



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

**“ANDAMIO BASADO EN PLA-PCL-PPY-I-AG PARA LA REPARACIÓN DE LESIONES
CONDRALES: EXPERIMENTOS IN VIVO.”**

TESIS

QUE PRESENTA

M.C. NANCY CECILIA ISLAS ARTEAGA.

MATRÍCULA 2113802325

nekra321@hotmail.com

**PARA OBTENER GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
(INGENIERÍA BIOMÉDICA)**

DIRECTORES DE TESIS: DR. ROBERTO OLAYO GONZÁLEZ.

DRA. ATLÁNTIDA MARGARITA RAYA RIVERA.

JURADO:

PRESIDENTE: DR. RICARDO VERA GRACIANO.

SECRETARIO: DR. HUMBERTO VÁZQUEZ TORRES.

VOCAL: DR. JUAN VALERIO CAUCH RODRÍGUEZ.

VOCAL: DR. BIRZABITH MENDOZA NOVELO.

CIUDAD DE MÉXICO, 21 DE SEPTIEMBRE DE 2023.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por todas las experiencias adquiridas durante mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo financiero a través de la beca de doctorado, CVU 413075.

Al Dr. Roberto Olayo González del Departamento de Física de la Universidad Autónoma Metropolitana y la Dra. Atlántida Margarita Raya Rivera del departamento de Ingeniería de tejidos del Hospital Infantil de México Federico Gómez por la dirección y apoyo para la conclusión de este trabajo.

Al Dr. Diego Ricardo Esquiliano Rendón del departamento de Ingeniería de tejidos del Hospital Infantil de México Federico Gómez por su colaboración y apoyo en los experimentos in vivo.

Al MVZ. Raúl Castro Luna encargado del Bioterio del Hospital Infantil de México Federico Gómez por su colaboración en los experimentos in vivo.

A la Dra. Patricia G. Ontiveros Nevares del Departamento de Patología del Hospital del Niño y el Adolescente Morelenses, por su colaboración en la realización de pruebas de histología e inmunohistoquímica.

Al Dr. Juan Morales Corona del Departamento de Física de la Universidad Autónoma Metropolitana, por la asesoría en el recubrimiento superficial mediante polimerización por plasma de las matrices poliméricas.

DEDICATORIAS

A mis amadas hijas Dana y Fernanda, así como a mi querido esposo Roni por todo su amor, paciencia y motivación para concluir con este trabajo.

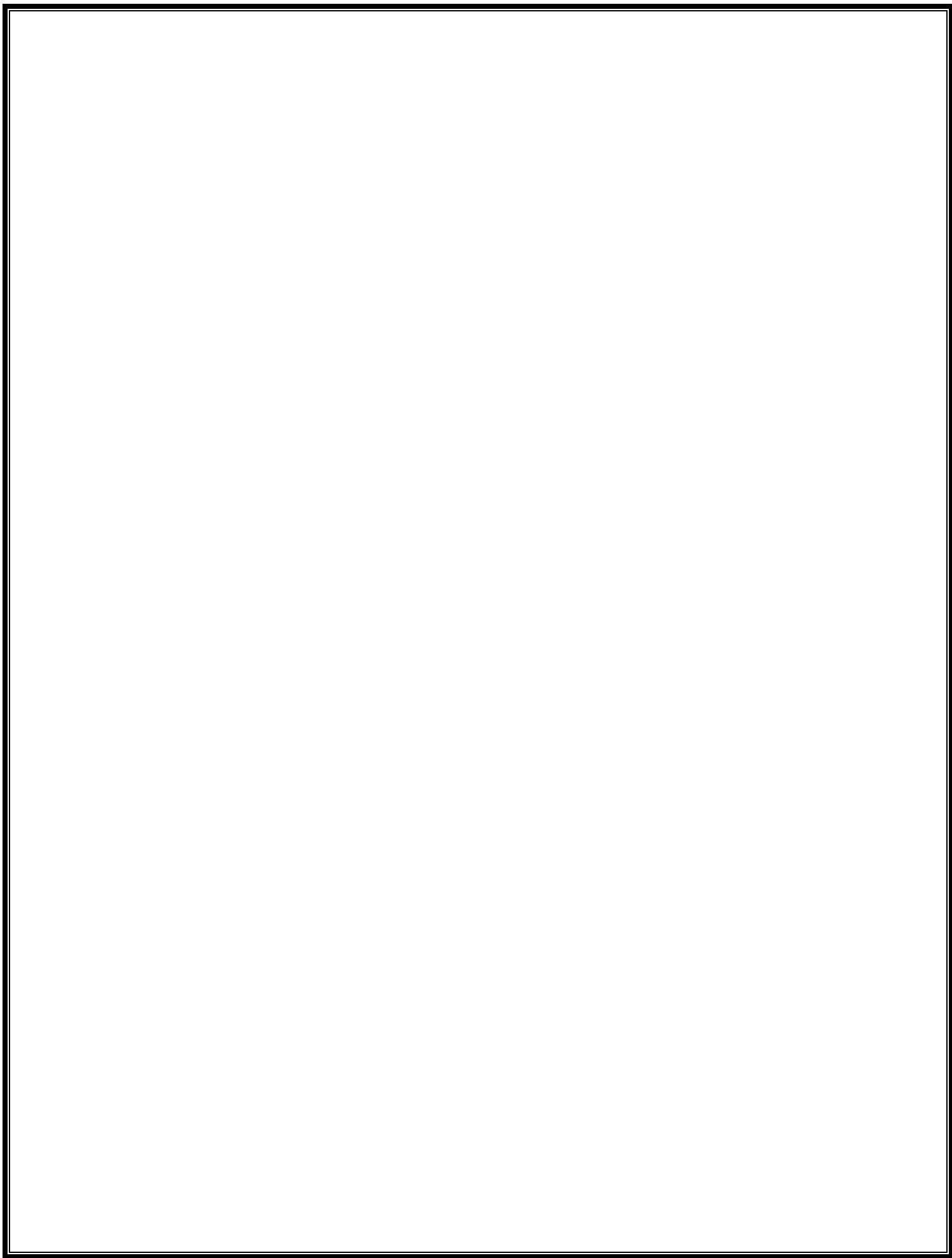
A mamá y papá por su fortaleza y amor que iluminan cada etapa de mi vida.

A Jorge y Oscar mis compañeros de vida con los que he reído, llorado y compartido momentos inolvidables.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
CAPÍTULO 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ANTECEDENTES.	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	6
ANTECEDENTES.....	7
PREVALENCIA.	7
TRATAMIENTOS PARA LA REPARACIÓN DE LESIONES.	7
INGENIERÍA DE TEJIDOS COMO ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO A LAS LESIONES DE CARTÍLAGO.....	8
ELECTROHILADO COMO TÉCNICA PARA ELABORACIÓN DE ANDAMIOS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.	10
POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.	11
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES: ESTUDIO PILOTO IN VIVO (ZONA DORSAL).....	12
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.	12
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.	13
COMPARACIÓN MECÁNICA DE LOS NEOTEJIDOS RECUPERADOS DE LA ZONA DORSAL.	13
HIPÓTESIS.	15
OBJETIVOS.....	15
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.	16
MATERIALES.	16
MÉTODOS.	16
CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA PARA NEOTEJIDOS RECUPERADOS DE LA ZONA DORSAL (FINALIZA ESTUDIO PILOTO).	16
FABRICACIÓN DE ANDAMIOS (COMIENZA ESTUDIO IN VIVO ZONA ARTICULAR).....	16
POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.	17
PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE AG Y ADSORCIÓN DE LA PROTEÍNA SOBRE EL ANDAMIO M1.....	18
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ANDAMIOS PLA-PCL Y M1 (POROSIDAD).....	19
BIOPSIA DE CARTÍLAGO Y CULTIVO PRIMARIO DE CONDROCITOS.....	20
VIABILIDAD CELULAR PRE-IMPLANTE MTT.....	20
IMPLANTACIÓN DE LOS ANDAMIOS CON CÉLULAS AUTÓLOGAS: PRUEBAS IN VIVO.....	21
EXTRACCIÓN DE NEOTEJIDOS.....	22
CARACTERIZACIÓN DE LOS NEOTEJIDOS.	22

ENSAYOS DE COMPRESIÓN:.....	22
HISTOLOGÍAS DE LOS NEOTEJIDOS RECUPERADOS DE LA ZONA ARTICULAR.	23
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
I. CONCLUYE EXPERIMENTO PILOTO IN VIVO DE LA ZONA DORSAL.....	24
PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE LOS ANDAMIOS.	24
ENSAYO DE MTT (VIABILIDAD CELULAR PREIMPLANTE).	26
CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS NEOTEJIDOS RECUPERADOS DE LA ZONA DORSAL. (FINALIZA ESTUDIO PILOTO).	27
II. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS IN VIVO ZONA ARTICULAR.	28
APARIENCIA DE NEOTEJIDOS FUNCIONALES RECUPERADOS DE LA ZONA ARTICULAR.	28
ENSAYOS DE COMPRESIÓN.....	29
HISTOLOGÍAS DE LAS MUESTRAS ARTICULARES.	31
CONCLUSIONES	33
TRABAJOS FUTUROS	34
BIBLIOGRAFÍA	34



ABREVIATURAS.

ADAMTS: desintegrina y metaloproteinasa con trombospondina.

AG: agrecano.

FTIR-ATR: Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier-reflectancia total atenuada, (por sus siglas en inglés Fourier Transform Infrared spectroscopy Attenuated Total Reflectance).

GAG o GAG's: glucosaminoglicano o glucosaminoglicanos.

HA: ácido hialurónico.

MEC: Matriz extracelular.

MMP: metaloproteinasas.

M1: andamio PLA-PCL-PPY-I

M2: andamio PLA-PCL-PPy-I-AG

OA: osteoartritis.

PBS: buffer fosfato salino (por sus siglas en inglés phosphate buffered saline).

PCL: Policaprolactona.

PG o PG's: proteoglicano o proteoglicanos.

PLA: Poli (ácido láctico).

PPy: polipirrol.

PPy-I: polipirrol Iodo.

RESUMEN

Se realizó previamente a este trabajo un estudio piloto, en donde se generaron andamios electrohilados de poli(ácido láctico) (PLA), policaprolactona (PCL), modificados superficialmente con polipirrol Iodo (PPy-I) a los que les fue añadido un componente importante de la matriz extracelular del cartílago nativo, el agregano (AG), que es una proteína esencial para la función normal del tejido y su concentración favorece la definición de la forma en tejidos durante su desarrollo inicial y las propiedades mecánicas del mismo. Los resultados de los andamios probados *in vivo* sobre el dorso de un conejo neozelandés por 30 días mostraron buena integración celular, además de que la comparación de los neotejidos generados sobre los andamios PLA-PCL-PPy-I (M1) y PLA-PCL-PPy-I-AG (M2) mediante ensayos mecánicos de tracción indicaron que M2 presenta una mayor tenacidad y ductilidad.

Dado los resultados en el estudio piloto que mostraron la capacidad del andamio en ingeniería de cartílago, este trabajo comienza con la caracterización de la distribución y tamaño de poros de los andamios PLA-PCL y M1, utilizando las imágenes adquiridas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) y el programa ImageJ, en donde se mostró que sus características de tamaño y distribución de poros ($156 \pm 85 \mu\text{m}^2$) son adecuadas para ingeniería de tejidos en cartílago. Posteriormente se realizó la caracterización histológica e inmunohistoquímica de los neotejidos generados en el dorso de un conejo neozelandés sobre los andamios M1 y M2, en los que se detectó colágeno tipo II y agregano, los cuales son marcadores de cartílago hialino. Se usaron condrocitos autólogos de conejo neozelandés para evaluar la viabilidad celular *in vitro* de los andamios mediante un ensayo de MTT. Estos mostraron que los andamios M2 celularizados mostraron aumento de viabilidad celular.

Los andamios con y sin células fueron evaluados *in vivo*, colocándose en los cóndilos superior e inferior de las patas traseras (articulaciones) de los conejos durante 1 año, el tamaño de los defectos fue de 0.5 cm^2 . Posteriormente se extrajeron los neotejidos que muestran integración del neotejido con el hueso subcondral, y no se mostraron huecos. Se realizaron ensayos de compresión en los neotejidos generados y se compararon con los del tejido nativo, y se mostró la influencia positiva de la proteína AG y la previa celularización del andamio; se observó una mayor pérdida de energía en los tejidos generados sobre M1 con y sin células, pues tienden a tener una baja recuperación al ser deformado. Finalmente se realizaron las histologías de los neotejidos recuperados sobre M1 y M2 con y sin células, y se mostró para M2 con células una morfología similar al tejido nativo. En contraste, M2 sin células, M1 con y sin células donde claramente se observa tejido fibroso o cambio de fenotipo celular.

Palabras clave: electrohilado, polimerización por plasma, cartílago, agregano, pirrol, andamio.

ABSTRACT

A pilot study was carried out previously, where electrospun scaffolds of polylactic acid (PLA), polycaprolactone (PCL), superficially modified with polypyrrole Iodo (PPy-I) were generated. An important component of the extracellular matrix of the native cartilage, aggrecan (AG), which is an essential protein for normal tissue function, was added and its concentration favors the definition of the shape in tissues during its initial development and their mechanical properties of the same. The scaffolds were tested *in vivo*, placed on the back of a New Zealand rabbit for 30 days, showing good cellular integration, and mechanical tensile tests were carried out comparing the neotissues generated on the scaffolds PLA-PCL-PPy-I (M1) and PLA-PCL-PP-I-AG (M2) where the latter showed greater tenacity and ductility.

The results obtained in the pilot study showed the potential of the scaffold in cartilage engineering, therefore, this work begins with the characterization of the distribution and pore size of PLA-PCL and M1 scaffolds, using images acquired by Scanning Electron Microscopy (SEM) and processed with ImageJ, where it was shown that their size and pore distribution ($156 \pm 85 \mu\text{m}^2$) characteristics are suitable for cartilage tissue engineering. Subsequently, histological and immunohistochemical characterization of the neotissues generated in the dorsum of a New Zealand rabbit on the M1 and M2 scaffolds was performed, where type II collagen and aggrecan, which are markers of hyaline cartilage, were detected. Autologous New Zealand rabbit chondrocytes were used to evaluate the *in vitro* cell viability of the scaffolds using an MTT assay where the cellularized M2 scaffolds showed increased cell viability.

The scaffolds with and without cells were evaluate *in vivo*, placed in the superior and inferior condyles of the hind legs (joints) of rabbits for 1 year, the size defects were 0.5 cm^2 . Subsequently the neotissues were extracted showing integration of the neotissue with the subchondral bone and no gaps were shown; a mechanical comparison was made by means of compression tests of the generated neotissues and the native tissue, where it was shown the positive influence of the AG protein and the previous cellularization of the scaffold compared with those that do not contain AG or cells, observing a greater loss of energy in the tissues generated on M1 with and without cells that tend to have a low recovery when deformed. Finally, histologies of the neotissues recovered on M1 and M2 with and without cells were performed, clearly showing for M2 with cells a morphology close to the native tissue in comparison with M2 without cells, M1 with and without cells where fibrous tissue or change of cellular phenotype is clearly observed.

Keywords: electrospinning, plasma polymerization, cartilage, aggrecan, pyrrole, scaffold.

INTRODUCCIÓN.

La composición y arquitectura del cartílago proveen de atributos biomecánicos para el deslizamiento repetitivo, así como la absorción y la transferencia de cargas mecánicas con el hueso subcondral subyacente. Desafortunadamente se caracteriza por una capacidad limitada para la autoreparación sobre los daños causados en lesiones traumáticas o enfermedades degenerativas, especialmente para aquellos defectos con grandes superficies en el cartílago. La dificultad en la reparación es atribuida a que es un tejido avascular, aneural y alinfático, por lo que, una vez que existe un daño se degrada hasta su erosión. Los tratamientos clínicos para la reparación del cartílago articular indican mejora a corto plazo, pero también indican sus deficiencias a largo plazo conduciendo a la formación de fibrocartílago que es mecánicamente inferior. En consecuencia, actualmente se buscan diferentes alternativas para regenerar tejido con características similares al tejido nativo para sustituir la zona dañada.

Una de estas alternativas es la generación de soportes poliméricos biodegradables (andamios) fabricados mediante la técnica de electrohilado, con la cual se obtienen redes tridimensionales para el depósito de la matriz extracelular, resultando atractivo debido a sus bajos costos de producción y reproducibilidad. Diversos polímeros naturales y sintéticos han sido empleados en esta técnica; sin embargo, dos polímeros de origen sintético: el PLA y PCL, han llamado nuestra atención debido a sus diversas aplicaciones ortopédicas, su compatibilidad con los condrocitos, diferentes tiempos de degradación que favorecen la estabilidad mecánica del andamio y la diversidad en el tamaño de poros para mejorar la integración del tejido. En contraste, su hidrofobicidad y baja bioactividad en la adhesión celular son problemas que se presentan y puede ser contrarrestados realizando la modificación superficial mediante diversos métodos como es el tratamiento con plasma con PPy-I, el cual ha mostrado en diversos estudios que mejora y activa la superficie para anclaje, proliferación celular y adhesión de proteínas. Esta cobertura fue aprovechada para adherir la proteína agregano, la cual es primordial dentro de la MEC (matriz extracelular) del cartílago hialino, y tiene como función la deformación y recuperación del tejido, además de contribuir a la difusión de nutrientes y eliminación de desechos. Así mismo juega un papel fundamental en la determinación de las propiedades físicas de las fibras de colágeno. El propósito de este trabajo es generar un andamio que imita la MEC del cartílago nativo (un armazón, una superficie preparada para adherir células y/o proteínas y células) que dirijan inicialmente la formación de neocartílago y que posteriormente sea capaz de generar y mantener su MEC.

Para evaluar la respuesta del andamio, se realizó un estudio piloto en donde se caracterizó su composición química con FTIR-ATR y morfología mediante SEM, además de ser evaluado *in vivo*, colocando los andamios con células autólogas en el dorso de un conejo neozelandés durante 30 días. Los condrocitos se obtuvieron de la biopsia de cartílago elástico en la oreja del conejo. Se mostró la capacidad de adherir la proteína agregano al andamio PLA-PCL-PPy-I, y los resultados *in vivo* indicaron excelente biocompatibilidad y formación de neotejidos, que, al ser comparados sus ensayos mecánicos de tracción, los andamios M2 que contienen la proteína AG mostraron mayor capacidad de soportar cargas y elongación.

El análisis morfológico de los andamios mostró que la distribución y tamaño de poro mediante las imágenes adquiridas por microscopía electrónica y el programa ImageJ de los andamios PLA-PCL y PLA-PCL-PPy (M1) es idónea para la regeneración del tejido, para posteriormente caracterizar histológica e inmunohistoquímicamente los neotejidos generados sobre M1 y M2 que mostraron tejido no fibroso y expresión de proteoglicanos y colágena tipo II.

Este trabajo está enfocado en un nuevo experimento *in vivo* con implantes en la zona articular que buscó la formación de neocartílago funcional, y está dividido de 4 capítulos.

En el capítulo 1 se plantea el problema de investigación y prevalencia, para abordar los antecedentes, comenzando con los tratamientos utilizados actualmente, presentando a la ingeniería de tejidos y el uso de andamios como alternativa en el tratamiento de lesiones de cartílago así como al electrohilado como técnica para elaborarlos y al tratamiento por plasma para modificar y mejorar su superficie, con lo que se establece el objetivo general y objetivos específicos para el desarrollo de este trabajo.

En el capítulo 2 se aborda la discusión y antecedentes de la zona dorsal *in vivo*, incluyendo los resultados previos del estudio piloto al que fueron sometidos los andamios M1 y M2, como son: la caracterización de su composición química mediante FTIR-ATR, ensayo *in vivo* sobre el dorso de un conejo neozelandés durante 30 días, y ensayos de tensión uniaxial para compararlos con los del neotejidos generados sobre los andamios.

En el capítulo 3 se enlistan los materiales y metodologías para la generación de los andamios, así como los protocolos para realizar el implante de los andamios M1 y M2 *in vivo* sobre las articulaciones de las patas posteriores en conejos neozelandeses, los ensayos de compresión y finalmente la caracterización inmunohistoquímica e histológica.

En el capítulo 4 se discute y presenta los resultados de la caracterización morfológica de los andamios, ensayos de MTT, inmunohistoquímicas e histológicas de los neotejidos recuperados de la zona dorsal del conejo neozelandés, así como los resultados obtenidos del estudio *in vivo* de la zona articular. Por último, se presentan las conclusiones.

CAPÍTULO 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ANTECEDENTES.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cartílago articular es un tejido conectivo, altamente mecano sensible, hidratado, carente de vasos sanguíneos, aneural y con una baja capacidad para reparar, que recubre las articulaciones diartrodiales y su función es resistir y distribuir cargas mecánicas, facilitar el movimiento y generar baja fricción entre las superficies [1] [2] [3]. Su integridad y buen funcionamiento dependen del equilibrio entre la síntesis y degradación de los componentes de su matriz extracelular. El condrocito es la única célula del cartílago que debe organizar su metabolismo para garantizar la producción, renovación periódica y su organización tridimensional [4] [5] [6]. Debido a que es un tejido avascular, aneural, alinfático y con baja actividad metabólica, una vez que hay un daño, el cartílago se degrada hasta su erosión, lo que resulta en el desarrollo de la osteoartritis (OA) [7] [8] [9].

La OA es una enfermedad caracterizada por la degradación y destrucción progresiva del cartílago con la que se pierde lubricación e integridad mecánica del cartílago, generando esclerosis del hueso subcondral, provocando un gran dolor físico e incapacidad al paciente [9]. El daño comienza con inflamación articular que genera una disregulación en las funciones anabólicas y catabólicas de los condrocitos, induciendo la activación de ADAMTS 4 y 5, estas enzimas degradan al agregano, dejando al colágeno tipo II expuesto para que las enzimas metaloproteinasas MMP1 y MMP13 degraden sus fibras, esto aumenta la ciclooxygenasa, estimulando la producción de óxido nítrico sintetasa, generando un cambio estructural y alentando la destrucción de tejido (Fig. 1). El intento de reparación del daño conduce a los condrocitos a producir MEC de mala calidad, provocando un cambio de fenotipo [10] [11] [12].

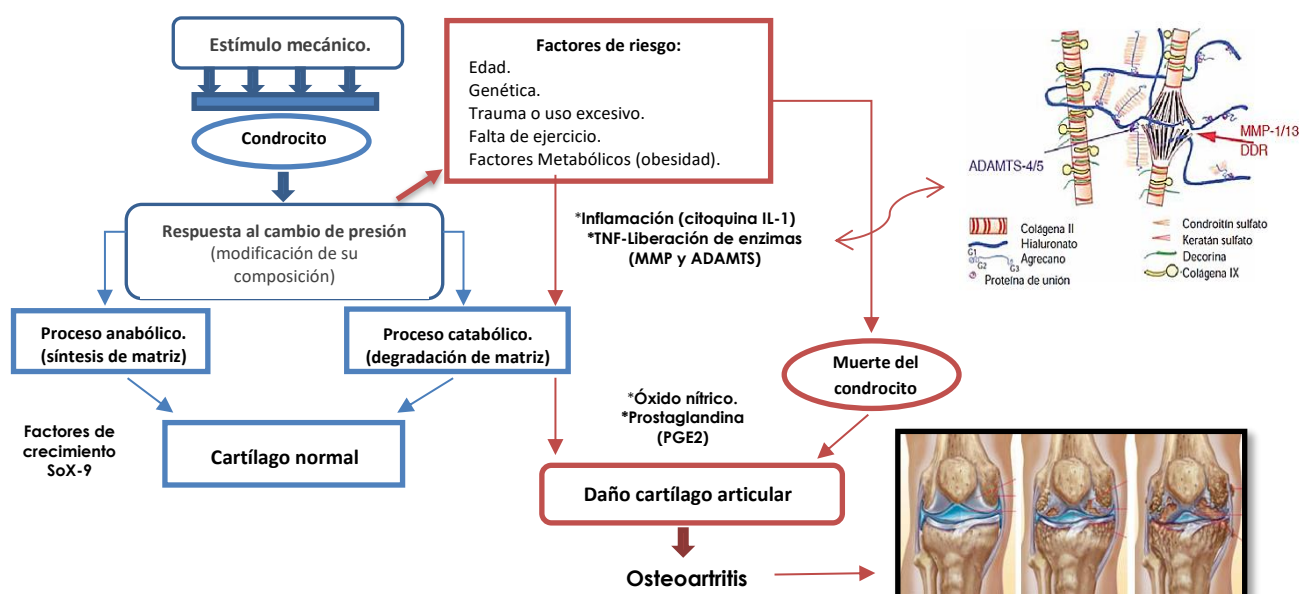


Fig. 1 Respuesta a la carga articular

ANTECEDENTES

PREVALENCIA.

La OA ha aumentado en todo el mundo con una estimación de 250 millones de personas; en México es una de las primeras 10 causas de invalidez total en donde el 30% de las personas entre 45 y 65 años la sufren y el 80% de la población de más de 80 años ha sido diagnosticada con dicha enfermedad, lo que incrementa la carga económica y social del país. Los tratamientos tienen como objetivos disminuir el dolor, conservar la movilidad articular y minimizar la discapacidad [6] [13].

TRATAMIENTOS PARA LA REPARACIÓN DE LESIONES.

La OA resulta en una irreparable pérdida de cartílago articular, debido a la dificultad para reparar defectos del cartílago articular, se atribuye principalmente a una baja densidad celular y actividad metabólica, así como al hecho de que es un tejido avascular, aneural y alifático [5] [14]. Se han desarrollado múltiples tratamientos para tratar de resolver este problema; estos tratamientos pueden ser divididos en tratamientos farmacológicos y quirúrgicos [8] [15] [16].

Por un lado, los tratamientos farmacológicos emplean el uso individual o combinado de medicamentos analgésicos (paracetamol, tramadol, lidocaína tópica) y antiinflamatorios (corticosteroides y diclofenaco) que solo reducen los síntomas tempranos de la OA como es el dolor e inflamación [17]. Otros tratamientos son las infiltraciones locales que incluyen corticosteroides (CSI), inyecciones de ácido hialurónico (HA) y plasma rico en plaquetas (PRP). Los corticosteroides: se utilizan en pacientes con artrosis de moderada a grave reduciendo dolor e inflamación como son la prednisolona, betametasona, metilprednisolona, sin embargo, su uso continuo podría adelgazar el cartílago. El ácido hialurónico es utilizado en base a varias formulaciones, la fórmula más empleada son hialuronato de sodio, hialurano e Hylan GF-20, los resultados reportados son alivio del dolor y mejora de la función tras varias infiltraciones. Es importante enfatizar que las inyecciones son especialmente utilizadas en pacientes que ya no logran aliviar el dolor con medicación y no funcionan en todos los casos, generalmente resultan efectivas en pacientes con OA leve. Los resultados son limitados hasta por periodos de 6 meses, en donde para observar mejoría se requieren de múltiples aplicaciones, además de ser tratamientos costosos, no son cura para la OA ya que no regenera ni mejora la estructura articular, puesto que solo reduce inflamación, por lo que los síntomas regresan. Presenta efectos secundarios como son dolor local e hinchazón que desaparecen en unos días, algunas personas pueden desarrollar infecciones, necrosis tisular y artritis pseudoséptica que se trata de una grave inflamación [18].

El plasma rico en plaquetas (PRP) es una preparación biológica, rica en factores de crecimiento y proteínas (alrededor de 1200) que se utiliza como terapia para promover la reparación de cartílago al reducir los efectos adversos de las citoquinas inflamatorias sobre la expresión génica de los condrocitos, aumentando el contenido de proteoglicanos y colágeno tipo II, e inhibiendo la concentración y expresión génica de la metaloproteínasa 13. Sin

embargo, los resultados en algunos estudios mostraron que el PRP no promovió la condrogénesis ni mejoró la reparación del daño del tejido, e inclusive se observó un efecto inhibitor de la MEC del cartílago [19].

Los métodos quirúrgicos incluyen tratamientos como: la perforación, abrasión, microfractura y mosaicoplastia, que tienen muy buenos resultados a corto plazo, sin embargo, estos tratamientos a largo plazo conducen a la producción de un nuevo tejido fibroso con alto contenido de colágeno tipo I y una matriz desorganizada (pérdida de topología) disminuyendo funcionalidad. Este tipo de tejido carece de las características mecánicas y viscosas del cartílago nativo, por lo que también produce diversas complicaciones, como hipertrofia y rigidez en las articulaciones [20] [11] [17] [21]. El autoinjerto osteocondral rellena el defecto con cartílago hialino maduro, realizando rehabilitaciones más rápidas, sin embargo, esta técnica se encuentra restringida para defectos osteocondrales menores a 2 cm². Por otro lado, el implante autólogo de condrocitos (ACI) es el método quirúrgico que más se utiliza en el tratamiento de lesiones de mayores de 3-4 cm² en la que se requiere de dos cirugías, una para recolectar condrocitos del cartílago y realizar su expansión vitro y otra cirugía para reimplantarlos en defecto, sin embargo, se reporta hipertrofia del periostio después del procedimiento. ACI inducido por matriz (MACI) implica la incorporación de condrocitos en un andamio de colágeno para posterior implantarlo. Ambas técnicas ACI y MACI emplea dos cirugías, largas fases de recuperación y altos costos, además de que los condrocitos pueden desdiferenciarse durante la expansión de cultivo in vitro, generando cambios de fenotipo celular, dando como resultado una menor vida útil después de la implantación [12].

La mayor parte de los tratamientos para la osteoartritis muestran una mejora a corto plazo; sin embargo, sus deficiencias a largo plazo conducen a un cambio de fenotipo (formación de fibrocartílago) [10] [22], pobres propiedades de la matriz, dando como resultado un cartílago insatisfactorio para su aplicación clínica, debido a una estructura no homogénea, propiedades mecánicas insuficientes y grosores deficientes [20] [11] [23].

INGENIERÍA DE TEJIDOS COMO ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO A LAS LESIONES DE CARTÍLAGO.

A pesar de que actualmente se cuenta con una amplia variedad de estrategias para el tratamiento de las lesiones articulares, los tratamientos de osteoartritis continúan siendo investigados puesto que se requieren mejoras, debido a que presentan importantes inconvenientes y/o efectos secundarios. Por lo que la búsqueda de tratamientos alternativos se enfoca en la ingeniería de tejidos, con las que se han conseguido cubrir defectos de gran tamaño al combinar componentes como son: los andamios, factores de crecimiento y células [16].

El cartílago es un buen candidato para la ingeniería de tejidos debido a su capacidad limitada para recuperarse de lesiones traumáticas o enfermedades degenerativas. La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario, que busca reparar o sustituir de forma parcial o total la función de un órgano o tejido, mediante el uso de una alta gama y combinación de biomateriales en la generación de soportes temporales (andamios) para depósito y generación de matriz extracelular [11].

Los andamios de gradiente discreto y gradiente continuo, el primero es fabricado en dos o tres fases por separado que posteriormente es integrado mediante el uso de sutura, pegamento o presión, sin embargo, en la

mayoría de los casos la fuerza de unión entre las fases es insuficiente, por lo que el riesgo de una delaminación de las fases es alto. El segundo se enfoca en la liofilización por lo que este diseño es menos propenso a la delaminación, además de facilitar la transferencia de esfuerzos en el andamio, aun cuando se han realizado estudios *in vitro* o *in vivo*, los resultados a largo plazo no son satisfactorios [24].

En el campo de los andamios 3D, los más utilizados en la ingeniería de cartílago, son los hidrogeles, sin embargo, se encuentran problemas en cuanto al control de la arquitectura interna, lo que no garantiza la interconectividad de los poros comprometiendo la formación de neot Tejido 3D, difusión de nutrientes y eliminación de desechos, por lo que la integridad de tejido se ve afectada. Por otro lado, con la bioimpresión 3D se ha desarrollado tecnología individualizada en los defectos osteocondrales permitiendo obtener arquitecturas con gradiente y tamaño de poro controlado que permiten la diferenciación condrogénica y osteogénica, debido a que se imita con precisión la compleja estructura del cartílago nativo. Los resultados indican que el tejido cartilaginoso se fabrica fácilmente *in vitro*, sin embargo, *in vivo* se reporta rápida degradación que conduce a pobres propiedades mecánicas y fallas prematuras, calcificaciones, incapacidad de mantener su estructura después del proceso de impresión (inestabilidad mecánica), falta de bioactividad y adhesión celular, por lo que son estructuras débiles para su aplicación en el campo de ortopedia [25] [26].

Recientemente fue aprobado por la FDA Agili-C™, el cual es un implante libre de células listo para usar en defectos de cartílago y osteocondrales en articulaciones traumáticas y artrósicas. El implante es un almacén bifásico poroso, biocompatible y reabsorbible, que consta de carbonato de calcio inorgánico natural interconectado (aragonito). Para su implantación es necesario realizar un orificio para ajustar a la perfección al tamaño de este, con área tratable de 1-7cm², por lo que una de las desventajas que se observa es el área que puede ser tratada con este material, ya que para casos en donde el defecto es mayor al tamaño del implante (osteoartritis severa), se tendría que recurrir a otro tipo de tratamiento, además de contraindicaciones de hipersensibilidad, alergia o intolerancia al carbonato de calcio o derivados del coral y una larga lista de potenciales efectos adversos como son: fuertes dolores regionales, sinovitis transitoria o crónica, fallas o fracaso en la regeneración del tejido, fractura, aflojamiento o extrusión del implante, fractura o deformación del hueso subcondral, abrasión de los tejidos circundantes (contrarios o cercanos), formación de nuevo cartílago o empeoramiento de la lesión, edema de médula ósea, formación de calcificaciones y formación de tejido fibroso.

Es entonces que la regeneración de cartílago articular ha resultado ser todo un desafío, la literatura reciente enfocada a la reparación de tejido cartilaginosos, tienen en común ser estudios a corto plazo (menores a 6 meses) en donde al hacer seguimientos a largo plazo, los resultados reportan problemas recurrentes como son: falta de integración en los bordes del defecto, surgimiento de fibrocartílago, calcificaciones, pobres propiedades mecánicas y pérdida de topografía (hundimientos). Por lo que las estrategias experimentales actualmente utilizadas para la reparación del cartílago articular aún no ha logrado replicar la estructura ni la función del tejido nativo, además de resaltar la importancia de la recuperación a largo plazo, más que en las mejoras encontradas a corto plazo de la evaluación clínica [27] [28] [29].

La elección del andamio adecuado es fundamental para proporcionar un entorno tridimensional que promueva la adhesión celular y resistencia mecánica, así como generación de neot Tejido con características semejantes a las del tejido nativo. Los andamios disponibles comercialmente no demuestran eficacia a largo plazo por lo que se continúa con la búsqueda del andamio ideal para la ingeniería de cartílago [17]. Los andamios creados bajo las técnicas de fundición con disolvente, formación de gas, liofilización y electrohilado son los más concurridos debido a la gran variedad de biomateriales, además de tener mayor control en cuanto al tamaño de poro y su bajo costo [24]. La técnica de electrohilado ha demostrado ser un método valioso en la construcción de andamios para la ingeniería de tejidos debido a que es simple, adaptable, asequible y capaz de imitar MEC. Sin embargo, aun que ha mostrado ser prometedora su aplicación para diferentes tejidos como son: vasos, tendones, neuronas, hueso y cartílago, su mayor inconveniente es que la mayor parte de publicaciones son estudios in vitro [30] [31].

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

Una de las técnicas para la fabricación de andamios es el electrohilado, debido a los diferentes diámetros de fibras que pueden obtenerse durante su producción, por lo que son capaces de imitar la red natural de las fibras, manteniendo los condrocitos en una posición adecuada para tener y mantener su propia actividad apoyando la formación de cartílago [11] [32] [33] [34] [35]. La técnica de electrohilado ha demostrado ser un método valioso en la construcción de andamios para la ingeniería de tejidos debido a que es simple, adaptable, asequible y capaz de imitar MEC. Sin embargo, aun que ha mostrado ser prometedora su aplicación para diferentes tejidos como son: vasos, tendones, neuronas, hueso y cartílago, su mayor inconveniente es que la mayor parte de publicaciones son estudios in vitro [30].

Durante el proceso de preparación (Fig. 2) se hace pasar un fluido a través de un electrodo capilar en forma de aguja o punta en presencia de un campo eléctrico producido por una fuente de alto voltaje ($\sim 30\text{kV}$). Cuando éste llega a un determinado valor, se vence la tensión superficial de la pequeña gota que se forma en el extremo de la aguja, generándose un chorro (jet) líquido cargado eléctricamente que se acelera hacia una región de menor potencial, en donde se encuentra un colector conectado a tierra. A medida que el disolvente se evapora, el chorro se estrecha, produciendo fibras continuas que forman una membrana tridimensional altamente porosa.

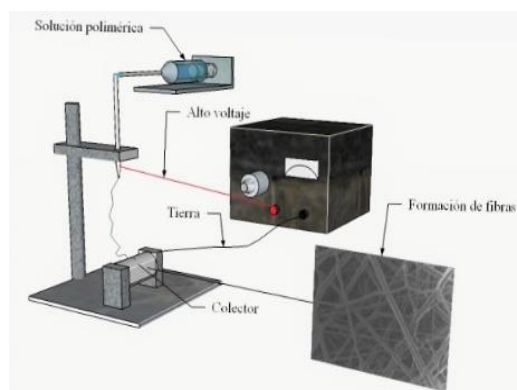


Fig. 2 Proceso de electrohilado.

Han sido probados varios tipos de andamios en la ingeniería del cartílago, a base de polímeros naturales y sintéticos. Los polímeros naturales más utilizados son el ácido hialurónico, fibrina, colágeno, los glucosaminoglicanos y fibrina debido a su excelente biocompatibilidad y bioactividad, sin embargo, debido a su rápida hidrólisis pierde rápidamente sus propiedades, generando una baja estabilidad mecánica provocando fallas prematuras en la reparación de los tejidos y la formación de fibrocartílago [16] [10] [23] [36] [37]. Por otro lado, los polímeros sintéticos más utilizados en la ingeniería de cartílago son poliuretano, alcohol polivinílico (PVA), polietilenglicol, PLGA o poliácido láctico-co-glicólico, ácido poliláctico (PLA) y poli(ϵ -caprolactona) (PCL), debido a su resistencia mecánica, baja inmunogenicidad, elasticidad y biodegradabilidad lo cual los hacen adecuados para su uso en ingeniería de tejidos de cartílago, se resalta la suma importancia de la reparación o regeneración del tejido con andamios que permitan elasticidad para la transducción de señales mecánicas a las células y el apoyo en la diferenciación condrogénica [38]. Tienen como desventaja una baja señalización biológica (adhesión celular) e hidrofobicidad, la cual puede ser contrarrestada con la modificación de su superficie mediante métodos físicos o químicos, mejorando la morfología, bioactividad, adherencia y distribución de las células sembradas sobre el andamio [16] [23] [37] [39][40].

POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.

Un método para modificar la superficie de materiales para mejorar y activar la superficie para anclaje, proliferación celular y adhesión de proteínas es la polimerización por plasma [41] [42] [43], que consiste en la formación de materiales poliméricos bajo la influencia de un gas parcialmente ionizado (plasma). La polimerización por plasma (**Fig. 3**) se lleva a cabo bajo condiciones de vacío en una cámara de reacción donde se introducen un monómero (PPy) y dopante (I) en estado gaseoso los cuales se ionizan por la influencia de un campo magnético generado por la diferencia de potencial entre dos electrodos. El polímero se forma a partir de partículas de los reactivos activadas por el plasma. Estas partículas ionizadas al interactuar con la superficie de un sustrato la recubren depositando una película delgada de material alterando la química superficial de las fibras.

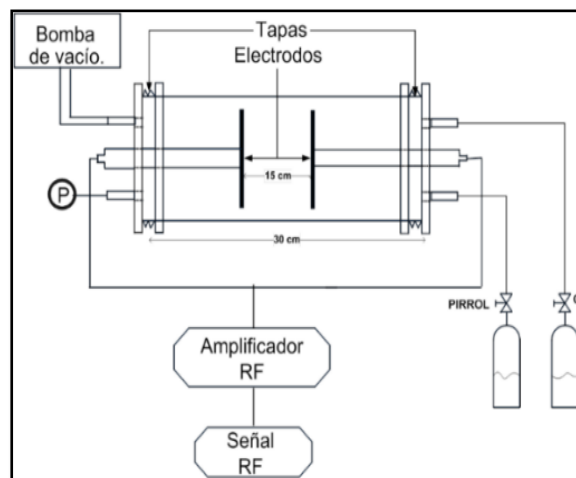


Fig. 3 Reactor de polimerización por plasma.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES: ESTUDIO PILOTO IN VIVO (ZONA DORSAL).

Se realizó previamente un estudio piloto para caracterizar los neotejidos generados sobre los andamios PLA-PCL-PPy-I (**M1**) y PLA-PCL-PPy-I-AG (**M2**) con previa siembra de condrocitos, que se recuperaron de la zona dorsal de un conejo neozelandés a los 30 días de cultivo *in vivo* [44]. A continuación, se presenta un extracto de los resultados.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.

Usando FTIR-ATR, se identificaron las bandas de absorción características del PPy-I, PLA y PCL del andamio M1 (**Fig. 4a**) y de la proteína AG del andamio M2 (**Fig. 4b**) en las áreas comprendidas entre 1800 a 700 cm^{-1} , porque es en esta región donde están las bandas de interés correspondientes de los grupos amina y sulfato contenidos en la proteína AG.

En el espectro del andamio M1 (**Fig. 4a**), las aminas primarias y secundarias se detectan en 1665 cm^{-1} . Los picos de C=O en 1752 cm^{-1} , CH₃ en 1452 cm^{-1} y la deformación de O-H en 869 cm^{-1} representan las moléculas de ácido láctico, y se observó una superposición entre la caprolactona y el ácido láctico. En el espectro del andamio M2 (**Fig. 4b**), se detectó al grupo amina en 1665 cm^{-1} , la presencia de los grupos sulfato en 1253 y 870 cm^{-1} característicos de la proteína AG [45]. La detección de la proteína AG en el andamio M2 es relevante, puesto que es un marcador de diferenciación condrogénica [46] [47], además de contribuir en la difusión de nutrientes y eliminación de desechos [1] [48] [49].

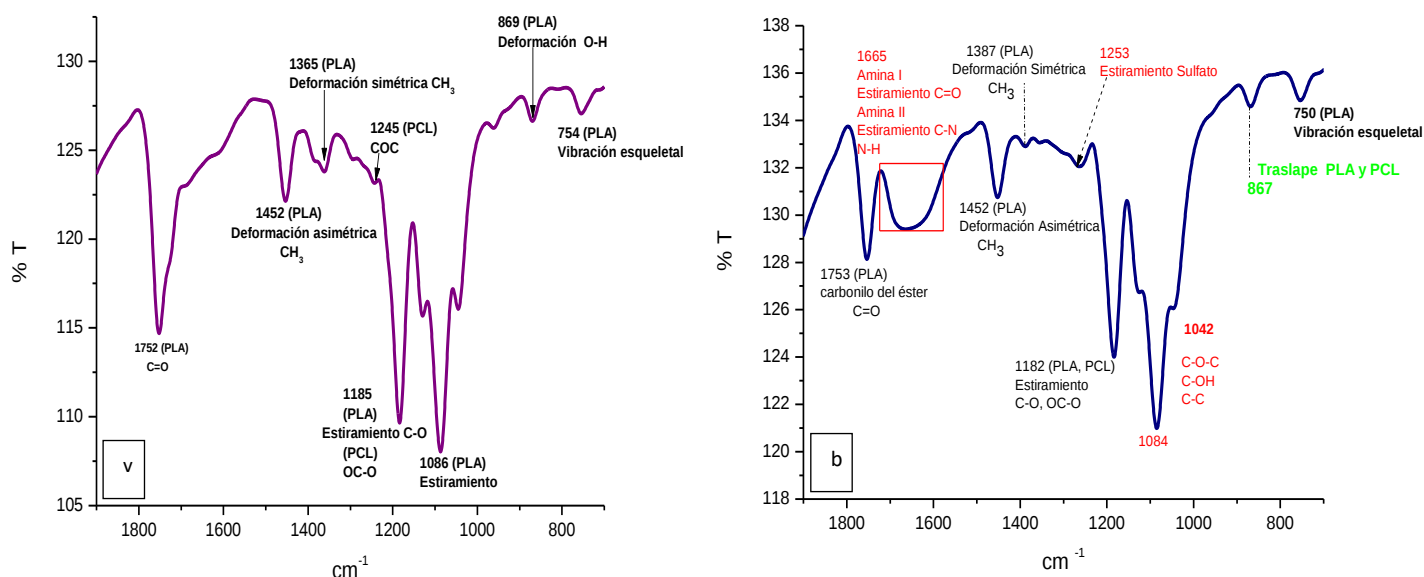


Fig. 4 Espectro FTIR-ATR de los andamios con recubrimiento superficial PPy-I a) sin proteína AG y b) con proteína AG.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.

En la figura **Fig. 5a** se muestra la micrografía del andamio M1 obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), se distinguen fibras con tratamiento superficial de PPy-I por plasma orientadas al azar, debido al tratamiento superficial algunas fibras se quebraron. Sin embargo, la integridad del andamio no se ve afectada puesto que el recubrimiento forma películas entre varias fibras, manteniendo su estabilidad, además de aumentar la rugosidad de las fibras, mejorando la adhesión y proliferación celular [50].

Por otro lado, en el andamio M2 con adhesión de AG (**Fig. 5b**) se aprecian cristales que se forman en la superficie de las fibras debido al contenido de azúcares y sulfatos contenidos en la proteína, estas estructuras no aparecen en el andamio M1 (**Fig. 5a**).

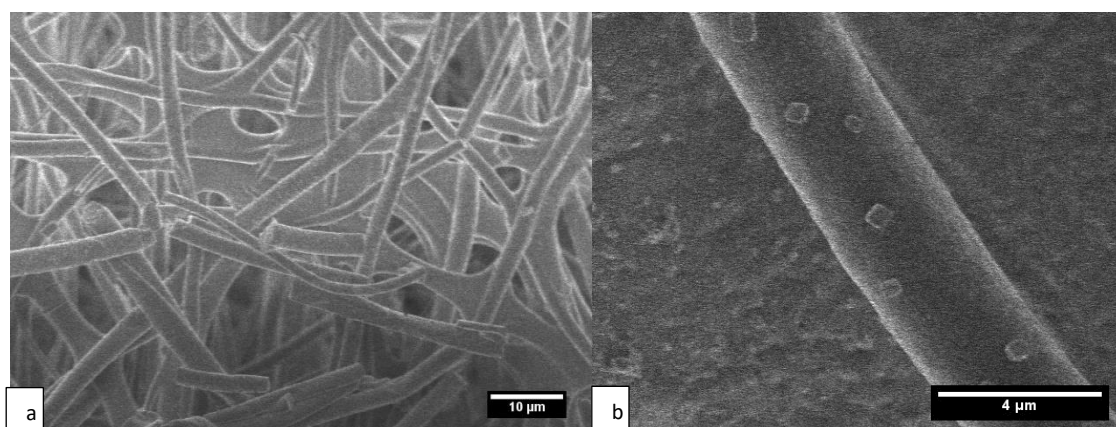


Fig. 5 Imagen SEM de la membrana generada por electrohilado de PLA-PCL.

a) Recubrimiento superficial con PPy-I, b) Recubrimiento superficial con PPy-I AG.

COMPARACIÓN MECÁNICA DE LOS NEOTEJIDOS RECUPERADOS DE LA ZONA DORSAL.

Se realizaron ensayos mecánicos de tracción con fines comparativos entre los neotejidos generados sobre el andamio M1 y M2 con previa siembra de condrocitos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Material	Módulo (MPa)	Máximo esfuerzo (MPa)	Ductilidad (% de elongación)	Tenacidad (MPa)
M1 (n=1)	0.39	0.19	131.0	0.09
M2 (n=1)	0.19	0.10	207.7	0.13

Tabla 1 Resultados ensayos mecánicos de tracción de los neotejidos recuperados de la zona dorsal.

La curva de esfuerzo vs deformación para el neotejido generado sobre M1 (Gráfico 1a) mostró un mayor módulo y punto de fluencia, en comparación con la curva del neotejido generado sobre M2 (Gráfico 1b). Sin embargo, el neotejido formado sobre M1 se fracturó sin reconstrucción al esfuerzo, mostrando un alargamiento del 100% y una tenacidad de 0.1 MPa, además de que presentó una deformación no homogénea que provocó agrietamientos tempranos, dejando el andamio expuesto (**Fig. 6a**), mientras que la curva de M2 mostró una

recuperación del esfuerzo antes de la fractura final, un alargamiento del 182% y una mayor capacidad de soportar impactos (tenacidad de 0.13 MPa), además sufrir deformación uniforme del neot Tejido (**Fig. 6b**).

Ambas muestras mostraron excelente biocompatibilidad y crecimiento celular, pero el neot Tejido formado en el andamio que contiene la proteína AG (M2) tuvo mejor comportamiento mecánico y aparenta ser un tejido con mejor hidratación e integración celular en comparación con M1, mostrando baja integración celular al andamio.

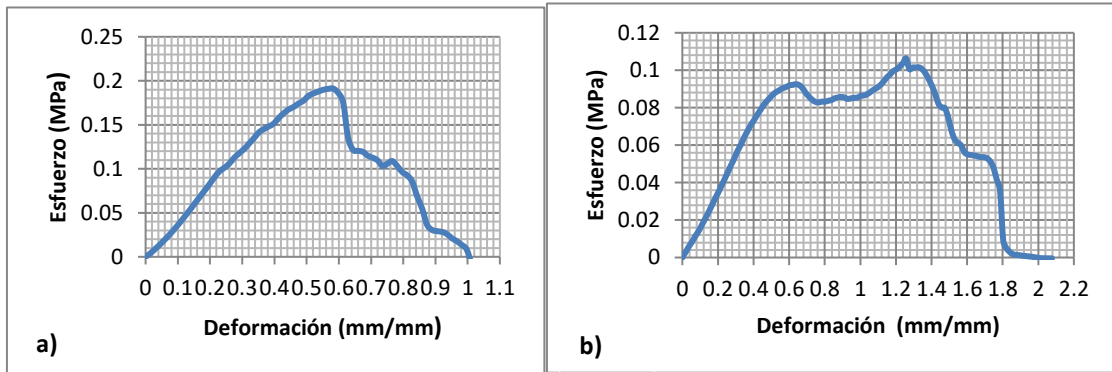


Gráfico 1 Esfuerzo vs. deformación del neot Tejido generado sobre el andamio a) M1, b) M2.

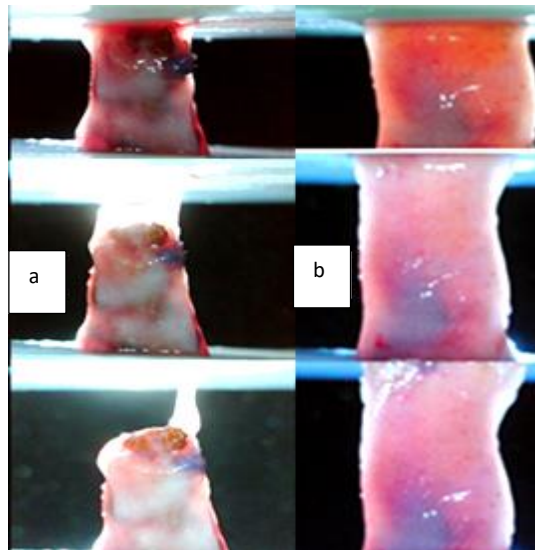


Fig. 6 Fotografías del ensayo de tracción en los explantes a los 30 días de cultivo *in vivo*.
a) M1, b) M2.

HIPÓTESIS.

Los andamios electrohilados de ácido poliláctico policaprolactona que son tratados superficialmente mediante plasma con polipirrol iodo para facilitar la adsorción de la proteína agregano y previa siembra de condrocitos, son un soporte celular en la generación de cartílago funcional, para el tratamiento de lesiones condrales.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Generar cartílago articular funcional sobre el andamio de PLA-PCL-PPy-I-AG.

Objetivos específicos:

Zona dorsal

- Caracterizar morfológica de los andamios M1 y M2.
- Caracterizar histológica e inmunohistoquímica de los neotejidos recuperados en la zona dorsal con siembra de condrocitos auriculares.

Zona articular

- Experimentos *in vivo* de los andamios generados mediante electrohilado, con previa siembra de condrocitos autólogos e implantados en la zona articular.
- Caracterizar mecánica e histológicamente de los neotejidos recuperados, comparando resultados con el tejido nativo.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIALES.

Policaprolactona ($C_6H_{10}O_2$) (181609) con $M_w=65000$, cloroformo ($CHCl_3$), alcohol etílico (C_2H_5OH), polipirrol (C_4H_5N), yodo (I_2) y agregano en polvo liofilizado de cartílago articular bovino (A1960), se obtuvieron de Sigma-Aldrich®.

Ácido poliláctico ($C_3H_6O_3$) Ingeo™ Biopolymer con número de catálogo 3251D de NatureWorks.

El medio de cultivo α -Eagle (α -MEM), suero fetal bovino (SFB), colagenasa tipo II y tripsina, se adquirieron de Invitrogen Corporation (NY, EE. UU).

Paraformaldehído, dexametasona, ácido ascórbico, formalina, acepromacina, ketamina, pentobarbital sódico, tripsina, xilocaína, fosfatasa alcalina, malla de vicrilo, nylon, aluminio micronizado, tampón de cacodilato de sodio, solución de glutaraldehído, cacodilato de sodio, formalina y Medio Eagle de cultivo modificado de Dulbecco: DMEM /F12, se obtuvieron de Sigma Aldrich.

Formol (10% en tampón de fosfato), formaldehído al 37%, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, etanol al 70% al 100% y xilol se obtuvieron de J.T. Baker.

Parafina de McCormick Scientific.

Los anticuerpos primarios para colágeno tipo II y agregano se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, mientras que el azul de alcian es Sigma Aldrich.

La hematoxilina, alcohol ácido, eosina, ácido acético, carbonato de litio y el entellan se obtuvieron de Harris Merck.

MÉTODOS.

Los comités de investigación, Ética y Bioseguridad del Hospital Infantil de México Federico Gómez, después de haber revisado el protocolo **HIM/2013/027** "Construcción de andamios a base de policaprolactona (PCL)-ácido poliláctico (PLA) recubiertos con polipirrol-iodo (PPy-I), para ingeniería de cartílago", emitieron su dictamen de aprobación, por lo que se autorizó su desarrollo.

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA PARA NEOTEJIDOS RECUPERADOS DE LA ZONA DORSAL (FINALIZA ESTUDIO PILOTO).

Para finalizar el estudio piloto se realizó la histología de los neotejidos M1 y M2 con y sin células que fueron recuperados de la zona dorsal a los 3 meses de ser implantados. Los neotejidos fueron deshidratados mediante EtOH de graduación creciente (70, 80, 96 y 100%) durante 12 horas cada uno en agitación constante, posteriormente se procesaron para su estudio histológico, realizando la fijación del tejido con formaldehído al 4%, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 μm de grosor. Por último, fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E), para una valoración general de la morfología celular (tiñe de azul-morado los núcleos y rosa el citoplasma celular).

FABRICACIÓN DE ANDAMIOS (COMIENZA ESTUDIO IN VIVO ZONA ARTICULAR).

Las soluciones poliméricas de PLA y PCL fueron preparados usando como disolvente una mezcla de 90% de cloroformo y 10% de etanol a una concentración de 0.12 g/ml cada solución. Los andamios fueron electrohilados a

una temperatura de 30°C, las soluciones de polímero se cargaron por separado en 2 jeringas para inyección simultánea con un flujo de 2 ml/h en una bomba de infusión a una proporción de 70% (PLA)/ 30% (PCL). Las soluciones viajaron a través de una aguja (electrodo positivo 20 kV) con un diámetro interno de 0.6mm hasta un colector giratorio de acero inoxidable (15 cm de largo y 10 cm de diámetro), ubicado a 20 cm con una velocidad de rotación de 680 rpm. La solución se estiró hacia el colector en forma de fibras con diámetros de diferentes tamaños en el orden de nano y microfibras. Los andamios de 20 x 10 cm se colocaron al vacío durante 4 días a 44°C para eliminar solventes remanentes.

POLIMERIZACIÓN POR PLASMA.

Para mejorar la interacción del andamio con proteínas y células, su superficie fue tratada mediante polimerización con plasma. El depósito de la película de polipirrol-yodo (PPy-I) en el andamio PLA-PCL modificó sus propiedades químicas y físicas. El reactor de polimerización por plasma se muestra en la **Fig. 7a**, consta de un tubo de vidrio (Pyrex), con 20 cm de longitud, un diámetro exterior de 9 cm y un grosor de 0.5 cm. En cada extremo del tubo se coloca una tapa de acero inoxidable con tres puertos de acceso. Un electrodo de acero inoxidable (placa plana circular de 6 cm de diámetro) que se encuentra acoplado a una varilla cilíndrica se colocó en el acceso central de cada tapa. Los electrodos se conectaron a un generador de potencia, uno a la terminal positiva y el otro a la terminal negativa, de modo que se generó un campo eléctrico entre ambos. En los otros 2 accesos de una de las tapas se introduce el monómero (pirrol) y un dopante (yodo) al reactor [43]. En la otra tapa, un acceso está conectado al sistema de vacío y el otro está conectado a un medidor Pirani para controlar la presión dentro del reactor. Otros detalles de los procedimientos involucrados se han descrito en trabajos previos [42] [51]. Los electrodos se colocaron a 8 cm uno del otro, los andamios de PLA-PCL se cortaron en 0.7 cm de ancho por 3 cm de longitud y se ubicaron en medio de los electrodos, que se encuentran conectados a un generador de potencia (13.5 MHz y 20 W). La presión se redujo a 1.2×10^{-1} Torr a través del sistema de vacío. Antes de comenzar la polimerización, el reactor se purgó durante 10 minutos para eliminar las impurezas. El monómero en fase de vapor se alimentó continuamente al reactor y el dopante se alimentó durante 30 segundos cada 6 minutos, el tiempo de reacción total fue de una hora. Al finalizar el tratamiento, el reactor permaneció cerrado durante una hora en una atmósfera de monómero antes de abrirse a la atmósfera y se retiraron los andamios M1 (PLA-PCL-PPy-I) **Fig. 7b**.

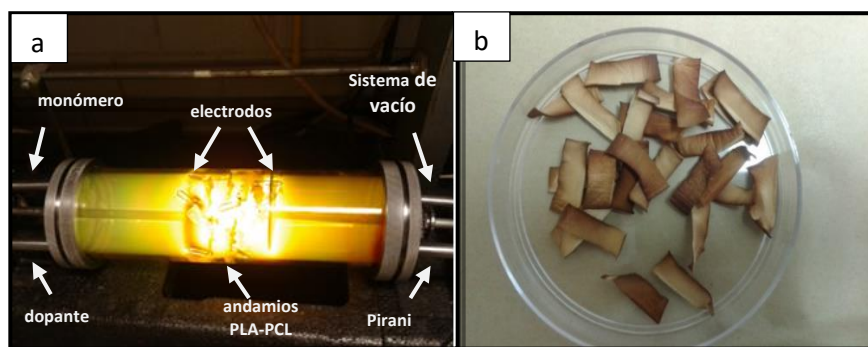


Fig. 7 a) Polimerización por plasma PPy-I, b) M1 (andamios de PLA-PCL con tratamiento de PPy-I).

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE AG Y ADSORCIÓN DE LA PROTEÍNA SOBRE EL ANDAMIO M1.

Se preparó una solución de proteína agrecano a una concentración de 0.04 mg/ml en agua destilada. Cuatro andamios M1 (PLA-PCL) se colocaron en placas de 35 mm x 15 mm y fueron lavados con 2 ml de solución de agrecano hasta humedecerlos para posteriormente ser sumergidos en la solución durante 24 horas a temperatura ambiente en un desecador. La solución se eliminó y los andamios se lavaron 3 veces con agua destilada durante 10 minutos, por último, los andamios M2 (PLA-PCL-PPy-I-AG) permanecieron durante 24 horas a temperatura ambiente dentro de un desecador al vacío, con la finalidad de eliminar el agua.

La proteína agrecano (AG), que aparte de ser uno de los principales elementos de la MEC del tejido cartilaginoso, resultan muy atractivo debido a ser reconocidos como estimulantes en la proliferación celular y mantenimiento del fenotipo condrogénico, así como liberación de múltiples proteínas de unión entre los grupos amino con carga positiva y los grupos sulfato con carga negativa [38]. Es entonces que la proteína AG al tener una carga negativa tiene gran afinidad a las moléculas de agua, que aportan a la MEC la capacidad de soportar fuertes presiones mecánicas, además de promover la difusión de nutrientes que tiene por objeto mantener la diferenciación condrogénica [1] [46] [52]. Para ejemplificar la adhesión de la proteína agrecano a las fibras de PLA o PCL con tratamiento superficial por plasma PPy-I, se muestra en la **Fig. 8a** un diagrama de la matriz extracelular del cartílago y sus principales componentes: los condrocitos, fibras de colágena y los proteoglicanos. Estos últimos son responsables de la resistencia a la compresión del cartílago y se componen por una proteína central con cadenas de polisacáridos llamados glucosaminoglicanos (GAGs) que contiene un grupo carboxilo (COOH) y sulfato (SO₄). Los principales GAGs son el condroitín sulfato (CS), queratán sulfato (QS) y ácido hialurónico (AH) siendo este último el único GAG no sulfatado. El ácido hialurónico se une mediante proteínas de unión a la proteína central que contiene al condroitín sulfato y queratán sulfato para dar lugar a los agrecanos, que se caracterizan por su peculiar forma de escobeta debido a su composición, como se representa en la **Fig. 8b**.

La **Fig. 8c** esquematiza el recubrimiento superficial de PPy-I mediante plasma sobre las fibras de PLA o PCL, con el cual se mejora el rendimiento biológico del andamio, funcionalizándolo con grupos amina (NH, NH₂), hidroxilo (OH), carbonilo (C=O) y carboxilo (C₃H) de acuerdo a la estructura química propuesta por Kumar [53], que se muestra en la **Fig. 8d**. Esta superficie modificada ha mostrado en diversos estudios la mejora del andamio en cuanto a la adhesión y la proliferación celular, además de promover la adhesión (adsorción) de proteínas como el agrecano y la inmovilización de biomoléculas [43] [54] [55]. Es entonces que el recubrimiento de PPy-I aparte de enriquecer la superficie para el anclaje y crecimiento celular, también ejerce la función del ácido hialurónico mediante la adhesión de la proteína AG, demostrado mediante la localización de picos característicos de la proteína AG utilizando FTIR-ATR (**Fig. 4b**) y presencia de cristales en las fibras formados por la presencia de azúcares y sulfatos contenidos en la proteína AG, los cuales fueron identificados mediante SEM de la **Fig. 5b**.

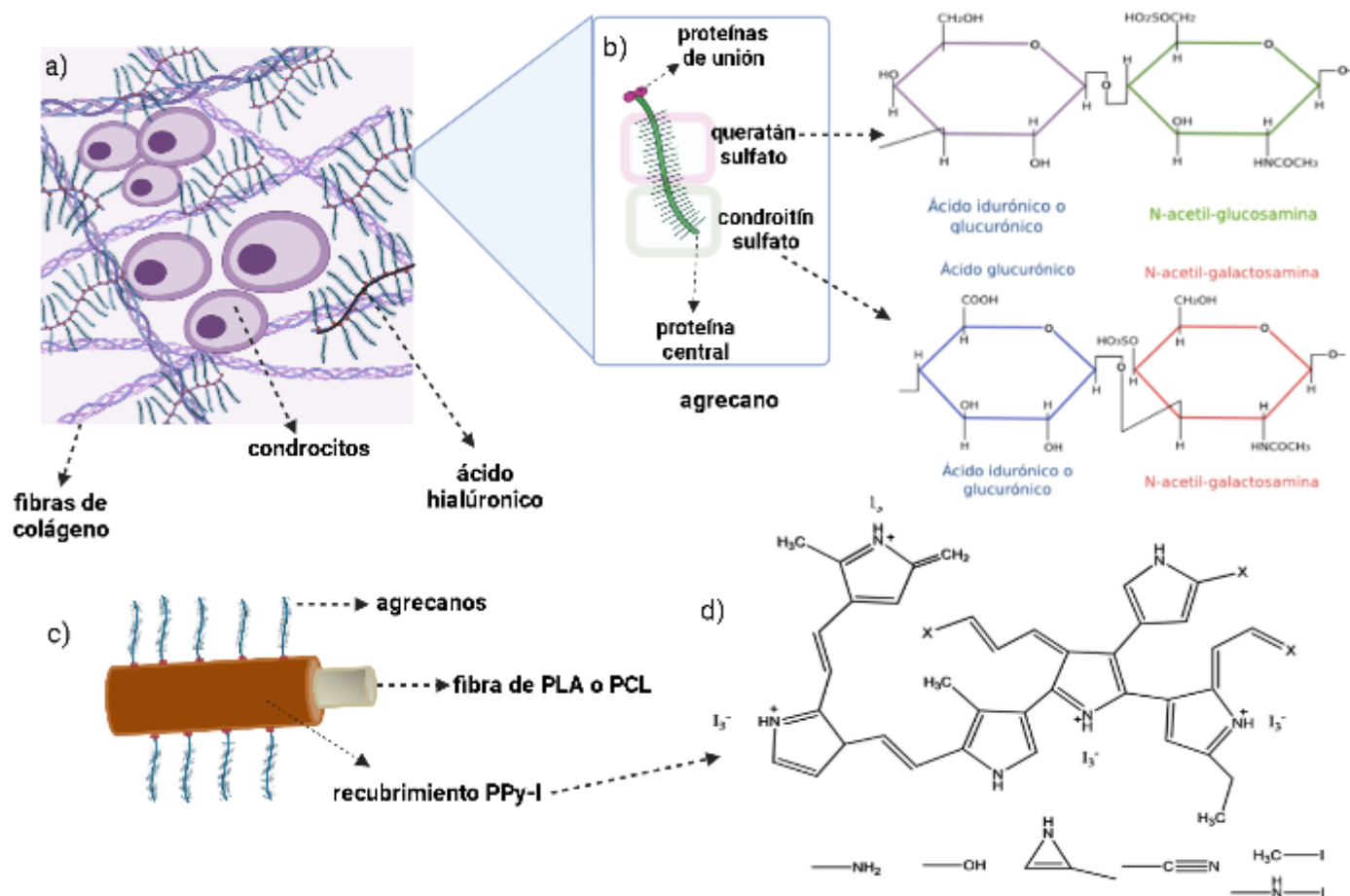


Fig. 8 a) Representación gráfica de la matriz extracelular del cartílago con sus principales componentes: condrocitos, fibras de colágeno, ácido hialurónico y proteoglicanos, b) composición y estructura química de la proteína agregano, c) representación gráfica de las fibras de PLA o PCL con tratamiento superficial PPy-I y la adhesión de la proteína agregano, d) estructura del PPy-I sintetizado por plasma propuesta por Kumar [66].

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ANDAMIOS PLA-PCL Y M1 (POROSIDAD).

Se exploró la superficie de los andamios tomando las imágenes representativas de la muestra con un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca JEOL JSM-7600F. Para identificar el área de los poros en los materiales generados, se usó el programa de procesamiento de imagen digital de dominio público ImageJ 1.46r. Para lo que es necesario establecer la escala de la imagen utilizando la distancia en píxeles y una distancia conocida (barra de escala de la imagen por utilizar) colocando la unidad de longitud (nm o μm) correspondiente. Se convirtieron las imágenes obtenidas mediante SEM para hacer un contraste binario, estableciendo las fibras en gris y poros en color rojo. Utilizando el comando analizador de partículas se identificarán los bordes de los poros indicando su área y ubicación.

BIOPSIA DE CARTÍLAGO Y CULTIVO PRIMARIO DE CONDROCITOS.

Las biopsias de cartílago hialino (**Fig. 9a**) se obtuvieron del apéndice xifoides del esternón de conejos blancos neozelandeses machos con un peso entre 2-2.5 kg y 3 meses de vida extrauterina.

El conejo se tranquilizó con una inyección intramuscular de Acepromacina (9 mg/Kg) y Ketamina (20 mg/Kg), anestesiando posteriormente con una inyección intravenosa de Pentobarbital Sódico (20 mg/kg). Se tomó la biopsia bajo condiciones asépticas del apéndice xifoides del esternón conejo (**Fig. 9a**). Obteniendo así una muestra de aproximadamente 1cm², la cual se transportará al laboratorio en un tubo Falcon con PBS c/Antibiótico-Antimicótico (1%) para ser procesada (**Fig. 9b**). Las células se indujeron para la multiplicación por disgregación mecánica en placas de cultivo de 100 mm con medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, posteriormente se disociaron enzimáticamente con collagenasa tipo II en agitación constante durante 15 minutos (**Fig. 9c**). Los sobrenadantes obtenidos se resuspendieron con 5 ml de medio suplementado y se centrifugaron para obtener el botón celular.

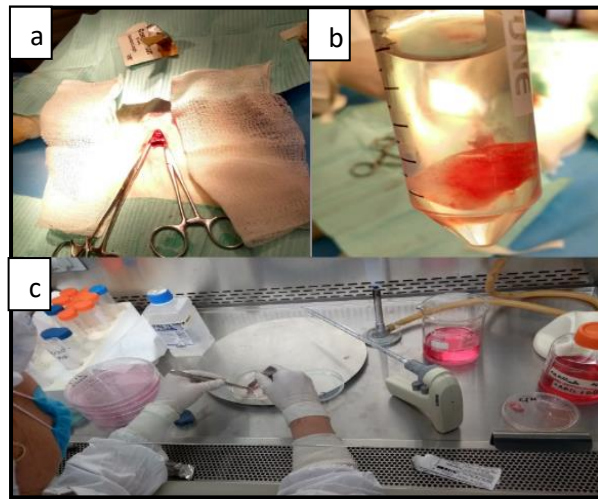


Fig. 9 a) Toma de biopsia apéndice xifoides del esternón de cartílago, b) lavado y transporte de muestra, c) procesamiento de la muestra, disgregación mecánica para multiplicación celular.

VIABILIDAD CELULAR PRE-IMPLANTE MTT.

La viabilidad fue evaluada a los 7 días del cultivo celular in vitro de los condrocitos autólogos sobre los andamios M1 y M2, a una concentración de 2.5×10^6 células/andamio. Las pruebas de viabilidad celular para los andamios celularizados M1 y M2 (sin y con proteína AG) se realizaron por triplicado usando el método colorimétrico del 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5—difetil-bromuro de tetrazolio (MTT, SIGMA). Los andamios fueron incubados a 37°C durante 4h en 300 μ L de medio DMEM/F12 sin suero y 30 μ L de PBS-MTT (5mg/mL), la placa se incubó a 37°C durante 4h cubierta por papel aluminio. Posteriormente se retiró el medio y los andamios fueron lavados con PBS para después añadir 300 μ L de solubilizador (SDS al 10% + HCl 0.04 N en isopropanol) para disolver los cristales de formazán y se incubó durante toda la noche a 37°C. Las placas se analizaron en un lector Labsystems Multiskan Ascent 354 a una densidad óptica (D.O) de 540 nm.

IMPLANTACIÓN DE LOS ANDAMIOS CON CÉLULAS AUTÓLOGAS: PRUEBAS IN VIVO.

Los andamios PLA-PCL-PPy-I (M1) y PLA-PCL-PPy-I-AG (M2) se esterilizaron y fueron hidratados en medio de cultivo durante 2h , posteriormente se sembraron condrocitos con una suspensión de densidad celular de 1.2×10^6 células/ml , los andamios se colocaron durante tres horas para asegurar la adhesión celular dentro de la incubadora en condiciones de cultivo estándar, luego fueron añadidos 2 ml de medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, 1% de antibiótico-antimicótico y 1% de ácido ascórbico (0.05 mg/ml) para mantener los andamios M1 y M2 en incubación durante 7 días, para posteriormente ser implantados en los cóndilos superior e inferior de las patas traseras del conejo, bajo condiciones asépticas apropiadas. El animal se calmó con una inyección intramuscular de acepromacina y ketamina; la anestesia general se realizó con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico y luego se anestesió localmente con xilocaína. Se afeitaron las patas traseras **Fig. 10a** y se realizó una incisión pararotuliana con un bisturí **Fig. 10b**, teniendo cuidado de no dañar las estructuras anatómicas hasta dejar expuesta la articulación **Fig. 10c**, se realizó la extracción total de cartílago con ayuda de un bisturí **Fig. 10d**. Se utilizaron 2 conejos para ser implantados con andamios de 0.7 cm de ancho x 0.7 cm de longitud, y un conejo control (sano), los andamios se colocaron como se muestra en la figura **Fig. 10e**, la ubicación de los andamios se ilustra en la **Fig. 10f**. Una vez que se insertaron todos los andamios, la herida se cerró en dos capas con suturas de vycril absorbibles **Fig. 10g**. Finalmente, se desinfectó el área y se administró una dosis única de antibiótico (cefalotina) 11mg por kilogramo después de la cirugía, los conejos permanecieron en jaula sin inmovilizar.

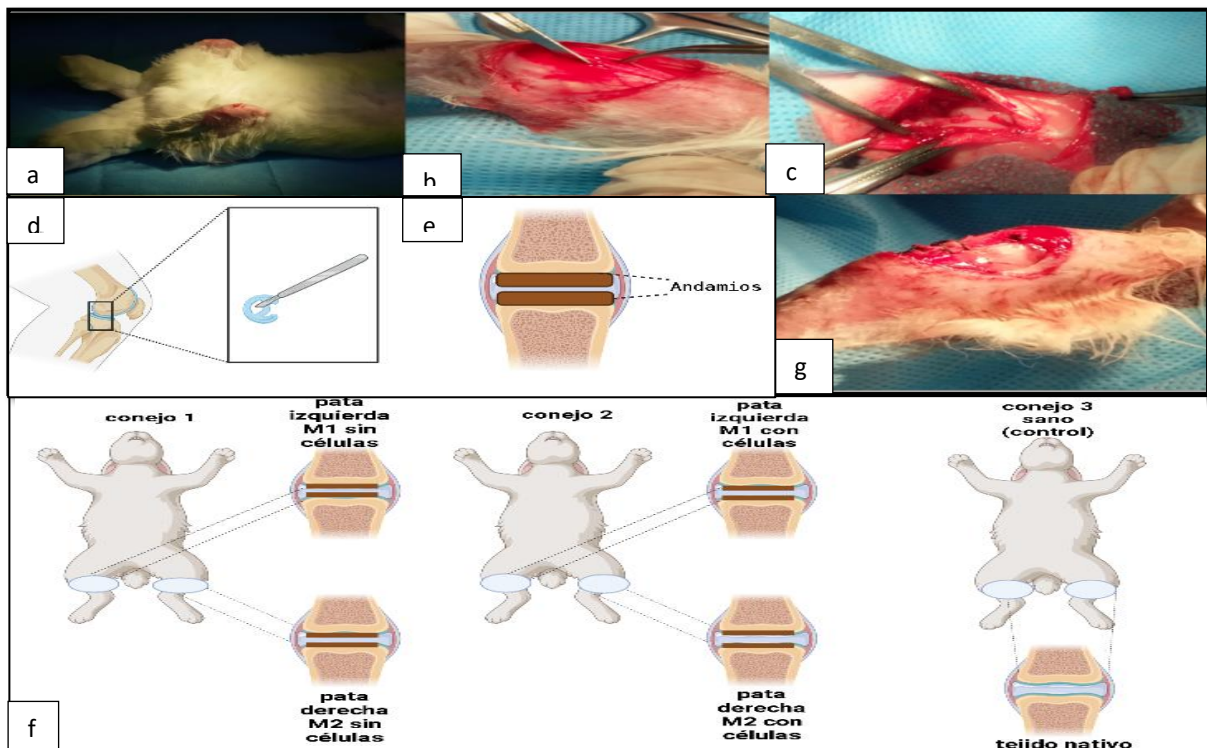


Fig. 10 Abordaje quirúrgico del experimento in vivo: a) anestesia general y afeitado de la zona articular, b) incisión pararotuliana, c) exposición de cartílago para preparación de la zona para implante, d) extracción total de cartílago con ayuda de un bisturí, e) colocación de implantes, f) número de conejos utilizados y ubicación de andamios en los implantes, g) sutura.

EXTRACCIÓN DE NEOTEJIDOS.

Tras un año de cultivo in vivo, fueron recuperados los neotejidos formados sobre PLA-PCL-PPy-I (M1) y PLA-PCL-PPy-I-AG (M2) siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

1. Se tranquilizó el conejo, con una inyección intramuscular de acepromacina (5 mg/ Kg) y ketamina (20 mg/ Kg), posteriormente se sacrificó con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (40mg/ml).
2. Se realizó un corte longitudinal con tijeras quirúrgicas para levantar la piel y dejar expuesta la musculatura de la zona articular (**Fig. 11a**), se efectuaron cortes con ayuda de una segueta en el fémur para la extracción total de la articulación (**Fig. 11b**), el exceso de musculatura se retiró con tijeras y bisturí, posteriormente se realizaron cortes de los ligamentos intracapsular, lateral y medial para separar el cóndilos superior e inferior (**Fig. 11c**).
3. Los neotejidos formados sobre los andamios M1 y M2 se colocaron en tubos Falcon con medio de cultivo F12 para ser transportados.



Fig. 11 Extracción de neotejidos: a) corte y retiro de piel, b) corte de fémur para retirar articulación, c) preparación de la muestra para ensayos de compresión.

CARACTERIZACIÓN DE LOS NEOTEJIDOS.

ENSAYOS DE COMPRESIÓN:

1. Los ensayos de compresión se realizaron con un analizador de textura Brookfield modelo CT3-4500, utilizando una geometría TA39 (cilíndrica de punta plana con 2 mm de $\varnothing$) como indentador. En la tabla de fijación se colocó una tenaza para ensayo de tensión uniaxial para acoplar la pata de conejo en el equipo (**Fig. 12a**).
2. Los parámetros utilizados en el ensayo fueron: velocidad 0.5 mm/min, carga de prueba de 0.1N, profundidad del objetivo en el cóndilo femoral lateral a 0.5 para el caso del tejido nativo y 0.7 mm para el caso de los neotejidos recuperados [56] [57] y 1 ciclo de carga.

3. Para poder realizar el montaje de la pieza en el equipo se realizaron cortes longitudinales en fémur con segueta, como se muestra en la **Fig. 12b**.
4. Se registró la carga y distancia de cada una de las piezas, con lo que se construirán sus respectivas gráficas carga vs distancia, posteriormente se calculó la histéresis (área dentro de la curva) de cada uno de los neotejidos mediante el programa OriginPro 8. Los resultados obtenidos en los ensayos mecánicos de los neotejidos fueron comparados con el cartílago articular nativo del conejo.

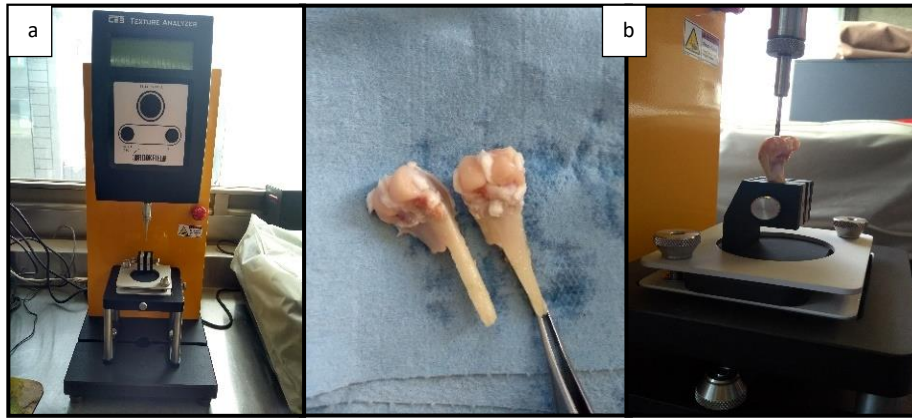


Fig. 12 a) acoplamiento del equipo para montaje de los materiales, b) preparación y montaje de los materiales.

HISTOLOGÍAS DE LOS NEOTEJIDOS RECUPERADOS DE LA ZONA ARTICULAR.

La deshidratación de los neotejidos recuperados sobre M1 y M2 con células y sin células se realizó mediante EtOH de graduación creciente (70, 80, 96 y 100%) durante 12 h cada uno en agitación constante, posteriormente se procesaron para su estudio histológico, realizando la fijación del tejido con formaldehído al 4%, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 μm de grosor. Por último, fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E), para una valoración general de la morfología celular (tiñe de azul-morado los núcleos y rosa el citoplasma celular).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

I. CONCLUYE EXPERIMENTO PILOTO IN VIVO DE LA ZONA DORSAL.

PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE LOS ANDAMIOS.

Mediante microscopía electrónica de barrido se exploró la superficie del andamio de PLA-PCL sin tratamiento superficial de plasma con PPy-I (**Fig. 13a**), en donde se mostraron fibras orientadas al azar, con una distribución del diámetro bimodal (**Fig. 13b**). Las fibras de PCL tienen diámetros promedio de $0.85 \pm 0.16 \mu\text{m}$ y las de PLA $2.57 \pm 0.66 \mu\text{m}$, las fibras fueron identificadas mediante. Partiendo de que las fibras de PCL son más delgadas que las de PLA, se espera sea más rápida la degradación *in vivo* al interactuar con los fluidos circundantes, este comportamiento se atribuye a la diferente relación superficie/volumen de las fibras. Además de que se ha reportado que los materiales de PCL electrohilados se degradaron mucho más rápido *in vivo* en comparación de *in vitro*, estos cambios en los tiempos de degradación más rápido *in vivo* pueden deberse a la degradación enzimática de PCL además de la degradación hidrolítica [58]. Con lo anterior se mejora el ambiente tridimensional del andamio (poros con mayores áreas), para ingeniería de tejidos es adecuado que las fibras del andamio experimenten una degradación gradual, con lo que se va dejando espacio suficiente para el crecimiento y la distribución uniforme de células.

El andamio tratado superficialmente con de plasma (M1) **Fig. 13c**, muestran claramente un aumento en el diámetro promedio de las fibras debido al recubrimiento de PPy-I de aproximadamente $0.50 \mu\text{m}$ ($1.32 \pm 0.24 \mu\text{m}$ para el PCL y $2.82 \pm 0.80 \mu\text{m}$ para el PLA) respectivamente (**Fig. 13d**) en comparación del andamio PLA-PCL sin tratamiento superficial (**Fig. 13b**), se observa incremento de la rugosidad en la superficie de las fibras y mejor definición de poros que apoyan la adhesión y proliferación celular **Fig. 13**. Se ha documentado que el incremento de en los diámetros de fibra favorece la adherencia y crecimiento celular, diferenciación condrogénica, expresión de colágeno tipo 2 y agregano, así como una distribución celular más uniforme por todo el andamio al paso de los días [31].

En la **Fig. 13e** se muestra la superficie del andamio M2 que tiene fibras tratadas con PPy-I y la adhesión de la proteína agregano, se observan estructuras muy bien definidas (cristales) debido al alto contenido de azúcar y sulfato de la proteína AG [45] [59]. Estas estructuras no aparecen en los otros andamios (**Fig. 13a** y **Fig. 13c**), por lo que visualmente se confirma la presencia de la proteína sobre el andamio.

El estudio morfológico de los andamios con tratamiento superficial de PPy-I mostraron incremento en la rugosidad de las fibras que favorecen el anclaje celular, por otra parte, el tamaño promedio de poro permitirá la libre difusión y crecimiento celular a través del andamio formando tejido tridimensional. Por último, se identificó la proteína AG sobre fibras del andamio M2 en forma de cristales, estas estructuras no fueron identificadas en las fibras de los otros andamios.

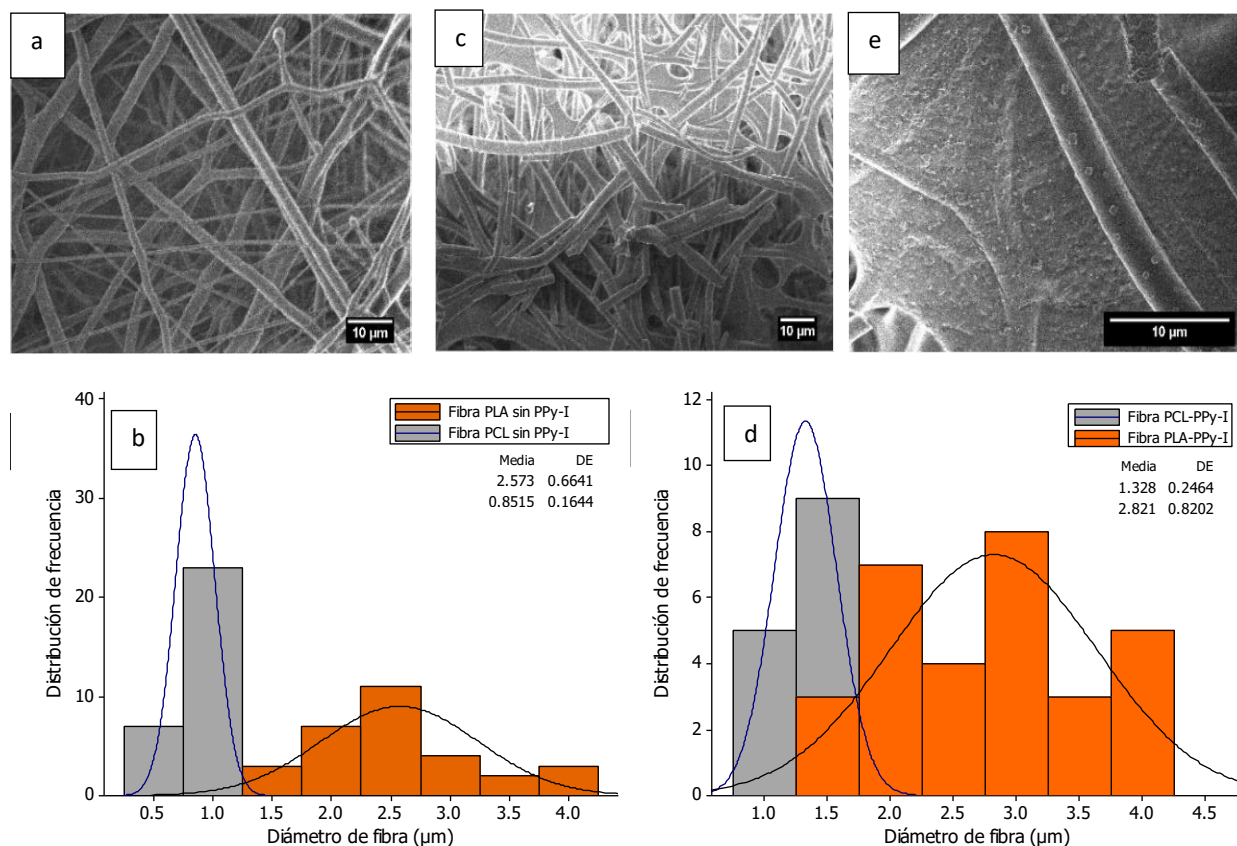


Fig. 13 Microfotografía (SEM) fibras orientadas al azar: a) Fibras electrohiladas de PLA/PCL (magnificación 1300×), c) Fibras electrohiladas de M1 (1000× magnificación), d) fibras de M1, e) Fibras electrohiladas de M2 (3500×). Histograma de frecuencia del diámetro de fibra en las imágenes SEM : b) fibras de PLA-PCL, d) fibras de M1.

Se utilizó el programa ImageJ para contabilizar y estimar el tamaño de los espacios entre las fibras (poros) en los andamios PLA-PCL y M1, basándonos en las imágenes bidimensionales obtenidas del SEM. Se establecieron umbrales de diferentes intensidades para cada andamio; los espacios están representados en rojo y las fibras en gris (**Fig. 14a** y **Fig. 14b**). Para realizar el análisis, se consideraron tamaños de área de entre los 78 y 550 μm^2 con el fin de evitar incluir artefactos de la imagen. Los resultados se muestran los contornos y los valores de las estructuras que se consideraron para el análisis (**Fig. 14c** y **Fig. 14d**).

El diámetro promedio de los condrocitos en el cartílago hialino es de 5 a 30 μm [60] [61], mientras que los espacios aparentes (áreas promedio de poro) entre las fibras de los andamios PLA-PCL (**Fig. 14a**) y M1 (**Fig. 14b**) fueron $186 \pm 106 \mu\text{m}^2$ y $156 \pm 85 \mu\text{m}^2$ respectivamente. Las proyecciones bidimensionales evidencian que el andamio tiene características que permitirá la filtración de células, soportará la generación de tejido superficial y tridimensional, esto sustentado con la literatura, en donde se ha mostrado que los andamios microporosos apoyan la condrogénesis, proliferación celular, además de mejorar la integración del tejido y la producción de MEC (glicosaminoglicanos sulfatados y colágeno) [16] [35].

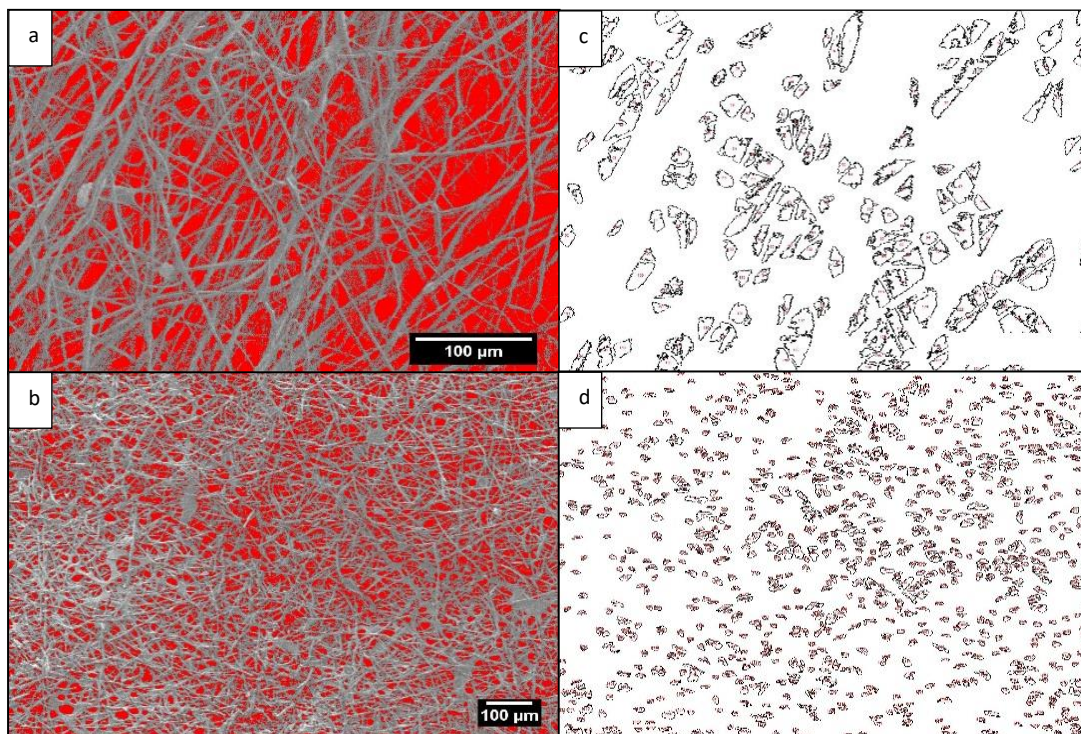


Fig. 14 Imágenes SEM de los andamios con cambio de umbral (fibras en gris), poros en rojo):
a) PLA-PCL, b) M1. Contornos obtenidos del análisis: c) PLA-PCL, d) M1

ENSAYO DE MTT (VIABILIDAD CELULAR PREIMPLANTE).

A continuación, se muestran los resultados de la viabilidad celular de los andamios M1 y M2 celularizados para los preimplantes cultivados in vitro en una caja Petri durante 7 días en condiciones estándar, por el método 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5—difetil-bromuro de tetrazolio (MTT) para la generación de cartílago funcional. Se observó un aumento en la viabilidad (proliferación celular) en la superficie tratada con la proteína AG (M2), en comparación con las superficies que no se trataron con proteína AG (M1) (**Fig.15**). Los niveles de absorbancia se midieron por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar.

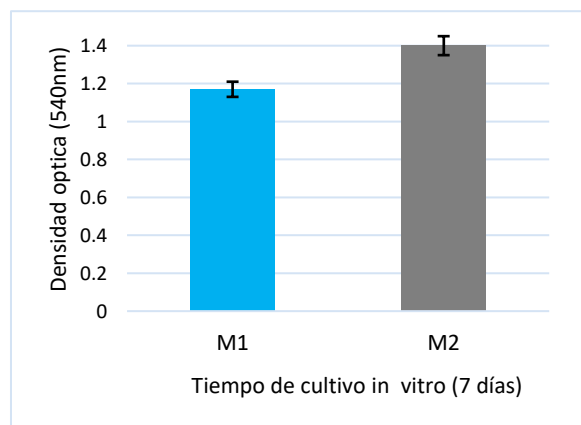


Fig.15 Análisis MTT preimplante.

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS NEOTEJIDOS RECUPERADOS DE LA ZONA DORSAL. (FINALIZA ESTUDIO PILOTO).

La histología del neot Tejido generado a los 30 días de cultivo in vivo de la zona dorsal sobre el andamio M2 celularizado se muestra en la **Fig. 16a**, los núcleos de las células en tono morado y citoplasma rosado, con una distribución apilada de condrocitos con morfología homogénea (elíptica-redondeada) característica del cartílago articular. Grupos isógenos típicos de la división celular se muestran en el recuadro de la esquina superior derecha, mientras que en el neot Tejido generado sobre M1 con células (**Fig. 16b**) se identificó tejido fibroso (fibroblastos).

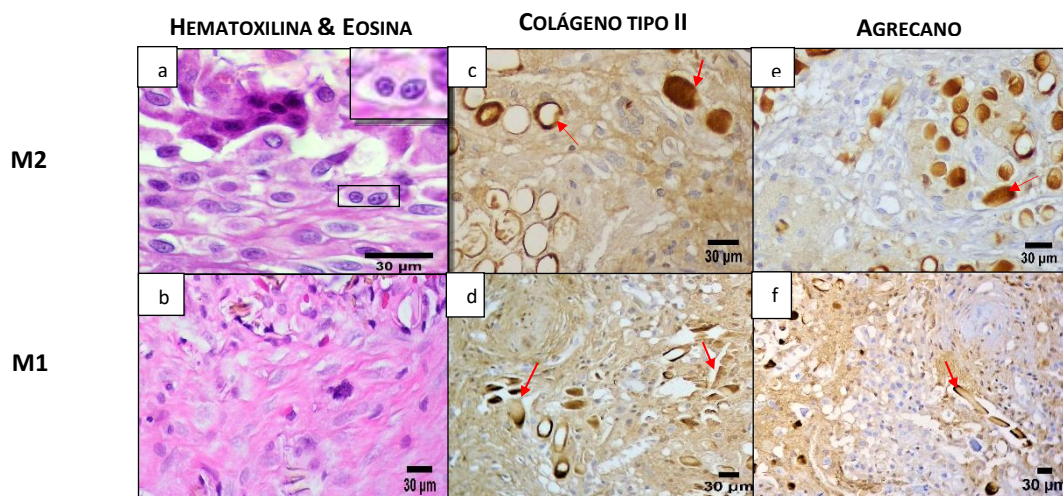


Fig. 16 Histologías e inmunohistoquímicas de M2 y M1.

Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron marcadores de diferenciación condrogénica del cartílago hialino nativo el colágeno tipo II y la proteína agrecano. El neot Tejido generado sobre M2 muestra expresión de colágeno tipo II (**Fig. 16c**) y proteína agrecano (**Fig. 16e**) en tono marrón, se identifican células elípticas y tejido uniforme no fibroso.

Por otra parte, el neot Tejido generado sobre el andamio M1 muestra áreas con expresión de colágeno tipo II (**Fig. 16d**) y agrecano (**Fig. 16f**), sin embargo, en ambas imágenes (**Fig. 16d** y **Fig. 16f**) es visible tejido fibroso y células alargadas (fibroblastos).

Se visualizan cortes transversales y longitudinales de las fibras pertenecientes al andamio temporal, que muestran una tinción marrón en tono más oscuro (marcados con flechas rojas) debido a la reacción del recubrimiento en las fibras con PPy-I y el peróxido empleado en la tinción, esto para las histologías de ambos neot Tejidos M1 y M2.

Las histologías e inmunohistoquímicas de los neot Tejidos recuperados de la zona dorsal del conejo muestran que el andamio M2 con previa siembra de condrocitos es un soporte temporal con características y composición que apoyan la generación de neot Tejido con expresión de las proteínas colágena tipo II y agrecano, que son importantes componentes de la matriz extracelular del cartílago, ya que las cadenas sulfatadas (condroitín sulfato y queratán sulfato) dotan al cartílago articular su capacidad de resistir cargas de compresión, permitiendo la

deformación y recuperación del tejido, además de contribuir con la difusión de nutrientes y eliminación de desechos. En la literatura se ha mostrado que una matriz de cartílago pobre en proteoglicanos exhibe un módulo de compresión insignificante en comparación con el tejido normal además se ha evidenciado que los proteoglicanos contribuyen al menos el 98% del equilibrio en el módulo de compresión del articular [62].

II. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS IN VIVO ZONA ARTICULAR.

Después de los resultados obtenidos en la caracterización de los andamios y neotejidos recuperados de la zona dorsal, se mostró el potencial del andamio M2 con células como tratamiento en las lesiones condrales. Por lo que se realizó un nuevo experimento en donde los andamios M1 y M2 con y sin células fueron colocados en los cóndilos superior e inferior en ambas patas traseras en una muestra de dos conejos neozelandeses como se mostró en la Fig. 10f; con el objetivo de generar tejido funcional. Tras un año de haber sido implantados, se extrajeron los neotejidos generados sobre los andamios M1 y M2, retirando totalmente las articulaciones (tibia y fémur), limpiando la piel y músculo, dejando expuesto el hueso como se muestra en la Fig. 11c. Se realizó la evaluación visual de los tejidos recuperados, ensayos mecánicos de compresión e histológicas, comparando los resultados con el tejido nativo, a continuación, se muestran los resultados.

APARIENCIA DE NEOTEJIDOS FUNCIONALES RECUPERADOS DE LA ZONA ARTICULAR.

Tras un año implantados, fueron extraídos los neotejidos formados sobre los andamios M1 y M2 con y sin células, en la figura Fig. 17 se observa la apariencia de los neotejidos recuperados. Se muestra que para todos los casos la integración del hueso con el neocartílago fue buena, no se observan huecos o rastros de la brecha entre ambos tejidos en los alrededores, tienen apariencia hidratada con cóndilos mediales y laterales bien definidos de aspecto no fibroso o cicatricial, no se aprecia la presencia física del soporte temporal (andamio).

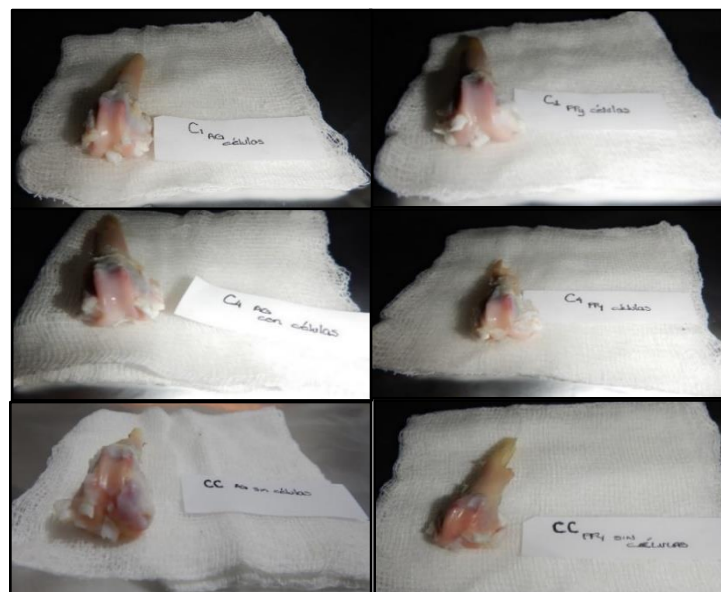


Fig. 17 Formación de neotejidos sobre los cóndilos femorales tratados con los andamios M1 y M2 con y sin previo cultivo celular.

ENSAYOS DE COMPRESIÓN.

De los ensayos de compresión realizados sobre el tejido nativo y los neotejidos recuperados M1 y M2, se obtuvieron las curvas que se muestran en el Gráfico 2, la respuesta del cartílago (esfuerzo máximo e histéresis) puede ser diferente de acuerdo con las condiciones en las que se desarrolló el ensayo como son: la profundidad y zona en donde se aplica la carga. Esta última debido a que no es un tejido uniforme se buscó colocar la punta del indentador (que es una punta plana) en la parte más plana de los tejidos, registrando los resultados en la misma zona para evitar grandes variaciones en los resultados.

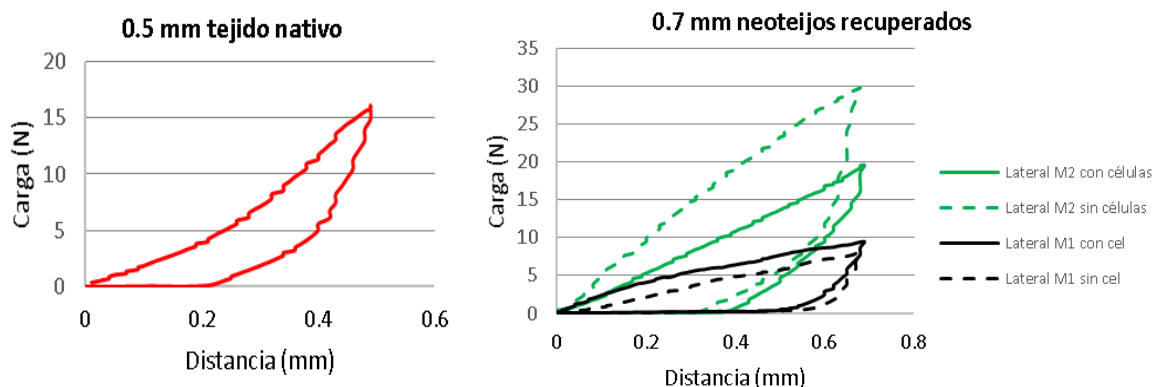


Gráfico 2 Curvas carga vs distancia: a) cartílago nativo, b) neotejidos M1 y M2 con y sin células.

En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de compresión:

	Tejido Nativo.	M2 Lat c/c	M2 Lat s/c	M1 Lat c/c	M1 Lat s/c
Deformación total. (mm)	0.5			0.7	
Trabajo total. (mJ)	4.37	8.5±1.2	13.9	4.9±0.6	3.3±0.3
Deformación recuperable. (mm)	0.46	0.5±0.1	0.4	0.57±0.1	0.55±0.06
Esfuerzo máximo (N)	16.09	19.79±1.6	29.7	9.83±0.6	8.69±0.7

Tabla 2 Resultados obtenidos de los ensayos de compresión para el tejido nativo y los neotejidos M1 y M2 con y sin células recuperados de la zona articular.

Se utilizó el programa OriginPro para calcular el área dentro de las curvas, carga vs distancia obtenidas en los ensayos de compresión (Gráfico 2), el área es la energía disipada por cada uno de los tejidos, los resultados se registraron en la tabla 3. Posteriormente se calculó el porcentaje de energía disipada y porcentaje de deformación para cada uno de los tejidos con las ecuaciones **a** y **b**, los valores obtenidos se registraron en la Tabla 3:

$$a) \% \text{ Energía Disipada} = \frac{\text{energía disipada}}{\text{Trabajo total}} \times 100$$

$$b) \% \text{ Deformación recuperada} = \frac{\text{Deformación recuperable}}{\text{Deformación total}} \times 100$$

	Tejido Nativo.	M2 Lat c/c	M2 Lat s/c	M1 Lat c/c	M1 Lat s/c
Energía disipada. (mJ)	1.8	5.1±1.2	8	3.6±0.6	2.6±0.1
% Energía disipada.	42.1	60±0.2	57.5	72.8±0.5	78.8±0.1
% Deformación recuperable.	92	71.4±0.1	57.1	81.4 ± 0.1	78.5±0.1

Tabla 3 Resumen de resultados calculados a partir de los ensayos de compresión para el cartílago nativo y los neotejidos formados sobre M1 y M2 con y sin células, recuperados de la zona articular.

El porcentaje de energía disipada indica pérdida de energía en forma de calor por fricción, es por esta razón que su importancia radica en que un valor muy “alto” comparado con los valores del tejido nativo podría ser traducido en un aumento de la temperatura local en el tejido (mayor a 37°C), entonces la disipación de energía es un mecanismo que retrasa la aparición de daños, por lo que entre mayor sea (su valor) se compromete la remodelación de la MEC induciendo un proceso patológico [3] [63] que podría ser debido a una baja lubricación del tejido (matriz con bajo contenido de GAGs o matriz degenerada) generando aumento de fricción que a su vez disminuye el efecto amortiguador del tejido [64], aumentando los riesgos en la generación de grietas en el interior del tejido como forma de disipar la energía.

Para el caso del cartílago nativo se observa un bajo porcentaje de energía disipada (42%), lo que podría indicar ser un tejido mejor hidratado que generará menor fricción durante la marcha permitiendo conservar su estructura con menos riesgos sufrir fracturas o fisuras. Al ser comparado con el alto porcentaje de energía disipada en los neotejidos generados sobre los andamios que no contienen proteína agregano ya sea con o sin previa celularización, tienden a tener gran riesgo a sufrir fisuras o fracturas ante cargas repetidas, ya que generan más fricción y por lo tanto mayor generación de calor, por lo que se tratan de neotejidos con menor capacidad elástica, en donde su capacidad de recuperación o amortiguamiento se ve comprometida. Por otra parte, los neotejidos formados sobre los andamios que contienen la proteína agregano (M2) tienden a tener valores más bajos en el porcentaje de energía disipada siendo más cercanos a los valores obtenidos para tejido nativo, lo que podría indicar un tejido mejor hidratado y con una MEC de composición similar al tejido nativo.

El porcentaje de deformación recuperada calculado para el cartílago nativo fue del 92%, indica una alta capacidad de recobrar su forma original una vez que cesa la fuerza que lo comprime, mostrando su característico comportamiento viscoelástico. Aun cuando los resultados obtenidos para los tejidos M1 con y sin células mostró tejidos más deformables, tienen el inconveniente de contar con un alto porcentaje de energía disipada, que se traduce como una menor capacidad de amortiguar el impacto; además de que su baja oposición a la deformación

(esfuerzo máximo) denota un neot Tejido blando que podría generar fracturas desencadenando un colapso prematuro ante cargas repetidas (hundimientos), lo anterior puede sugerir un cambio de fenotipo celular.

Es entonces que, de acuerdo con los resultados obtenidos, la incorporación de la proteína AG y células en el andamio electrohilado de PLA-PCL-PPy-I (M2 con células), favorece la respuesta mecánica durante la compresión, esto a pesar de haber mostrado menor capacidad de recuperación ante la deformación, ya que cuenta con una mejor capacidad de amortiguamiento, esto de acuerdo con una menor cantidad de energía disipada. Además de contar con una oposición a la deformación (esfuerzo máximo) con orden de magnitud más cercano al tejido nativo, por lo que su respuesta para soportar cargas repetidas podría verse favorecida, esto podría deberse a una mejor hidratación del neot Tejido y la estructura de su matriz (tejido no fibroso).

Por último, los neot Tejidos generados sobre M2 sin células, tienden a tener una muy baja recuperación del tejido durante la compresión, además de que la oposición para ser deformado se encuentra muy por encima de la obtenida en el cartílago nativo por lo que podría indicar un cambio de fenotipo celular que favorece un aumento en la fricción y como consecuencia un incremento de la temperatura local del tejido, induciendo un proceso de destrucción de su matriz [65].

HISTOLOGÍAS DE LAS MUESTRAS ARTICULARES.

En la **Fig. 18** se aprecia una sección histológica de cartílago hialino de conejo sano, en la que se visualizan condrocitos organizados en racimos apilados embebidos en la matriz extracelular, los condrocitos presentan núcleos redondeados. Se observan diferentes zonas como son el cartílago articular (CA), cartílago calcificado (CC), hueso subcondral (HS) y la bolsa sinovial (BS).

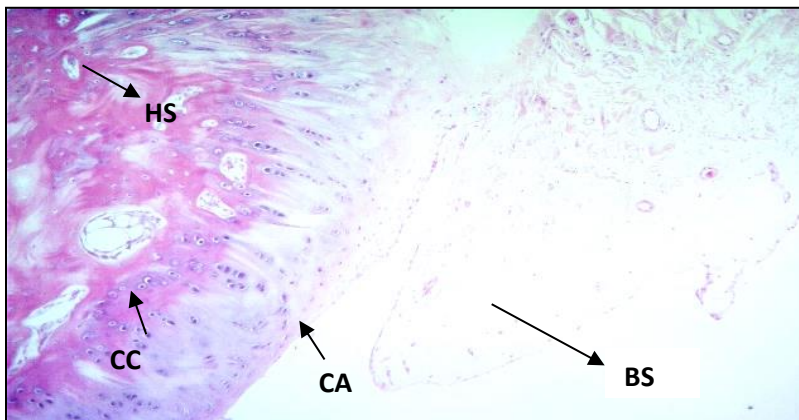


Fig. 18 Histología cartílago hialino sano.

Los cortes histológicos teñidos con H-E de los neot Tejidos formados sobre el neot Tejido M2 con previo cultivo celular de condrocitos (**Fig. 19d**) muestra una morfología más parecida a la del cartílago hialino articular nativo (**Fig. 18**); en el que se distinguen células con morfología elíptica características del tejido hialino en la zona superficial, que es la que mantiene contacto físico con el cartílago articular opuesto, su importancia radica en la funcionalidad

del tejido durante la marcha proporcionando un mejor ambiente para el amortiguamiento de la carga y desplazamiento con bajos niveles de fricción. Mientras que todos los demás neotejidos (**Fig. 19a**, **Fig. 19b** y **Fig. 19c**) muestran claramente cambio de fenotipo mediante formación de fibrocartilago y calcificaciones (**Fig. 19b**), por lo que su capacidad de soportar cargas repetidas se ve comprometido debido a su bajo amortiguamiento y altos niveles de fricción que desencadenará progresivamente el desgaste articular.

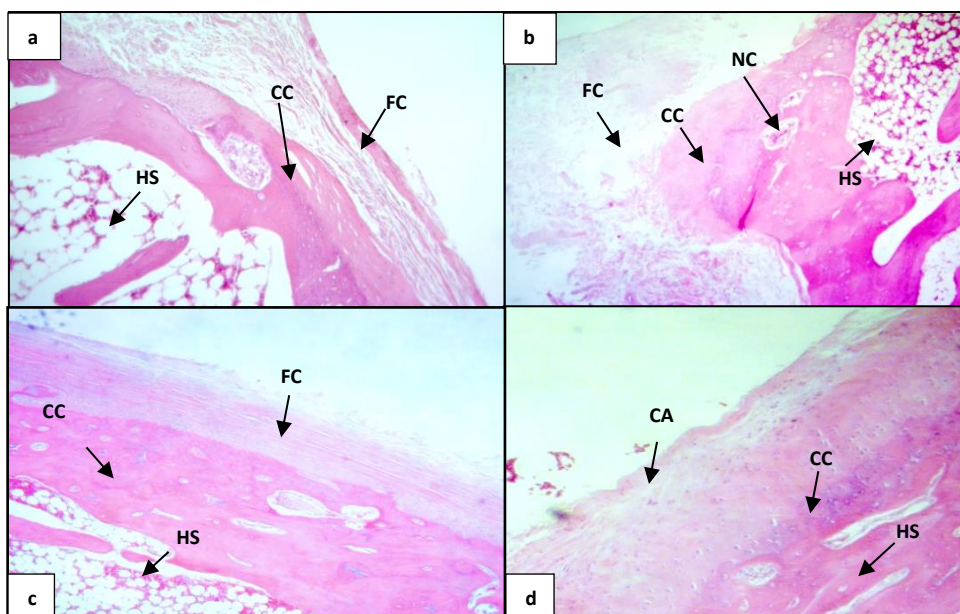


Fig. 19 Histologías de neotejidos generados sobre a) M1 sin células, b) M1 con células, c) M2 sin células y d) M2 con células.

FC-Fibrocartilago, CC-cartilago calcificado, HS-Hueso subcondral, NC-Nódulo calcificado.

CONCLUSIONES

De andamios:

Se prepararon andamios electrohilados de poli (ácido láctico) PLA- policaprolactona (PCL) modificados superficialmente con plasma PPy-I que apoyo la adhesión de la proteína AG, que fue detectada mediante SEM y FTIR, y se utilizó como agente de diferenciación condrogénica.

Las fibras de los andamios presentaron una distribución bimodal, en donde las fibras de policaprolactona (PCL) son claramente más delgadas en comparación de las fibras de ácido poliláctico (PLA), mejorando las condiciones del entorno en cuanto a la porosidad para el depósito celular, anclaje y generación de tejido tridimensional. Lo anterior se comprobó durante la evaluación in vivo, en donde se mostró que el tamaño de poro y estructura del andamio promueve el crecimiento de tejido tridimensional.

La viabilidad celular (condrocitos) mostró que los andamios que contienen la proteína AG tienen mejor proliferación celular en comparación de los que no contienen la proteína.

Histología e inmunohistoquímica de la zona dorsal:

La histología para el neot Tejido generado sobre el andamio de PLA-PCL-PPy-I-AG celularizado mostró una morfología más parecida al tejido nativo, así como grupos isógenos que son característicos de la división celular, mientras que en el neot Tejido formado sobre el andamio PLA-PCL-PPy-I se identificó tejido fibroso. Para ambos neot Tejidos se obtuvo inmunoreacción positiva para las proteínas colágeno tipo II y agregano, sin embargo, para los generados sobre PLA-PCL-PPy-I se identificó el cambio de fenotipo celular a tejido fibroso.

Evaluación Visual de los neot Tejidos recuperados de la zona articular:

La evaluación visual de los neot Tejidos recuperados tras un año de su implantación en la zona articular mostró una excelente integración con el cartílago nativo circundante y el hueso subcondral en donde no se muestran físicamente límites o huecos entre la formación de ambos tejidos.

Ensayos de compresión e histologías de la zona articular:

Los ensayos de compresión e histologías evidenciaron la influencia de la proteína AG y la celularización de los andamios para una favorable respuesta mecánica y generación de cartílago, se mostró un porcentaje de disipación cercano al valor obtenido para el tejido nativo, morfología de células redondeadas, elípticas y apiladas, así como la expresión de proteínas características del cartílago nativo. En comparación con los demás neot Tejidos que mostraron alto porcentaje de disipación de energía y muy baja oposición a la deformación, disminuyendo el efecto amortiguador, comprometiendo su integridad, así como la identificación de tejido fibroso y calcificaciones.

En General:

La comparación entre los resultados obtenidos en los ensayos mecánicos e histologías del cartílago nativo de los neot Tejidos recuperados de la zona articular muestran claramente que el andamio M2 con células, favorece el comportamiento mecánico, la generación de neocartílago y la expresión de proteínas características del tejido nativo, por lo que la evidencia en este trabajo muestra el potencial del andamio M2 celularizado en el tratamiento de osteoartritis para la generación de cartílago articular funcional.

TRABAJOS FUTUROS

Para trabajos futuros se requiere continuar con las inmunohistoquímicas e incrementar el número de muestras y ensayos *in vivo* llevando un seguimiento mensual desde su implantación hasta antes de su extracción mediante resonancia magnética nuclear, para poder observar detalladamente el progreso y la composición en la formación del neotejido. Además, de incrementar el número de ciclos en los ensayos de compresión, y así detallar el comportamiento mecánico del neotejido, siempre comparando los resultados obtenidos con el tejido nativo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. J. Roughley, «The structure and function of cartilage proteoglycans.,» *European Cells and Materials*, vol. 12, pp. 92-101, 2006.
- [2] C. Bastías O, «Inflamación en osteoartritis,» *Revista Chilena de Reumatología*, vol. 27, nº 2, pp. 83-86, 2011.
- [3] D. F. Rodríguez-Camacho y J. F. Correa-Mesa, «Biomecánica del cartílago articular y sus respuestas ante la aplicación de las fuerzas,» *MÉD.UIS*, vol. 31, nº 3, pp. 47-56, 2018.
- [4] C. Chung y J. A. Burdick, «Engineering cartilage tissue,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, nº 2, pp. 243-262, 2008.
- [5] C. Vinatier , C. Bouffi , C. Merceron, J. Gordeladze , J. M. Brondello , C. Jorgensen , P. Weiss , J. Guicheux y D. Noël , «Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy,» *Current Stem Cell Research & Therapy*, vol. 4, nº 4, pp. 318-329, 2009.
- [6] H. Esquivel Solís, A. A. Canales Aguirre, T. Neri Gómez y N. E. Díaz Martínez, «Uso de las células troncales mesenquimales en la osteoartritis,» *Investigación en discapacidad.*, vol. 3, nº 2, pp. 77-86, 2014.
- [7] M. Cucchiariini, H. Madry, F. Guilak, D. B. Saris, K. J. Stoddart, M. Koon Wong y P. Roughley, «A vision on the future of articular cartilage repair,» *European Cells and Materials*, vol. 27, pp. 12-16, 2014.
- [8] A. P. Nicolini, R. Teixeira Carvalho, B. Dragone, M. Lenza, M. Cohen y M. Ferreti, «Updates in biological therapies for knee injuries: full thickness cartilage defect,» *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, vol. 7, nº 3, pp. 256-262, 2014.

- [9] C. B. Eaton , L. F. Schaefer, J. Duryea, J. B. Driban, G. H. Lo, M. B. Roberts, I. K. Haugen, B. Lu, M. C. Nevitt, M. C. Hochberg, R. D. Jackson, C. K. Kwoh y T. McAlindon, «Prevalence, Incidence, and Progression of Radiographic and Symptomatic Hand Osteoarthritis: The Osteoarthritis Initiative,» *Arthritis & Rheumatology*, vol. 74, nº 6, pp. 992-1000, 2022.
- [10] K. Ye, R. Felimban, S. E. Moulton, . G. G. Wallace, C. Di Bella, K. Traianedes, P. F. M. Choong and D. E. Myers, "Bioengineering of articular cartilage: past, present and future.," *Regenerative Medicine*, vol. 8, no. 3, pp. 333-349, 2013.
- [11] B. Johnstone, M. Alini, M. Cucchiari, G. R. Dodge, D. Eglin, F. Guilak, H. Madry, A. Mata, R. L. Mauck, C. E. Semino y M. Soddart, «Tissue engineering for articular cartilage repair-the state of the art,» *European Cells and Materials*, vol. 25, pp. 248-267, 2013.
- [12] Y. Liu, K. M. Shah y J. Luo, «Strategies for Articular Cartilage Repair and Regeneration,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021.
- [13] R. Espinoza Morales, J. Alcántar Ramírez, C. A. Arce Salinas, L. M. Chávez Espina, J. A. Esquivel Valerio, J. J. Gutiérrez Gómez, L. De la Lanza, J. L. Martínez Hernández, C. Méndez Medina, M. Robles San Román, E. Santillán Barrera, F. Torres Roldan, J. O. Sosa García, J. Aldrete Velasco y A. Romero González, «Reunión multidisciplinaria de expertos en diagnóstico y tratamiento de pacientes con osteoartritis. Actualización basada en evidencia,» *Medicina Interna de México*, vol. 34, nº 3, pp. 443-476, 2018.
- [14] M. Ochi, Y. Uchio, K. Kawasaki, S. Wakitani y J. Iwasa, «Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee,» *The journal of bone and joint surgery*, vol. 84B, nº 4, pp. 571-578, 2002.
- [15] Z. Youjia , W. Hua, S. Shaofa, Z. Ting, W. Jingjing y W. Ying, «Designed composites for mimicking compressive mechanical properties of articular cartilage matrix,» *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 36, pp. 32-46, 2014.
- [16] J. A. Rojas-Murillo, M. A. Simental-Mendía, N. K. Moncada-Saucedo, P. Delgado-Gonzalez, J. F. Islas, J. A. Roacho-Pérez, y E. N. Garza-Treviño, «Physical, Mechanical, and Biological Properties of Fibrin Scaffolds for Cartilage Repair,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, nº 17, p. 9879, 2022.
- [17] V. Rai, M. F. Dilisio , . N. E. Dietz y D. K. Agrawal, «Recent strategies in cartilage repair: A systemic review of the scaffold development and tissue engineering,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 105, nº 8, pp. 2343-2354, 2017.
- [18] S. Chavda , S. Rabbani y T. Wadhwa , «Role and Effectiveness of Intra-articular Injection of Hyaluronic Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review.,» *Cureus. Journal of*

Medical Science, vol. 14, nº 4, p. e24503, 2022.

- [19] D. Sun, X. Liu , L. Xu, Y. Meng , H. Kang y Z. Li , «Advances in the Treatment of Partial-Thickness Cartilage Defect,» *International Journal of Nanomedicine*, vol. 2022, nº 17, pp. 6275-6287, 2022.
- [20] B. J. Huang, J. C. Hu y K. A. Athanasiou, «Cell-Based tissue engineering strategies uses in the clinical repair of articular cartilage,» *Biomaterials*, vol. 98, pp. 1-22, 2016.
- [21] E. Kon, G. Filardo, B. Di Matteo, F. Perdisa y M. Marcacci, «Matrix assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage treatment,» *Bone & Joint Research*, vol. 2, nº 2, pp. 18-25, 2013.
- [22] M. K. Murphy, G. D. DuRaine, A. H. Reddi, J. C. Hu y K. A. Athanasiou, «Inducing articular cartilage phenotype in costochondral cells,» *Arthritis Research & Therapy*, vol. 15, nº 6, pp. 1-11, 2013.
- [23] E. V. Medvedeva, E. A. Grebenik, V. I. Telpuhov , A. V. Lychagin, P. S. Timashev y A. S. Chagin, «Repair of Damaged Articular Cartilage: Current Approaches and Future Directions.,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, nº 8, pp. 1-23, 2018.
- [24] B. Zhang, J. Huang y R. J. Narayan, «Gradient scaffolds for osteochondral tissue engineering and regeneration,» *J. Mater. Chem. B*, vol. 8, nº 36, pp. 8149-8170, 2020.
- [25] H. Gao, Q. Pan, W. Dong y Y. Yao, «Progress in Osteochondral Regeneration with Engineering Strategies,» *Ann Biomed Eng*, vol. 50, nº 10, pp. 1232-1242, 2022.
- [26] X. Yang, S. Li, Y. Ren, L. Qiang, Y. Liu, J. Wang y K. Dai, «3D printed hydrogel for articular cartilage regeneration,» *Composites Part B*, vol. 237, nº 109863, 2022.
- [27] A. Zelinka, A. J. Roelofs, R. A. Kandel y C. De Bari, «Cellular therapy and tissue engineering for cartilage repair,» *Osteoarthritis and Cartilage*, pp. 1-14, 2022.
- [28] M. Gong, J. Sun, G. Liu, L. Li, S. Wu y Z. Xiang, «Graphene oxide–modified 3D acellular cartilage extracellular matrix scaffold for cartilage regeneration.,» *Materials Science and Engineering*, vol. 119, nº 111603, pp. 1-15, 2021.
- [29] S. Jelodari , A. Ebrahimi Sadrabadi, Z. Fatemeh, S. Jahangir, A. Mahmoud, S. Mohsen y H. Samaneh, «New Insights into Cartilage Tissue Engineering: Improvement of Tissue-Scaffold Integration to Enhance Cartilage Regeneration,» *BioMed Research International*, nº 7638245, p. 13, 2022.
- [30] H. A. Owida, J. I. Al-Nabulsi, F. Alnaimat, M. Al-Ayyad, N. M. Turab, A. A. Sharah y . M. Shakur, «Recent Applications of Electrospun Nanofibrous Scaffold in Tissue Engineering,» *Applied Bionics and Biomechanics*, vol. 2022, nº 1953861, p. 15, 2022.
- [31] M. Herrero-Herrero, S. Alberdi-Torres, M. L. González-Fernández, G. Vilariño-Feltrer, J. C. Rodríguez-

Hernández, A. Vallés-Lluch y V. Villar-Suárez, «Influence of chemistry and fiber diameter of electrospun PLA, PCL and their blend membranes, intended as cell supports, on their biological behavior.,» *Polymer Testing*, vol. 103, p. 107364, 2021.

- [32] D. S. Young, «Hyaluronic acid-based nanofibers via electrospinning,» *EUA*, 2006.
- [33] I. Shabani, V. Haddadi-Asl, E. Seyedjafari y M. Soleimani, «Cellular infiltration on nanofibrous scaffolds using a modified electrospinning technique,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 43, nº 1, pp. 50-54., Jun. 2012.
- [34] J. A. Steele, S. D. McCullen, A. Callanan, H. Autefage y M. M. Stevens, «Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering,» *Acta Biomaterialia*, vol. 10, nº 5, pp. 2065-2075, 2014.
- [35] O. Urbanek, D. Kołbuk y M. Wróbel, «Articular cartilage: New directions and barriers of scaffolds development– review,» *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 68, nº 7, pp. 396-410 , 2018.
- [36] U. Cheema, M. Ananta y V. Mudera, «Collagen: Applications of a Natural Polymer in Regenerative Medicine,» de *Regenerative Medicine and Tissue Engineering-Cells and Biomaterials*, InTech, 2011, pp. 287-300.
- [37] Z. Chao, C. Dou y S. Dong, «Scaffolding biomaterials for cartilage regeneration,» *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, pp. 1-8, 2014.
- [38] B. Wang, F. Chariyev-Prinz, R. Burdis, K. Eichholz y D. J. Kelly, «Additive manufacturing of cartilage-mimetic scaffolds as off-the-shelf implants for joint regeneration.,» *Biofabrication*, vol. 14, nº 2, p. 024101, 2022.
- [39] T. Gredes, F. Kunath, T. Gedrange y C. Kunert-Keil, «Bone Regeneration after treatment with covering materials composed of flax fibers and biodegradable plastics: A histological study in rats,» *BioMed Research International*, vol. 2016, pp. 1-8, 2016.
- [40] D. Puppi, F. Chiellini, . A. Piras y E. Chiellini, «Polymeric materials for bone and cartilage repair,» *Progress in Polymer Science*, vol. 35, nº 4, pp. 403-440, 2010.
- [41] O. Fabela-Sánchez, H. Salgado-Ceballos, L. Medina-Torres, L. Álvarez-Mejía, S. Sánchez-Torres, R. Mondragón-Lozano, A. Morales-Guadarrama, A. Díaz-Ruiz, M.-G. Olayo, G. J. Cruz, J. Morales y R. Olayo, «Effect of the combined treatment of albumin with plasma synthesised pyrrole polymers on motor recovery after traumatic spinal cord injury in rats,» *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 29, nº 13, pp. 1-11, 2018.
- [42] E. Zuñiga-Aguilar, R. Olayo, O. Ramírez-Fernández, J. Morales y R. Godínez, «Nerve cells culture from

lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization,» *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.*, vol. 25, nº 7, pp. 729-747, 2014.

- [43] R. Olayo, C. Ríos, H. Salgado ceballos, G. Cruz, M. G. Olayo, M. Alcaraz Zubeldia, A. L. Álvarez, R. Mondragon, J. Morales y A. Morales, «Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma,» *Journal of materials science: Material in medicine*, vol. 19, nº 2, pp. 817-826, 2008.
- [44] N. C. Islas-Arteaga, A. Raya Rivera, D. R. Esquiliano Rendon, J. Morales-Corona, P. G. Ontiveros-Nevares, M. G. Flores Sánchez, M.-C. Mojica-Cardoso y R. Olayo, «Electrospun scaffolds with surfaces modified by plasma for regeneration of articular cartilage tissue: a pilot study in rabbit,» *International Journal Of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 68, nº 18, pp. 1-10, 2019.
- [45] N. P. Camcho, P. West, P. A. Torzilli y R. Mendelson, «FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage,» *Biopolymers*, vol. 62, nº 1, pp. 1-8, 2000.
- [46] K. E. Healy, A. Rezania y R. A. Stile, «Designing Biomaterials to Direct Biological Responses,» *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 875, pp. 24-35, 2006.
- [47] R. Kandel, «Reconstituted mineralized cartilage tissue». Canadá Patente CA 2236807 A1, 1995.
- [48] C. Kiani, L. Chen, Y. J. Wu, A. J Yee y B. B Yang, «Structure and function of aggrecan,» *Cell research.*, vol. 12, nº 1, pp. 19-32, 2002.
- [49] T. E. Hardingham, «Cartilage:Aggrecan- Link Protein-Hyaluronan Aggregates,» 1998. [En línea]. Available: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA05/HA05E.html>. [Último acceso: 12 Diciembre 2013].
- [50] J. M. Corona, «Polimerización por plasma: Tratamiento superficial y Simulación del plasma,» México, D. F, 2001.
- [51] M. G. Flores-Sánchez, A. M. Raya-Rivera, D. R. Esquiliano-Rendon, P. G. Ontiveros-Nevares, N. C. Islas-Arteaga, J. Morales-Corona y R. Olayo, «Scaffolds of polylactic acid/hydroxyapatite coated by plasma with polypyrrole-iodine for the generation of neo-tissue–bone in vivo: Study in rabbit,» *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 67, nº 7, pp. 427-437, 2018.
- [52] L. Z. J. H. and K. A. A. , "The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration," *Critical reviews in biomedical engineering*, vol. 37, no. 1-2, pp. 1-57, 2009.
- [53] I. N. Serratos, R. Olayo, C. Millán-Pacheco, J. Morales-Corona, J. O. Vicente-Escobar,, A. M. Soto-Estrada, J. G. Córdoba-Herrera, O. Uribe, T. Gómez-Quintero, . M. Á. Arroyo-Ornelas y R. Godínez-

Fernández, «Modeling integrin and plasma-polymerized pyrrole interactions: chemical diversity relevance for cell regeneration.,» *Scientific Reports*, vol. 9, pp. 1-12, 2019.

- [54] E. Zuñiga Aguilar, R. Godínez, M. Morales , F. Cifuentes, O. Ramírez Fernández, J. Morales y R. Olayo, «Crecimiento de células nerviosas motoras sobre material modificado superficialmente por plasma,» de *V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB*, 2011.
- [55] J. Morales, C. Osorio, R. Montiel, H. Vázquez, R. Olayo, M. Olayo, G. Cruz y E. Pérez, «Autoensamble de capas de polímeros iónicos sobre polietileno funcionalizado por plasma de pirrol,» *Superficies y vacío*, vol. 21, nº 3, pp. 1-4, 2008.
- [56] K. A. Athanasiou, M. P. Rosenwasser, J. A. Buckwalter, T. I. Malinin y V. C. Mow, «Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage.,» *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 9, nº 3, pp. 330-340, 1991.
- [57] C. J. Moran, A. Ramesh, P. A. J. Brama , J. M. O'Byrne, F. J. O'Brien y T. J. Levingstone, «The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair,» *Journal of experimental orthopaedics*, vol. 3, nº 1, pp. 1-12, 2016.
- [58] N. Bölgen, Y. Z. Menceloğlu, K. Acatay, I. Vargel y E. Pişkin, «In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(epsilon-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions.,» *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 16, nº 12, pp. 1537-1555, 2005.
- [59] J. L. Arias, C. A. Neira, J. I. Arias, C. Escobar, M. Boderó, M. David y M. S. Fernández, «Sulfated polymers in biological mineralization: a plausible source for bio-inspired engineering,» *Journal of Materials Chemistry*, nº 14, pp. 2154-2160, 2004.
- [60] J. C. Sánchez Naranjo, «Fisiología del condrocito articular,» *Revista Colombiana de Reumatología*, vol. 15, nº 1, pp. 21-33, 2008.
- [61] M. S. Şenol y H. Özer, «Chapter 7 - Architecture of cartilage tissue and its adaptation to pathological conditions.,» de *Comparative Kinesiology of the Human Body*, 2020, pp. 91-100.
- [62] C. Canal Guterl, C. T. Hung y G. A. Ateshian, «Electrostatic and Non-Electrostatic Contributions of Proteoglycans to the Compressive Equilibrium Modulus of Bovine Articular Cartilage,» *Journal of biomechanics*, vol. 43, nº 7, pp. 1343-1350, 2010.
- [63] N. Nasrollahzadeh, P. Karami, J. Wang, L. Bagheri, Y. Guo, P. Abdel-Sayed, L. Laurent-Applegate y D. P. Pioletti, «Temperature evolution following joint loading promotes chondrogenesis by synergistic cues via calcium signaling.,» *eLife*, nº 11:e72068., 2022.
- [64] A. Haoming, L. Yubo, Y. Jiafeng, X. Hongbin, L. Chao y W. Xing, «Research progress of cartilage

lubrication and biomimetic cartilage lubrication materials.,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10, 2022.

[65] P. Abdel-Sayeda, M. Nassajian Moghada, R. Salomir, D. Tchernin y D. P. Piolettia, «Intrinsic viscoelasticity increases temperature, Intrinsic in knee cartilage under physiological loading,» *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 30, pp. 123-130, 2014.

[66] D. S. Kumar, K. Nakamura, S. Nishiyama, S. Ishii, H. Noguchi, K. Kashiwagi y Y. Yoshida, «Optical and electrical characterization of plasma polymerized pyrrole films.,» *Journal of Applied Physics* , vol. 93, pp. 2705-2711, 2003.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

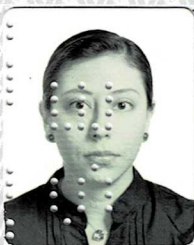
No. 00041

Matrícula: 2113802325

Andamio basado en
PLA-PCL-PPY-I-AG para la
reparación de lesiones
condrales: experimentos in
vivo.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:30 horas
del día 21 del mes de septiembre del año 2023 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DR. RICARDO VERA GRAZIANO
DR. JUAN VALERIO CAUICH RODRIGUEZ
DR. BIRZABITH MENDOZA NOVELO
DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES



NANCY CECILIA ISLAS ARTEAGA
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretario el último, se reunieron a la presentación de la
Disertación Pública cuya denominación aparece al margen,
para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: NANCY CECILIA ISLAS ARTEAGA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento
de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma
Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la
interesada el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

Roman Linares Romero
DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

Ricardo Vera Graziano
DR. RICARDO VERA GRAZIANO

VOCAL

Juan Valerio Cauich Rodriguez
DR. JUAN VALERIO CAUICH RODRIGUEZ

VOCAL

Birzabith Mendoza Novelo
DR. BIRZABITH MENDOZA NOVELO

SECRETARIO

Humberto Vazquez Torres
DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES