotación | 360 ° | 360 ° | 360 ° |
| Distancia de trabajo | 1,5 mm a 25 mm | 1,5 mm a 25 mm | 1,5 mm a 25 mm |
| Sistema de vacío | 2 SIP, TMP cojinete magnético, RP | | |
| Eficiente de la energía de Diseño | Funcionamiento normal: 1,2 KVA El modo de espera: 1 KVA Utilización por el sistema: 0,76 kVA | | |

MICROSCOPIO ÓPTICO LEICA DLMP



Debido a su flexibilidad, el Leica DLMP satisface las necesidades de exámenes avanzados donde se requiere equipos de alta calidad de polarización. Hay muchas configuraciones diferentes disponibles.

Características

Cinco posiciones Revólver centrable

El Leica DLMP cuenta con un revólver de cinco posiciones centrable. El microscopio puede ser equipado con diferentes objetivos para tareas específicas.

Conoscopía flexible

El **módulo avanzado** con lente centrable, enfocable Bertrand, de agujero de alfiler, y campo de visión ampliado es ideal para las configuraciones de luz transmitida y luz incidente microscopio.

Dos **módulos estándar** con lentes centrables, Bertrand enfocable o pre-enfocada lente Bertrand única, integrada en el analizador, y el agujero integrados, adecuados para la transmisión y configuraciones de luz del microscopio.

Un cubo de lente de Bertrand centrable y pre-enfocado para las configuraciones de microscopio con un eje de luz incidente.

Equipo de polarización

El Leica DLMP tiene un sistema de polarización diseñado de acuerdo con la norma DIN 58.

REFERENCIAS

- Adachi T., Osako Y., Tanaka M. (2006). Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. *Biomaterials*. 27:3964-3972.
- Agrawal C., Ray R. (2001). Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res*: 55 (2):141-150.
- Almirall A., Larrecq G. (2004). Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an alpha-TCP paste. *Biomaterials*. 25(17):3671-3680.
- Avérous L. (2008). Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications. 21, 433-435.
- Baar A, Ibáñez A. Grafts and bone substitutes, and osteoconductive substances: state of the art. *Revista chil. ortop. traumatol*;47(1):7-23, 2006
- Barrere G., et al.(2008). Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *J Materials Science and Engineering*. 59, 38-71.
- Beck F.y Oberst M. (1990). *J. Electroanal. Chem*. 285:77.
- Boonchoat P., Tapaneeyakorn K., Bhanthumnavin W. (2010). AC plasma polymerization of pyrrole. *Surface & coatings technology*.
- Boskey A. (1997). Amorphous calcium phosphate: the contention of bone. *Journal of Dental Research*. Vol. 76 No 8, 1433-1439.
- Butler M. (2004). *Animal Cell Culture and technology*. Ediciones The Basics, 2002, Cap. 2 y 5. 11-26 y 47-66.
- Cara JA., Cañadell J. (1994). Limb salvage for malignant bone tumors in young children. *J Pediatr Orthopaedics*. 14: 112-8.
- Cerroni G., et al. (2002). Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study. *Biomolecular engineering*. 12,2:56-70.
- Chungara., (2000). Patologías óseas, traumas y otros atributos en el grupo arcaico demorro de arica, norte de Chile. *Revista de Antropología Chilena*. 32: 79-83.
- Cook S., et al (1988). Hydroxyapatite-coated titanium for orthopaedic implant

applications. Clin Orthop. 232, 225-243.

Cortés R, Castañeda G, Tercero G. (2011). Complicaciones asociadas al uso de las endoprótesis tumorales no convencionales "RC-10". Investigación materno infantil Vol. III, No. 1 pp 36-40.

Cowie J. (1991). Polymers: Chemistry & Physics of Modern Materials, Chapman & Hall, New Delhi.

Enneking WF, Dunham W, Gebhardt MC, Malawar M, Pritchard DJ.(1993). A system for the functional evaluation of reconstructive procedures after surgical treatment of tumors of the musculoskeletal system. Clinical Orthopaedics and Related Research. 286: 241-6.

Fernández O., (2003). Polímeros conductores: síntesis, propiedades y aplicaciones electroquímicas. Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol 4(4).

Fong H., Reneker D. (2001). Electrospinning and formation of nanofibers. Salem DR, editor. Structure formation in polymeric fibers. 225-246.

Formhals A. (1934). US patent 1,975,504.

Fulmer M., Ison I.(2002). Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. Biomaterials. 23, 751-755.

Galbusera F., Bertolazzi L. (2009). Combined computational study of mechanical behavior and drug delivery from a porous, hydroxyapatite-based bone graft. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology. 8:209-216.

Garlotta D. (2002). A literature review of Poly (Lactic Acid). Journal of Polymers and the Environment, 9 (2).

Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. J Am Acad Orthoped Surg 3:1-8, 1995.

Gil H., Ginebra T., Planell N. (2008). Biomateriales. Elisava TdD.

Grimer RJ., Carter SR., Tillman RM., Sneath RS., Walker PS., Unwin PS., Shewell PC. (1999). Endoprosthetic replacement of the proximal tibia. J Bone Joint Surg. 81-B: 488-94.

Groot K. (1980). Bioceramis consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials*.2, 34-41.

Hardingham T., Tew S., and Murdoch A.(2002). Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res*. 4, S63-S68.

Hartmann M. (1998). *Biopolymers from Renewable Resources*. D.L. Kaplan (Ed.) 367-411.

Hasegawa S., Ishii S., Tamura J. (2006). A 5-7 year in vivo study of high-strength hydroxyapatite/poly (l-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures. *Biomaterials*. 27,3:167-177.

Herman B. and Lemasters J. (1993). *Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications*. Academic Press. 441.

Hoffer FA.(2002).Primary skeletal neoplasms: osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*. 13(4): 231-40.

Ichikawa F., Kobayashi M. (1995). U.S. Patent 5, 440, 008.

Ignjatovic N., Uskokovic D. (2004). Synthesis and application of hydroxyapatite/polylactide composite biomaterial. *Applied Surface Science*. 1:19-25.

Ikada D.(2006). Challenges in tissue engineering. En *Journal of The Royal Society Interface*. Reviews, 589-601.

Ivanova T., Frank K., O. V. (2001). Crystal structure of calcium-deficient carbonated hydroxyapatite. Thermal descomposition. *Journal of Solid State Chemistry*. 160, 340-349.

J. Austria, E. Severiano, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, L.E. Gómez-Quiroz, M.C. Gutiérrez-Ruíz, R. Olayo. (2008). Plasma surface modification of nanofibers obtained by electrospinning, 1st US-Mexico Symposium on advances in polymer science, Macromex, Los Cabos, Baja California, Méx. TGN-P-011. ISBN 978-970-764-613-1.

J.P. Vidalain. (2004). Corail stem long term results based on the 15-year artro group experience. In: J. A. Epinette, M.T. Manley, eds. *Fifteen years of clinical experience with hydroxyapatite coatings in joint arthroplast*. 217-224.

Jae Y., Bashur C., Goldstein A. (2009). Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*. 30: 4325-4335.

Janes-Hedder H., Keene N. (2002). *Childhood cancer. A parent's guide to solid tumor cancers*. Second edition. O'Reilly Cambridge 1: 164-181.

Jia Y., Gong J. (2006). Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydrate Polymers*. 1-7.

Kawai A, Healey JH, Boland PJ, Athanasian EA, Jeong DG.(1999). A rotating-hinge knee replacement for malignant tumors of the femur and tibia. *J Arthroplasty*.14(2): 187-96.

Kim B. S., Baez C. E. and Atala A. (2000). *Biomaterials for tissue engineering*. World Journal of Urology. Vol. 18, 2-9.

Kim H., Kim H. E., and Salih V. (2005). Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 26, 5221-5230.

Kim S.S., Sun M., Jeon O. (2006). Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 27, 1399-1409.

Kitsugi T., Yamamuro T., Nakamura T. (1995). Transmission electron microscopy observations at the interface of bone and four types of calcium phosphate ceramics with different calcium/phosphorus molar ratios. *Biomaterials*. 16,3:12-22.

Krause P., Lugg T. (1989). *J. Electrochem. Soc.* 5, 136,1989, 1379-1385.

Kuboki Y., Takita H. (1998). BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and non feasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res*: 39 (2):190-199.

Lane JM., Hurson B., Boland PJ., Glasser DB. (1986). Osteogenic sarcoma. *Clin Orthop*. 204: 93-110.

Langer R., Vacanti J.P.(1993). *Tissue engineering science*. 260, 920-926).

Levy O., Copeland. S. (2006). Cementless surface replacement arthroplasty (Copeland (SRA)) for osteoarthritis of the shoulder. *J. Shoulder Elbow Surg*. 13, 266-271.

López M., Echavarría A., Suárez R. and Herrera N. (2003). Hidroxiapatita macroporosa obtenida en la Universidad de Antioquia: síntesis, caracterización y comparación con el hueso esponjoso y calcinado de bovino. *Revista Facultad de Ingeniería*. 30, 109-124.

M.J.Cross, E.N. Parish. (2005). A hydroxyapatite-coated total knee replacement: prospective analysis of 1000 patients. *J. Bone Joint*. 87, 1073-1076.

Malawer MM, Chou LB. (1995). Prosthetic survival and clinical results with use of large-segment replacements in the treatment of high-grade bone sarcomas. *J Bone and Joint Surgery* 1995. 77-A(8): 1154-65.

Marinaa N., Gebhardt M., Teotc L., Gorlickd R. (2004). Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *The Oncologist*. 9(4): 422-41.

Mejía AJM, Flores AH. (2002) Edad de aparición de los diferentes tumores malignos en la infancia. Fajardo GA. *Cáncer en el niño. Epidemiología descriptiva*. Ediciones Cuellar. México, 289-310.

Meyer U., Meyer Th., Handschel J., (2009). *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine*.

Okumura M., Ohgushi H., Tamai S.(1991). Bonding osteogénesis in coralline hydroxyapatite combined with bone marrow cells. *Biomaterials*. 2, 56-65.

Parks J., and Lakes R. (1992). *Biomaterials: an introduction*.

Pat C., Jma K. (1990). Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. *Biomaterials*. 1,2, 223-228.

Pierz KA, Womer RB, Dormans JP. (2001). Pediatric bone tumors: osteosarcoma, Ewing's sarcoma, and chondrosarcoma associated with multiple hereditary osteochondromatosis. *Journal of Pediatric Orthopedics*. 21: 412-8.

Qiu Q.. (1999). Bioactive ceramic: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 20:45-52.

Ramakrishna S., Fijihara K., Teo W.E. (2005). *An introduction Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific. 90.

Ratner B., and Hoffman A. (1996). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic Press. 473.

Rincón M., Rodríguez A., Londoño M.E., y Echavarría A. (2007). Fabricación y caracterización de una matriz tridimensional de hidroxiapatita macroporosa para aplicación en ingeniería de tejidos óseos. *Revista EIA*, ISSN 1794-1237. 7, 87-95.

Robertson A., Lavalette D. (2005). The hydroxyapatite-coated JRI Furlong hip: outcome in patients under the age of 55 years. *J. Bone Joint.* 87, 12-15.

Rodríguez L. and Vallet R. (2000). Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. *Chem. Mater.* 12, 2460-2465.

Roth S. (1989). *Material Science Forum*. J. Plochanski, S. Roth (Ed.), Trans. Tech, Publications, Suiza.

Ruimerman R., Huiskes R. (2009). Development of a unifying theory for mechanical adaptation and maintenance of trabecular bone. *Theoretical Issues in Ergonomics Science.* 6, 3-4: 225-238.

Salgado A., Coutinho O. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 4(8):743-765.

Sanz-Herrera J., Garcia J. (2009). On scaffold designing for bone regeneration: a computational multiscale approach. *Acta Biomateriales.* 5:219-229.

Shieh S., Vacanti J. (2005). State of the art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *137 (1):*1-7.

Shikinami Y., Okuno M. (1999). Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite particles and poly-a-lactide: part I. Basic characteristics. *Biomaterials.* 20:53-62.

Trécant M. (1994). Mechanical changes in macro-porous calcium phosphate ceramics after implantation in bone. *Clinical Materials.* 15,3:12-22.

Valencia H., Morales C. () Determinación del tiempo de reabsorción de una matriz de ácido poliláctico utilizada como sustituto óseo en cavidades preparadas en tibias de conejo. Universidad del Valle, Cali.

Vázquez M. (2004). Tesis: Síntesis por plasma y caracterización de compuestos derivados de poliacetileno. Instituto Politécnico Nacional. ESIQIE.

Wang H., Lu X., Zhao Y. (2006). Preparation and characterization of ZnS: Cu/PVA composite nanofibers via electrospinning. *Materials Letter*. 60:2480-2484.

Wei G., Ma P. (2003). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 25, 4749-4957.

Weir NA., Buchanan FJ., Orr J., Boyd A. (2004). Processing, annealing and sterilisation of poly lactide. *Biomaterials*. 25, 1:45-52.

Wenguo Cui, Xiaohong Li, Chengying Xie., (2010), Hydroxyapatite nucleation and growth mechanism on electrospun fibers functionalized with different chemical groups and their combinations.

Williams R. y Elliot J. *Bioquímica dental básica y aplicada*. El Manual Moderno. México. ISBN. 316

Zhong-Hua Q., Hao Y., Zhang Y., Chen Y. (2011). Study of effect of mixed solvings (chloroform/ethanol) in Electrospun of poly (lactic acid). University of Donghua, Shanghai.

Zongjian Y., Yuan H. (1996). Osteogenesis in extraskelally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials*. 17, 1:9-30.