



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
POSGRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

MATRICES DE PLA/HA CUBIERTAS CON PPY/I
MEDIANTE POLIMERIZACIÓN POR PLASMA PARA LA GENERACIÓN DE
NEOTEJIDO ÓSEO *IN VIVO*: ESTUDIO EN CONEJO

TESIS QUE PRESENTA

M. EN C. MARÍA GUADALUPE FLORES SÁNCHEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS
(INGENIERÍA BIOMÉDICA)

DIRECTORES:

DR. ROBERTO OLAYO GONZÁLEZ

DRA. ATLÁNTIDA MARGARITA RAYA RIVERA

SINODALES:

DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ

DR. RAMÓN GONZÁLEZ CAMARENA

DR. JUAN VALERIO CAUICH RODRÍGUEZ

DR. HUMBERTO VÁZQUEZ TORRES

CIUDAD DE MÉXICO A 13 DE NOVIEMBRE DE 2017

COLABORADORES

DR. JUAN MORALES CORONA, DEPARTAMENTO DE FÍSICA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO.

DR. DIEGO R. ESQUILIANO RENDON, DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE TEJIDOS, HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DRA. PATRICIA G. ONTIVEROS NEVARES, DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA, HOSPITAL DEL NIÑO Y EL ADOLESCENTE MORELENSE, MORELOS.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por la formación brindada.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo financiero a través de la beca de doctorado, CVU 329323.

Al Dr. Roberto Olayo González del Departamento de Física de la Universidad Autónoma Metropolitana, y a la Dra. Atlántida Raya Rivera del departamento de Ingeniería de tejidos del Hospital Infantil de México Federico Gómez por el tiempo dedicado a la dirección y asesoría durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Patricia G. Ontiveros Nevares del Departamento de Patología del Hospital del Niño y el Adolescente Morelenses, por su valiosa cooperación 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 cubrimiento de matrices poliméricas mediante Polimerización por Plasma.

DEDICATORIA

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

A mis padres y hermanos, por su amor y apoyo absoluto e incondicional.

*A mi familia, por su amor, Emiliano y Mateo, por su ternura y por ser uno
de mis mayores motivos.*

COLABORADORES	1
AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE GRÁFICAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO 1.PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	16
Planteamiento del problema	16
Objetivos	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos parte de tus objetivos los tienes redactados en forma de actividades debes hacerte la pregunta con esa actividad que vas a lograr	17
Justificación	17
Hipótesis.....	18
CAPÍTULO 2.MARCO TEÓRICO	19
Bases fisiológicas y anatómicas del tejido óseo	19
Partes del hueso.....	20
Tejido óseo esponjoso.....	23
Tejido óseo compacto	24
Formación del tejido óseo.....	25
Estructura mineral del hueso	26
Injertos como sustitutos óseos	27
Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa	29
¿Cómo funcionan la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa?	30
Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa en las prácticas médicas actuales.....	31
Ingeniería de tejido óseo.....	32
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y TEORÍA DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS	36
MATERIALES	36
TÉCNICAS UTILIZADAS	36
Electrohilado	38
Polimerización por plasma	40
Microscopía óptica (MO).....	44
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	45

Microscopía Raman.....	47
Cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	48
Citometría de flujo	50
El citómetro.....	51
Ensayo de bromuro de 3- [4, 5-dimetiltiazol -2-ilo]-2, 5-difeniltetrazol (MTT)	53
Estudios histológicos e inmunohistoquímica.....	54
Pruebas mecánicas de tensión.....	57
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.....	59
GENERACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS MEDIANTE ELECTROHILADO.....	59
Modificación superficial de los andamios mediante polimerización por plasma.....	64
Caracterización morfológica mediante microscopía óptica (MO)	67
Caracterización morfológica mediante MEB.....	68
Caracterización química y estructural mediante microscopía Raman.....	72
Criterios para la elección de matrices por comparar.....	73
AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (CTM's)	77
Biopsia ósea.....	77
Separación de CTM's.....	77
Cultivo primario de CTM's.....	77
Mantenimiento de cultivo primario y tripsinización.....	78
Evaluación de CTM's mediante inmunofenotipos: CD45, CD34, HLA-DR, CD90 y CD73	79
CULTIVO <i>IN VITRO</i>	81
Diferenciación de células troncales mesenquimales.....	81
Viabilidad celular de CTM's de médula ósea de conejo (<i>Cultivo in vitro</i>)	82
Cultivo <i>in vitro</i> de células óseas en las matrices de HA/PLA e HA/PLA/PPy-I.....	85
Prueba de viabilidad celular pre-implante mediante ensayo MTT	87
CULTIVO <i>IN VIVO</i>	89
Implante autólogo de matrices de.....	89
PLA/HA and PLA/HA/PPy-I	89
Prueba de viabilidad mediante ensayo MTT después de 1 mes <i>in vivo</i>	91
Análisis histológicos e inmunohistoquímicos del neot Tejido removido.....	92
Pruebas mecánicas.....	95
CONCLUSIONES.....	100
PERSPECTIVAS.....	102
REFERENCIAS	103
ANEXO A.....	106
FONDOS.....	106
ANEXO B.....	106
CONDICIONES ÉTICAS.....	106

ANEXO C	107
BIOSEGURIDAD.....	107
ANEXO D	113
Histología	113
Fijación del tejido.....	113
Procesamiento del tejido: deshidratación, aclaramiento e infiltración	113
Inclusión del tejido	114
Microtomía.....	115
Tinción con hematoxilina y eosina.....	116
Montaje	117
Prueba de inmunohistoquímica	117
Protocolos	119
<i>Método inmunohistoquímico directo</i>	119
<i>Método Inmunohistoquímico Indirecto</i>	119
Fijación	119
Secciones.....	119
Inmunoreacción	119
Controles	120
Ensayo MTT	120
Materiales	120
Protocolo	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Medicina regenerativa. Combinación de materiales, células y factores biológicos para regenerar o sustituir tejido óseo.....	16
Figura 2. Partes del hueso.....	21
Figura 3. Matriz ósea y sus principales componentes.	21
Figura 4. Evolución de las células óseas en el proceso de formación de tejido óseo.....	22
Figura 5. Sección de un hueso largo, la diáfisis, donde se muestra la organización y localización del hueso compacto y del esponjoso.....	25
Figura 6. Sistema de Electrohilado utilizado para la formación de matrices de PLA e HA. Laboratorio de polímeros UAM-I.....	39
Figura 7. Reactor de Polimerización por Plasma y sus componentes. a) Bomba de vacío b) Barómetro digital c) Generador de potencia.....	42
Figura 8. Microscopio Óptico modelo DMLP Leica, Depto. de física UAM-I.....	44
Figura 9. Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo JEOL JSM-7600F, Depto. de física UAM-I.....	46
Figura 10. Microscopio Witec alpha 300 AR, UAM-I.....	48
Figura 11. Laboratorio de Ingeniería de tejidos, HIMFG.....	50
Figura 12. Citómetro de flujo. En ésta técnica, cada una de las células presentes en la muestra colisiona con el láser, dicha colisión genera un haz de luz secundario el cual atraviesa un sistema de lentes y prismas que reflejan distintos rayos a diversas longitudes de onda.....	52
Figura 13. Lector TECAN Genius, HIMFG.....	53
Figura 14. MTT.....	54
Figura 15. Reducción del MTT desde sal de tetrazolio a formazano de MTT insoluble en agua.....	54
Figura 16. Laboratorio de Histopatología. Hospital del niño y el adolescente morelense.....	56
Figura 17. Máquina de pruebas de tensión, depto. de física UAM-I. En esta máquina se colocan las probetas del material a analizar, la máquina tiene un sistema informático en el cual se puede establecer la velocidad de tensión y capturar las distintas imágenes a determinado tiempo.....	58
Figura 18. Sistema de Electrohilado. En este sistema se coloca la solución polimérica para ser inyectado desde el electrodo positivo (aguja) hacia el electrodo negativo (colector cilíndrico), éste último se encuentra conectado directamente a tierra y cuenta con movimiento de rotación y traslación para asegurar el depósito de las fibras en toda la superficie cilíndrica.	61
Figura 19. Matrices de PLA e HA mediante la técnica de Electrohilado. En dichas matrices se puede observar una morfología delgada y porosa (M1-M6) o gruesa y cerrada (M7-M10), debido a las condiciones de depósito que se determinaron para cada una de ellas como lo describe la tabla 2.	63
Figura 20. Espectro de transmisión de PPy (Zúñiga., 2014).	64
Figura 21. Reactor del Sistema de Polimerización por Plasma en el que se depositan las matrices entre los electrodos, además dicho sistema contiene dos tubos en ambos lados para la administración y escape de polipirrol e Yodo.	65
Figura 22. Matrices de PLA / HA depositadas entre los electrodos del Sistema de Polimerización por Plasma.....	66
Figura 23. Matrices cubiertas con PPy, las cuales presentaron una morfología dura al momento de manejarlas,.....	67
Figura 24. Microscopía Óptica a 200x de 10 matrices distintas en las cuales se puede observar morfología más abierta en cuanto a poros o más cerrada, además, la presencia de HA es muy evidente en M6, M8, M9 y M10.....	68

Figura 25. Preparación del fragmento de PLA-HA antes del análisis mediante MEB, las muestras deben prepararse mediante el recubrimiento de oro para hacerlas conductoras y se colocaron en el portamuestras del microscopio electrónico.....	69
Figura 26. Microscopía Electrónica de Barrido de M1. En ambas matrices se observan fibras de distintos tamaños de diámetro y poro, en M2 se pueden observar (como lo muestra la flecha verde) zonas rugosas debido a la presencia de HA.....	69
Figura 27. Microscopía Electrónica de Barrido de M3-M8 a distintos aumentos, en éstas se pueden observar la presencia de distintos tamaños de fibra y poro, sin embargo, M3-M5 presentan morfología más lisa a comparación de M6-M8 que presentó morfología rugosa por la cantidad de HA presente, además las fibras en éstas últimas son de tamaño mucho mayor.71	
Figura 28. Espectro de matriz de PLA/HA. El componente de HA muestra un pico de 900 (1/cm) y el PLA de 2900 (1/cm).	72
Figura 29. Imágenes Raman de matriz de PLA/HA. La HA en color azul se observa en las fibras más gruesas y tiende a amontonarse; el PLA por su parte se observa en fibras más delgadas y lisas en color verde.....	73
Figura 30. Microscopía Óptica de las matrices por comparar 500 x. MA y MB muestran estructuras más abiertas en cuanto a poro se refiere, mientras que MC y MD presentan morfología más cerradas.....	74
Figura 31. Microscopía Electrónica de Barrido de MA PLA/HA (18.1%) y MB PLA/HA (35.7%)..	75
Figura 32. Microscopía Electrónica de Barrido de MC PLA/HA/PPy-I (18.1%) y MD PLA/HA (35.7%)/PPy-I.....	76
Figura 33. Células Troncales Mesenquimales a los 8 días de cultivo en placas petri.	78
Figura 34. Estimulación osteogénica (con medio osteogénico) en cultivo primario de CTM's. En ambas imágenes se puede observar que las células presentan morfología fibroblastoide y también hay algunas con morfología osteoblastoide más redonda, lo que corresponde a la formación de células que tienden a ser más definidas a algún tipo.....	79
Figura 35. CTM's a los 17 días de cultivo <i>in vitro</i> a) 100x b) 200 x. En esta figura las células óseas se ven mucho mejor definidas y la figura a 100 x permite observar que efectivamente hubo proliferación celular y en algunas zonas se muestra la acumulación de dichas células.	79
Figura 36. Expresión de proteínas CD45, CD34, HLA-DR, CD90 y CD73. La imagen muestra que se obtuvieron en el 100% y 99% de tipo mesenquimal, y casi no se obtuvieron células de tipo hematopoyético, lo que se esperaba ya que la inducción se realiza hacia linaje osteogénico. .	80
Figura 37. CTM's en la cuarta semana de diferenciación osteogénica.....	81
Figura 38. CTM's marcadas con fosfatasa alcalina para la diferenciación hacia osteoblastos. La fosfatasa alcalina se marca en color amarillo-naranja en las matrices, lo que es un buen indicio ya que es uno de los principales marcadores químicos en diferenciación osteogénica.....	82
Figura 39. Diferenciación osteogénica de CTM's a los 7, 14, 21 y 28 días, donde se comienza con pocas células fibroblastoides a), b), c), d) y se termina con bastantes células óseas (morfología osteoblastoide) e), f), g) h).....	84
Figura 40. Siembra celular en membranas cerámico-poliméricas. Se sembraron las células óseas en las matrices poliméricas junto con medio de cultivo.....	85
Figura 41. MA, MB, MC y MD con osteoblastos al día 7 de cultivo <i>in vitro</i> . En éstas se puede observar morfologías lisas para aquellas matrices con menor HA y rugosas para las matrices que contienen más HA, cúmulos celulares se observaron en ambas, sin embargo, dichos cúmulos son más evidentes en las matrices que además de más HA, contenían PPy.	86
Figura 42. Implante de andamios de PLA/HA, PLA/HA/PPy-I.	89
Figura 43. Imagen descriptiva de los distintos andamios colocados debajo del dorso del conejo para las distintas pruebas MTT, PH y PTA	91
Figura 44. <i>Histología de MA, MB, MC y MD con tinción de H&E e inmunohistoquímica por medio de Colágena Tipo 1 y Osteocalcina (OCN). En efecto los marcadores de tinción e inmunohistoquímica muestran que las matrices MC y MD presentaron morfologías más cerradas y con más células, a diferencia de MA y MB que si muestran células, sin embargo se</i>	

<i>observan huecos en los que el tejido no alcanzó a cerrarse debido a que contienen menos cantidad de HA y a la ausencia de PPy.....</i>	94
Figura 45. Puntos específicos de la prueba de esfuerzo para MA [PLA / HA (18.1%)] neo-tejido. En la imagen e presenta la evolución de la aplicación de tensión al tejido, se puede observar la formación de un cuello de botella, es un tejido que se estira considerablemente antes de romperse.	95
Figura 46. Puntos específicos de la prueba de esfuerzo para el neo-tejido MC (PLA / HA (18.1%) / PPy-I). Al igual que MA se trata de una matriz que cede a la tensión de manera gradual, sin embargo, en el tejido se observan secciones en color amarillo-marrón, las cuales involucran un rompimiento de golpe, sin embargo, la forma de ruptura continúa siendo en botella hasta el final.....	96
Figura 47. Puntos específicos de la prueba de estrés para el neo-tejido MB (PLA / HA (35.7%)). Para este caso se observa que el material se rompe transversalmente en cierta sección del tejido.	98
Figura 48. Puntos específicos de la prueba de esfuerzo para el neo-tejido MD (PLA / HA (35.7%) / PPy-I). Esta matriz presentó un rompimiento muy parecido a MB, de manera transversal pero se ve muy ligeramente la formación del cuello de botella antes de romperse totalmente.....	98
Figura 49. Inserción del biomaterial en el espacio debido a la extracción de una sección de fémur en conejo.	102
Figura 50. Procesador automático de las distintas soluciones en las histologías.....	114
Figura 51. Secuencia de tinción.....	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales y pruebas utilizadas como alternativa en la reconstrucción de tejido óseo.	34
Tabla 2. Concentraciones de PLA, HA y condiciones de depósito de las matrices.	60
Tabla 3. Características de las matrices por comparar	74
Tabla 4. Anticuerpos específico por cada antígeno	80
Tabla 5. Condición de las matrices.....	90

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Viabilidad celular de CTM's de médula ósea de conejo a los 7 días en cultivo in vitro, efectivamente se observa viabilidad y crecimiento celular lo cual se difiere entre el día 7 y el día 28.....	83
Gráfica 2. Viabilidad celular Pre-implante al día 7. Dicha prueba permite ver que las matrices con mayor HA y mayor HA con PPy obtuvieron mejor viabilidad celular al día 7 de cultivo in vitro.	88
Gráfica 3. Viabilidad celular después de 1 mes <i>in vivo</i>	92
Gráfica 4. Esfuerzo-deformación del neo-tejido MA (PLA / HA (18.1%)). La gráfica muestra que el tejido cede a la ruptura de manera gradual hasta llegar a un punto máximo (1.2 MPa), posteriormente tiende a romperse en distintas secciones hasta su punto final de ruptura (50%) de deformación, ésta última fue bastante considerable.	96
Gráfica 5. Esfuerzo-deformación del neotejido MC (PLA / HA (18.1%) / PPy-I). Esta matriz tendió a romperse y puede observarse que aguanta más esfuerzo (1.6 MPa) que MA y también presentó mayor deformación (94%) antes de romperse totalmente, lo que da una buena idea de que el PPy contribuyó a la conformación de un material más resistente y además más elástico.	97

Gráfica 6. Esfuerzo-deformación del neo-tejido MB PLA / HA (35.7%). Para este caso se observa de manera abrupta que el material llega a soportar hasta 0.5 MPa y después comienza a romperse pero tiene una caída abrupta asociada a la sección transversal que se presentó en la figura 46, finalmente se sigue estirando muy levemente, pero se puede observar que la deformación se quedó tan solo en un 6.5%..... 99

Gráfica 7. Esfuerzo-deformación del neo-tejido MD PLA / HA (35.7%) / PPy-I. En MD se presenta una situación muy parecida de MB, sin embargo, aunque soporta un menor esfuerzo (0.4 MPa), tiende a deformarse más (30%), es decir, una vez más la presencia de PPy es significativa en este aspecto. 99

RESUMEN

Este trabajo presenta un estudio de matrices porosas de ácido poliláctico (PLA) e hidroxiapatita (HA) procesadas por electrospinning y cubiertas con polipirrol- Yodo (PPy-I) sintetizado por polimerización por plasma. Se prepararon dos grupos de muestras: PLA / HA y PLA / HA / PPy-I, en ambos grupos se utilizaron dos concentraciones diferentes de HA (18.1% y 35.7%) para cada uno de los grupos. Se obtuvieron células óseas (osteoblastos) autólogas a partir de la médula ósea y después se sembraron en las matrices. Después de 7 días de crecimiento celular *in vitro*, las matrices se colocaron en el dorso del conejo y se evaluaron 30 días después de la implantación. Los andamios se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido, pruebas de tensión uniaxial y pruebas de viabilidad celular, esto se realizó a los 7 días de siembra de osteoblastos obtenidos a partir del cultivo primario de células madre mesenquimales. Los andamios porosos obtenidos mostraron una morfología homogénea con fibras nanométricas y micrométricas continuas. Todos los grupos de andamios mostraron adhesión y proliferación celular, pero el grupo de matrices PLA / HA (35.7%) / PPy-I mostró mayor viabilidad celular, lo que confirma que el PPy y la HA juegan un papel importante en el proceso de formación de nuevo tejido óseo. El ensayo de tensión de muestras *ex vivo* mostró una mejor integración en muestras de alta concentración de HA.

Palabras clave: ácido poliláctico, hidroxiapatita , electrohilado, pirrol, polimerización por plasma, cultivo *in vitro*, cultivo *in vivo*.

ABSTRACT

This work presents a study of porous matrices of polylactic acid (PLA) and hydroxyapatite (HA) processed by Electrospinning and coated with polypyrrole with iodine (PPy-I) synthesized by plasma polymerization. Two groups of samples were prepared: PLA / HA and PLA / HA / PPy-I, in both groups' two different concentrations of HA (18.1% and 35.7%) were used for each of the groups. Autologous bone cells (osteoblasts) were obtained from the bone marrow and then seeded into the matrices. After 7 days *in vitro*, the matrices were placed on the back of the rabbit and tested 30 days after implantation. The scaffolds were characterized by Scanning Electron Microscopy, uniaxial stress tests and cell viability tests during 7 days of osteoblast seeding obtained from the primary culture of mesenchymal stem cells. The obtained porous scaffolds showed homogeneous morphology with nanometric and continuous micrometric fibers. All scaffold groups showed cell adhesion and proliferation, but PLA / HA matrices (35.7%) / PPy-I showed greater cell viability, confirming that polypyrrole and HA play an important role in the process of formation of new bone tissue. The sample stress test *ex vivo* showed better integration in samples of high HA.

Key words: Polylactic acid, hydroxyapatite, electrospinning, pyrrole, plasma polymerization, *in vitro* culture, *in vivo* culture.

INTRODUCCIÓN

Una gran parte del tejido óseo puede ser dañada por varias enfermedades y lesiones. Cada año se realizan cirugías de injertos óseos a nivel mundial (Saiz., 2013) que han ido en aumento (Liu., 2013). El aspecto más importante en el tratamiento de estas enfermedades es preservar la extremidad dañada y garantizar su funcionalidad; esto no ha sido fácil, aunque clínicamente se ha recurrido al uso de nuevos procedimientos y técnicas quirúrgicas (McCall., 2010), a menudo, la eliminación completa de la sección dañada sigue siendo el principal manejo cuando se habla de grandes secciones de tejido, mientras que en secciones pequeñas son injertos autólogos (Khan., 2008) los que se utilizan con mayor frecuencia. Los aloinjertos y xenoinjertos también se han utilizado durante algunas décadas; sin embargo, en estos casos el costo es muy alto y las infecciones y el rechazo del injerto a veces ocurren donde se implanta. Otra alternativa ha sido el uso de prótesis o soportes metálicos, ya que proporcionan una estabilidad inmediata y favorecen la movilización del paciente, pero este método tiene la limitación de que sólo puede utilizarse en pacientes mayores de 8 años debido a la inmadurez esquelética antes de ese período; además, su uso implica ciertas complicaciones tales como infección, fatiga del implante, fallas mecánicas y / o en el peor de los casos la pérdida de prótesis.

Se han utilizado muchos tipos de materiales en la búsqueda de un buen sustituto o regenerador de tejido óseo. Estos materiales incluyen metales tales como estroncio (Sr) (Kumar., 2015), titanio (Ti) (Pressaccoa., 2015), magnesio (Mg) (Chaya., 2015) y aleaciones de Mg (Li., 2012); polímeros naturales tales como quitosano (Kai., 2015), seda (Sheikhet., 2015) y colágena (Ferreira., 2012), y polímeros sintéticos tales como ácido poliglicólico (PLGA) (Gentile., 2014), policaprolactona (PCL) (Van., 2015) y (PLA). Este último es uno de los principales materiales poliméricos utilizados porque es un polímero biocompatible, biodegradable y relativamente accesible que presenta una extensa gama de aplicaciones y ha sido ampliamente probado en el sector clínico. También se han empleado materiales cerámicos que incluyen dióxido de titanio, fosfatos de calcio, vitrocerámicas e HA (HA), siendo esta última uno de los principales materiales cerámicos utilizados porque es una cerámica resistente,

biocompatible y componente inorgánico primario del hueso natural, además, de su degradación lenta. Estos materiales pueden promover la formación de nuevo tejido que actúan como portadores de las células que se siembran en ellos y a su vez inducen su crecimiento. Las propiedades mecánicas son un factor importante a considerar, y es relevante mejorarlas. Diversos estudios mencionan que los materiales poliméricos y cerámicos son una buena alternativa ya que la flexibilidad del polímero y la resistencia de las cerámicas se combinan para mejorar el rendimiento del andamio (Santhanam., 2015) (Palazzo., 2014) (Mohammad., 2015).

Se han realizado estudios con ensayos *in vitro*, ensayos *in vivo* y ensayos mecánicos, otros han utilizado una técnica de modificación de superficie o factores que contribuyen a la interacción del material con el tejido o las células circundantes; sin embargo, hasta ahora, se han reportado pocos estudios que incluyan todos estos en conjunto, y esto es de gran importancia ya que la ingeniería de tejidos está buscando hacer una combinación de materiales, células y factores biológicos y/o factores de crecimiento con el fin de obtener un tejido sintético que cumpla las funciones de tejido natural y que sea biocompatible, capaz de permitir la migración y proliferación de células óseas, y que sirva de base para guiar la nueva formación ósea a lo largo de la superficie, produciendo así un solo tejido resistente. La polimerización por plasma se ha utilizado como activador superficial de material para cultivo celular, en el caso del PPy la buena interacción celular se ha asociado a la diversidad química de la superficie, lo que confiere adherencia y estimulación celular (Alvarez., 2015) (Zúñiga., 2014).

Este estudio evalúa la textura porque el número de muestras es limitado y no se cuenta con una estadística tan amplia como para hacer comparaciones y mediciones de los distintos parámetros mecánicos correspondientes; también se evaluarán las propiedades biológicas de los andamios porosos de PLA/ HA fabricados por electrohilado y recubiertos con polipirrol-Yodo por polimerización por plasma; el polipirrol es un polímero con buena conductividad eléctrica lo cual permite que las células se adhieran y proliferen con facilidad en las matrices producidas. Para regenerar o sustituir tejido óseo resulta una gran ventaja el uso de estos materiales, dadas las características propias de la parte cerámica y la parte polimérica; además, la versatilidad de la técnica de electrohilado responde de manera exitosa ante la producción de matrices formadas por fibras de distintos diámetros, que al superponerse forman un entre-mallado con una porosidad

que permite la circulación de nutrientes, induciendo la proliferación y adhesión de células óseas que son soportadas por tales matrices.

Para evaluar la respuesta biológica de las matrices, se sembraron osteoblastos *in vitro* (7 días) e *in vivo* en el dorso de conejos (30 días). Los osteoblastos fueron obtenidos a partir de células madre mesenquimales (MSC) de médula ósea de fémur de conejo utilizando un protocolo ya establecido y se midió viabilidad por ensayos de (MTT). Finalmente, se realizaron ensayos de tensión uniaxial al andamio con osteoblastos *ex vivo* con el objeto de caracterizar su textura.

La generación de un biomaterial a base de HA y PLA cubierto con PPy-I surge como una gran alternativa en la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa ya que puede en un futuro ser utilizado para sustituir o reparar tejido óseo debido a que cuenta con las características necesarias para inducir proliferación y adhesión de células óseas sin generar reacciones secundarias; ya que dichos materiales tuvieron buena respuesta en modelo animal, mostrando biocompatibilidad y buena viabilidad celular (Zúñiga., 2014).

El desarrollo de esta tesis comienza con el planteamiento del problema de investigación, dando a conocer además cual es el objetivo general y los específicos de este trabajo, dando estos últimos una idea de los pasos a seguir desde la fabricación del biomaterial hasta su caracterización morfológica, biológica y mecánica, así como la justificación e hipótesis del mismo, Capítulo 1.

El Capítulo 2 aborda la descripción de las bases teóricas en relación con las bases fisiológicas y anatómicas del hueso y los alcances que tienen la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos como una propuesta nueva y útil para generar un biomaterial óseo a base de un polímero y una cerámica.

En el capítulo 3 se presentan los materiales y técnicas utilizadas basadas en un protocolo para generar y caracterizar las matrices porosas.

En el capítulo 4 se detalla el protocolo para producir, caracterizar y utilizar *in vitro* e *in vivo* las matrices porosas.

Finalmente se presentan las conclusiones y perspectivas de este proyecto.

CAPÍTULO 1.PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Planteamiento del problema

Los tumores óseos constituyen la séptima causa de muerte por cáncer. En los adolescentes, el osteosarcoma constituye el tercer tipo más común de cáncer después de las leucemias y los linfomas. Es un tumor óseo maligno que se origina en las células óseas y se asienta principalmente sobre la metáfisis de los huesos largos, en especial en el extremo distal del fémur, el extremo proximal de la tibia y en el extremo proximal del húmero. El reemplazo parcial de la extremidad con prótesis ha sido una solución alternativa a la amputación. La medicina regenerativa constituye una alternativa viable para reemplazo de hueso, Figura 1. La aplicación de esta tecnología para este propósito en pacientes ya fue reportada; sin embargo, no se ha podido realizar la aplicación rutinaria debido a que se requiere más investigación para diseñar biomaterial con posibilidad de conformar un tejido óseo de longitud mayor de 3 cm que conserve las características anatómicas y estructurales similares al tejido nativo.

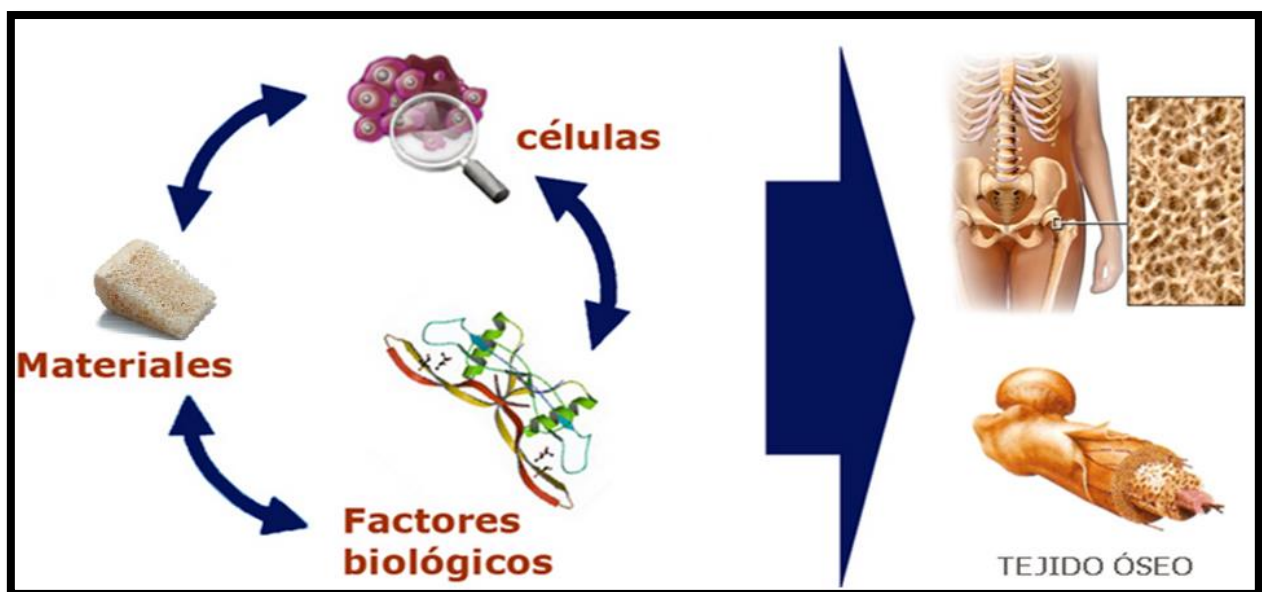


Figura 1. Medicina regenerativa. Combinación de materiales, células y factores biológicos para regenerar o sustituir tejido óseo.

Objetivos

Objetivo general

Demostrar que el nuevo biomaterial diseñado a partir de PLA (PLA)/HA (HA)/PPy (PPy)/I (I), sembrado con osteoblastos, logra la conformación de neot Tejido óseo de características anatómicas y funcionales similares al hueso nativo.

Objetivos específicos

- Diseñar y obtener matrices celulares de PLA/HA cubiertas con polipirrol.
- Producir cultivos *in vitro* de células óseas en las matrices de PLA/HA y PLA/HA/PPy .
- Inducir implantes autólogos de matrices de PLA/HA y PLA/HA/Ppy con células óseas en conejo.

Justificación

Los materiales que han dado mejor resultado para reconstruir tejido óseo se basan en la combinación de un polímero y una cerámica por lo que la propuesta de este trabajo radica en el uso de PLA, un polímero biodegradable ampliamente estudiado con diversas aplicaciones en el campo de la medicina y la ingeniería de tejidos y la HA, cerámica resistente que constituye el 60% de la parte inorgánica del tejido óseo, ambos biocompatibles, además de que su obtención es relativamente sencilla y económica. Las propiedades de ambos materiales hacen de la matriz resultante, después de su electrohilado, corresponden a un entramado constituido por nano y microfibras poliméricas brindando elasticidad, anisotropía y resistencia, dejando de lado las reacciones de toxicidad y rechazo debido a su biocompatibilidad.

La versatilidad que ofrece la técnica de electrohilado hace que dichas matrices puedan modificarse según las necesidades requeridas y el cubrir con Ppy, dichas matrices mediante Polimerización por Plasma, genera la presencia de diferentes grupos funcionales en su superficie dando como resultado la interacción de distintos grupos funcionales con el medio celular y con las propias células. En esta tesis supone que la mayor diversidad química facilita la adhesión al material y permite la proliferación celular, lo que resulta en una alternativa viable para la construcción de biomateriales capaces de sustituir y/o regenerar tejido óseo.

Hipótesis

Dado que matrices porosas compuestas de PLA/HA cubiertas con PPy/I mediante polimerización por plasma mostraron buenos resultados al sembrar células óseas en ellas in vitro, dichas matrices con células óseas serán usadas para ser implantadas en dorso de conejo para obtener neottejido.

CAPÍTULO 2.MARCO TEÓRICO

Bases fisiológicas y anatómicas del tejido óseo

El cuerpo humano posee una estructura mecánica que protege los órganos internos, colabora en el movimiento y cumple otras complejas funciones fisiológicas importantes en el metabolismo de minerales. Esta estructura denominada Sistema Óseo, posee a su vez huesos que se constituyen en órganos gracias a la acción concertada de diversos tejidos (óseo, cartilaginoso, conectivo denso, y otros que generan la sangre, así como tejidos adiposo y nervioso). Si bien el hueso como órgano es la conjunción de diversos tejidos, en él predominan los tejidos conectivos óseo y cartilaginoso, que se encuentran en proceso continuo de remodelamiento dinámico, y los cuales se modifican gracias al ejercicio, tipos y magnitudes de carga y factores metabólicos. El Sistema Óseo cumple varias funciones principales:

Sostén: Los huesos constituyen el marco estructural del cuerpo, ya que ofrecen soporte a los tejidos suaves y aportan los puntos de inserción para los tendones músculos esqueléticos.

Protección: Los huesos protegen muchos órganos internos contra posibles lesiones, por ejemplo, los huesos del cráneo protegen el encéfalo; las vértebras, la médula espinal; y la caja torácica, el corazón y los pulmones, además de varios órganos del tracto digestivo.

Movimiento: La contracción y relajación sistemática de los músculos, en conjunción con las articulaciones óseas, atraen los huesos para producir el movimiento.

Homeostasis de minerales: El tejido óseo almacena diversos minerales, principalmente el calcio y el fósforo, lo cual contribuye a la resistencia de los huesos, que a su vez pueden liberar estos elementos en el torrente sanguíneo con el fin de mantener el equilibrio de minerales y distribuirlos a otros órganos.

Producción de células sanguíneas: En ciertas partes de algunos huesos, el tejido conectivo llamado médula ósea roja lleva a cabo un proceso denominado hematopoyesis para producir eritrocitos, leucocitos y

plaquetas. La médula ósea roja, que es uno de los dos tipos de médula, consta de células sanguíneas en desarrollo dentro de una red de fibras reticulares, también contiene adipocitos, macrófagos y fibroblastos.

Almacenamiento de triglicéridos: en los neonatos, toda la médula ósea es roja y participa en la hemopoiesis; sin embargo, la producción de células sanguíneas disminuye con el paso de los años y la mayor parte de la médula roja se vuelve amarilla. La médula ósea amarilla consiste principalmente en adipocitos y algunas células sanguíneas dispersas. (Saiz., 2013)

Partes del hueso

Tomando en cuenta las dimensiones de sus ejes longitudinal, transversal y anchura, los huesos se pueden clasificar en largos y planos. Los huesos largos se encuentran constituidos principalmente por:

La diáfisis: es el cuerpo o porción cilíndrica principal del hueso.

La epífisis: son los extremos proximal y distal del hueso.

La metáfisis: son las regiones de los huesos maduros donde las diáfisis se unen con las epífisis. En el crecimiento de los huesos, las metáfisis comprenden la placa epifisiaria, el sitio donde el cartílago es reemplazado por tejido óseo. Dicha placa se forma de cartílago hialino, el cual permite que la diáfisis aumente en longitud, pero no en ancho, Figura 2.

El cartílago articular: constituye una capa delgada de cartílago hialino que cubre la parte de la epífisis donde un hueso se articula con otro. Este cartílago reduce la fricción y absorbe impactos que sufren las articulaciones de movimientos libres.

El periostio: es un recubrimiento que se compone de tejido conectivo denso e irregular, el cual rodea la superficie ósea que no está cubierta por el cartílago articular. Esta capa contiene las células formadoras de tejido óseo gracias a las cuales el hueso aumenta su diámetro o grosor, pero no su longitud. Además, protege el hueso, participa en la reparación de fracturas, la nutrición ósea y sirve como punto de inserción para tendones y ligamentos.

La cavidad medular: corresponde al espacio interno de la diáfisis que contiene la médula ósea amarilla grasa.

El endostio: es una membrana que contiene células formadoras de hueso y recubre la cavidad medular.

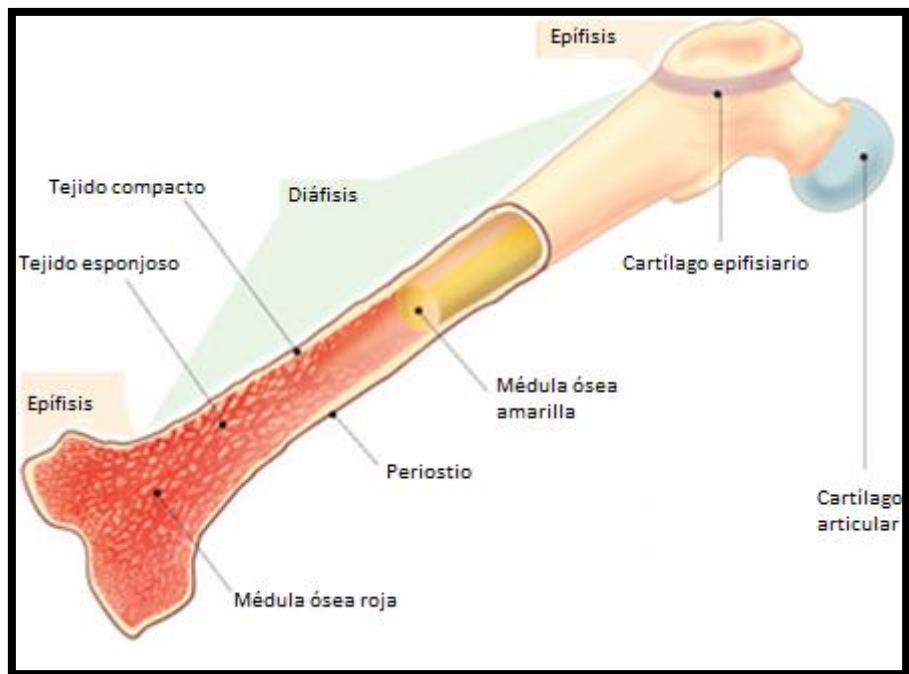


Figura 2. Partes del hueso.

El hueso posee una abundante matriz de materiales intercelulares y células separadas que circundan entre sí. En el tejido óseo, la matriz se compone de 25% de agua, 25% de fibras proteínicas y 50% de sales minerales cristalizadas. Se encuentran cuatro tipos de células en el tejido óseo: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, Figura 3.

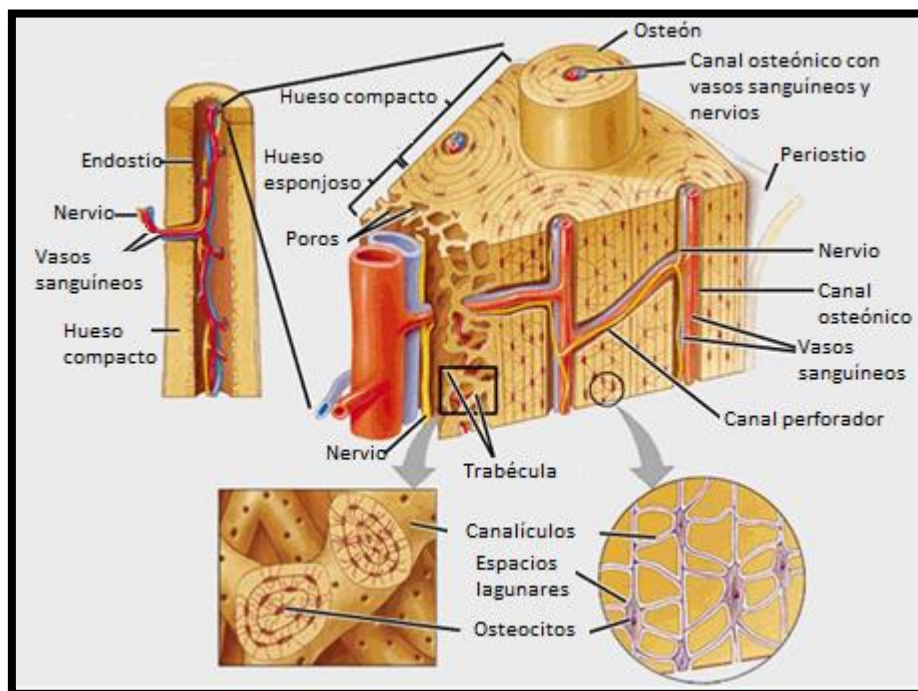


Figura 3. Matriz ósea y sus principales componentes.

Las células osteoprogenitoras: son células madre que no son especializadas, estas se derivan del mesénquima, o sea, el sitio donde se forman todos los tejidos conectivos. Las células osteoprogenitoras tienen la capacidad de división, de la cual resultan los osteoblastos. Estas células se localizan principalmente en la parte interna del periostio, en el endostio y en los conductos internos de los huesos que poseen irrigación sanguínea (vasos sanguíneos).

Los osteoblastos: son células que modelan y regeneran el hueso mediante la síntesis y secreción de fibras de colágena y otros componentes orgánicos para la producción de la matriz ósea, además, inician el proceso de calcificación.

Los osteocitos: son células maduras que se encuentran en el tejido óseo siendo el componente celular principal. Se generan a partir de los osteoblastos que quedan atrapados en las secreciones en la matriz. El osteocito no deposita material al tejido óseo, pero mantiene las funciones celulares diarias del mismo (circulación, alimentación e intercambio de nutrientes y de desechos con la sangre).

Los osteoclastos: son células grandes, derivadas de la unión de 50 monocitos (un tipo de glóbulo blanco), que se concentran en el endostio. El lado de estas células que da hacia la superficie del hueso tiene una membrana plasmática con pliegues profundos, que se denominan bordes arrugados. En estos, los osteoclastos liberan enzimas lisosómicas y ácidos que digieren los componentes proteínicos y minerales del hueso subyacente. Esta destrucción es parte del desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reconstrucción del hueso, Figura 4.

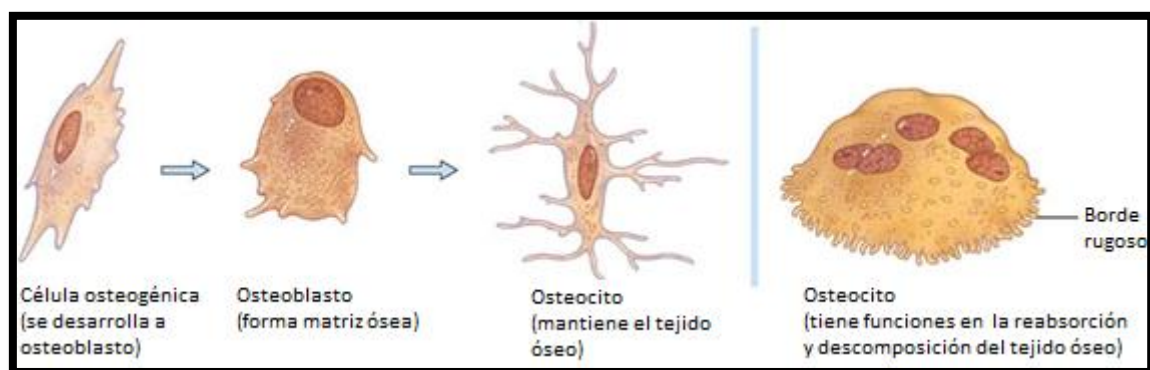


Figura 4. Evolución de las células óseas en el proceso de formación de tejido óseo.

La matriz ósea tiene una cantidad considerable de sales minerales inorgánicas tales como la HA (que es un fosfato de calcio) y en menor proporción carbonato de calcio, hidróxido de magnesio, fluoruro y sulfato. Cuando estas sales son depositadas en la estructura que forman las fibras de colágena de la matriz, se cristalizan y endurecen el tejido. Las células encargadas de este proceso son los osteoblastos que calcifican o mineralizan el hueso.

La dureza del tejido óseo depende de las sales minerales inorgánicas cristalizadas y su flexibilidad de las fibras de colágena. Si las sales minerales se disuelven al sumergirlas en un fluido de baja concentración de éstas, se pierde la dureza y el hueso se vuelve ahulado. Los huesos no son absolutamente sólidos en su estructura, ya que contienen espacios entre sus componentes duros. Estos espacios pueden contener conductos de vasos sanguíneos para aportar nutrientes a las células óseas (Arenas., 2010).

Tejido óseo esponjoso

El tejido óseo esponjoso no contiene osteonas verdaderas, sino que consta de laminillas dispuestas en una red irregular de columnas delgadas de hueso, llamadas trabéculas. Los espacios macroscópicos observables contienen médula ósea roja, la cual está encargada del proceso de hematopoyesis. Al igual que el hueso compacto, existen lagunas desde donde se ramifican los canaliculos. Los osteocitos trabeculares reciben nutrientes directamente de la sangre que circula por las cavidades medulares. Existe tejido óseo esponjoso en la mayoría de los huesos sin importar su geometría. Casi todas las epífisis de los huesos largos y una pequeña franja angosta alrededor de la cavidad medular de la diáfisis de huesos largos contienen este tipo de tejido.

Una revisión superficial del tejido esponjoso indica que su organización es menor que la de hueso compacto; sin embargo, el tejido esponjoso orienta las trabéculas a lo largo de las líneas de esfuerzo, lo que permite transferir fuerza y recibir cargas provenientes de muchas direcciones.

Tejido óseo compacto

Este tejido posee pocos espacios entre sus componentes duros. El hueso compacto se encuentra en la diáfisis de los huesos largos proporcionando resistencia a las cargas producidas por el apoyo de peso y los movimientos.

La configuración del hueso compacto está dada por unidades denominadas osteonas o sistemas de Havers. Los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios, provenientes del periostio penetran el hueso compacto por los conductos perforantes (de Volkmann). Los vasos y nervios de estos conductos se conectan con los de la cavidad medular, el periostio y los conductos centrales (de Havers), que tienen un trayecto longitudinal en los huesos y se hallan rodeados por laminillas concéntricas (de Havers), las cuales son anillos de matriz dura calcificada. Entre estas laminillas se presentan espacios llamados lagunas que contienen osteocitos. Desde las lagunas, se proyectan pequeños canales denominados canalículos, que contienen líquido extracelular. En el interior de los canalículos se presentan prolongaciones delgadas de los osteocitos. El sistema de lagunas intercomunicadas permite el intercambio de oxígeno y nutrientes desde la sangre hacia los osteocitos y el depósito de desechos para su expulsión vía vasos sanguíneos (Fernández., 2005).

Las osteonas del tejido óseo compacto se alinean en la misma dirección que las líneas de esfuerzo. Es así, por ejemplo, como el fémur posee los sistemas haversianos alineados con la diáfisis resistiendo cargas flexionantes y de compresión. Las líneas de esfuerzo cambian dependiendo de la actividad física, cambiando a su vez la disposición de los conductos haversianos los cuales se presentan uniformemente distribuidos en la niñez y van cambiando su estructura según las necesidades corporales (fracturas, ejercicio, etc.)

Las áreas que hay entre las osteonas contienen laminillas intersticiales, las cuales también incluyen osteocitos y canalículos. Dichas laminillas son fragmentos de osteonas antiguas que sufrieron destrucción parcial o remodelamiento óseo.

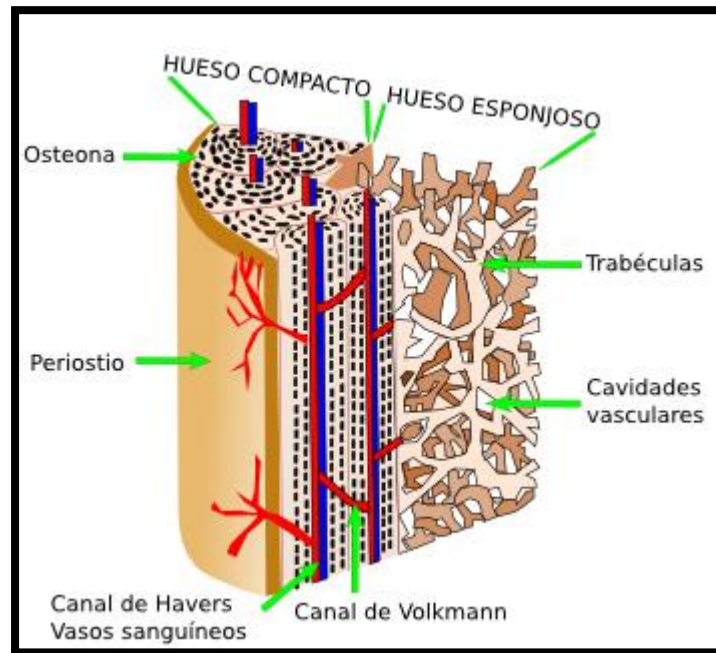


Figura 5. Sección de un hueso largo, la diáfisis, donde se muestra la organización y localización del hueso compacto y del esponjoso.

Las diferencias entre tejido óseo esponjoso y el tejido óseo compacto radican principalmente en que el hueso esponjoso es más ligero, reduce el peso del hueso y puede moverse más fácilmente cuando un músculo tira de él. Además, absorbe, gracias a las trabéculas, las cargas de impacto. Otra diferencia es que las trabéculas del hueso esponjoso son el almacén y protección de la médula ósea roja. En los adultos, el tejido óseo que se encuentra en la cadera, costillas, esternón, columna vertebral y los extremos de huesos largos, tienen médula ósea roja que genera la hematopoyesis (Arenas., 2010).

Formación del tejido óseo

La osificación u osteogénesis es el proceso mediante el cual se forma el hueso. En los neonatos, el pseudoesqueleto está constituido por membranas de tejido conectivo embrionario (mesénquima) o partes de cartílago hialino cuya forma es similar a la del hueso. El tejido embrionario sirve de precursor para una posterior osificación. Dichos procesos de osificación se pueden dividir en:

Osificación intramembranosa: es la formación de hueso sobre las membranas del tejido conectivo fibroso. El hueso se forma a partir del mesénquima, sin pasar por una etapa cartilaginosa.

Osificación endocondral: las células mesenquimatosas se convierten en condroblastos modelando el hueso en cartílago hialino. Posteriormente, los osteoblastos reemplazan poco a poco el cartílago con tejido óseo.

El remodelamiento óseo, depende de diversos factores externos como la edad, el metabolismo, las enfermedades óseas, el ejercicio, el estrés, la alimentación, la raza, etc. El problema de regeneración ósea es aún incipiente en el mundo biomédico gracias a la falta de correlación experimental precisa (Fernández., 2005). La regeneración ósea es un proceso de renovación permanente que persiste aún en la edad adulta, este proceso consiste en la excavación de túneles en el tejido antiguo por parte de los osteoclastos para renovar su composición por la intervención de los osteoblastos. El ciclo de remodelamiento óseo requiere en promedio tres meses o más, dependiendo del metabolismo y otros factores; en condiciones normales, la regeneración sirve para:

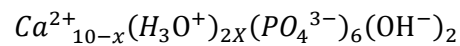
- Renovar el tejido óseo antes de su total deterioro.
- Redistribuir la masa ósea a lo largo de las líneas de esfuerzo mecánico.
- Recuperar tejidos y huesos lesionados.

El proceso de reabsorción ósea se lleva a cabo gracias a la destrucción de la matriz por parte de los osteoclastos. En el proceso, los osteoclastos se adhieren firmemente a la superficie ósea en el endostio o en el periostio para sellar el área de contacto en su límite de borde arrugado. Una vez que se da esta unión, se liberan enzimas lisosómicas, que digieren proteínas y varios ácidos en la unión sellada. Estas enzimas consumen las fibras de colágena entre otras sustancias orgánicas, mientras que los ácidos desintegran el material óseo. Este proceso lo llevan a cabo varios osteoclastos cavando túneles en el hueso. Una vez que las proteínas y minerales se encuentran en el líquido intersticial, se difunden a los capilares sanguíneos cercanos para mantener la homeostasis química del cuerpo, después, los osteocitos y los osteoblastos ingresan en el proceso para reconstruir el hueso (Arenas., 2010).

Estructura mineral del hueso

El hueso es un matriz proteica de colágena impregnada de sales minerales, especialmente fosfatos de calcio. Desde este punto de vista, debe existir una adecuada ingesta y absorción de proteínas y minerales para

mantener la estructura ósea. Los minerales en el hueso se encuentran principalmente en forma de HA que tienen la forma general:



Estas sales forman cristales que miden 20 x 5 nm aproximadamente, también se encuentra Na y pequeñas cantidades de Mg.

Injertos como sustitutos óseos

Hoy se cuenta con diferentes tipos de injertos, los cuales se clasifican según su origen. Pueden distinguirse los extraídos del propio paciente (autólogos); los provenientes de diferente individuo de la misma especie, genotipo (aloinjertos; por ejemplo, el hueso de banco); los de origen animal (xenoinjertos o heterólogos; por ejemplo, hueso bovino) y los sintéticos (por ejemplo, la HA o combinación de materiales como metales, cerámicos o polímeros).

La selección del injerto debe fundamentarse en el conocimiento de los mecanismos de interacción con el organismo y de neoformación ósea, que se describen a continuación:

Osteogénesis: es el proceso de formación y desarrollo de hueso. Un injerto con propiedades osteogénicas tiene osteoblastos viables, únicos capaces de sintetizar la matriz osteoide, la cual posteriormente se mineraliza. La supervivencia de las células trasplantadas cuando se realiza un injerto estará determinada por su distancia a una fuente de aporte sanguíneo. Sólo lo harán las que se encuentren a menos de 300 µm de distancia.

Osteoconducción: el injerto tiene la función de esqueleto y provee una matriz física que constituye una guía para la aposición de tejido óseo.

Osteoinducción: se inicia por medio de la transformación de células mesenquimatosas no diferenciadas y peri-vasculares de la zona receptora en células osteoformadoras, en presencia de moléculas reguladoras del metabolismo óseo (BMP, PDGF, FGF, IGF, VEGF15), (Khon., 1991). La fuente de estas proteínas son los injertos

autólogos, el plasma rico en factores de crecimiento y las proteínas morfogenéticas obtenidas mediante técnicas de ingeniería genética (Ravaglioli., 1992) (Salgado., 2004).

El injerto autólogo es mayormente utilizado debido a que implica un procedimiento quirúrgico que evita la transmisión de enfermedades y el rechazo inmunitario, proporcionando buenos resultados postoperatorios. Además, consta de los tres mecanismos de regeneración ósea: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción. Como contrapartida a estos beneficios, sus desventajas más frecuentes son algunas heridas en la zona donadora y la insuficiente cantidad de injerto, por ejemplo, en las artrodesis vertebrales y en los defectos de los huesos largos, donde se requieren injertos de gran volumen. Otro factor para tener en cuenta es la posibilidad de sufrir, como en el caso de todo procedimiento quirúrgico, infección, dolor, hemorragia, debilidad muscular o lesión neurológica.

El aloinjerto, por su parte, ofrece la estructura a partir de la cual comienza a formarse hueso nuevo, que después es reemplazada gradualmente por el tejido anfitrión. Como no tiene células vivas, la formación ósea producida por proliferación subperióstica y endocondral es lenta y se pierde un volumen apreciable en comparación con el injerto autólogo. Se le emplea fundamentalmente para soportar cargas mecánicas en zonas donde hace falta soporte estructural. Tiene elevada inmunogenicidad y es un vector potencial de patologías. Sin embargo, representa una alternativa de relevancia en los pacientes que presentan un autoinjerto inadecuado y suele utilizarse también en reconstrucciones secundarias a resecciones oncológicas y en defectos óseos segmentarios (Barón., 2006).

Los injertos heterólogos de origen animal, conocidos también como xenoinjertos, basados en HA, son una opción más que aceptable y han tenido resultados clínicos satisfactorios. Su característica fundamental es su capacidad osteoconductor, al igual que el aloinjerto, pero sin desventajas en cuanto a la inmunogenicidad. Se les suele utilizar para el relleno de defectos óseos y en artrodesis vertebrales.

Por último, se tiene a los materiales sintéticos, por ejemplo, el trifosfato de calcio (TCP), los cuales pueden ser altamente biocompatibles, reabsorbibles y osteoconductores, debido a sus características fisicoquímicas, a su reactividad biológica y, fundamentalmente, a su propiedad de ser sustituido de forma rápida por el tejido anfitrión, con ciertas desventajas que implican elevados costos, ya que sólo se obtienen por síntesis química, y poseen deficientes propiedades mecánicas. (Barón., 2006)

Durante los últimos 50 años, el desarrollo de la biología celular y molecular, con sus grandes logros técnicos y científicos, ha hecho posible el poder restaurar o mejorar la función de órganos y tejidos lesionados por enfermedades o traumatismos. La cirugía de trasplantes a partir de órganos y tejidos extraídos de donantes es parte de esta medicina reparadora.

El desarrollo *in vitro* de las células epiteliales, así como su diferenciación y multiplicación, dependen de complejas interacciones con la matriz extracelular, así como de diferentes estímulos procedentes de los fibroblastos y sus productos. Su primera aplicación clínica se da en 1980, en el equipo del Dr Banks-Schelegel donde demuestra la viabilidad del epitelio cutáneo obtenido *in vitro* empleándolo como injerto en animales de experimentación, lo cual llevó al perfeccionamiento de estas técnicas haciendo posible la utilización de estos tejidos, obtenidos en el laboratorio, en la práctica clínica, (Tom., 2006).

La ingeniería de tejidos evolucionó del campo de desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para producir tejidos funcionales. El objetivo de la ingeniería de tejidos es restaurar, mantener o mejorar los tejidos dañados u órganos completos. La piel y los cartílagos artificiales son ejemplos de tejidos fabricados por ingeniería que han sido aprobados por la FDA (Federal Drug Administration) ; sin embargo, todavía tienen un uso limitado en pacientes. La medicina regenerativa es un campo amplio que incluye la ingeniería de tejidos, pero también incorpora la investigación sobre auto curación – donde el cuerpo usa sus propios sistemas, algunas veces con ayuda de material biológico extraño, para reproducir células y reconstruir tejidos y órganos. Los términos “ingeniería de tejidos” y “medicina regenerativa” han llegado a ser intercambiables, ya que el campo intenta enfocarse en las curas en lugar de en los tratamientos para enfermedades complejas y a menudo crónicas. Este campo continúa evolucionando. Además de las aplicaciones médicas, las aplicaciones no terapéuticas incluyen el uso de tejidos como biosensores para detectar agentes amenazantes biológicos o químicos, y chips de tejidos que se pueden utilizar para probar la toxicidad de un medicamento experimental.

¿Cómo funcionan la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa?

Las células son los componentes fundamentales del tejido, y los tejidos son la unidad básica de la función en el cuerpo. Generalmente, grupos de células forman y secretan su propia estructura de soporte, llamada matriz extracelular. Esta matriz, o andamio, hace más que sólo servir como soporte para las células; también actúa como una estación repetidora para varias moléculas de señalización. Por consiguiente, las células reciben mensajes de muchas fuentes que se vuelven disponibles desde el entorno local. Cada señal puede iniciar una cadena de respuestas que determina qué le sucede a la célula. Al entender cómo responden las células individuales a las señales, cómo interactúan con su entorno y cómo se organizan en los tejidos y organismos, los investigadores han podido manipular estos procesos para sanar los tejidos dañados o incluso producir nuevos. El proceso frecuentemente comienza con la construcción de un andamio a partir de un amplio grupo de fuentes posibles, desde proteínas hasta polímeros sintéticos (Lizarbe., 2007). Una vez que se producen los andamios, se pueden introducir células con o sin factores de crecimiento. Si el entorno es adecuado, se desarrolla un tejido. En algunos casos, las células, los andamios y los factores de crecimiento se mezclan todos al mismo tiempo, permitiendo que el tejido se “autoensamble”. Otro método para producir un tejido nuevo utiliza un andamio existente. Las células de un órgano donado se desprenden y el andamio de colágena y todas las proteínas de matriz extracelular restante se usa para crecer un tejido nuevo. Este proceso ha sido utilizado para la bioingeniería de tejidos de corazón, hígado, pulmón y riñón. Este enfoque ofrece grandes esperanzas para utilizar el andamiaje con el tejido humano descartado durante una cirugía y combinarlo con las propias células de un paciente para hacer órganos personalizados que no sean rechazados por el sistema inmunológico (Tuney., 2011) (Relman., 1998).

En la mayoría de casos, la formación de tejidos y estructuras biológicas *in vitro* requiere un considerable conocimiento de la célula para garantizar su supervivencia, crecimiento e incentivar su funcionalidad. En

general, los requerimientos básicos de las células que deben ser mantenidos durante su cultivo incluyen oxígeno, pH, humedad, temperatura, nutrientes y el mantenimiento de la presión minúscula osmótica.

Otro campo de la ingeniería de tejidos es la introducción a los propios factores o la estimulación requerida para inducir las funciones vitales de los tejidos por regenerar o reconstruir. En muchos casos, el mantenimiento del cultivo celular no es suficiente por lo que se debe agregar aditivos como factores de crecimiento, hormonas, metabolitos específicos o nutrientes, estímulos químicos y físicos.

En muchos casos, se emplean **biorreactores** para mantener condiciones de cultivo celular específicas. Los dispositivos son muy diversos, con múltiples diseños para aplicaciones específicas. El uso de biorreactores permite el control preciso y continuo de las condiciones de cultivo celular y permiten también introducir diferentes estímulos al cultivo de tejidos.

Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa en las prácticas médicas actuales

Actualmente, la ingeniería de tejidos juega un papel relativamente pequeño en el tratamiento de pacientes a nivel mundial; sin embargo, cada vez son más las investigaciones que se tienen acerca de las alternativas para dar solución para regenerar algún tejido. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), se han llevado a cabo protocolos en este sentido. Uno de ellos es para el implante de vejigas suplementarias, implante de vagina y útero, pequeñas arterias, injertos de piel, cartílago y hueso, pero los procedimientos son todavía experimentales y con un alto costo. Los tejidos de órganos más complejos como el corazón, pulmón e hígado se han recreado con éxito en el laboratorio, todavía falta mucho para que sean totalmente reproducibles y estén listos para ser implantados en un paciente. Sin embargo, estos tejidos pueden ser de gran utilidad en la investigación, especialmente en el desarrollo de fármacos. El uso de tejido humano funcional se puede utilizar para ayudar a seleccionar medicamentos, los candidatos podrían acelerar el desarrollo y proveer herramientas clave para facilitar la medicina personalizada, al tiempo que se ahorra dinero y se reduce el número de animales utilizados para la investigación (Lizarbe., 2007).

Ingeniería de tejido óseo

Tradicionalmente las lesiones en el tejido óseo causadas por trauma, osteonecrosis y tumores han sido tratadas con el implante de injertos autólogos, alogénicos o xenogénicos; en otros casos, implantando materiales sustitutivos como prótesis metálicas. En vista de problemas como la escasez de donantes, la transmisión de enfermedades, la morbilidad del sitio de extracción y la incapacidad de los materiales para remodelarse y reaccionar ante condiciones fisiológicas, se hace necesaria la búsqueda de soluciones donde la ingeniería de tejidos aparece como una opción para restaurar, mantener o mejorar la función mediante la producción de sustitutos biológicos que incluyan células cultivadas en matrices tridimensionales, en un medio de cultivo suplementado con factores de crecimiento (Estrada., 2006).

Cuando se piensa en reparar una parte del esqueleto, podrían existir dos posibilidades; la primera es reemplazar la parte dañada, o sustituirla regenerando el hueso, lo cual lleva a pensar en un campo de investigación muy importante, dirigida a conseguir biocompositos, que tengan buena resistencia mecánica y que puedan conducir a la regeneración de hueso.

Los materiales que mejoran la regeneración ósea tienen una gran cantidad de potenciales aplicaciones clínicas desde el tratamiento de fracturas hasta la fusión espinal. El uso de andamios de materiales porosos a partir de componentes biocerámicos y poliméricos para soportar el crecimiento de células óseas y tejidos es un área de gran interés, ya que se ha observado que dichos materiales son los mejores candidatos para reconstruir tejido óseo. Además se pueden reforzar las biocerámicas con una matriz polimérica para mejorar los pobres aspectos mecánicos de éstas y profundizar en el estudio del mecanismo de formación del hueso natural para buscar las condiciones de síntesis que permitan obtener en el laboratorio biomateriales compuestos orgánico-inorgánico con propiedades mecánicas aceptables (Estrada., 2006).

Los retos actuales incluyen la ingeniería de tejidos que pueden igualar el contexto mecánico y biológico de la matriz de tejido óseo real y apoyar la vascularización de grandes construcciones de tejido. La ingeniería de tejidos combina materiales, células y factores biológicos para generar o sustituir algún tejido. Una serie de materiales biodegradables y biorreabsorbibles, así como diseños de andamios, se han estudiado experimentalmente y / o clínicamente; idealmente, un andamio debe tener las siguientes características: (i)

debe ser tridimensional y altamente poroso con una red interconectada de poros para permitir el crecimiento celular y el transporte de flujo de nutrientes y desechos metabólicos; (ii) debe ser biocompatible y biorreabsorbible con una velocidad de degradación y reabsorción controlable para adaptarse al crecimiento de células / tejidos *in vitro* y / o *in vivo*; (iii) debe tener una química de superficie adecuada para la unión, proliferación y diferenciación celular y (iv) se espera que el nuevo material tenga las propiedades adecuadas para producir un tejido óseo con propiedades mecánicas muy similares a las del tejido nativo.

En la Tabla 1 se muestran algunos de los trabajos de investigación que se han realizado para reconstruir o sustituir el tejido óseo tratando de cumplir con las características previamente descritas. Dichos trabajos se basan en el uso de materiales metálicos, cerámicos o poliméricos, pero, como ya se mencionó, los mejores candidatos para tal tarea son los biocompositos a base de cerámicas y polímeros, ya que las cerámicas proporcionan fuerza en carga mientras que los polímeros brindan propiedades de elasticidad y anisotropía. Obviamente, el hecho de que sean materiales biocompatibles agrega gran ventaja ya que se pueden utilizar sin ningún problema de generación de reacciones de toxicidad.

Otro aspecto importante acerca de estas investigaciones se ve reflejado en el hecho de que algunas incluyen estudios *in vitro*, otras se basan en los estudios *in vivo* o pruebas mecánicas, mientras que algunos otros contienen factores de adhesión o crecimiento en sus materiales. Hasta el momento, sin embargo, no se ha encontrado algún estudio que integre todos los aspectos relevantes con el objeto de dar una información más amplia de algún material para reparar o sustituir tejido óseo. Es precisamente por ello que en la última fila de la Tabla 1 se resume que el presente trabajo de tesis se enfoca en la generación, caracterización (morfológica, biológica y mecánica) de un material compuesto a base de una cerámica (HA) y un polímero (PLA), modificado superficialmente con PPy mediante Polimerización por plasma. De esta manera, se pretende que en el material se depositen células óseas y se induzca su adhesión y proliferación celular, lo cual refleja de manera directa un ejemplo de Ingeniería de Tejidos, ya que se está combinando un material con un factor de adhesión (PPy) y células óseas con el objeto de dar una alternativa para sustituir o reparar tejido óseo. Más aún, se complementa la caracterización de dicho material, ya que se realizan cultivos *in vitro*, *in vivo*, pruebas mecánicas y estudios histológicos.

Tabla 1. Materiales y pruebas utilizadas como alternativa en la reconstrucción de tejido óseo.

	*Material	Factor de adhesión/ crecimiento	Vitro	Vivo	Pruebas mecánicas	Referencia
Metal	Mg-Zr-Sr	NO	SI	(Conejo)	SI (Compresión)	Li Y. , 2012
	Titanio	Ligando ($\alpha 5\beta 1$ -integrina)	SI	SI (Rata)	NO	Petrie, 2010
Polímero	Tereftalato-Polietileno	TiO ₂	SI	SI (Conejo)	SI (desprendimiento)	(T Saito., 2011)
	Espojas de fibras de seda-quitosano	NO	SI	NO	SI (Compresión)	Sionkowska & Płaneczka, 2012
	Policaprolactona (Masa ósea no calidad en hueso)	GFOGER (péptido sintético de triple hélice-receptor involucrados en la osteogénesis)	NO	SI (Rata)	SI (Torsión)	García & Wojtowicz, 2012
Cerámico	Cerámicas de vidrio	NO	NO	NO	SI (Fractura)	Qiang C., 2012
	Polifosfato de calcio	Dopaje iónico (K/Sr)	SI	SI	SI (Compresión)	Dormer, 2012.
	Beta-fosfato tricálcico (β -TCP)/HA (HA)	SiO ₂	SI	SI(Caprino)	NO	Shahram, 2013

Polímero/ Cerámico	Fibras de Polifenil-éter-éter-sulfona(PPEES)/nanoHA(NHA)	NO	SI	NO	SI (Tracción)	Manickam, 2013.
	HA-Quitosano-Gel	Proteínas ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 5\beta 5$) (hMSCs)	SI	NO	NO	Hunter & Ma., 2013
	Polisacárido sintético (β -1,3-glucano)-HA (Maxilofacial)	NO	NO	SI (Perro)	SI (Compresión)	Belcarz, 2013
	Fosfato de quitosano-calcio (Cs-CP)	NO	SI	NO	SI (Compresión)	Tanase, 2013
	TCP-quitosano	NO	SI	NO	NO	Olivos, 2015
	Plasma-gel-silicio orgánico	NO	SI	NO	NO	Viloria,2017
	Nanoapatita-quitosano	NO	SI	SI	NO	More,2017
	PLA/HA	PPy-I	SI	SI(Conejo)	SI (Tracción)	Flores,2017

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y TEORÍA DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS

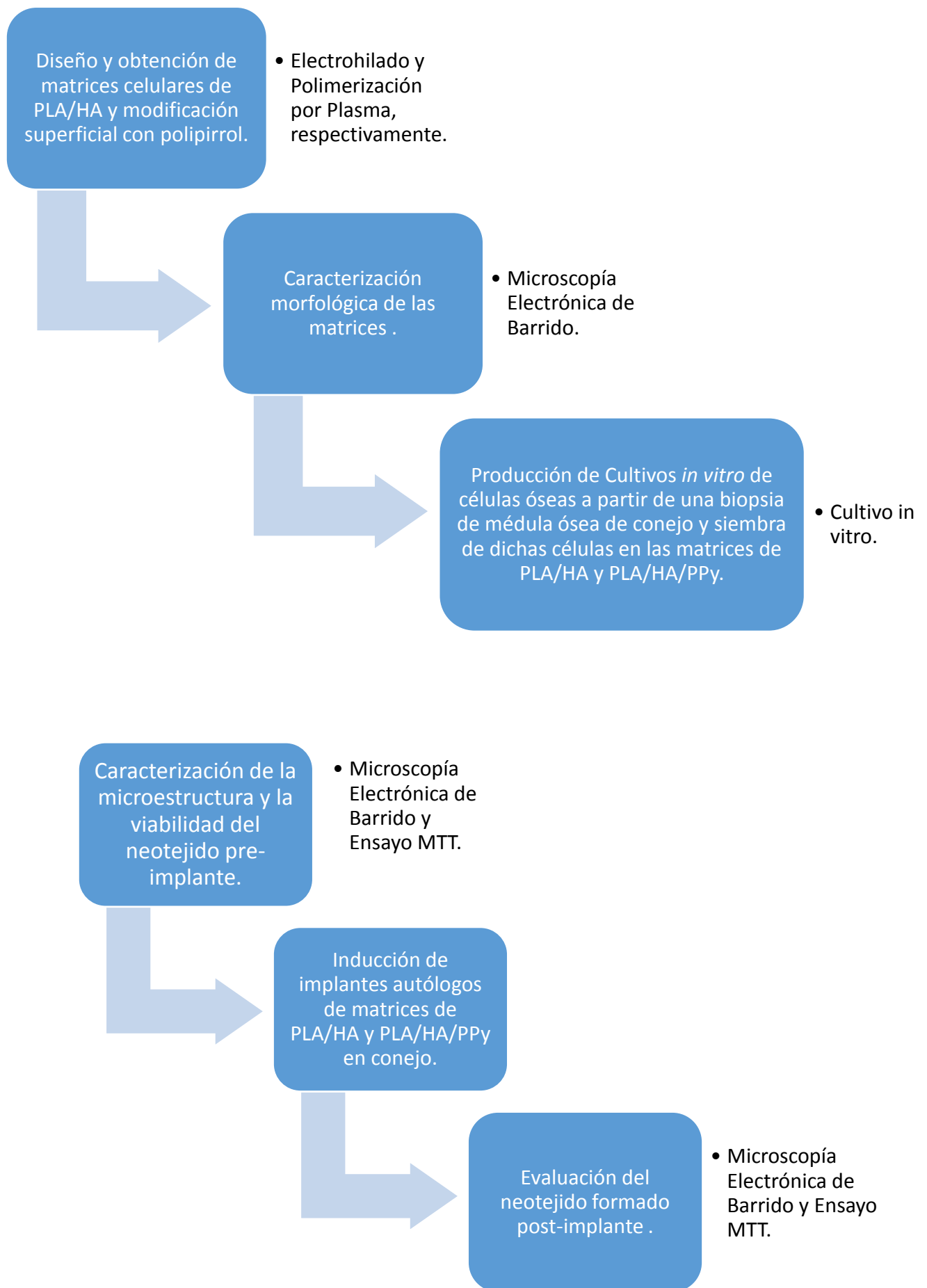
MATERIALES

HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), PLA ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), cloroformo (CHCl_3), alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), PPy ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$), con peso molecular 4531, Yodo (I_2), obtenidos de Sigma-Aldrich®.

Medio de cultivo α -MEM, suero fetal bovino (SFB), medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), medio de cultivo Dulbecco's Modified (MDM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), nycoprep, paraformaldehído, dexametasona, ascorbato, formalina, acepromazina, ketamina, pentobarbital sódico, tripsina, xilocaina, fosfatasa alcalina, fluorocromos APC, PE-CY5, PE, isotipos 1gG2a, 1gG3, B-GP, marcadores CD45 (-), CD34 (-), HLA-DR (-), CD90 (+), CD73 (+), mallas de vicryl, nylon, aluminio micronizado.

TÉCNICAS UTILIZADAS

En este capítulo se describe el protocolo general en donde se muestra toda la secuencia de actividades a seguir y las respectivas técnicas que se utilizaron en este trabajo, tal como lo muestra la Ilustración 1:



Esquema 1. Protocolo de actividades y técnicas desarrolladas a lo largo de este trabajo.

Electrohilado

El electrohilado es una técnica de fabricación de fibra electrostática que ha atraído más la atención en los últimos años debido a su versatilidad y potencial para aplicaciones en diversos campos. Dicha técnica está basada en una serie de conceptos electromagnéticos, como la carga electrostática, en donde una solución generalmente polimérica es inyectada desde un electrodo positivo (inyector) hasta un electrodo negativo (colector) bajo la acción de un campo electromagnético, el cual rompe la tensión superficial que se tiene en la punta del inyector donde se forma el cono de Taylor, cuando dicha tensión superficial se rompe, entonces se tiene como resultado fibras de diversos tamaños, obteniendo así productos finos de hasta unos cuantos nanómetros de espesor. En el electrohilado es común hacer las soluciones a temperatura ambiente y a altos potenciales eléctricos (generalmente por arriba de 1 kV).

En este trabajo se usó la técnica de Electrohilado para preparar las matrices porosas. En este proceso se utiliza un alto voltaje de 10KV a 30KV para producir un campo eléctrico fuerte, capaz de atraer partículas eléctricamente cargadas de una solución o fluido polimérico de alta densidad molecular, desde una aguja inyectora hacia una superficie metálica colectora en donde se solidifica formando micro y nanofibras de polímeros o de algún otro material con diámetros alrededor de 50 nanómetros y hasta algunas micras, y de longitudes variables. Los materiales que se utilizan en esta técnica son principalmente polímeros porque estos tienen las propiedades físicas y químicas para formar fibras que sean resistentes, que confieran cierta elasticidad y que sean duraderas. Los polímeros son dieléctricos, que en presencia de un campo eléctrico pueden considerarse como un arreglo de dipolos eléctricos microscópicos compuestos por cargas positivas y negativas cuyos centros no coinciden perfectamente (Robles, 2014). Se mantienen en su lugar por acción de fuerzas atómicas y moleculares, y solo pueden cambiar su posición ligeramente en respuesta a fuertes campos eléctricos externos. Son llamadas cargas ligadas, las cuales pueden ser tratadas como cualquier otra fuente de campo electrostático, en contraposición a cargas libres que determinan la conductividad en otro material "conductor". En particular, en este trabajo se le denomina co-electrohilado, dado que la solución precursora está formada por un polímero con partículas inmersas en él. Los factores más importantes que afectan la morfología de las fibras en este método son:

- Viscosidad de la solución
- Conductividad del polímero
- Disolvente
- Temperatura de la solución
- Forma del colector
- Distancia inyector-colector
- El voltaje aplicado
- Diámetro del inyector
- Temperatura ambiente
- Humedad

Dos requisitos fundamentales para que un material pueda ser utilizado en ingeniería de tejidos son la biocompatibilidad y la biodegradabilidad, ya que el andamio debe degradarse con el tiempo y ser reemplazado con tejidos recién regenerados. También es importante la arquitectura del andamio y afecta la unión celular (Cajero., 2010).

La Figura 6 muestra el sistema de Electrohilado del departamento de física de la UAM-I que se empleó en este proyecto.



Figura 6. Sistema de Electrohilado utilizado para la formación de matrices de PLA e HA. Laboratorio de polímeros UAM-I.

Polimerización por plasma

La polimerización por plasma se refiere a la formación de materiales poliméricos utilizando el estado de plasma de los monómeros, o especies reactivas creadas en el estado de plasma. El plasma es el cuarto estado de la materia, que consiste en gran parte del gas ionizado que mantiene neutralidad eléctrica total. El plasma utilizado en la formación de materiales poliméricos es el llamado "plasma de baja temperatura" o "plasma de baja presión", en el que el equilibrio térmico no se mantiene entre electrones, iones y especies neutras. La energía cinética (kT) de los electrones, expresada en la temperatura del electrón, está en la vecindad de 60 000 K, mientras que los valores correspondientes para iones y especies neutras están a menudo en el intervalo de 300-500 K.

Ya en la década de 1870 se conocían "polímeros" formados por este proceso, pero estos polímeros fueron inicialmente considerados como subproductos indeseables asociados con la descarga eléctrica, con poca atención dada a sus propiedades. No fue sino hasta la década de 1960 que las propiedades de estos polímeros se encontraron útiles. Se encontró que los recubrimientos poliméricos finos sin defectos podrían formarse sobre metales, aunque para películas muy delgadas (<1 mm) se ha demostrado recientemente que es una simplificación excesiva. Se halló también que seleccionando el tipo de monómero y la densidad de energía por monómero, conocido como parámetro de solubilidad, la composición química y la estructura de la película delgada resultante se pueden variar. Algunos monómeros comunes polymerizados por este método incluyen estireno, etileno y metacrilato, por nombrar sólo algunos. La mayor parte de la atención dedicada a la polimerización de plasma ha sido en los campos de recubrimientos (Botero., 2002).

La polimerización por plasma es una técnica de depósito de láminas delgadas en el ámbito de la investigación básica. Estos procesos están basados en la técnica plasma activated chemical vapor deposition (PA-CVD). La polimerización por plasma consiste en la ignición de un elemento precursor de naturaleza orgánica (gaseoso o líquido) en una descarga luminiscente (o plasma frío). La interacción del precursor con los elementos del plasma (electrones libres, radiación UV), fragmentan la molécula en especies activas, iones y neutros que son susceptibles de reaccionar sobre un substrato determinado, formando una película de naturaleza orgánica o inorgánica. Estas películas suelen presentar una elevada densidad de entrecruzamiento y alta adherencia.

Las propiedades de las películas así depositados dependen de las condiciones del proceso. Entre las más importantes se encuentran:

- Naturaleza del precursor
- Potencia de descarga en el plasma
- Flujo de entrada del precursor
- Polarización de los substratos
- Geometría del reactor (electrodos)
- Temperatura ambiental

Uno de los factores clave para la viabilidad de la técnica reside en su capacidad para que la película depositada retenga la estructura original del precursor, así como los grupos funcionales buscados. Esta retención de la microestructura no es siempre evidente y supone uno de los retos de la técnica (Botero., 2002).

Existen diversos tipos de reactores para polimerización por plasma, uno de ellos es el reactor de flujo continuo, que tiene electrodos internos y permite que el gas monomérico fluya a través de la cámara de reacción, lo que debería dar un recubrimiento más uniforme para el depósito de la película de polímero. Tiene la ventaja de que una mayor cantidad de monómero sigue fluyendo en el reactor para depositar más polímero. No obstante, tiene el inconveniente de formar lo que se llama "cola de llama", que es cuando la polimerización se extiende dentro de la línea de vacío, precisamente este tipo de reactor fue el que se utilizó en este trabajo tal como lo muestra la figura 7.

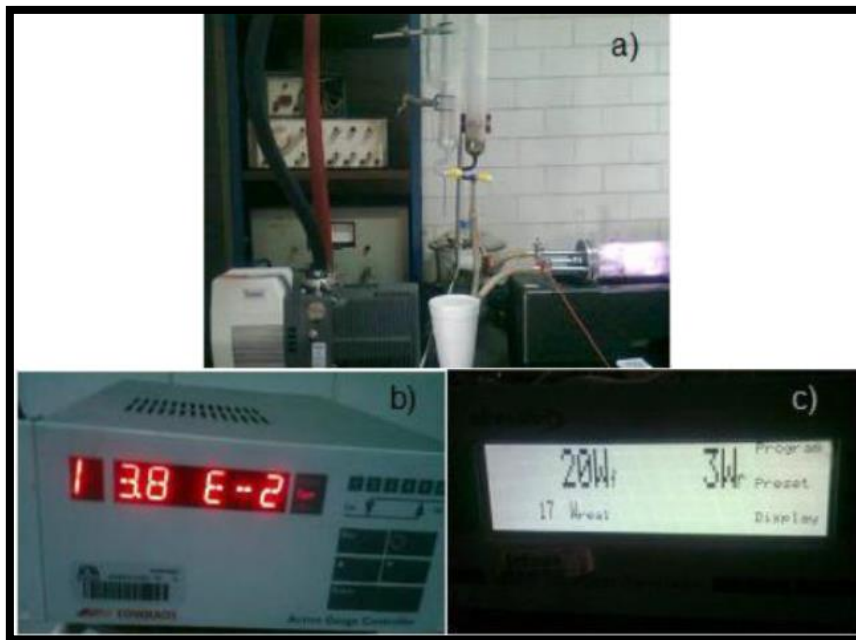


Figura 7. Reactor de Polimerización por Plasma y sus componentes. a) Bomba de vacío b) Barómetro digital c) Generador de potencia.

La formación de un plasma para polimerización requiere una energía electrónica de 1-10 eV, con densidades electrónicas de 10^9 a 10^{12} por centímetro cúbico, para formar el estado de plasma deseado. La formación de un plasma a baja temperatura es importante ya que las temperaturas electrónicas no son iguales a las temperaturas del gas y tienen una relación de Temperatura crítica (T_e)/Temperatura de transición vítrea (T_g) de 10 a 100, de manera que este proceso puede ocurrir a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente, lo cual es ventajoso porque los polímeros se degradan a altas temperaturas. Esto implica la formación de plasmas de equilibrio, lo que significa que las especies de monómero cargadas tienen más energía cinética que las especies de monómero neutro y provocan la transferencia de energía a un sustrato en lugar de a un monómero neutro.

Otros parámetros que son importantes en la polimerización por plasma son la potencia, la presión, el caudal, la frecuencia, la separación de los electrodos y la configuración del reactor. [6] Los caudales bajos normalmente sólo dependen de la cantidad de especies reactivas presentes para la polimerización, mientras que los altos caudales dependen de la cantidad de tiempo de residencia en el reactor. Por lo tanto, la tasa máxima de polimerización está en algún lugar en el medio. Las reacciones más rápidas tienden a ser del orden de las moléculas unidas por enlace triple > doble enlace>, y también las moléculas de menor peso molecular

son más rápidas que las moléculas con mayor peso. El factor de peso molecular en el depósito de polímero depende del caudal de monómero, en el que un monómero de mayor peso molecular típicamente cerca de 200 g / mol necesita un caudal mucho mayor de $15 \times 10^4 \text{ g / cm}^2$, mientras que pesos moleculares inferiores, alrededor de 50 g / mol, requieren un caudal de sólo $5 \times 10^4 \text{ g / cm}^2$. [1] Por lo tanto, un monómero pesado necesita un flujo más rápido, y probablemente conduciría a presiones incrementadas, reduciendo las tasas de polimerización.

El aumento de la presión tiende a disminuir las tasas de polimerización, reduciendo la uniformidad de el depósito, ya que la uniformidad se controla mediante presión constante. A presiones mayores de 1 torr, se forman oligómeros sobre la superficie del electrodo y los monómeros también en la superficie pueden disolverse. A bajas presiones, las superficies reactivas son bajas en concentración de monómero y facilitan el crecimiento de polímeros de alto peso molecular.

La tasa de polimerización depende de la potencia de entrada, hasta que la saturación de potencia se produce y la tasa llega a ser independiente de ella. Un espacio entre electrodos más estrecho también tiende a incrementar las velocidades de polimerización porque se forma una densidad electrónica más alta por unidad de área. Las velocidades de polimerización también dependen del tipo de aparato utilizado para el proceso. En general, el aumento de la frecuencia de descarga de corriente alterna hasta aproximadamente 5 kHz aumenta la velocidad debido a la formación de más radicales libres. Después de esta frecuencia, los efectos inerciales de los monómeros que chocan inhiben la polimerización. Esto forma la primera meseta para las frecuencias de polimerización. Un segundo máximo en frecuencia ocurre a 6 MHz, donde las reacciones secundarias se superan de nuevo y la reacción se produce a través de radicales libres difundidos desde el plasma a los electrodos, momento en el que se obtiene una segunda meseta. Estos parámetros difieren ligeramente por cada monómero y deben ser optimizados in situ.

Microscopía óptica (MO)

El microscopio óptico se caracteriza porque posee una lente ocular además de la lente objetivo, para lograr un mayor aumento. En este tipo de microscopía, el objeto se coloca justamente detrás del foco principal de la lente objetivo, de tal manera que se forma una imagen real que es aumentada por la lente ocular de forma invertida. En este instrumento hay dos tipos de lentes: el ocular, en la parte superior del microscopio, más próximo al ojo del observador, y el objetivo, próximo al preparado. El ocular normalmente tiene un aumento de 10x. En cuanto a los objetivos, por lo común tienen un aumento que varía entre 4X a 45X. Para hacer uso del microscopio óptico, se debe considerar que las muestras sean muy finas (pocas micras de grosor) para que los rayos luminosos puedan atravesarlas (corte fino) y dependiendo de la muestra por observar, ésta se trata con las siguientes técnicas:

Fijación: Se trata a la muestra con fijadores como el alcohol etílico.

Tinción: Se coloca la muestra sobre el portaobjetos (porta) y se utiliza un colorante específico según lo que se quiera observar.

Montaje: La muestra teñida colocada sobre el portaobjetos se le cubre con el cubreobjetos (cubre) para protegerla. Se coloca sobre la platina del microscopio, se enfoca y se procede a la observación

En este trabajo se utilizó un microscopio DMLP Leica de la UAM-I para algunos análisis morfológicos que no requerían ser tan detallados y profunda. Figura 8.



Figura 8. Microscopio Óptico modelo DMLP Leica, Depto. de física UAM-I.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microscopía electrónica de barrido o MEB o SEM por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscopy, se basa en el principio de la microscopía óptica en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones. Con esto se alcanza hasta los 100 Å, resolución muy superior a cualquier instrumento óptico.

Su funcionamiento consiste en hacer incidir un barrido de haz de electrones sobre la muestra. La muestra (salvo que ya sea conductora) está generalmente recubierta con una capa muy fina de oro o carbón, lo que le otorga propiedades conductoras. La técnica de preparación de las muestras se denomina “sputtering” o pulverización catódica.

Al alcanzar el haz la superficie de la muestra se generan principalmente las siguientes partículas

- Electrones retrodispersados (e1)
- Electrones secundarios (e2)

Además de radiación electromagnética (rayos X) y otras partículas menos significativas.

El microscopio se encuentra internamente equipado con unos detectores que recogen la energía y la transforman en las siguientes imágenes y datos:

- Detector de electrones secundarios: (SEI – Secondary Electron Image) con los que obtenemos las imágenes de alta resolución.
- Detector de electrones retrodispersados: (BEI – Backscattered Electron Image) Con menor resolución de imagen pero mayor contraste para obtener la topografía de la superficie.
- Detector de energía dispersiva: (EDS – Energy Dispersive Spectrometer) detecta los rayos X generados y permite realizar un análisis espectrográfico de la composición de la muestra.

El MEB se caracteriza porque utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen, ampliada de la superficie de un objeto por lo que permite la observación y caracterización superficial de sólidos inorgánicos y orgánicos. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra.

El MEB está equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: el detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image), y un detector de energía dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis de MEB cuantitativos y de distribución de elementos en superficies. Dentro de las principales utilidades de la MEB se encuentran la alta resolución (~ 1 nm), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras (sólida o conductora). En el caso de que se requiera que la muestra sea conductora, ésta se recubre con una capa de carbón o una capa delgada de un metal como el oro; las muestras no conductoras se trabajan en bajo vacío.

En este trabajo se utilizó un MEB de emisión de campo JEOL JSM-7600F de la UAM-I, el cual cuenta con una resolución máxima de al menos 0.8nm garantizados a en el orden de Kilovolts, 1.5nm garantizados a 1.0kv y 5nm garantizados a 0.1kv, usando Gentle Beam, Figura 9.



Figura 9. Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo JEOL JSM-7600F, Depto. de física UAM-I.

Microscopía Raman

La microscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico, permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado, e independientes de la frecuencia de la luz incidente. El efecto Raman se basa en la interacción de la luz con los enlaces químicos de una muestra. Debido a las vibraciones en los enlaces químicos, la interacción con los fotones provoca cambios de energía específicos en la luz trasera dispersada que aparecen en un espectro Raman (Pastor., 2003). El espectro Raman es único para cada composición química y puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa del material. Dentro de sus ventajas se encuentran las siguientes:

- Proporciona una "huella digital" química de los compuestos investigados
- Es no invasivo, no destructivo
- Requiere una preparación de muestras mínima, si es que la hay
- Es insensible al agua
- Puede utilizarse para la obtención de imágenes

Se trata de una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material por analizar sin necesidad de ningún tipo de preparación especial, y no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, no es destructiva, ésta técnica aplica para muestras que no son fluorescente y en caso de que lo sean se debe contar con el láser adecuado para poder observar su morfología.

En este trabajo se utilizó el microscopio Witec alpha 300 AR de la UAM-I, el cual incorpora las características del sistema de microscopía Raman para la obtención de imágenes químicas potentes junto con la microscopía de fuerza atómica para la caracterización de alta resolución de la superficie a nanoescala. Por lo tanto, la imagen correlativa de Raman AFM facilita una comprensión de las muestras, Figura 10.



Figura 10. Microscopio Witec alpha 300 AR, UAM-I.

Cultivo *in vitro* e *in vivo*

El cultivo de tejidos ha sido considerado durante mucho tiempo como una mezcla de ciencia y arte. Inicialmente fue considerada como una técnica particularmente difícil de aprender. Sin embargo, hoy en día estas dificultades están superadas gracias a factores como los medios de composición definida, la disponibilidad de antibióticos, las instalaciones asépticas (salas de cultivo limpias, cabinas de flujo laminar, incubadores estériles, etc), dispositivos de cultivo (botellas con tapones filtrantes, placas de Petri ventiladas, etc).

In vitro se refiere a la técnica de realizar un procedimiento dado en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo tratando de que se mantengan sus funciones, propiedades bioquímicas y genéticas. Una de las debilidades permanentes de los experimentos *in vitro* es que fallan en replicar las condiciones celulares precisas de un organismo, particularmente un microbio.

Los cultivos de tejido, por su habilidad de adherencia a algún material específico, pueden formar monocapa o mantenerse en suspensión; si proceden de órganos crecen en monocapa.

Frecuentemente los cultivos en suspensión ocurren con células que son circulantes (que pueden mantenerse suspendidas), como las células sanguíneas, por citar un ejemplo. El mantenimiento en suspensión tiene como ventaja mayor facilidad de manipulación, debido a que durante el pase de un cultivo al siguiente, la separación del sustrato no requiere la adición de sustancias como la tripsina. Además es posible un mayor escalamiento, debido a que dependen esencialmente de la accesibilidad del medio y de la tensión de los gases, pero no de la superficie del recipiente. Como desventajas se enfatiza la necesidad de agregar suplementos, y el hecho de que pueden perderse las interacciones espaciales y de adhesión. El cultivo *in vitro* permite un control preciso y fino del medio ambiente dado que se pueden controlar todos los factores físicoquímicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular). Para la división de células óseas, fue necesario realizar cultivo *in vitro* de estas en modo monocapa en cajas Petri y también en los materiales porosos. Es importante destacar que los medios de cultivo deben tener: nutrientes, suero, factores de crecimiento y adhesión, presencia o ausencia de oxígeno y otros gases, condiciones adecuadas de humedad, de pH y de temperatura.

In vivo (latín: "dentro de la vida") se refiere a la experimentación usando un organismo vivo entero en oposición a un organismo parcial o muerto. Los estudios en animales y ensayos clínicos son dos formas de investigación *in vivo*.

El cultivo *in vivo*, se caracteriza por mantener las células dentro de su medio natural, en el cual no se tiene un control fino de los factores físicoquímicos y fisiológicos pero tiene la ventaja de que dichas células se mantienen en un ambiente mucho más parecido al propio original, este cultivo se utilizó para probar la reacción del hospedero (animal), ante la presencia de los materiales porosos fabricados.

La investigación experimental *in vivo* se generalizó con el uso de microorganismos y modelos animales en experimentos de manipulación genética, así como el uso de modelos animales para estudiar toxicidad de fármacos en farmacología. Los genetistas han utilizado procariontes y eucariontes como la levadura, y organismos enteros como *Drosophila*, ranas y ratones para estudiar genética, biología molecular y toxicología. La función de los genes ha sido estudiada observando los efectos de mutaciones espontáneas en organismos enteros o introduciendo mutaciones específicas en células cultivadas. La introducción de la

clonación de genes y mutagénesis *in vitro* ha hecho posible producir mutaciones específicas en animales completos facilitando así considerablemente la investigación *in vivo*.

Ambos enfoques, *in vitro* e *in vivo*, se suelen combinar para obtener información detallada sobre las relaciones estructura-función en los genes y sus productos proteicos, ya sea en células cultivadas y tubos de ensayo o en todo el organismo (Díaz., 2007). Los cultivos *in vitro* e *in vivo* se realizaron en el laboratorio de ingeniería de tejidos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, siguiendo un protocolo previamente establecido, Figura 11.



Figura 11. Laboratorio de Ingeniería de tejidos, HIMFG.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una poderosa técnica capaz de dar una enorme cantidad de información relativa a las células. Permite averiguar entre otras cosas, la composición de la población, su estado de división, los marcadores que expresa en su superficie (una especie de conjunto de etiquetas que la identifican y definen funcionalmente) e incluso su respuesta metabólica a determinados estímulos. Por ello, es una de las técnicas más utilizadas en la investigación en biología celular, en el análisis de expresión de genes y en el diagnóstico.

La esencia de esta técnica está en la posibilidad medir la luz procedente de células individuales que pasan por la luz de un láser, a razón de miles de células por segundo. Los datos que se obtienen de estas medidas pueden ser analizados estadísticamente por software, generando información acerca del tamaño, complejidad, fenotipo y estado de salud de la población celular que se analiza (Ramírez., 2004).

El citómetro

Para poder realizar esta proeza, la citometría se vale de un equipamiento especializado y altamente sensible:

Un citómetro consta de varias partes básicas. En primer lugar, necesitamos una canalización (lo que los ingenieros llaman fluídica) que dirija nuestras células hacia el lugar donde se producirá el impacto de la luz del láser en las células (el llamado punto de detección). Este sistema también retira los líquidos de desecho una vez realizada la detección. Los láseres son las fuentes de luz que impactan contra las células, a razón de una por vez.

Los "ojos" del equipo están formados por sistemas de lentes y filtros que recogen la luz emitida por la muestra a raíz del impacto de los láseres y la dirigen y filtran hacia los sistemas de detección. Por último, los equipos electrónicos y el software recogen los datos procedentes del sistema de detección y los analizan transformándolos en información que podemos entender e interpretar, figura 12.

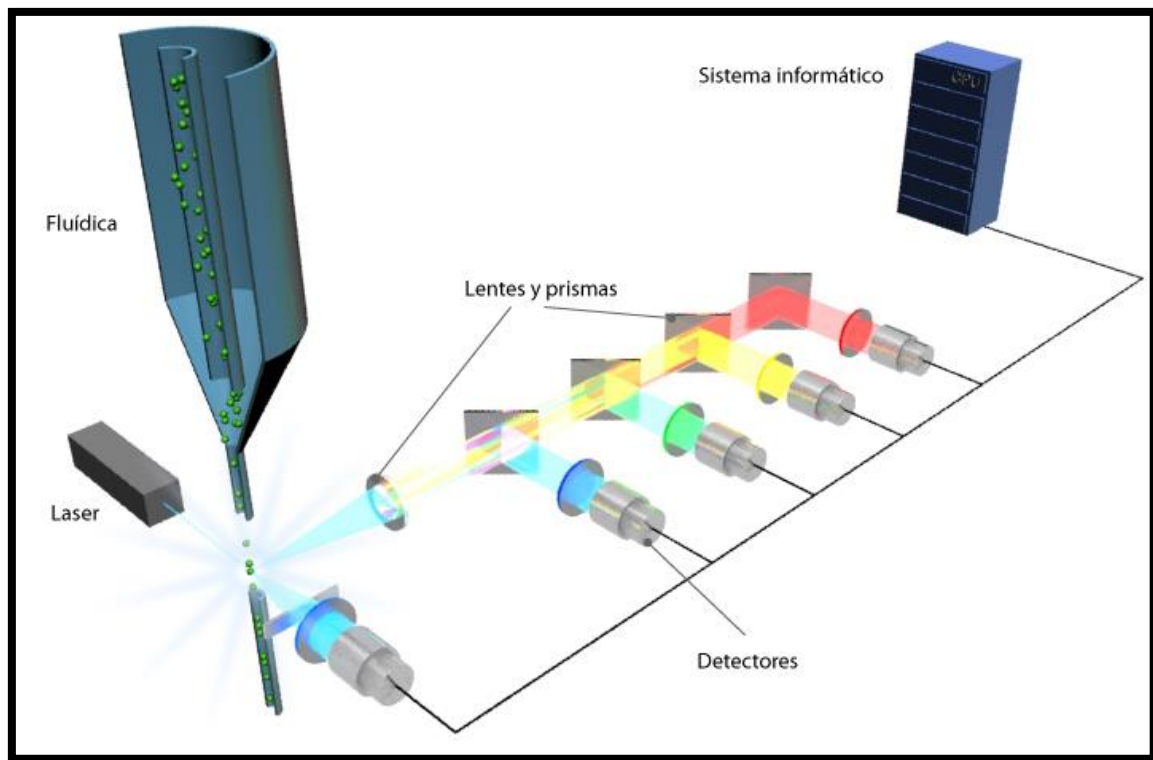


Figura 12. Citómetro de flujo. En ésta técnica, cada una de las células presentes en la muestra colisiona con el láser, dicha colisión genera un haz de luz secundario el cual atraviesa un sistema de lentes y prismas que reflejan distintos rayos a diversas longitudes de onda.

El punto de detección es donde los láseres impactan con la muestra y se genera la luz resultante de este impacto, que es la que en realidad será analizada. Sin embargo, el buen funcionamiento de esta técnica depende de que las células pasen por el punto de detección de una en una. La mayoría de citómetros logran el paso adecuado de las células inyectando el flujo de muestra que contiene las células dentro de otro flujo de líquido que actúa a modo de embudo. De esta forma, el flujo de muestra es comprimido a un diámetro próximo al de la partícula o célula que se quiere medir. Esta técnica se denomina enfoque hidrodinámico, o en inglés hydrodynamic focusing. Mediante este sistema, los citómetros son capaces de discriminar partículas en un intervalo entre 1 y 15 micras, aunque hay sistemas especializados que pueden detectar partículas fuera de este intervalo (Ramírez., 2004).

Cuando una célula pasa por el punto de detección y el haz luminoso procedente del láser impacta con ella, la célula dispersa la luz en todas las direcciones. La parte de luz que se dispersa en la dirección del haz de luz incidente, se denomina en la jerga de los expertos en citometría “forward scatter”, que podría traducirse como dispersión delantera o dispersión de avance. La magnitud de esa dispersión constituye la primera medida importante en la citometría, ya que es aproximadamente proporcional al tamaño de la célula. Por lo tanto, este dato se puede utilizar para estimar el tamaño de las células que estamos analizando y si hay varias

poblaciones de diferentes tamaños en nuestra muestra. En este trabajo se utilizó el lector TECAN Genius , para analizar la cantidad y tipos de células presentes en los medios de cultivo y en los andamios con células.



Figura 13. Lector TECAN Genius, HIMFG

Ensayo de bromuro de 3- [4, 5-dimetiltiazol -2-ilo]-2, 5-difeniltetrazol (MTT)

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.

El MTT es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo, figura 14.

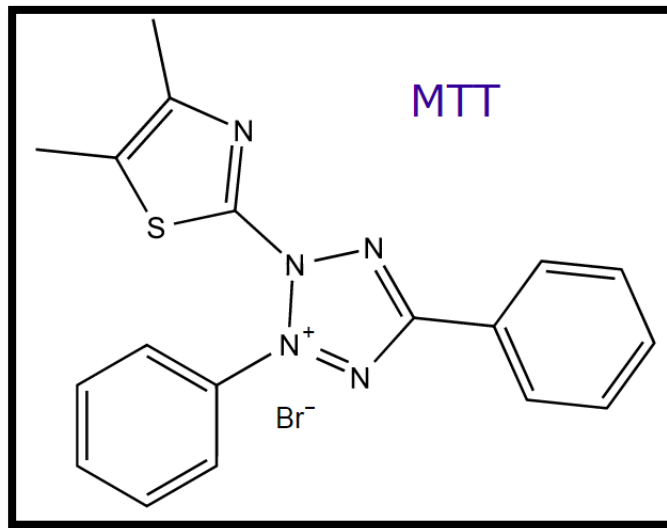
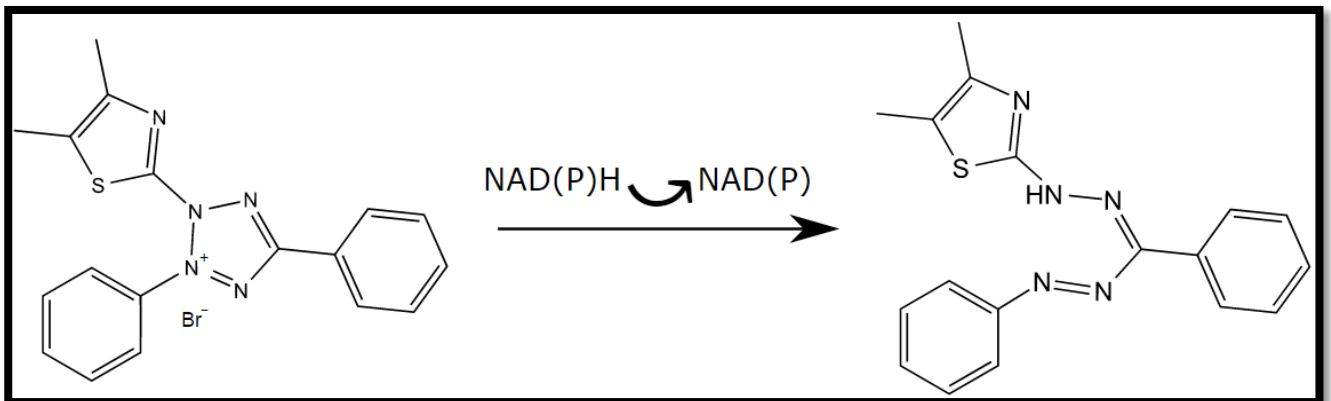


Figura 14. MTT.

Al reducirse, el MTT se convierte en un compuesto de la familia de formazán, de color violeta e insoluble en agua. Para cuantificarlo se suele disolver en un disolvente orgánico, como DMSO (dimetilsulfóxido) y se mide su color mediante la A570, Figura 15.



MTT (sal de tetrazolio)
-forma oxidada-

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

formazano del MTT

-forma reducida-

(E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano

Figura 15. Reducción del MTT desde sal de tetrazolio a formazano de MTT insoluble en agua.

La actividad metabólica de las células incluye la de las deshidrogenasas. Se considera que la acción sobre el MTT se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato deshidrogenasa, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. Las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT en su formazán.

Estudios histológicos e inmunohistoquímica

La histoquímica es un método que hace posible localizar mediante reacciones moléculas y constituyentes específicos de células y tejidos *in situ*, al formar un precipitado insoluble, coloreado o electrodenso, que puede visualizarse al microscopio óptico o electrónico de transmisión, respectivamente.

Los métodos histoquímicos se usan de forma amplia y han contribuido en grado significativo en importantes descubrimientos en el campo de la biología celular y molecular, y en el mejoramiento de procedimientos de diagnóstico médico. Con frecuencia, las reacciones histoquímicas se aplican sobre tejidos fijados, lo que asegura la conservación del compuesto a identificar y una buena preservación morfológica. Por lo general, la histoquímica se divide en histoquímica convencional, histoquímica enzimática, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Para este apartado hablaremos exclusivamente de la histoquímica convencional y la inmunohistoquímica que fueron las técnicas empleadas en este trabajo.

La histoquímica convencional se basa en el depósito de colorantes específicos, como resultado de las propiedades físicas o químicas intrínsecas de los componentes del tejido. Esto permite localizar compuestos químicos tisulares o celulares ya conocidos, en zonas específicas. Los compuestos tanto inorgánicos como orgánicos se pueden identificar por medio de reacciones químicas simples o de doble sustitución, las que producen sustancias coloreadas insolubles.

La inmunohistoquímica se ha establecido como una técnica histoquímica regular para identificar constituyentes celulares de tejidos (antígenos) por medio de interacciones **antígeno-anticuerpo**. La existencia del sitio de unión del anticuerpo se identifica, ya sea por **marcaje directo** en el que se marca con fluorescencia el anticuerpo contra la macromolécula a identificar; una vez que tiene lugar la reacción, se puede observar el complejo resultante mediante el uso de microscopía de fluorescencia. El otro método es el uso de **marcaje indirecto** en el cual se incuba primero el tejido con un anticuerpo primario específico contra la macromolécula de interés y posteriormente se lava la preparación para eliminar el anticuerpo primario no unido y en seguida se añade el segundo anticuerpo marcado que reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo original, con lo cual se forma un complejo visible con microscopía de fluorescencia. Éste último método es más sensible que el directo porque se unen múltiples anticuerpos marcados al anticuerpo

primario y la observación es más fácil, además, no requiere marcar el anticuerpo primario, el cual muchas veces sólo se encuentra disponible en cantidades limitadas y su costo es mayor (Morales., 2005).

Existe otra técnica para realizar el método indirecto y en ella se emplean **cromógenos**; el procedimiento es similar al marcaje indirecto, sólo que al anticuerpo secundario se adiciona biotina o avidina, que permiten el acoplamiento de un complejo que contiene estreptavidina y una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina), que al unirse forman un complejo que puede marcarse con el cromógeno (DAB, 3-3'-diaminobencidina o rojo rápido) y el resultado es un precipitado coloreado que es visible con microscopía óptica.

Aunque los procedimientos histoquímicos hacen posible ubicar a las enzimas y macromoléculas en células y tejidos, es posible obtener una localización más exacta con la inmunohistoquímica o la inmunocitoquímica. Estos procedimientos requieren el desarrollo previo de un anticuerpo contra la macromolécula particular a localizar y marcar el anticuerpo con una sustancia fluorescente (fluorocromo), como fluoresceína o damina, o emplear un cromógeno como la 3-3'-diaminobencidina o rojo rápido que al precipitarse en el sitio de la reacción antígeno-anticuerpo suministra una coloración observable con el microscopio óptico.

En este trabajo se realizaron las histologías necesarias en el departamento de Patología del Hospital del Niño y del Adolescente Morelense, Figura 16.



Figura 16. Laboratorio de Histopatología. Hospital del niño y el adolescente morelense.

Pruebas mecánicas de tensión

Las pruebas mecánicas son pruebas destructivas en las que los materiales de estudio son sometidos a esfuerzos mediante la aplicación de una fuerza externa hasta su deformación y/o ruptura, donde el principal objetivo es determinar sus propiedades de dureza, elasticidad, fragilidad y resistencia a la penetración. Se pueden estudiar materiales diversos como: polímeros, metales de baja dureza, materiales cerámicos, materiales compuestos, entre otros.

La caracterización de los materiales atendiendo a sus propiedades mecánicas es de suma importancia en el diseño, ya que nos permite elegir el material correcto según la función y esfuerzos a los que estará sometido, lo cual es de obvia relevancia en los materiales de este trabajo puesto que hablamos de tejido óseo, el cual se caracteriza por dar soporte al cuerpo. Para que dichas propiedades se puedan comparar convenientemente es necesario que el tamaño de las probetas, así como la forma en que se aplique la carga, estén estandarizadas.

En este trabajo se hizo énfasis en la prueba mecánica de tensión, para ello se utilizó una máquina de tensión construida en el departamento de física de la UAM-I, Figura 17. Se reportan las curvas de esfuerzo-deformación y se calcula el módulo de Young, esfuerzo máximo y deformación a la ruptura. Para reportar estas variables el procedimiento requiere de tener una estadística mínima que cambia de acuerdo a la disponibilidad de material. En este trabajo las pruebas se hicieron con tejido obtenido del experimento *in vivo* por lo que solo se pudo obtener una muestra de cada tejido esto no permite una discusión ortodoxa de las variables mecánicas, así que solo se mencionan y la discusión se hace como una prueba de textura (aparición externa y superficial de la estructura del material) tratando de destacar las diferencias que se aprecian en los tejidos cuando se realizan las pruebas mecánicas.



Figura 17. Máquina de pruebas de tensión, depto. de física UAM-I. En esta máquina se colocan las probetas del material a analizar, la máquina tiene un sistema informático en el cual se puede establecer la velocidad de tensión y capturar las distintas imágenes a determinado tiempo.

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

GENERACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS MEDIANTE ELECTROHILADO

Para la elaboración de la solución por electrohilar se realizaron varios ensayos antes de establecer las cantidades de disolvente y soluto, buscando obtener una solución conductora y que tuviera una viscosidad tal que el campo eléctrico aplicado pudiera estirarla sin romperla hacia el electrodo negativo manteniendo una continuidad en el hilado; finalmente, se encontró una mezcla en proporción de 10 mL de disolvente, 90% cloroformo (9 mL) y 10% etanol (1 mL); en cuanto al soluto, se realizaron pruebas añadiendo a la solución PLA/HA; para éste proceso fue necesario añadir el PLA mediante agitación suave por 5 horas a temperatura ambiente y después añadir la HA e inmediatamente llevar al sistema de Electrohilado.

Cabe mencionar que la adición de etanol a la solución ayuda a mejorar la homogenización del hilado haciendo que la morfología de las fibras varíen simultáneamente; es decir, el etanol combinado con el cloroformo, funcionaron como disolvente, lográndose así que las cadenas del polímero no se enreden, sino que se mantengan parcialmente expandidas de tal manera que cuando se aplica la técnica de Electrohilado, el PLA con partículas de HA en éstas, experimenten un estiramiento, formando fibras de diámetro muy pequeño, que se proyectan hacia el electrodo negativo. Además, el etanol también aumenta la polaridad de la solución y permite un secado más rápido (Zhong-Hua Q., 2011).

Debido a que es de gran interés conocer la concentración de HA presente en las matrices, se calcularon dichas concentraciones de HA para algunas de las soluciones empleadas, Tabla 2. Cabe señalar que debido a que no se tuvo problemas al hilar 1.8 g de PLA con hasta 1 g de HA (M10), también se preparó una solución con 1.8 g de PLA con 0.4 g de HA (M9), con el propósito de hacer comparaciones entre ambas preparaciones, lo que finalmente representaba en las muestras obtenidas un porcentaje de HA del 18.1% (M9) y 35.7% (M10), respectivamente.

Tabla 2. Concentraciones de PLA, HA y condiciones de depósito de las matrices.

Muestra	Concentración de Sólidos (CS)		(g/ml)	%p/v	Volumen Inyectado (ml)	%HA	Voltaje (KV)
	PLA(g)	HA(g)					
M1	1.2	0	0.12	12%	40	0	30
M2	1.2	0.3	0.15	15%	10	20	30
M3	1.8	0.3	0.21	21%	10	14.2	30
M4	1.2	0.3	0.15	15%	20	20	30
M5	1.2	0.1	0.13	13%	20	7.6	30
M6	1.8	0.1	0.19	19%	30	5.2	30
M7	1.8	0.3	0.21	21%	40	14.2	30
M8	1.8	0.2	0.2	2%	80	10	30
M9	1.8	0.4	0.22	22%	20	18.1	30
M10	1.8	1	0.28	28%	20	35.7	30

En la Figura 18 se presenta el sistema de Electrohilado el cual se compone de un sistema de inyección donde se aplica la solución polimérica. Las velocidades a las que se inyecta dicha solución varían según se requiera; para estos casos fue de 50 ml/hr. Se utilizaron tiempos entre 12 min y 96 min según el volumen de solución inyectada; se utilizaron distintos diámetros de agujas según la cantidad de HA inyectada, así, para inyectar cantidades de entre 0.1 g y 0.4 g de HA se utilizó una aguja 21 G x 1" (0.8 mm diam x 25 mm largo), mientras que para cantidades de entre 0.5 g y 1 g se utilizó una aguja 18 G x 1/2" (1.2 mm diam x 38 mm largo). La aguja funciona como electrodo positivo y es conectada a una fuente de alto voltaje que va de 0 – 30 KV y posee una corriente de salida de 330 μ A.

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

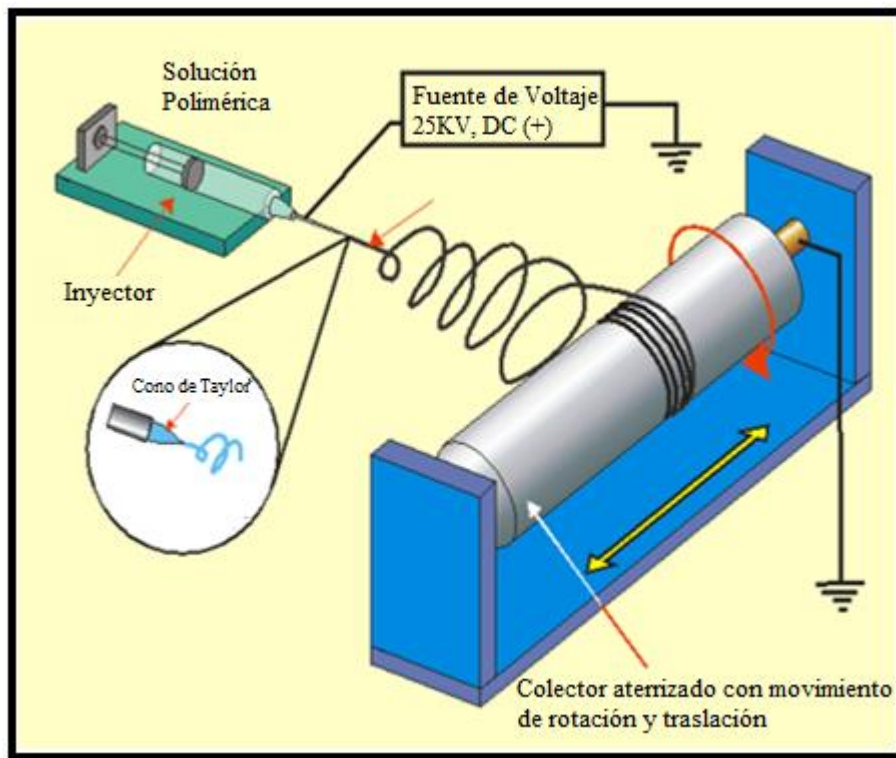


Figura 18. Sistema de Electrohilado. En este sistema se coloca la solución polimérica para ser inyectado desde el electrodo positivo (aguja) hacia el electrodo negativo (colector cilíndrico), éste último se encuentra conectado directamente a tierra y cuenta con movimiento de rotación y traslación para asegurar el depósito de las fibras en toda la superficie cilíndrica.

La distancia entre electrodos fue de 10 cm, suficiente para que el disolvente contenido en la solución se evaporara y las fibras llegaran total o parcialmente secas al colector. Una vez generadas las matrices, éstas son retiradas del colector y deben secarse a vacío a 42 °C durante 3 días, para asegurarse de que el disolvente se evapore por completo.

La Figura 19 muestra las 10 matrices, obtenidas por electrohilado, los hilos (morados o transparentes) que se observan en algunas de las matrices se deben a que estos hilos son colocados en todo el cilindro para sostén de las fibras. Aquellas matrices que poseen porcentajes bajos de HA o que carecen de ella como en el caso de M1, M5 y M6 presentan una morfología más homogénea mientras que las que poseen mayor cantidad de HA como en M2, M3, M4 y M7 presentan una morfología con agregados precisamente de HA, esto se observa mejor en M2 y M3. Cabe señalar que mientras mayor es la cantidad de solución que se inyecta, la matriz obtenida presenta una morfología más cerrada debido a que se van superponiendo las fibras en el transcurso del electrohilado, como en M8 que está compuesta por 80ml de solución. Una vez que la matriz porosa se seca por completo, los hilos morados o transparentes son retirados.

Otro aspecto importante a mencionar es que mientras más HA contienen, las matrices siendo más duras pero manejables, debido a la presencia del PLA, lo cual representa una ventaja ya que dichas matrices se pueden manipular como mejor convenga e incluso se les puede dar alguna forma si así conviene.

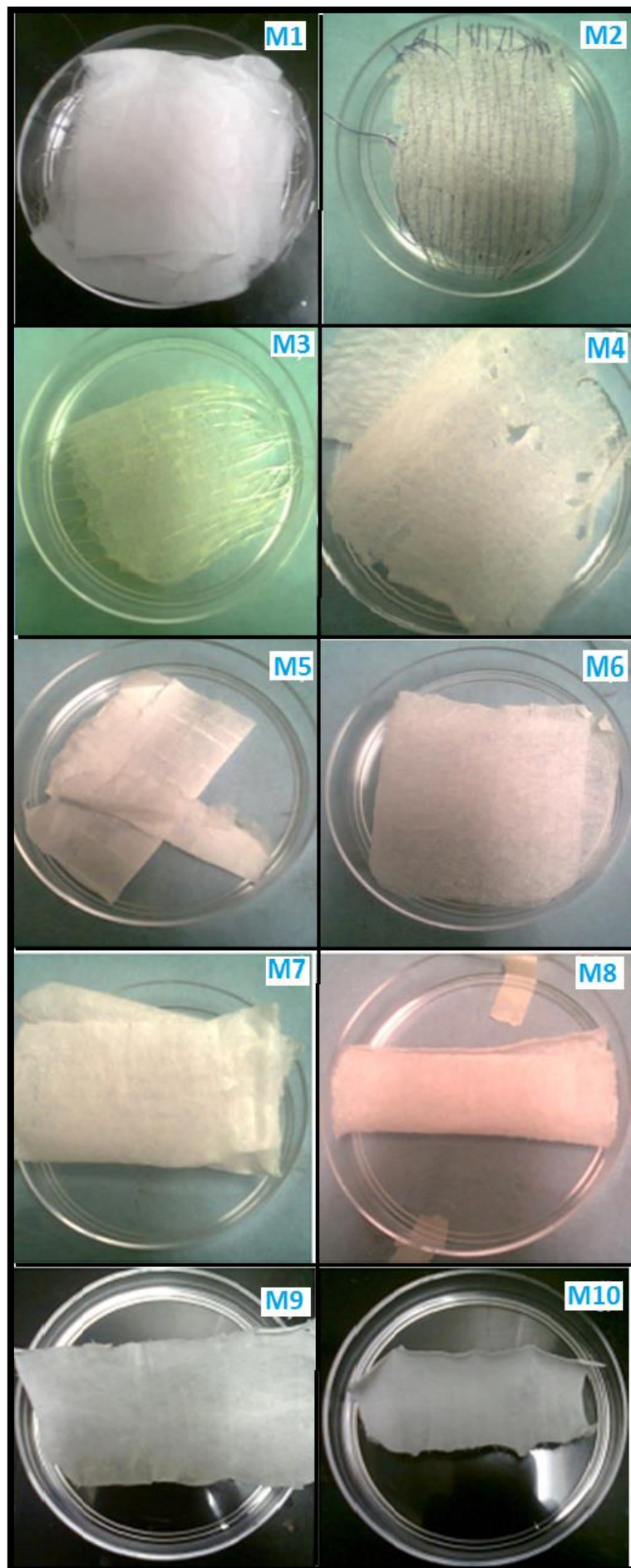


Figura 19. Matrices de PLA e HA mediante la técnica de Electrohilado. En dichas matrices se puede observar una morfología delgada y porosa (M1-M6) o gruesa y cerrada (M7-M10), debido a las condiciones de depósito que se determinaron para cada una de ellas como lo describe la tabla 2.

Modificación superficial de los andamios mediante polimerización por plasma

Se utilizó la técnica de polimerización por plasma para sintetizar películas de PPy (PPy) y modificar las propiedades químicas, físicas y eléctricas de las superficies de las muestras de PLA / HA. Se ha observado que controlando el tiempo, la potencia de descarga y la presión, las películas se obtienen con características diferentes (Zúñiga., 2014). El espectro de transmisión de PPy se muestra en la Figura 20, en la cual se pueden ver picos de los grupos funcionales de PPy. Los picos a 3357 cm^{-1} y 1627 cm^{-1} corresponden a las aminas en la estructura PPy. El pico ancho en el intervalo de $500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ contiene muchas absorciones correspondientes a alquenos de rotura de los anillos de pirrol. El ancho del pico indica la absorción compleja en el polímero debido a la ramificación, la reticulación y las interacciones entre los grupos de pirrol (Zúñiga., 2014).

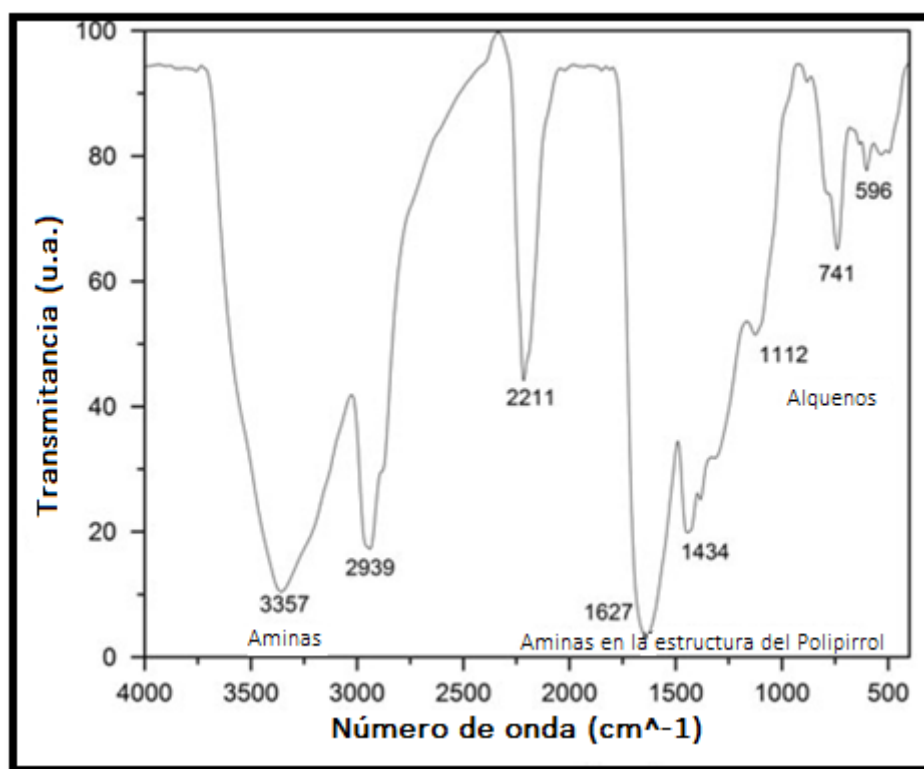


Figura 20. Espectro de transmisión de PPy (Zúñiga., 2014).

El reactor de polimerización por plasma se muestra en la Figura 34, es un tubo de vidrio (pyrex), con 25 cm de longitud, 8.3 cm de diámetro interior y diámetro exterior de 9 cm. En cada extremo del tubo se colocó

una tapa de acero inoxidable en la que se insertó un electrodo también de acero inoxidable que consistía en un vástago cilíndrico y una placa plana circular de 6 cm de diámetro. Los electrodos se conectaron a un generador de potencia, uno al terminal positivo y el otro al terminal negativo, de manera que se generó un campo eléctrico entre ambos.



Figura 21. Reactor del Sistema de Polimerización por Plasma en el que se depositan las matrices entre los electrodos, además dicho sistema contiene dos tubos en ambos lados para la administración y escape de polipirrol e Yodo.

En un lado del reactor se conectaron las dos válvulas del reactor, una para la introducción del monómero principal (pirrol) y la otra para introducir Yodo (Y), que se utiliza como un dopante; el experimento duró 30 min. La válvula de pirrol permaneció abierta todo el tiempo, mientras que la válvula de I se abrió durante cuatro minutos a los 6 min y a los 16 min. El pirrol y el I se introdujeron en el reactor debido a la diferencia de presión entre la cámara principal y los depósitos de cada uno de ellos. Durante la polimerización, la separación del electrodo era de aproximadamente 10 cm. Los andamios PLA / HA se colocaron en el núcleo del reactor; antes del inicio de la polimerización, el reactor se purgó durante 10 min para eliminar las impurezas. Las condiciones de polimerización fueron: 13 MHz, 20 W, 1.2×10^{-2} Torr; la temperatura inicial de los monómeros y los contaminantes fue de aproximadamente 25°C, Figura 22 .

La polimerización por plasma promueve la producción de iones y radicales libres debido a la colisión de iones y electrones con las moléculas del monómero, pero también puede ocurrir por disociación de grupos químicos que son absorbidos por la superficie de las muestras que se colocan en el reactor. Así sucede que la reacción se propaga y resultan cadenas de polímeros, que a su vez se fijan a la superficie de los andamios

como una película delgada. El dopaje con I apunta a mejorar las propiedades conductoras de PPy-I (Cruz., 2012).

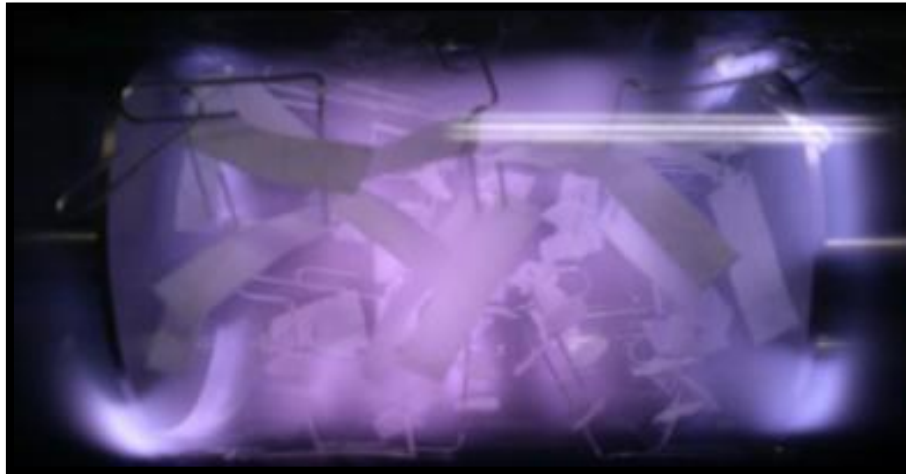


Figura 22. Matrices de PLA / HA depositadas entre los electrodos del Sistema de Polimerización por Plasma.

En la figura 23 se presentan algunas matrices polimerizadas de color marrón debido al Yodo y con una textura flexible, lo que facilita su manipulación. El tiempo también fue un factor importante, ya que con 30 min se aseguró que las matrices se recubrieran con una capa de polipirrol suficiente para reaccionar con el medio de cultivo y las células circundantes; además, el PPy cual influyó en sus propiedades mecánicas porque disminuyó la calidad en la textura, la presencia del PLA también tuvo que ver ya que proporcionó cierta elasticidad. Por su parte la HA aporta dureza y resistencia. Las propiedades del PLA y de la cerámica, HA en conjunto dieron como resultado matrices aptas para ser manipuladas y darles forma si es que así se requiere porque no son frágiles; es decir, quebradizas. Esto hace la diferencia entre aquellos biomateriales que son solo poliméricos los cuales se pueden manipular, pero no son resistentes, o los cerámicos que son resistentes, pero son frágiles.



Figura 23. Matrices cubiertas con PPy, las cuales presentaron una morfología dura al momento de manejarlas, el color café se debe a la presencia de Yodo.

Caracterización morfológica mediante microscopía óptica (MO)

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

El análisis de microscopía óptica se realizó a 200 X considerando la ampliación del objetivo del microscopio y la ocular (10 X), con un Microscopio Óptico modelo DMLP marca Leica del laboratorio de Polímeros de la UAM-I. Se utilizó una cámara digital para la obtención de las imágenes con el objeto de obtenerlas en formato electrónico. La

Figura 24 presenta matrices sin PPy, se tiene por ejemplo que todas excepto M1, presentan agregados de HA en distintas proporciones según corresponde. Además, cuanto mayor es la concentración inyectada, la morfología de la matriz es más cerrada y efectivamente se forman fibras de distintos diámetros con diversas porosidades en los enmallados.

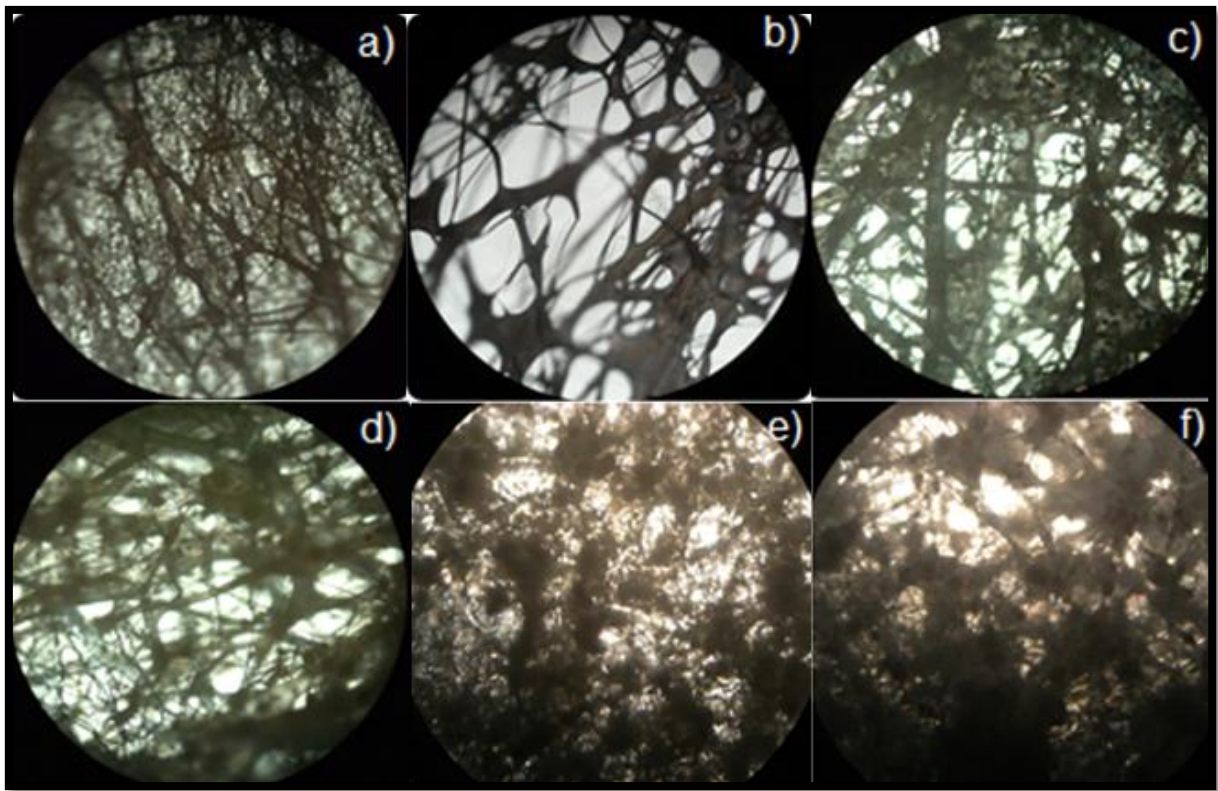


Figura 24. Microscopía Óptica a 200x de 10 matrices distintas en las cuales se puede observar morfología más abierta en cuanto a poros o más cerrada, además, la presencia de HA es muy evidente en M6, M8, M9 y M10

a) M1 1.2g PLA b) M3 1.8g PLA 0.3g HA 10ml sol. c) M6 1.8g PLA 0.1g HA 30ml sol.

d) M8 1.8g PLA 0.2g HA 80ml sol. e) M9 1.8g PLA 0.4g HA 20ml sol. f) M10 1.8g PLA 1g HA 20ml sol.

Caracterización morfológica mediante MEB

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (MEB, Jeol, JSM-7600F, EE.UU.) de la UAM-I para analizar la morfología de las matrices obtenidas, para ello fue necesario cortarlas en segmentos cuadrangulares (0.5 cm²) y rectangulares (0.5 cm de ancho x 2 cm de longitud).

Las muestras se prepararon mediante la técnica de chisporroteo en la cual dichos segmentos se pegaron a un pequeño porta-muestras de aluminio, usando para ello un pegamento conductor. Después se recubrieron con oro (aproximadamente 10 nm ya que las matrices no son conductoras) y se generó una diferencia de potencial a partir de una pulverización catódica a alto vacío e intercambiando partículas de oxígeno por argón. Finalmente se colocaron en el porta-muestras del microscopio electrónico para comenzar con el análisis, Figura 25 .



Figura 25. Preparación del fragmento de PLA-HA antes del análisis mediante MEB, las muestras deben prepararse mediante el recubrimiento de oro para hacerlas conductoras y se colocaron en el portamuestras del microscopio electrónico.

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

Las matrices fueron analizadas a distintos aumentos. La Figura 26 muestra, como era de esperarse, que M1 que no posee HA, presenta una morfología más homogénea y “lisa”, a diferencia de M2, por ejemplo, que presenta morfologías “rugosas”, debido precisamente a los agregados de HA.

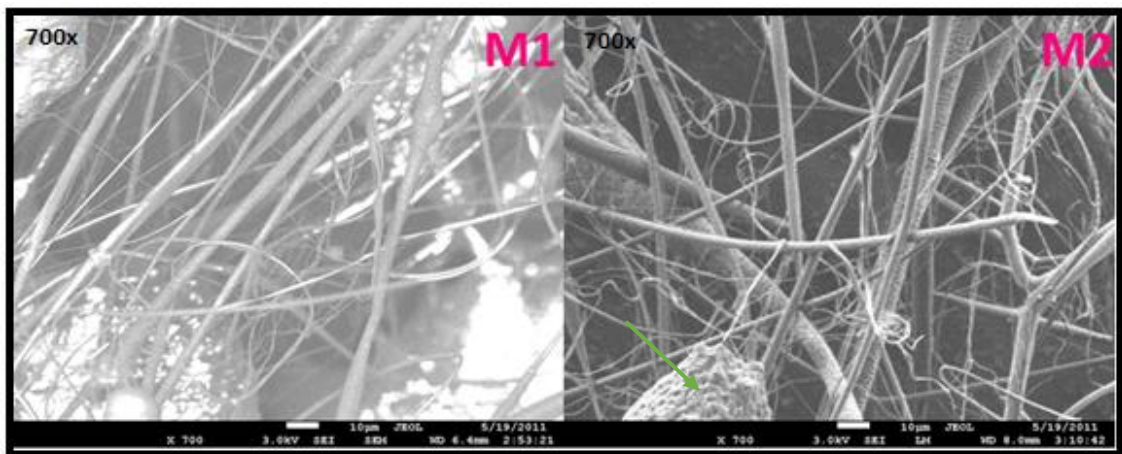


Figura 26. Microscopía Electrónica de Barrido de M1. En ambas matrices se observan fibras de distintos tamaños de diámetro y poro, en M2 se pueden observar (como lo muestra la flecha verde) zonas rugosas debido a la presencia de HA.

M1 (1.2g PLA 40ml sol.) y M2 (1.2g PLA 0.3g HA 10ml sol.)

En la Figura 27 , se muestra la microscopía electrónica de barrido de M3, M4, M5, M6, M7 y M8 a distintos aumentos. Sus morfologías son muy peculiares debidas a la presencia de partículas de HA en la composición de las matrices, ya sea en aquellas a las cuales se les inyectó una menor cantidad de solución como en M3 y M5 (con tan solo 10 ml y M6 con 30 ml de solución), o en aquellas que se les inyectó una mayor cantidad de solución como M8 con 80 ml.

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

Se puede observar (utilizando la escala que viene en cada una de las fotografías) que, aunque la mayoría de las fibras van aproximadamente de 1 μm a 10 μm de diámetro, existen también hasta de 50 μm como en M3 b), o incluso de 900 μm como en M5 b). Así, resulta interesante contar con matrices ricas en fibras con diámetros que permitan el paso de osteoblastos y nutrientes (10 μm).

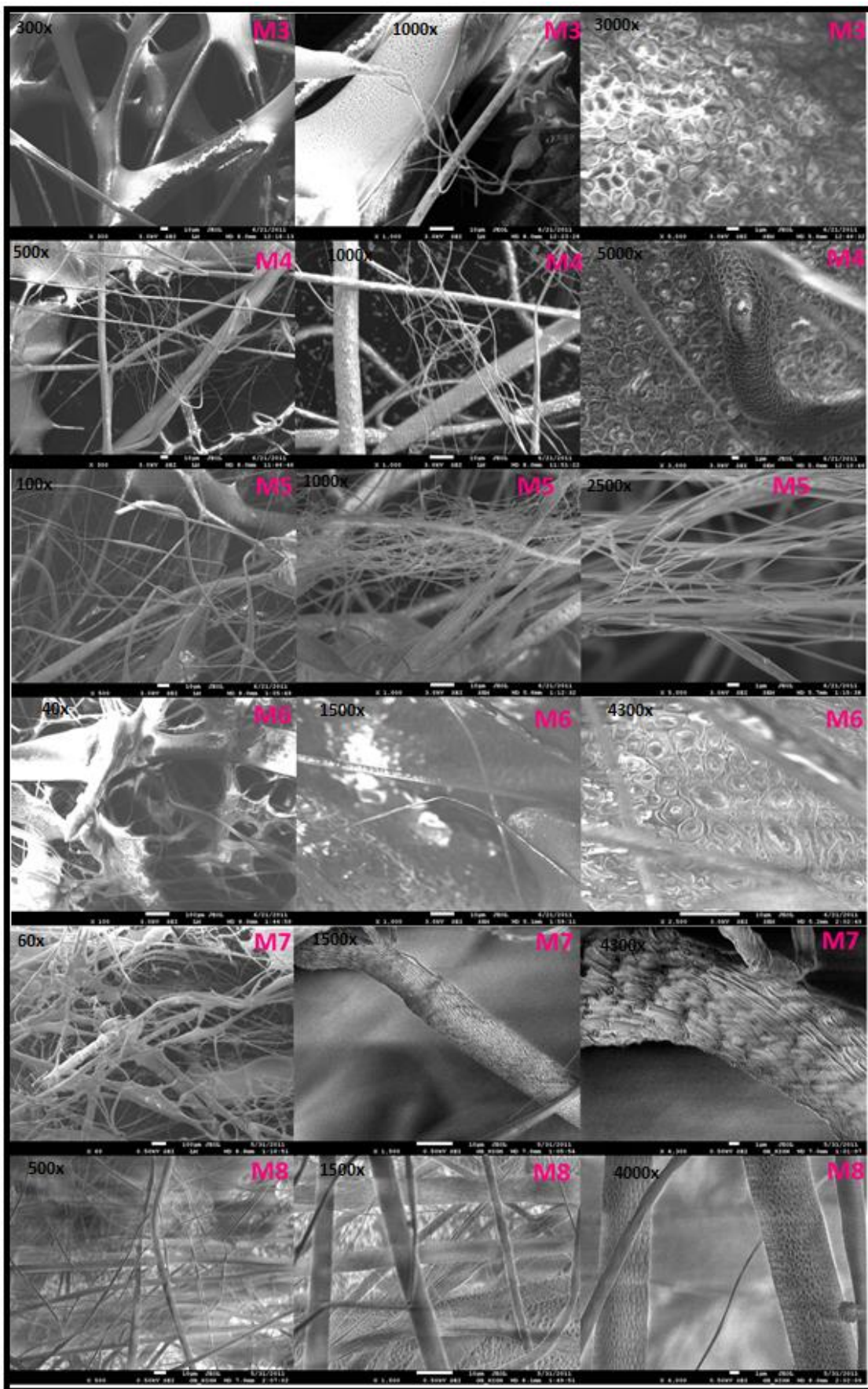


Figura 27. Microscopía Electrónica de Barrido de M3-M8 a distintos aumentos, en éstas se pueden observar la presencia de distintos tamaños de fibra y poro, sin embargo, M3-M5 presentan morfología más lisa a comparación de M6-M8 que presentó morfología rugosa por la cantidad de HA presente, además las fibras en éstas últimas son de tamaño mucho mayor.

M3. (1.8 g PLA 0.3 g HA 10 ml sol), M4 (1.2 g PLA 0.3 g HA 20 ml sol.), M5 (1.2 g PLA 0.1 g HA 20 ml sol.), M6 (1.8 g PLA 0.1 g HA 30 ml sol.), M7 (1.8 g PLA 0.3 g HA 20 ml sol.) y M8 (1.8 g PLA 0.2 g HA 80 ml sol.)

Caracterización química y estructural mediante microscopía Raman

Con el objetivo de conocer la distribución y confirmar la presencia de los componentes principales de las matrices que son el PLA y la HA, se utilizó microscopía Raman por medio de la cual se observaron los picos típicos correspondientes al polímero y a la cerámica en los números de onda de 900 cm^{-1} y $2,900\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, Figura 28. En cuanto a la distribución de las matrices, se encontró que grupos o agregados de HA todas (color azul) se encuentran principalmente en las fibras de diámetros superiores, además de que el PLA (color verde) forma fibras más delgadas. Tal como lo muestra la Figura 29, en los andamios porosos se identifican zonas rugosas muy ricas en HA que se hallan principalmente en las fibras más gruesas, mostrando que la distribución del polímero y la cerámica no es homogénea; es decir, hay zonas en las cuales se observan más fibras de PLA y en otras predominan agregados de HA.

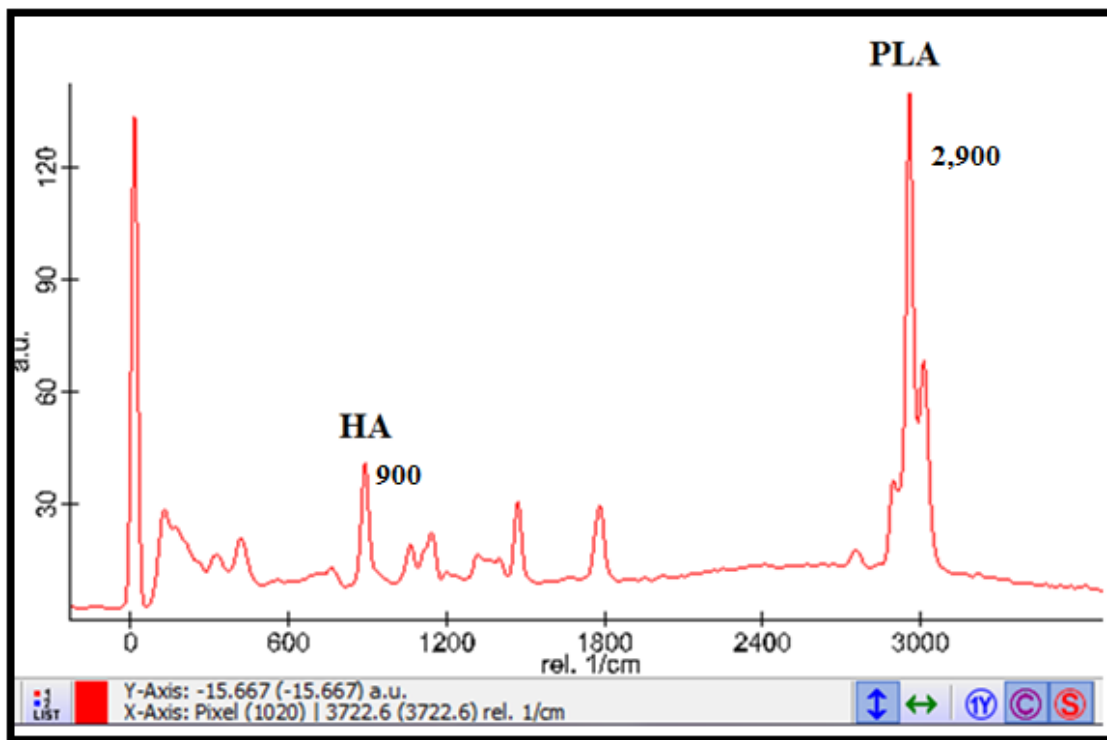


Figura 28. Espectro de matriz de PLA/HA. El componente de HA muestra un pico de 900 (1/cm) y el PLA de 2900 (1/cm) .

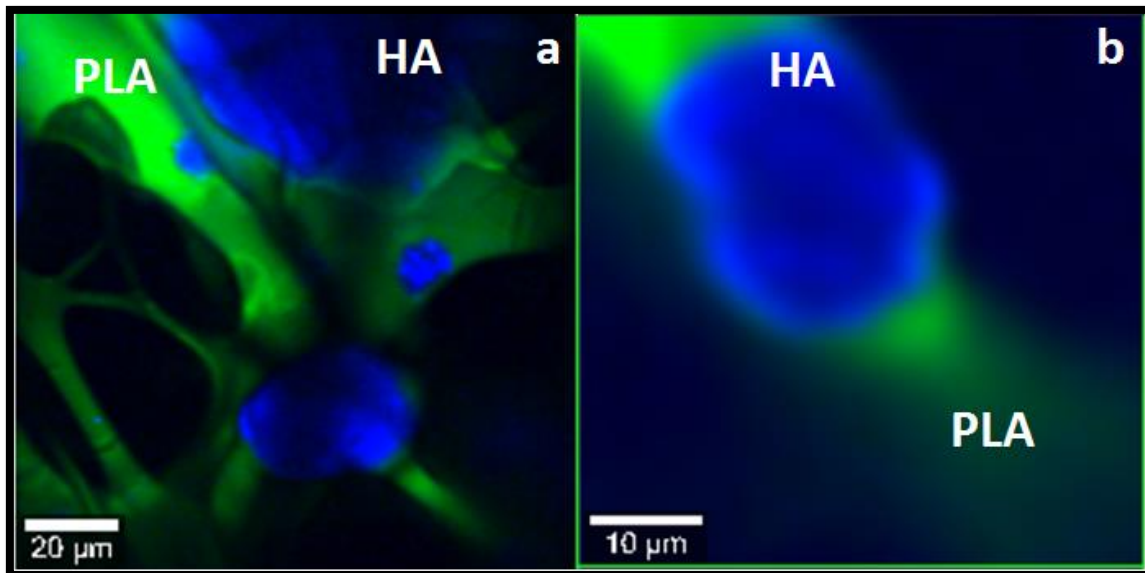


Figura 29. Imágenes Raman de matriz de PLA/HA. La HA en color azul se observa en las fibras más gruesas y tiende a amontonarse; el PLA por su parte se observa en fibras más delgadas y lisas en color verde.

Criterios para la elección de matrices por comparar

Los criterios para la elección de matrices por comparar fueron dos, el primero considera la cantidad de HA presente en la matriz debido a que la HA representa el 60% de la parte orgánica del hueso, por lo que al aumentar el contenido de HA en las matrices se buscó tener una similitud con las propiedades del hueso natural. Cabe señalar que el mayor porcentaje de HA que se pudo aplicar mediante electrohilado fue 35.7%, correspondiente a M10, ya que al aplicar un porcentaje mayor ya no se obtenían fibras sino grumos de solución.

El segundo factor fue la presencia o ausencia de PPy, por lo que con base en la Tabla 3 se eligieron las matrices M9 y M10 debido a que M10 posee aproximadamente el doble de HA con respecto a M9. Estas matrices se duplicaron y se cubrieron con PPy mediante polimerización por plasma (M11 y M12) de tal manera que así se consideran los factores claves para hacer tal comparación. Para efectos de simplicidad, se renombró a M9 como MA, M10 como MB, M11 como MC y M12 como MD, como puede observarse en dicha Tabla 3.

Tabla 3. Características de las matrices por comparar

Muestra	Concentración de Sólidos (CS)		(g/ml)	Volumen Inyectado (ml)	%HA	Voltaje (KV)	PPy
	PLA(g)	HA(g)					
M9 --->MA	1.8	0.4	0.22	20	18.1	30	NO
M10 --->MB	1.8	1	0.28	20	35.7	30	NO
M11 --->MC	1.8	0.4	0.22	20	18.1	30	SI
M12 --->MD	1.8	1	0.28	20	35.7	30	SI

La Figura 30 muestra la microscopía óptica de MA, MB, MC y MD a 500 X, matrices en la que se observa una morfología distinta y más lisa en las muestras que tienen PPy con respecto a las que no lo contienen. En MD es muy notoria la diferencia entre porcentajes de HA con respecto a MC. Es de gran ventaja que aún con la presencia del PPy, la HA continúa dispersa en las muestras. Así, se logró una modificación superficial sin perder las propiedades químicas que inicialmente tenían cada una de las matrices.

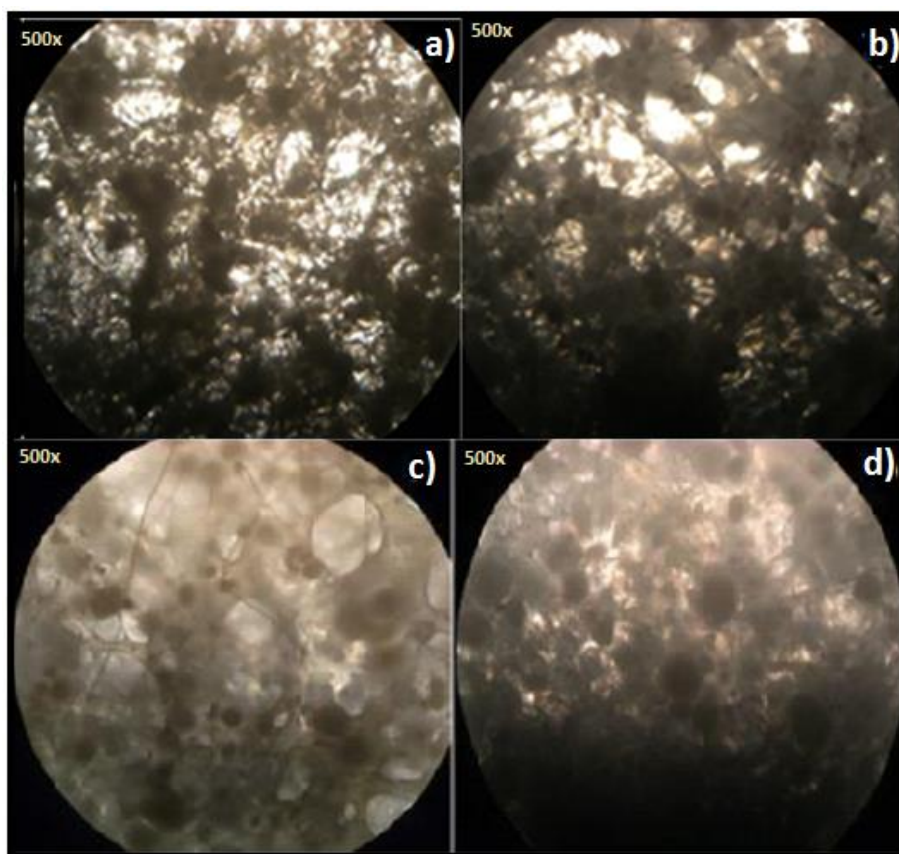


Figura 30. Microscopía Óptica de las matrices por comparar 500 x. MA y MB muestran estructuras más abiertas en cuanto a poro se refiere, mientras que MC y MD presentan morfología más cerradas.

a) MA 1.8 g PLA 0.4 g HA 20 ml sol. b) MB 1.8 g PLA 1 g HA 20 ml sol. c) MC 1.8 g PLA 0.4 g HA 20 ml sol. / PPy y d) MD 1.8 g PLA 1 g HA 20 ml sol. / PPy

También se realizó MEB de éstas cuatro matrices, PLA / HA (**MA** y **MC**) y PLA / HA / PPy-I (**MB** y **MD**) con fibras de diferentes diámetros. El intervalo fue de 800 nm a 50 μm , con longitudes y tamaño de poro variables de 10 μm a 100 μm , permitiendo la proliferación de osteoblastos *in vitro*. La Figura 31 muestra los andamios **MA** PLA/HA (18.1%) y **MB** PLA/HA (35.7%). La diferencia entre ellos radica principalmente en que la matriz con mayor cantidad de HA tiene una morfología rugosa con aglomerados. También se observó que los agregados de HA se encuentran principalmente en aquellas fibras cuyo diámetro es mayor, mientras que la matriz con menor cantidad de HA tiene fibras lisas y su morfología es más homogénea. Las fibras en tales andamios mostraban diámetros muy diferentes, diferentes longitudes y diferentes tamaños de poro.

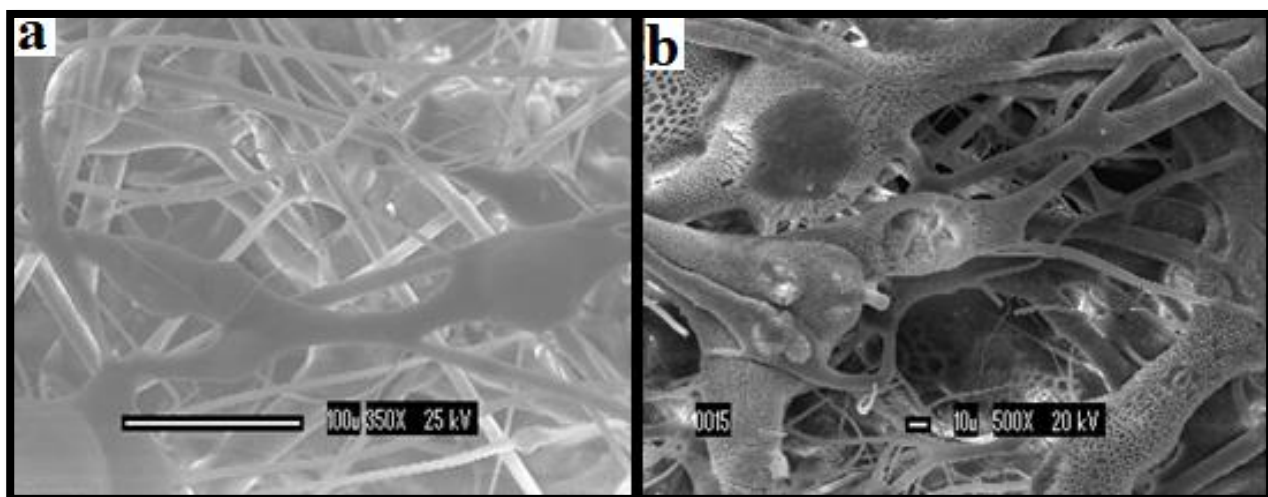


Figura 31. Microscopía Electrónica de Barrido de MA PLA/HA (18.1%) y MB PLA/HA (35.7%).

a) MA PLA/HA (18.1%) presenta fibras con morfología lisa b) MB PLA/HA (35.7%) presenta fibras con morfología rugosa.

La

Figura 32 muestra los andamios **MC** PLA / HA (18.1%) / PPy-I y **MD** PLA / HA (35.7%) / PPy-I. En ambos, se observó también la presencia de fibras de diferentes diámetros, porosidad de diferentes tamaños y morfologías lisas y rugosas según la cantidad de HA presente. Los andamios con menos HA presentan morfologías tipo hojuelas en fibras de mayor diámetro, lo que se atribuye a la presencia de PPy-I.

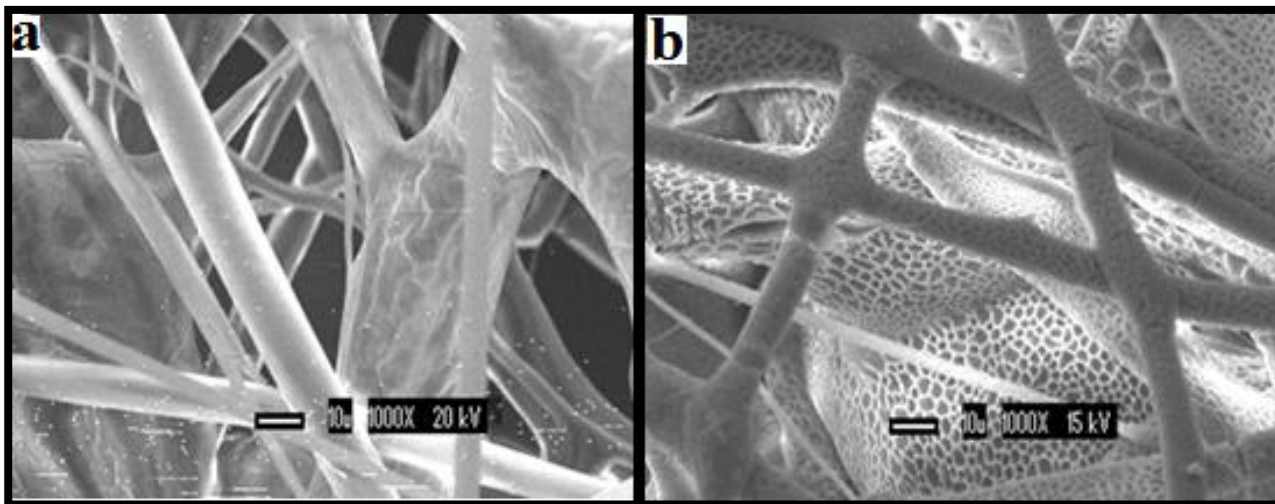


Figura 32. Microscopía Electrónica de Barrido de MC PLA/HA/PPy-I (18.1%) y MD PLA/HA (35.7%)/PPy-I

a) MC PLA/HA/PPy-I (18.1%) presenta fibras con morfologías de hojuela y b) MD PLA/HA (35.7%)/PPy-I presenta fibras con morfología rugosa.

AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (CTM's)

Biopsia ósea

La obtención de células óseas, comienza con la aspiración de una muestra de médula ósea del fémur de un conejo de la especie new zealand de 2,2 kg y 2 meses de vida extrauterina. Los animales fueron anestesiados y mantenidos con pentobarbital sódico (40 mg/kg), después de un pretratamiento con 20 mg/kg con ketamina y 5 mg/kg de acepromazina. Posteriormente se hizo la aspiración de médula con un escariador y dicha muestra se depositó en un tubo estéril con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0,2 mL EDTA: 0,1 mL de médula ósea). Posteriormente, la muestra se transportó al laboratorio de ingeniería de tejidos donde se procesó a 25°C de temperatura.

Separación de CTM's

Las CTM's se obtuvieron a partir de 3 mL de la médula ósea de conejo new zealand previamente aspirada. La muestra de médula ósea se depositó en una placa de Petri estéril con 1X FBS + EDTA 2 MI. Para macerar y romper el material de médula ósea, se hizo pasar varias veces a través de pipetas de diferentes diámetros cada vez más pequeños para romperla aún más y, finalmente se realizó el aislamiento de células mononucleares por gradiente de densidad, utilizando solución Nycoprep (1.077 g / mL) y por centrifugando a 600 g x 20 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados con PBS 1X a 1600 g durante 5 minutos a 25°C de temperatura y en el último lavado las CTM's se resuspendieron en 1 mL 1X PBS.

Cultivo primario de CTM's

A partir de la fracción correspondiente a las CTM's, se sembraron botones celulares en placas Petri con medio alfa-MEM suplementado con FBS al 10% y se incubaron a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad saturada hasta el tercer pase. Después de este tiempo, se retiraron las células no adherentes y se añadió medio de cultivo fresco. Al cabo de 8 días las células presentaron adherencia y morfología fibroblastoide, Figura 33. Cabe mencionar que la resiembra en cada caja de 10 cm² fue de 3x 10⁶ células por caja .

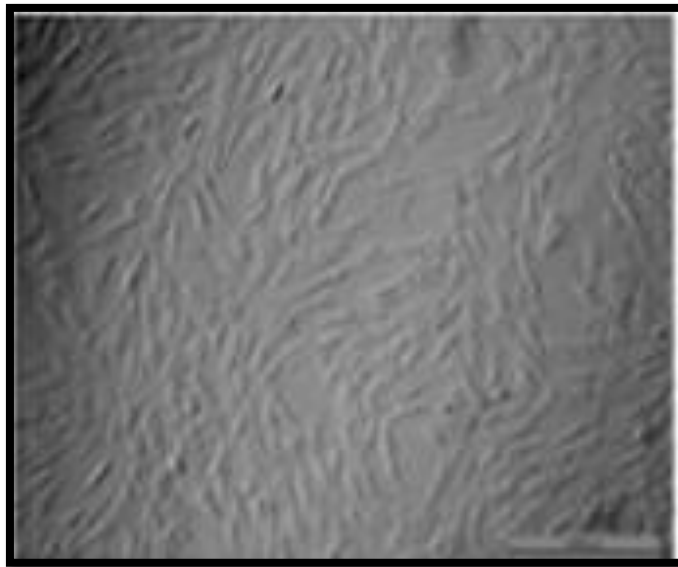


Figura 33. Células Troncales Mesenquimales a los 8 días de cultivo en placas petri.

Mantenimiento de cultivo primario y tripsinización

El cultivo primario de CTM's se mantuvo con medio de cultivo, el cual se cambió cada 3-4 días hasta que se alcanzó una confluencia del 70%. Posteriormente, las células separadas se centrifugaron 3 veces a 1, 800 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, y después se realizó un recuento en una cámara de Neubauer y viabilidad con azul de tripano 0,05%. Las células mononucleares se sembraron en placas de cultivo de pocillos múltiples con una densidad de 3×10^6 células / placa en condiciones estándar de incubación durante 72 h. Después de este tiempo, las células adherentes se mantuvieron en incubación bajo las mismas condiciones descritas anteriormente hasta el cuarto pase celular donde se obtuvieron CTM's para su posterior uso.

Las células troncales mesenquimales de la biopsia de médula ósea de conejo se caracterizaron por citometría de flujo induciendo osteogénesis, es decir, dando lugar al proceso de formación de tejido óseo. Se observaron células individuales con morfología fibroblastoide mediante microscopía invertida y algunas ya presentaron morfología osteoblastoide (redonda) entre el primer y tercer pase de cultivo, Figura 34 a) y Figura 34 b). La Figura 35 muestra las células troncales mesenquimales a los 17 días, en las cuales se puede observar que las células presentaron morfología osteoblastoide, lo que quiere decir que se está tendiendo a algún tipo de célula en específico (células óseas).

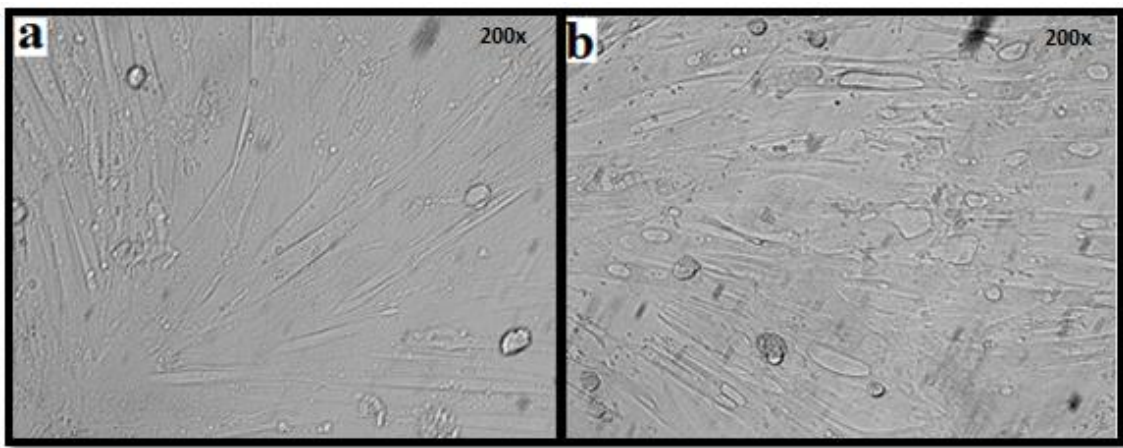


Figura 34. Estimulación osteogénica (con medio osteogénico) en cultivo primario de CTM's. En ambas imágenes se puede observar que las células presentan morfología fibroblastoide y también hay algunas con morfología osteoblastoide más redonda, lo que corresponde a la formación de células que tienden a ser más definidas a algún tipo.

a) Pase 1, 20% confluencia, 200 x b) Pase 2, 40% confluencia, 200 x.

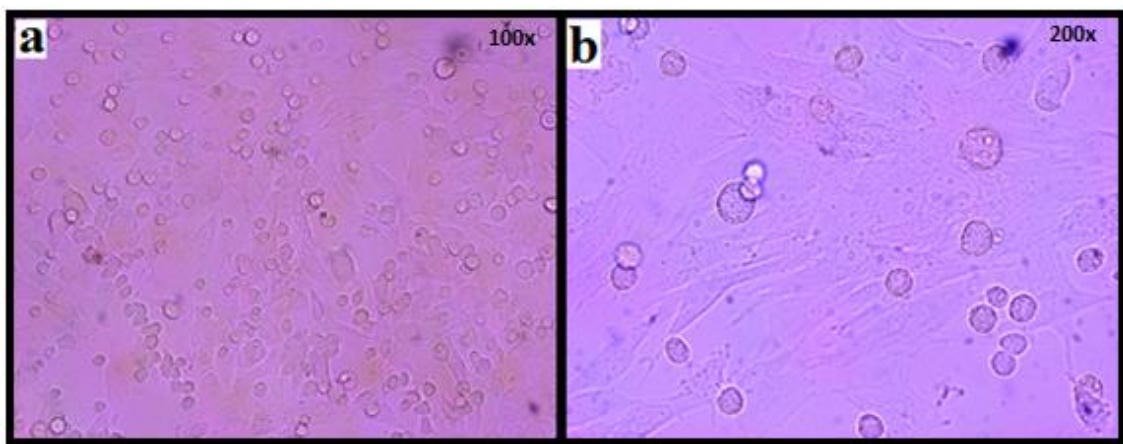


Figura 35. CTM's a los 17 días de cultivo *in vitro* a) 100x b) 200 x. En esta figura las células óseas se ven mucho mejor definidas y la figura a 100 x permite observar que efectivamente hubo proliferación celular y en algunas zonas se muestra la acumulación de dichas células.

Evaluación de CTM's mediante inmunofenotipos: CD45, CD34, HLA-DR, CD90 y CD73

En el cuarto pase se determinó la expresión de las proteínas CD45, CD34, HLA-DR, CD90 y CD73. Para ello, a partir de 10,000 células se inició la marcación para citometría de flujo con anticuerpos específicos para cada antígeno, Tabla 4. Las células se incubaron con dichos anticuerpos durante 30 minutos en oscuridad a 4 °C, después las células se lavaron a 1,800 rpm se debe de poner en xg durante 10 minutos con tampón de citometría. Después de 4 lavados, se suspendieron las células en 300 µL con tampón de fijación, finalmente se realizó la determinación de marcadores. Los datos para determinar la expresión de proteínas relacionadas con el inmunofenotipo se realizó en el citómetro de flujo. Para este caso se observó el % de células para cada

marcador pero para el caso de aquellos anticuerpos que manejan el mismo fluorocromo, entonces se separaron los diferentes tipos celulares conforme al marcador que tenían.

Tabla 4. Anticuerpos específico por cada antígeno

Nombre	Fluorocromo
CD34	APC
CD45	PE-CY5
CD73	PE
CD90	PE
HLA-DR	PE

La expresión de antígenos hematopoyéticos (CD34 y CD45) y mesenquimales (CD73, CD90 y HLA-DR) se determinó mediante la intensidad de fluorescencia media (MFI) de cada proteína en el tercer pase de cultivo y la citometría de flujo dio como resultado la expresión de antígenos CD34 (-) CD45 (-) CD73 (+) CD90 (+), y HLA - DR (-). Más del 94,60% de las células expresaron antígenos (CD73 y CD90), mientras que los antígenos CD45, CD34 y HLA-DR se expresaron en más del 99,4% de las células, Figura 36 , lo cual es conveniente que ya se con esto se confirma que se tienen dentro de la población analizada, células mayormente de tipo mesenquimal que en un futuro y debidamente inducidas darán lugar a células óseas, figura .

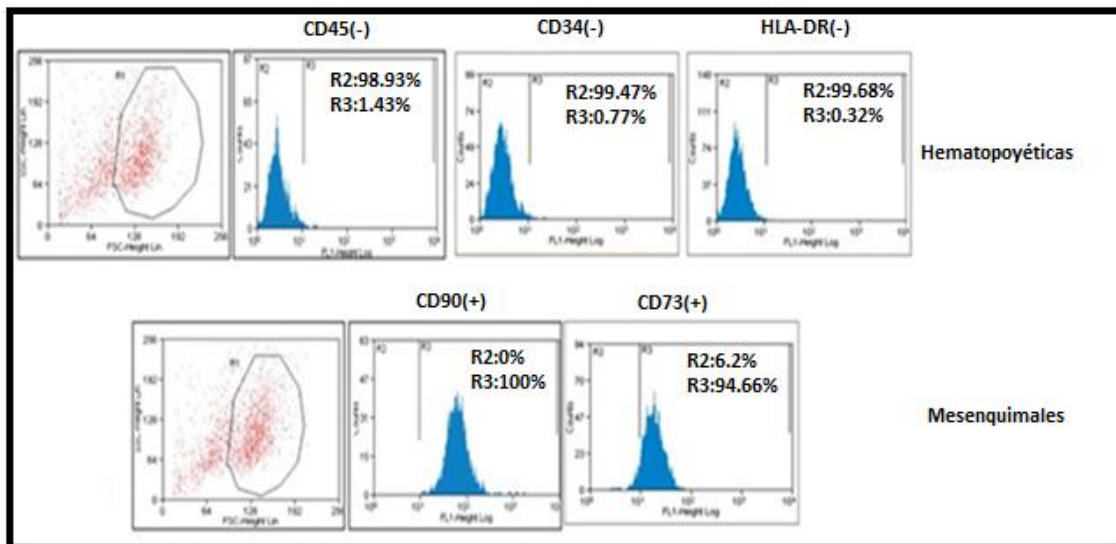


Figura 36. Expresión de proteínas CD45, CD34, HLA-DR, CD90 y CD73. La imagen muestra que se obtuvieron en el 100% y 99% de tipo mesenquimal, y casi no se obtuvieron células de tipo hematopoyético, lo que se esperaba ya que la inducción se realiza hacia linaje osteogénico.

CULTIVO IN VITRO

Diferenciación de células troncales mesenquimales

La diferenciación de CTM's en osteoblastos, se llevó a cabo en el cuarto pase ya que según la experiencia hasta ese punto ahí se mantienen sus características originales fenotípicas y al mismo tiempo se expandieron lo más posible después de determinar el inmunofenotipo. La diferenciación osteogénica se realizó sembrando 10,000 cel / cm² y se cultivó hasta que se alcanzó 70% de confluencia. Después se suplementaron 20,000 células / 1,5 cm² con 1 mL de IMDM hasta obtener una confluencia de 70%, y a continuación se cambió el medio de cultivo suplementado por medio de cultivo para la diferenciación osteogénica, el cual contiene aminoácidos y requiere la adición de suero (10%).

Después de 4 semanas se observó morfología fibroblastoide en las células, Figura 37, y la evaluación de la diferenciación se realizó observando la fosfatasa alcalina en las células. Para la tinción con fosfatasa alcalina se fijaron las células con formalina durante 1 minuto, después, las células se retiraron y éstas se lavaron con tampón de lavado. Después de retirar el reactivo tampón de lavado se añadieron 0,5 mL de fosfatasa alcalina y las células se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se retiró el reactivo de fosfatasa alcalina y las células se lavaron con tampón de lavado y se observaron células rojizas debido a la presencia de fosfatasa alcalina en un microscopio de luz invertida, Figura 38.

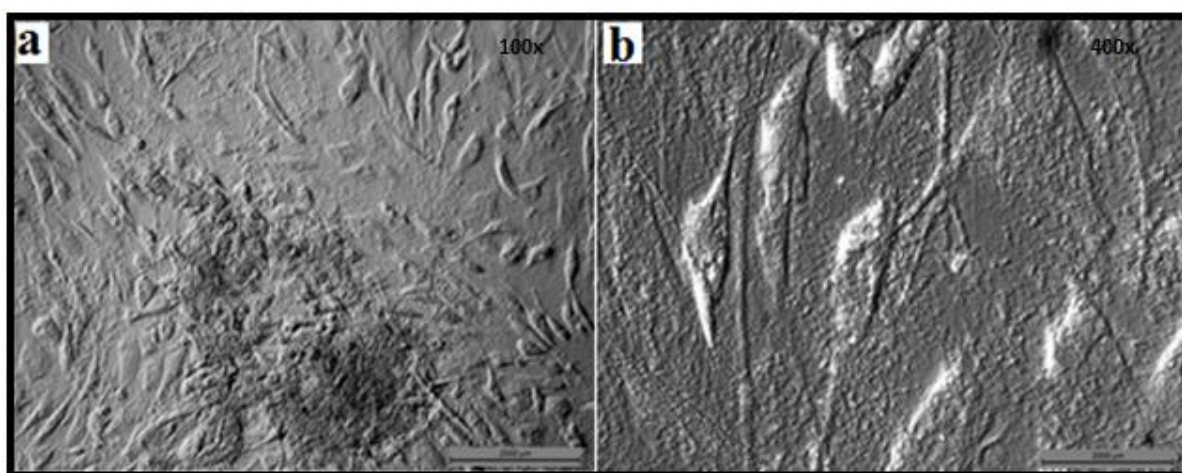


Figura 37. CTM's en la cuarta semana de diferenciación osteogénica.

a) Osteoblastos 100 x, b) Osteoblastos 400 x.

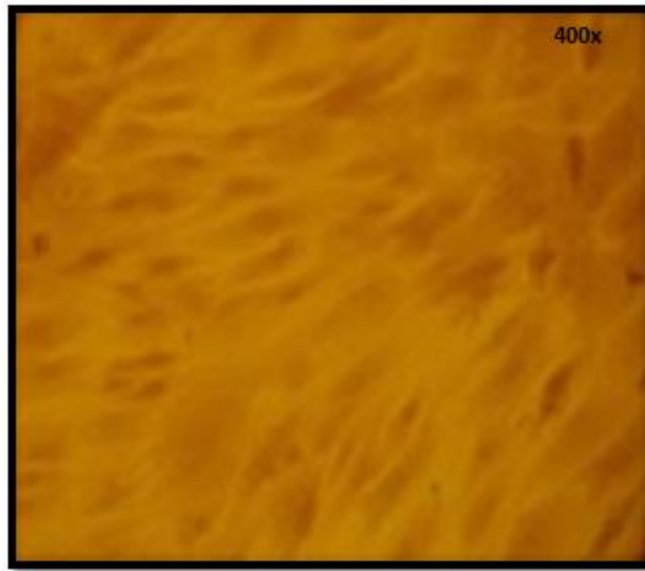


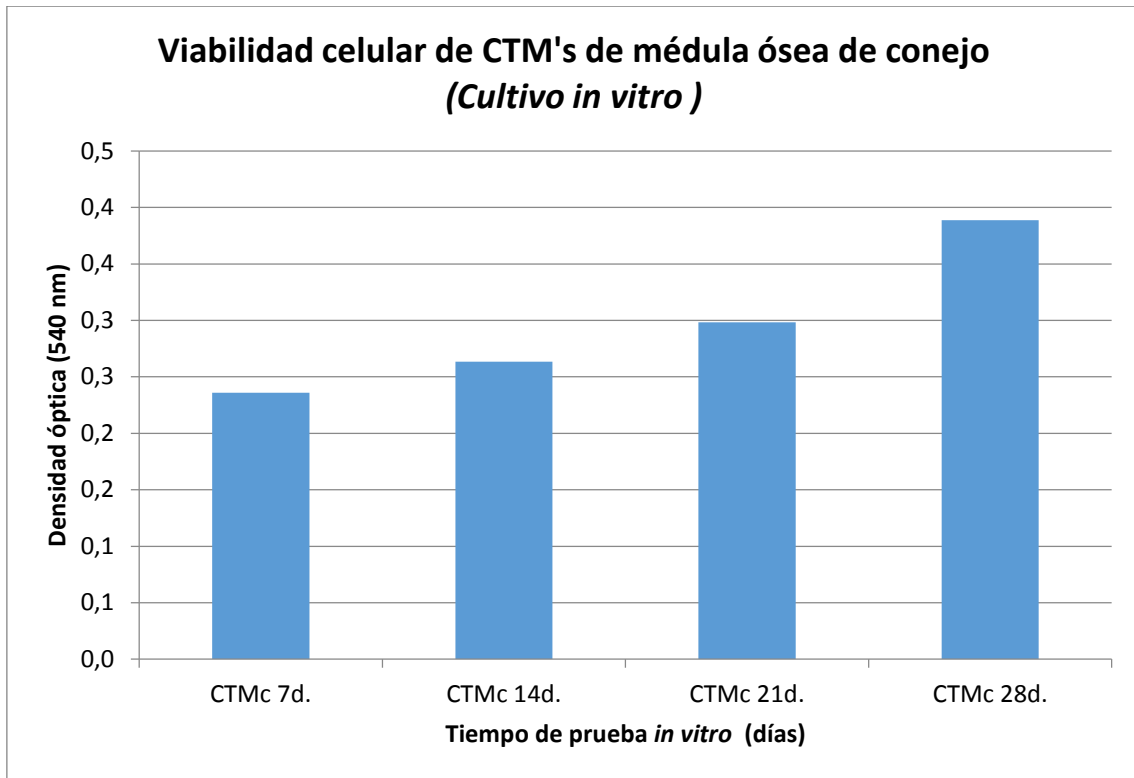
Figura 38. CTM's marcadas con fosfatasa alcalina para la diferenciación hacia osteoblastos. La fosfatasa alcalina se marca en color amarillo-naranja en las matrices, lo que es un buen indicio ya que es uno de los principales marcadores químicos en diferenciación osteogénica.

Viabilidad celular de CTM's de médula ósea de conejo (Cultivo *in vitro*)

La viabilidad celular fue evaluada a los 7, 14, 21 y 28 días de la siembra celular *in vitro* en las cajas Petri por el método colorimétrico del 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5—difetil-bromuro de tetrazolio (MTT, SIGMA). En este procedimiento, las células fueron incubadas a 37 °C por 3 horas en la oscuridad en 1 mL de medio DMEM/F12 sin suero con 200 µL de PBS-MTT (5mg/mL). Transcurrido el tiempo se retiró el medio y las cajas Petri fueron lavadas con PBS para después agregar 400 µL de isopropanol-HCl (0.04%) para disolver los cristales de formazan.

Los sobrenadantes obtenidos fueron leídos a una densidad óptica (D.O.) de 595 nm en un lector TECAN GENios, en el cual se puede observar con claridad que conforme fueron pasando los días, hubo mayor proliferación y buena viabilidad celular, gráfica 1. Lo mismo se puede observar en la Figura 39 donde se muestra la evaluación del día 7 al día 28 de la diferenciación osteogénica a 200 X y 400 X; en los días 7 y 14 puede apreciarse menor cantidad de células y predomina la morfología fibroblastoide, mientras que para los días 21 y 28 se muestra una cantidad mucho mayor de células y además su morfología ya es redonda, lo que quiere decir que tienden a ser osteoblastos.

Gráfica 1. Viabilidad celular de CTM's de médula ósea de conejo a los 7, 14, 21 y 28 días en cultivo *in vitro*.



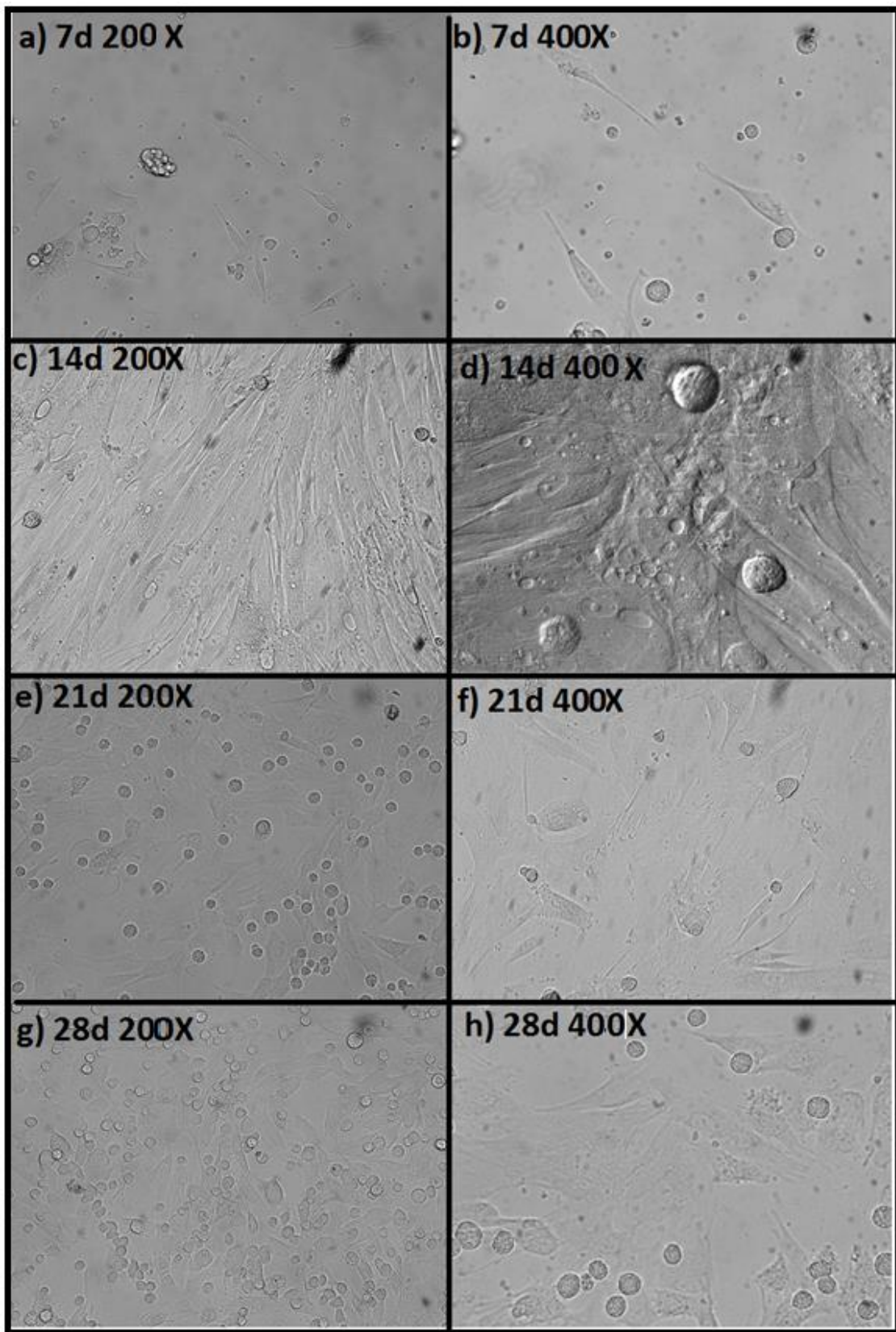


Figura 39. Diferenciación osteogénica de CTM's a los 7, 14, 21 y 28 días, donde se comienza con pocas células fibroblastoides a), b), c), d) y se termina con bastantes células óseas (morfología osteoblastoide) e), f), g) h).

Cultivo *in vitro* de células óseas en las matrices de HA/PLA e HA/PLA/PPy-I

Para caracterizar biológicamente las matrices seleccionadas (**MA, MB, MC y MD**), se hizo cultivo *in vitro* de células óseas sobre éstas, para ello fue necesario despegar de las placas Petri las células obtenidas con una solución de tripsina-EDTA, e inactivada con suero. Las células fueron centrifugadas y el botón fue resuspendido a un concentración de 2.5×10^6 cel/caja y sembradas sobre los templetos de PLA/HA/PPy/I y sus controles PLA/HA. Para su adherencia, las matrices se incubaron 1 hora y posteriormente fueron resuspendidos con medio osteogénico y mantenidos en cultivo durante 7 días, Figura 40.



Figura 40. Siembra celular en membranas cerámico-poliméricas. Se sembraron las células óseas en las matrices poliméricas junto con medio de cultivo.

La Figura 41, muestra las matrices MA, MB, MC y MD con osteoblastos al día 7 a distintos aumentos. En MA y MB, aunque se trata de un cultivo *in vitro* de corta duración, se observó presencia de pequeños grupos de células en las partes blanquecinas; en MC y MD, por el mismo tiempo de cultivo, se observaron más grupos de células, lo que confirma que la presencia de PPy-I, da mayor adherencia y proliferación celular en los andamios.

Para poder observarlas mediante SEM Las muestras se prepararon mediante la técnica de chisporroteo en la cual dichos segmentos se pegaron a un pequeño porta muestras de aluminio, usando para ello un pegamento conductor, después se recubrieron con oro y se generó una diferencia de potencial a partir de una

pulverización catódica a alto vacío e intercambiando partículas de oxígeno por argón, finalmente se colocaron en el porta-muestras del microscopio electrónico para comenzar con el análisis .

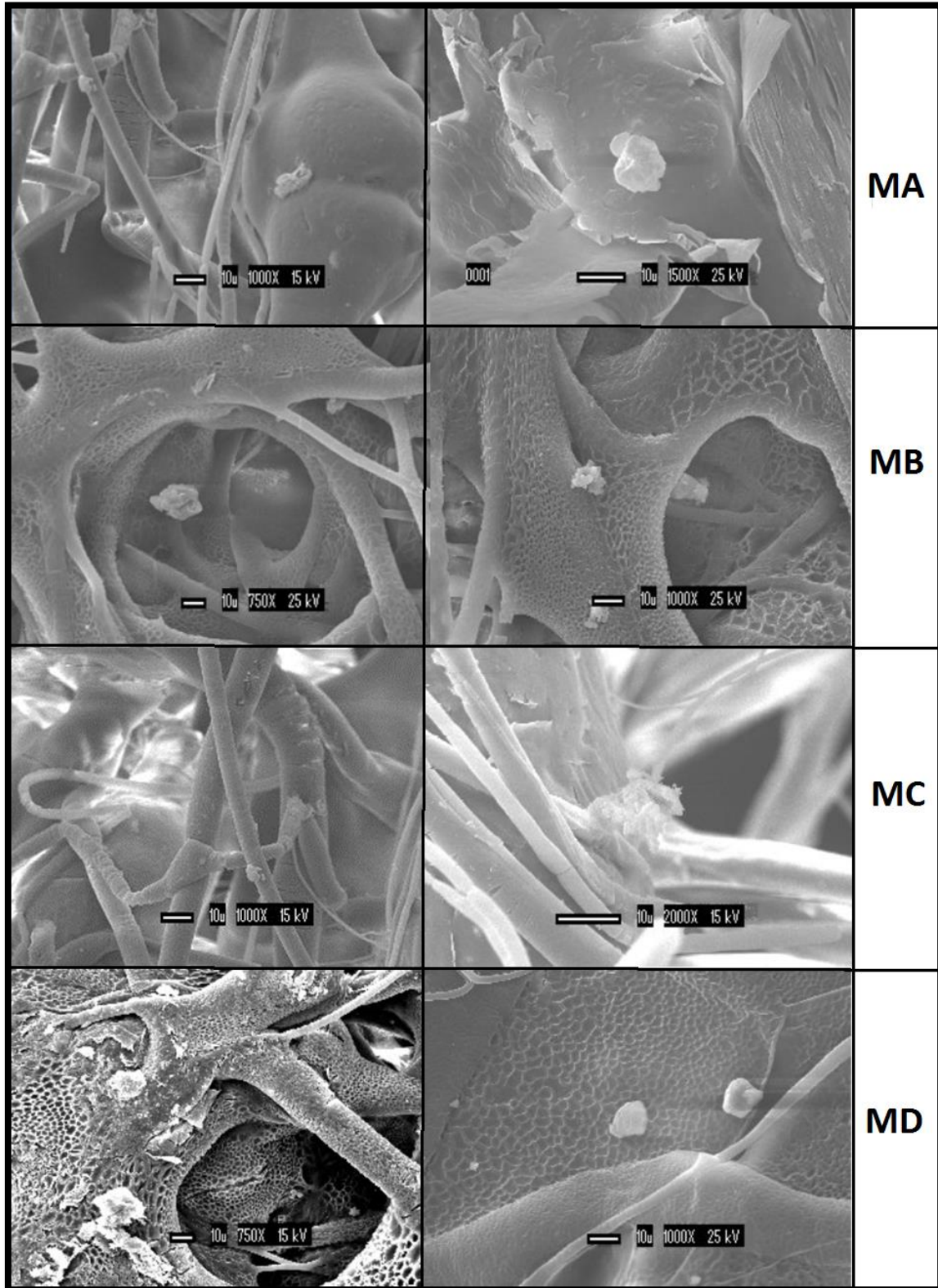


Figura 41. MA, MB, MC y MD con osteoblastos al día 7 de cultivo *in vitro*. En éstas se puede observar morfologías lisas para aquellas matrices con menor HA y rugosas para las matrices que contienen más HA, cúmulos celulares se observaron en ambas, sin embargo, dichos cúmulos son más evidentes en las matrices que además de más HA, contenían PPy.

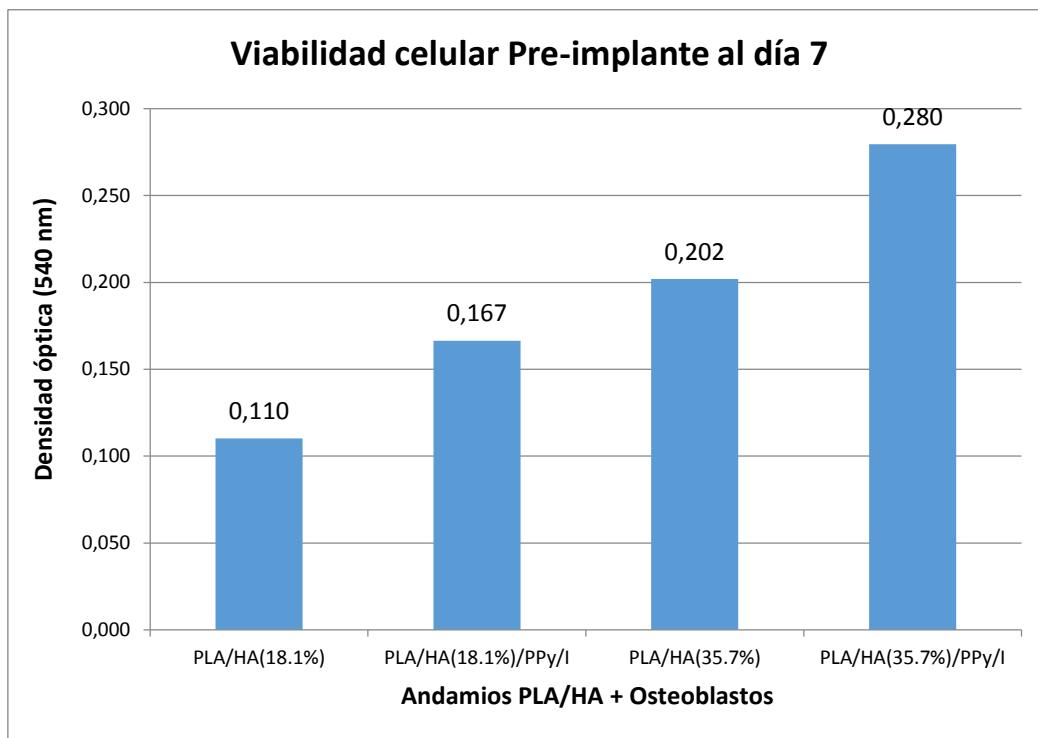
MA PLA/HA(18.2%), MB PLA/HA(35.7%), MC PLA/HA(18.2%)/PPy-I y MD PLA/HA(35.7%)/PPy-I con osteoblastos al día 7 de cultivo *in vitro*.

Prueba de viabilidad celular pre-implante mediante ensayo MTT

Posteriormente se realizó la multiplicación de células haciendo dos pases celulares, se sembraron las células obtenidas a una concentración de $2,5 \times 10^6$ cel/ placa y se mantuvieron en cultivo *in vitro* durante 7 días. Después de los 7 días de cultivo se realizaron ensayos de viabilidad celular por el método MTT para los andamios MA, MB, MC y MD con osteoblastos usando (3- (4,5 dimetiltiazol-2-il) -2,5 -difeniltetrazolio bromuro) que reacciona con el sistema mitocondrial de células viables dando como resultado cristales de formazán. Para este propósito, las células se lavaron con PBS y se colocó una concentración de 1×10^4 células / pocillo en una placa de 48 pocillos con 300 μ l de medio y se añadieron 30 μ l de solución de MTT a cada pocillo. Después de añadir la solución de MTT, la placa se incubó de nuevo durante 4 horas a 37 °C. Después de este tiempo, se añadieron 300 μ l de solubilización (SDS al 10% en 0,01 MHCL) para deshacer los cristales púrpuras de formazán que se formaron. La placa con células, el MTT y la solubilización, se incubaron durante la noche a 37 °C y las mediciones de absorbancia del día siguiente se realizaron con el espectrofotómetro X-Wave Power de Bio-Tek, usando una longitud de onda de referencia de 750 nm pero leído a 570 nm (35).

Los valores de absorbancia que se obtuvieron mediante el ensayo de MTT son directamente proporcionales a la cantidad de células viables. En la gráfica 2 se muestran las medidas de absorbancia para cada matriz. En este caso se observó que los andamios con menor cantidad de HA, **MA** PLA / HA (18.1%) y **MB** PLA / HA (18.1%) / PPy-I, tuvieron valores menores de absorbancia en comparación con **MC** PLA / HA (35.7%) y **MD** PLA / HA (35.7%) / PPy-I, los cuales tienen mayor cantidad de HA, siendo M4 la matriz con viabilidad celular más alta debido a que presenta más HA y contiene PPy-I, así que estos dos aspectos están haciendo gran diferencia en los andamios en cuanto a dureza, flexibilidad, integración.

Gráfica 2. Viabilidad celular Pre-implante al día 7. Dicha prueba permite ver que las matrices con mayor HA y mayor HA con PPy obtuvieron mejor viabilidad celular al día 7 de cultivo in vitro.



CULTIVO *IN VIVO*

Implante autólogo de matrices de PLA/HA and PLA/HA/PPy-I

Se hizo un solo experimento de implante de andamios a 30 días, el cual se realizó bajo la piel del dorso de un conejo macho blanco de Nueva Zelanda de 2,2 kg y 2 meses de vida extrauterina que se utilizó para la extracción de médula ósea dado que fue un implante autólogo, cabe mencionar que se realizó en dorso porque lo que se quiso verificar de primera instancia es que no halla rechazo por parte del conejo, con la idea de que si funciona bien en un lugar donde el tejido circundante no es de tipo óseo, con mayor razón se tendrán buenos resultados al llevarlos directamente a hueso. Bajo las condiciones apropiadas de asepsia y antisepsia, el animal se calmó con una inyección intramuscular de acepromazina y ketamina, Figura 42 a); después, se anestesió con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico y después se anestesió localmente con xilocaína. Posteriormente la parte posterior del animal se afeitó, Figura 42 b), y se realizó una incisión con un escalpelo teniendo cuidado de no dañar las estructuras anatómicas, Figura 42 c). Los andamios fueron envueltos en malla vicryl para que al ser insertados no se perdieran dentro del tejido circundante, Figura 42 d). Una vez insertados todos los andamios, Figura 42 e), el defecto se cerró en dos capas con suturas de nylon absorbible y se utilizó aluminio micronizado, Figura 42 f), para sellar, finalmente se desinfectó el área y se administró antibiótico postoperatorio durante 3 días.

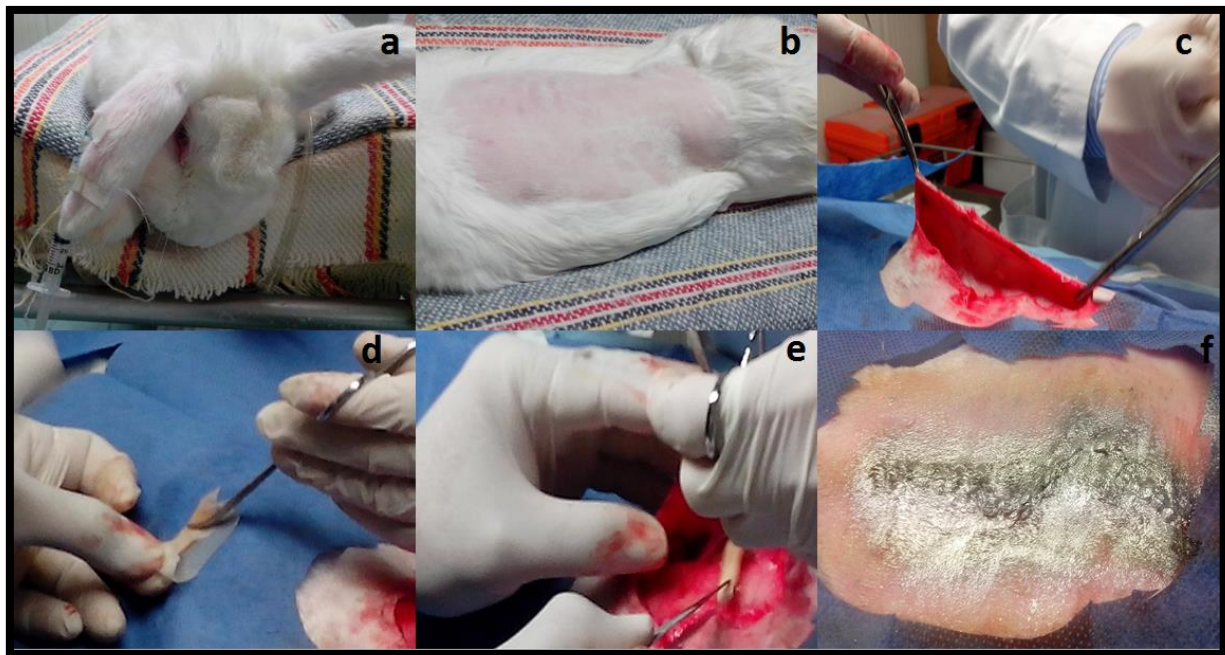


Figura 42. Implante de andamios de PLA/HA, PLA/HA/PPy-I.

a) Rasurado de dorso b) Inserción de andamios, c) 12 andamios insertados, d) Sutura y sellado con aluminio micronizado.

Se incluyeron 12 andamios, Figura 43, que se dividieron en tres grupos para comprobar la viabilidad celular (MTT), las pruebas histológicas (PH) y las pruebas de tracción axial (PTA). Las condiciones de los andamios para cada prueba se muestran en la Tabla 5. Para las pruebas MTT y HT, los andamios se cortaron en segmentos cuadrangulares (0,5 cm²) y para andamios de prueba de tracción axial se cortaron en segmentos rectangulares (0,5 cm de ancho x 2 cm de longitud). Es importante mencionar que se hizo comparación entre cuatro tipos de andamios (M1, M2, M3, M4) que tenían diferentes cantidades de HA, algunas de ellas con PPy y otras sin ella. Los andamios implantados se mantuvieron durante 30 días en condiciones ad libitum, posteriormente se recuperó el tejido formado para los ensayos anteriores. Se eligió un periodo de 30 días ya que se considera suficiente para observar si hubo primeramente algún tipo de rechazo, y al mismo tiempo si hubo formación de algún tipo de tejido en las matrices, considerando además que la mayor parte de los huesos largos del cuerpo se forman primero como cartílagos, que constituyen un modelo que sustituye más tarde el hueso; esto se denomina **formación endocondral de hueso** y esto ocurre precisamente alrededor de las primeras 4 semanas. Como resultado de las pruebas in vivo se obtuvieron neo-tejidos viables con buena vascularización.

Tabla 5. Condición de las matrices

Matriz	Condiciones
MA	PLA(1.8g)/HA(0.4g)
MB	PLA(1.8g)/HA(1g)
MC	PLA(1.8g)/HA(0.4g)/PPy-I
MD	PLA(1.8g)/HA(1g)/PPy-I

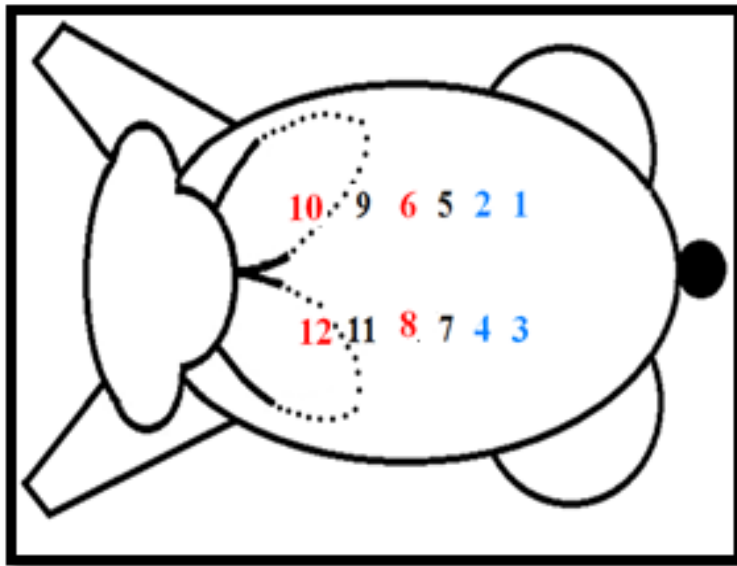


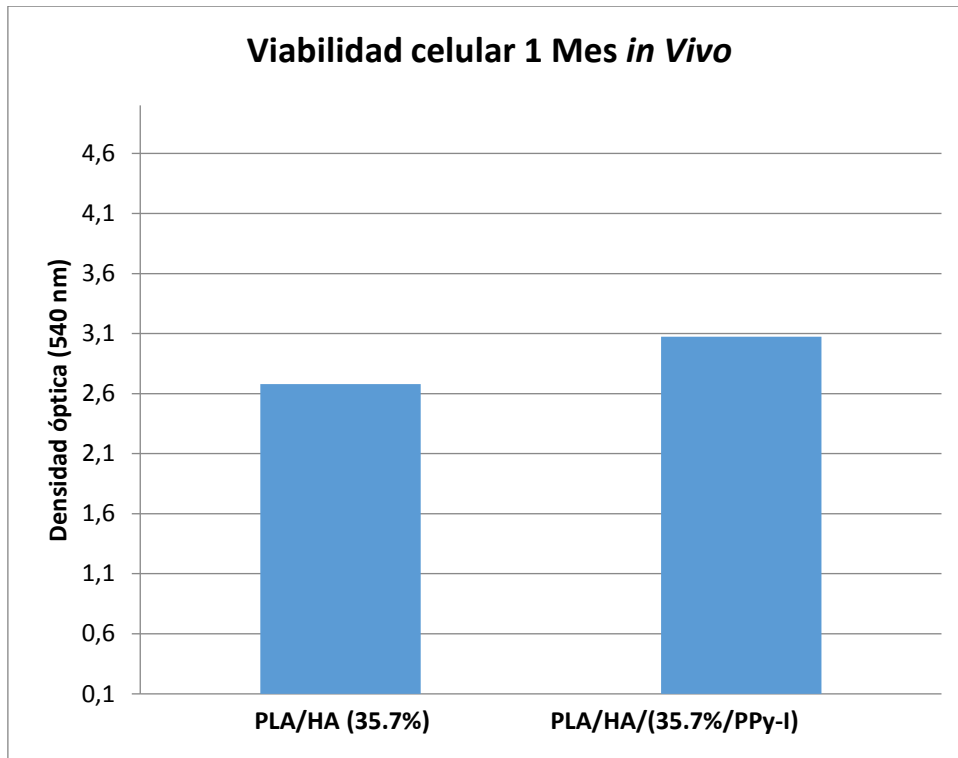
Figura 43. Imagen descriptiva de los distintos andamios colocados debajo del dorso del conejo para las distintas pruebas MTT, PH y PTA .

Prueba de viabilidad mediante ensayo MTT después de 1 mes *in vivo*

Debido a que los andamios M3 PLA / HA (35.7%) y M4 PLA / HA (35.7%) / PPy-I con una mayor cantidad de HA presentaron mayor viabilidad celular *in vitro* a los 7 días, los dos neo-tejidos respectivos de M3 y M4 se extrajeron a un mes *in vivo* y se realizó su ensayo de viabilidad celular siguiendo el mismo protocolo para el ensayo de MTT para andamios *in vitro* (35). La extracción de los neo-tejidos se realizó en las condiciones adecuadas de asepsia y antisepsia, siguiendo el mismo protocolo utilizado para el implante autólogo. En este caso se tomaron extractos de las muestras explantadas y se colocaron junto con medio de cultivo y se siguió el mismo protocolo antes mencionado.

La gráfica 3 muestra los resultados del ensayo de MTT en los andamios después de un mes de prueba *in vivo*. En este caso **MD**, que tiene una mayor cantidad de HA y que contiene PPy-I, mostró mayor viabilidad celular en comparación con **MC** que no tiene PPy-I. Este resultado confirma que la presencia de PPy está dando lugar a una mayor adhesión y proliferación celular.

Gráfica 3. Viabilidad celular después de 1 mes *in vivo*.



Análisis histológicos e inmunohistoquímicos del neot Tejido removido

El tejido fue sometido al proceso de fijación con formalina al 4%, seguido por inclusión en parafina. Posteriormente se obtuvieron secciones de tejido de 5 μ m, las cuales fueron procesadas y teñidas con hematoxilina y eosina. Así mismo, otras secciones fueron utilizadas para inmunohistoquímica. para Colágena Tipo I y Osteocalcina (OCN), y combinación de citoqueratina (AE1 y AE3), como control negativo para identificar células no óseas en el tejido. Las células osteoblasticas fueron identificadas con reactivos policlonales (colágena tipo I y osteocalcina) a una dilución de 1:50 mantenidos por 24 h a 4°C. Las preparaciones fueron contra teñidas con hematoxilina. Las imágenes fueron tomadas con microscopio óptico. Cabe señalar que se utilizó colágena tipo 1 debido a que es un componente que se encuentra a nivel de la piel, los tendones, los huesos y forma fibrillas relativamente gruesas en comparación con las del tipo II. (Prockop., 1981)

La Figura 44 muestra las imágenes correspondientes a la histología que se hizo para los cuatro tipos de andamios (MA, MB, MC, MD) ex vivo después de 30 días por debajo de la parte posterior del conejo, usando un microscopio óptico con una amplificación de 400 x.

La tinción con hematoxilina y eosina mostró que MC y MD tienen un tejido más homogéneo y mejor constituido, con muy pocos espacios vacíos, mientras que MA y MB tienen áreas con necrosis y también áreas vacías donde hay pérdida de tejido. Por lo tanto HA ayuda a la buena integración de un tejido viable.

La Colágena tipo I se tiñe de color marrón. En las muestras MA y MB pueden identificarse áreas no teñidas que corresponden a tejido en degradación donde las células pierden su sustrato y tienden a morir. Esto ocurre en menor grado en MC y mucho menos en MD; matrices que tienen más HA. También se puede ver que MB y MD, que son las matrices con PPy, tienen áreas con color más fuerte, cuando se comparan, esto corresponde a áreas donde se tienen mayor cantidad de células que expresan mejor el teñido correspondiente a dicha proteína.

La tinción de osteocalcina da un color marrón que muestra las proteínas alrededor del tejido óseo; sin embargo, también hay áreas que no están manchadas y muestran pocas células, lo que significa que hay tejido necrótico y por lo tanto, hay pérdida de células óseas. También hay espacios que se muestran en MD. En los últimos dos andamios se puede observar claramente la presencia de las fibras que a éste tiempo aún permanecen, lo que significa que parte del material no se ha degradado y además, que la HA ayudò a mantener el material más cerrado.

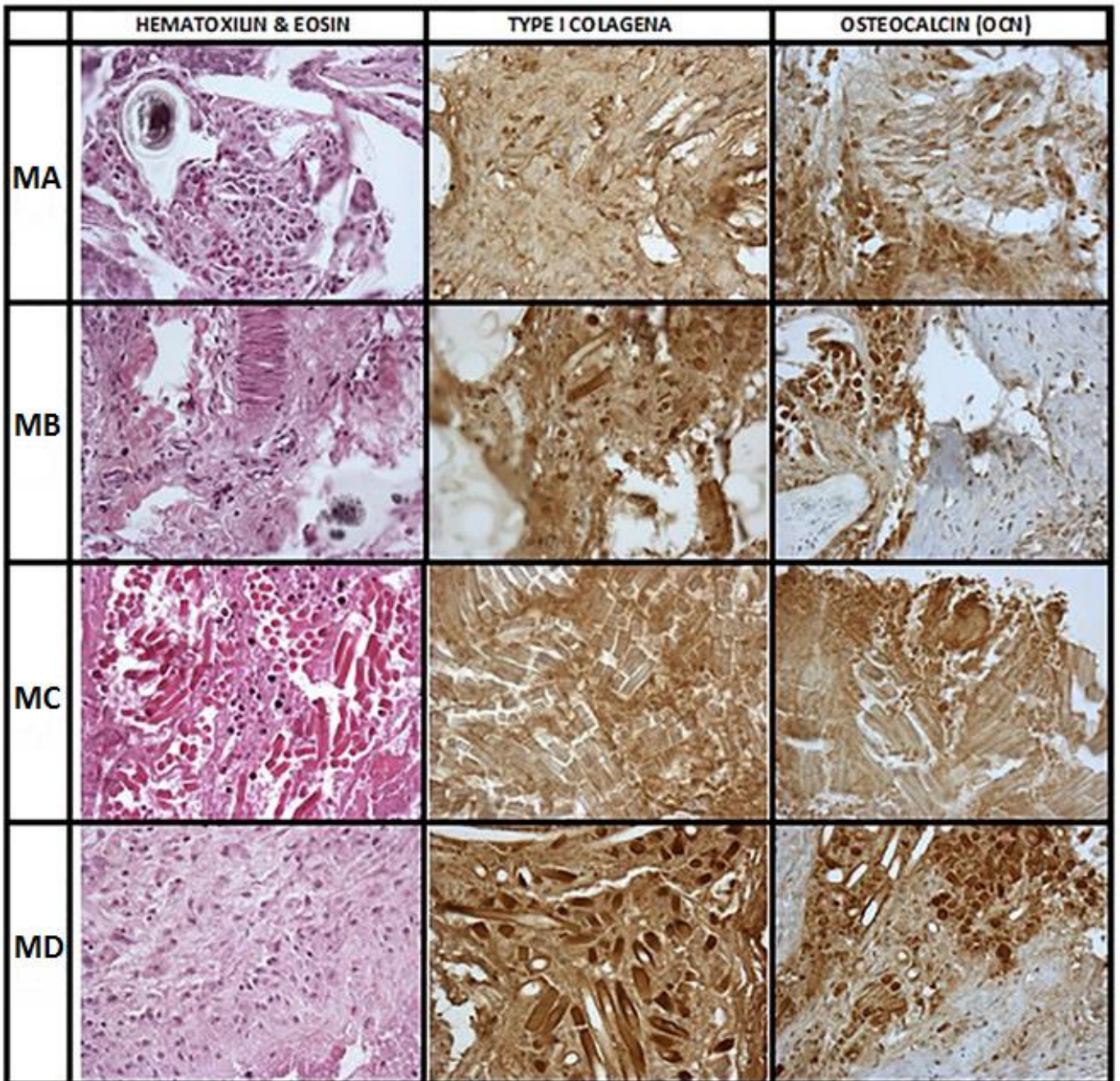


Figura 44. Histología de MA, MB, MC y MD con tinción de H&E e inmunohistoquímica por medio de Colágena Tipo 1 y Osteocalcina (OCN). En efecto los marcadores de tinción e inmunohistoquímica muestran que las matrices MC y MD presentaron morfologías más cerradas y con más células, a diferencia de MA y MB que si muestran células, sin embargo se observan huecos en los que el tejido no alcanzó a cerrarse debido a que contienen menos cantidad de HA y a la ausencia de PPy.

Pruebas mecánicas

El mismo día que se extrajeron los neotejidos, se les realizaron ensayos de tracción para estudiar su comportamiento de deformación, se colocaron muestras de 22 mm x 7 mm x 3 mm de espesor en la máquina de tracción teniendo cuidado de no dañarlas. Cada neotejido se sometió a ensayo de tensión a una velocidad de 0.5 mm/min en a temperatura de 25 °C y humedad hasta fracturarlo. Se registraron datos de carga y desplazamiento y también se capturaron imágenes de ensayo, sólo se probó una muestra para cada condición.

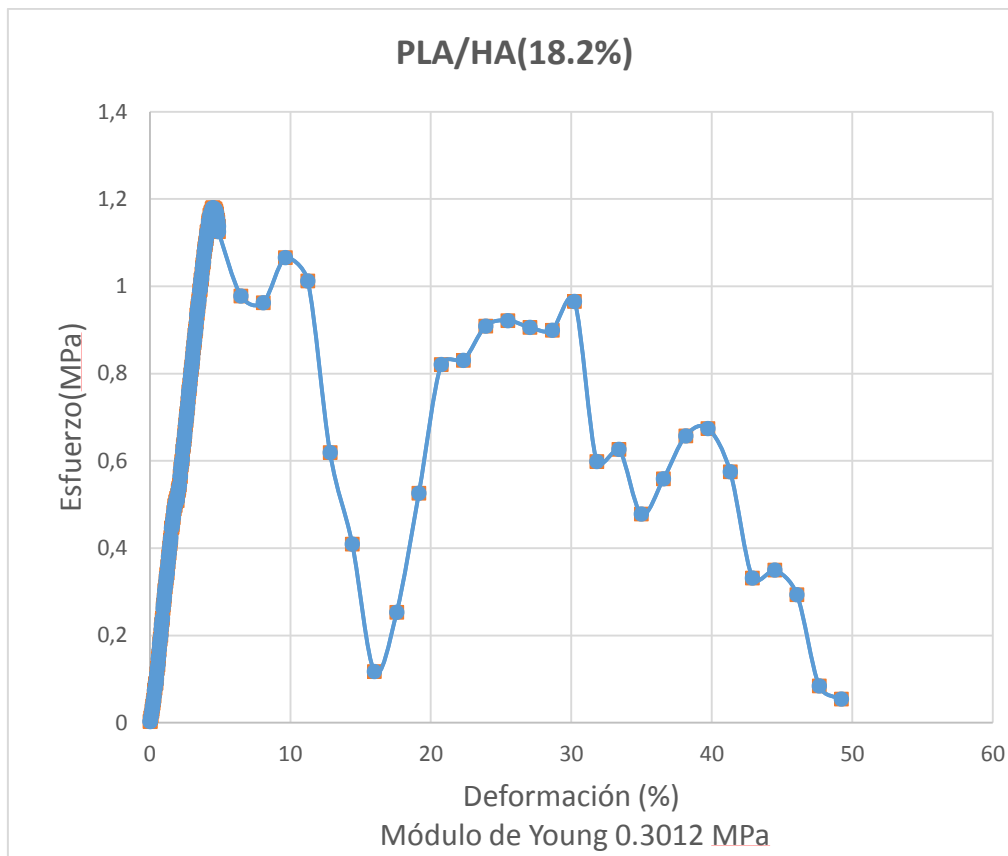
La Figura 45 muestra la evolución de deformación para la muestra MA, a diferentes etapas de la prueba. El comportamiento tiene que ver con el tejido que crece con poca integración al andamio, pero resistente para soportar el estrés hasta que va a completar la falla. Esta falta de integración permite una gran deformación del tejido y eventualmente se rompe, esto se debe principalmente al tiempo en el que se llevó a cabo el experimento in situ, sin embargo, también es lo que se esperaba ya que a ese tiempo se forma tejido cartilaginoso que es el precursor a futuro de la formación de tejido óseo.



Figura 45. Puntos específicos de la prueba de esfuerzo para MA [PLA / HA (18.1%)] neo-tejido. En la imagen e presenta la evolución de la aplicación de tensión al tejido, se puede observar la formación de un cuello de botella, es un tejido que se estira considerablemente antes de romperse.

a) Punto inicial b) Punto medio c) Cerca del punto de ruptura.

La gráfica 4 muestra la curva esfuerzo-deformación de MA, en la cual se puede observar que aguanta un estiramiento hasta 1,2 MPa de esfuerzo y a partir de este punto comienza a romperse, se puede observar un desgarre o rotura abrupta y después tiende a recuperarse y así sucesivamente hasta que se rompe por completo, se puede observar que alcanza hasta un 50% de deformación, lo cual se atribuye a que ésta matriz contiene menos cantidad de HA.



Gráfica 4. Esfuerzo-deformación del neo-tejido MA (PLA / HA (18.1%)). La gráfica muestra que el tejido cede a la ruptura de manera gradual hasta llegar a un punto máximo (1.2 MPa), posteriormente tiende a romperse en distintas secciones hasta su punto final de ruptura (50%) de deformación, ésta última fue bastante considerable.

La Figura 46 muestra las imágenes de la evolución de deformación de la muestra MC, la principal diferencia en este caso es que la deformación se acompaña por ruptura del tejido, ya que está empezando a integrarse al andamio y sólo hay una pequeña cantidad de tejido que se separa y mantiene la deformación hasta la falla total. Vale la pena mencionar que la tensión máxima de la muestra MC es mayor que MA.

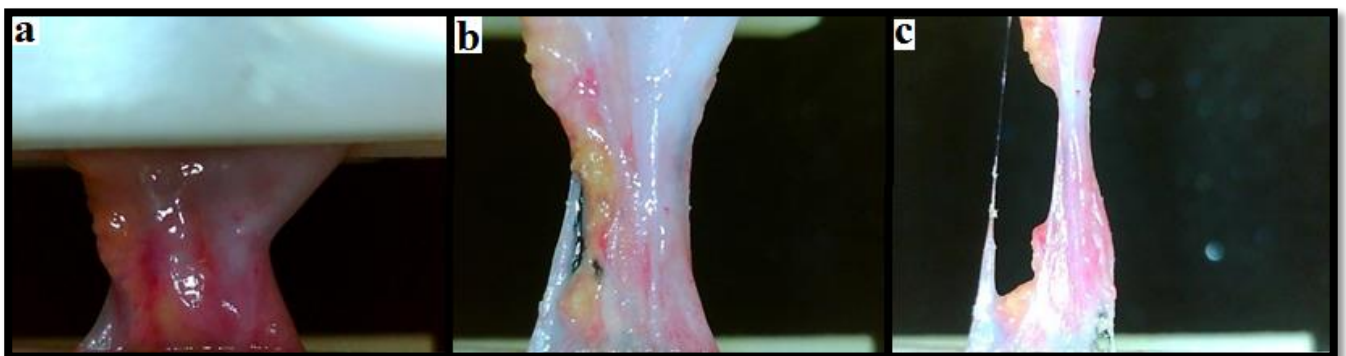
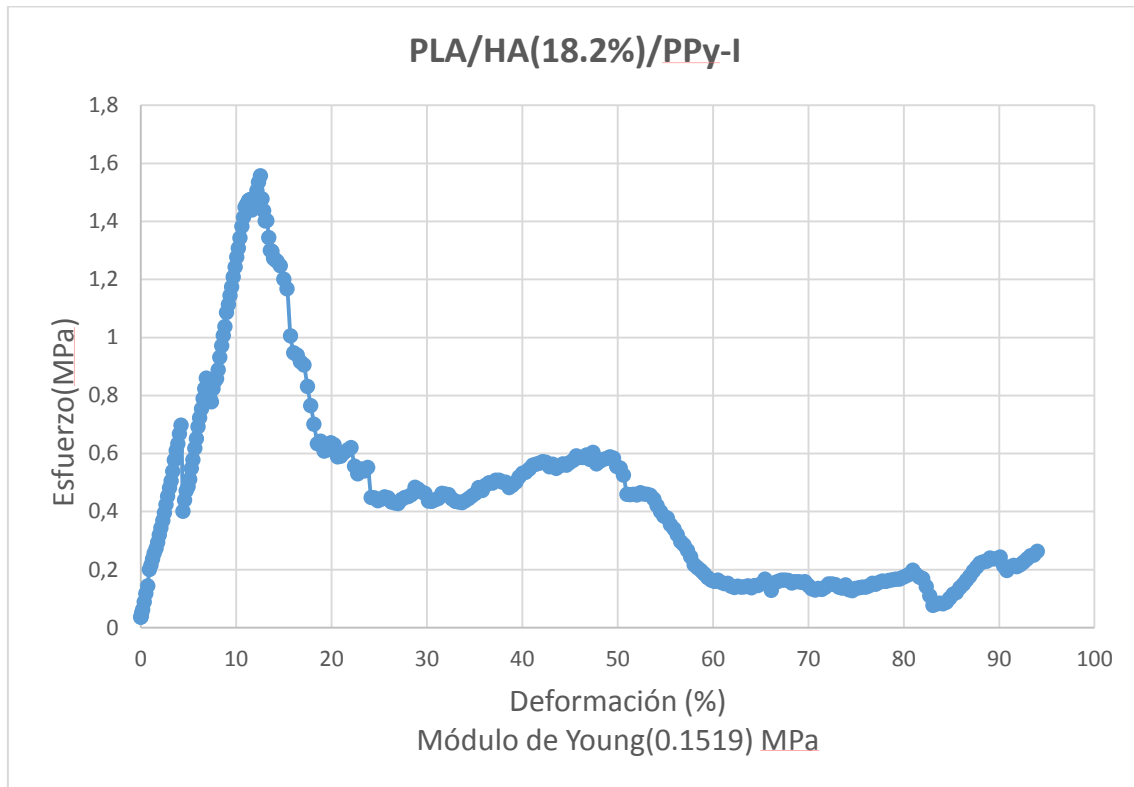


Figura 46. Puntos específicos de la prueba de esfuerzo para el neo-tejido MC (PLA / HA (18.1%) / PPy-I). Al igual que MA se trata de una matriz que cede a la tensión de manera gradual, sin embargo, en el tejido se observan secciones en color amarillo-marrón, las cuales involucran un rompimiento de golpe, sin embargo, la forma de ruptura continúa siendo en botella hasta el final.

a) Punto inicial b) Prueba de punto medio c) Más cerca del punto de ruptura

La gráfica 5 muestra la curva esfuerzo-deformación de MC, en esta se puede observar que va rompiéndose por secciones y tiende a recuperar el esfuerzo, sin embargo, soportó un esfuerzo máximo de 1,59 MPa y finalmente se va estirando hasta llegar al punto final de ruptura, en este caso vemos similitud con respecto a MA, ya que contienen menos HA, lo que permite alcanzar una mayor deformación antes de romperse completamente.



Gráfica 5. Esfuerzo-deformación del neotejido MC (PLA / HA (18.1%) / PPy-I). Esta matriz tendió a romperse y puede observarse que aguanta más esfuerzo (1.6 MPa) que MA y también presentó mayor deformación (94%) antes de romperse totalmente, lo que da una buena idea de que el PPy contribuyó a la conformación de un material más resistente y además más elástico.

La Figura 47 y la Figura 48 muestran los andamios MB y MD, respectivamente. En estos casos, podemos ver que la integración del nuevo tejido al andamio es mucho mejor que a menor concentración de HA, y las muestras son frágiles y no totalmente consolidadas ya que hay una pequeña cantidad de tejido blando que las rodea. Un experimento de 30 días muestra la integración, pero aún no se logra la formación de tejido óseo como tal.



Figura 47. Puntos específicos de la prueba de estrés para el neo-tejido MB (PLA / HA (35.7%)). Para este caso se observa que el material se rompe transversalmente en cierta sección del tejido.

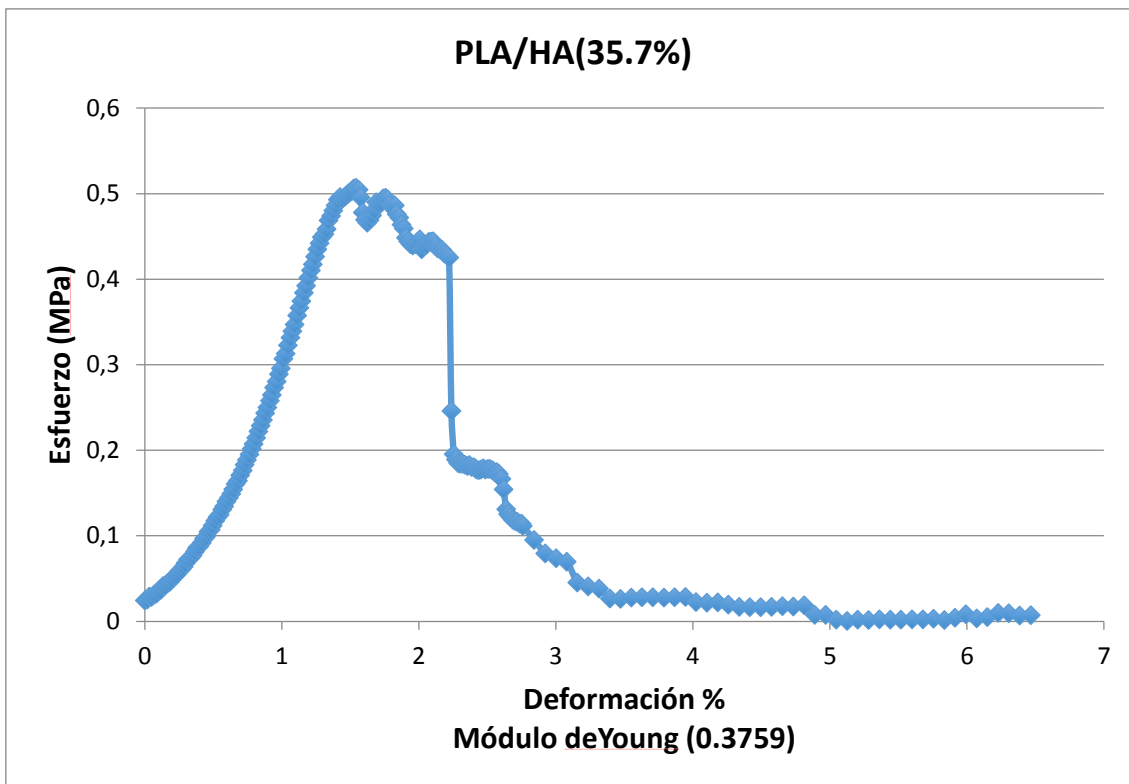
a) Punto inicial b) Prueba de punto medio c) Punto de ruptura



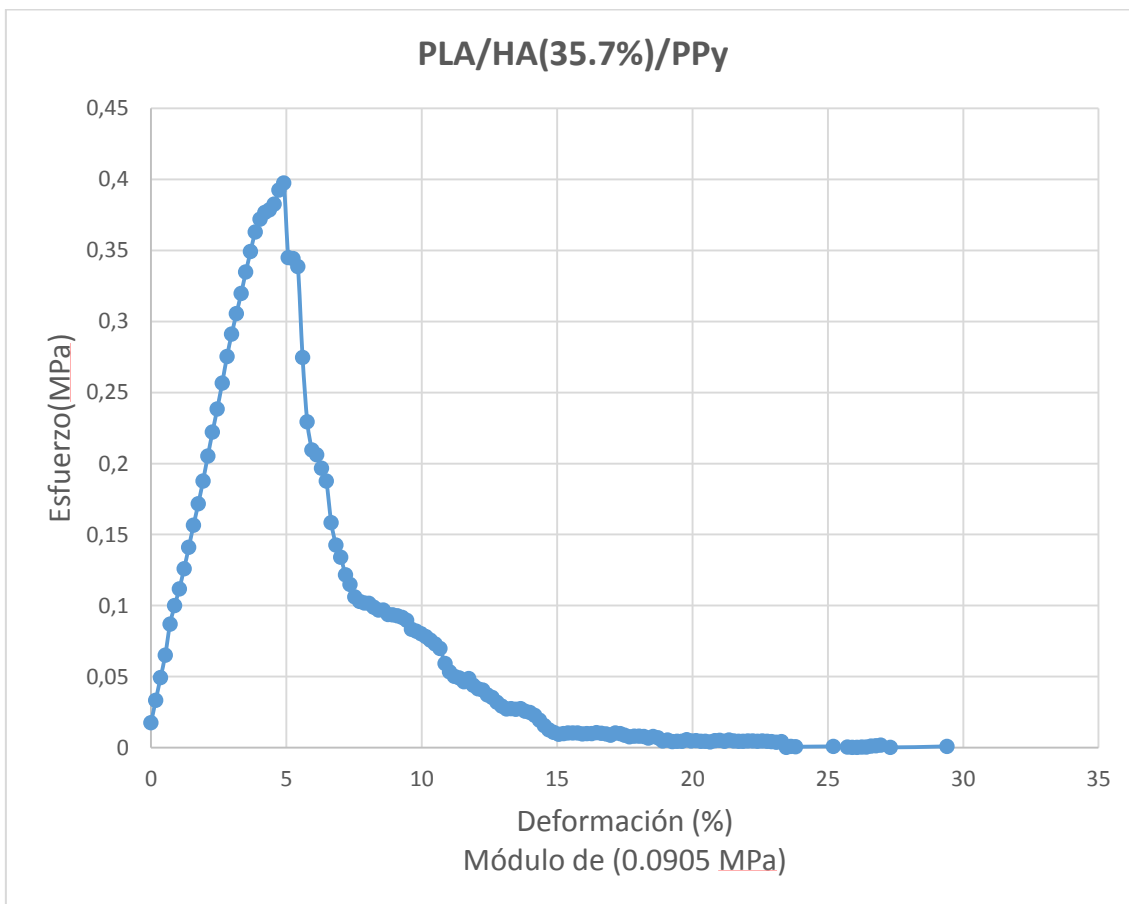
Figura 48. Puntos específicos de la prueba de esfuerzo para el neo-tejido MD (PLA / HA (35.7%) / PPy-I). Esta matriz presentó un rompimiento muy parecido a MB, de manera transversal pero se ve muy ligeramente la formación del cuello de botella antes de romperse totalmente.

a) Punto inicial b) Prueba de punto medio c) Punto de ruptura

En la gráfica 6 y gráfica 7 se muestran las curvas esfuerzo-deformación para las matrices que poseen mayor cantidad HA, una sin PPy MB y la otra con PPy MD, respectivamente; en éstas el esfuerzo que soportan es muy parecido (0,4-0,5 MPa) antes de comenzar a romperse, sin embargo, MD alcanza una mayor deformación, lo cual se atribuye a la presencia de PPy. Un aspecto importante es que una vez que éstas matrices llegaron al punto máximo de esfuerzo es que ya no se recuperan se rompen de manera más abrupta.



Gráfica 6. Esfuerzo-deformación del neo-tejido MB PLA / HA (35.7%). Para este caso se observa de manera abrupta que el material llega a soportar hasta 0.5 MPa y después comienza a romperse pero tiene una caída abrupta asociada a la sección transversal que se presentó en la figura 46, finalmente se sigue estirando muy levemente, pero se puede observar que la deformación se quedó tan solo en un 6.5%.



Gráfica 7. Esfuerzo-deformación del neo-tejido MD PLA / HA (35.7%) / PPy-I. En MD se presenta una situación muy parecida de MB, sin embargo, aunque soporta un menor esfuerzo (0.4 MPa), tiende a deformarse más (30%), es decir, una vez más la presencia de PPy es significativa en este aspecto.

CONCLUSIONES

Este trabajo confirma que la técnica de electrohilado produce matrices porosas formadas por fibras de diámetros muy variados, desde 800nm hasta 50 μ m y diversidad en tamaño de poro desde 10 μ m hasta 100 μ m, lo que permitió el libre desplazamiento de las células óseas y nutrientes dentro de los andamios.

Debido a la versatilidad de la técnica de electrohilado fue posible variar las condiciones de depósito de manera que se pudieron combinar las propiedades del **PLA** con las de la **HA** por lo cual fue posible inyectar soluciones de PLA/HA a distintas concentraciones de HA, donde; se exploraron las dos concentraciones (PLA/HA(18.2%) y PLA/HA(35.7%)) con mejores probabilidades para producir un andamio para dar soporte y generar adherencia y proliferación para dichas células óseas. Además, fue de gran ventaja que el PLA y la HA sean biocompatibles.

Se modificaron las matrices porosas con PPy mediante polimerización por plasma lo que dio buenos resultados, ya que se consiguió buena adhesión y proliferación celular in vitro e in vivo. En cuanto al aislamiento y diferenciación de las CTM's se destaca que la diferenciación hacia linaje osteogénico dio buenos resultados debido a que al utilizar la fosfatasa alcalina como uno de los principales marcadores bioquímicos óseos, se observaron células rojizas y además las células presentaron buena viabilidad cuando fueron sometidas a MTT, con lo cual se obtuvo proliferación celular progresiva bastante notable entre el día 7, 14, 21 y 28.

Los resultados de los experimentos in vitro dejaron observar una buena adhesión y proliferación celular en los cuatro tipo de andamios que se utilizaron; sin embargo, los más prometedores son aquellos que poseen más HA y también los que poseen más HA y están cubiertos con PPy, de manera tal que efectivamente, éstas últimas dos condiciones hacen favorable el biomaterial.

Como resultado de las pruebas in vivo se obtuvieron neo-tejidos viables con buena vascularización. Los mejores resultados se dieron con la muestra que tenía más HA y estaba modificada superficialmente con PPy,

además, la textura de este andamio estaba mejor constituida. El andamio cerámico-polimérico a base PLA/HA/PPy/I, demostró buena adherencia, multiplicación de las células osteoblásticas y conformación de tejido con características morfológicas muy parecidas a las de hueso, como demostró la histología e inmunohistoquímica.

Las pruebas de tracción mostraron la integración de tejido al andamio, mostrando un neot Tejido con características en cuanto a morfología más cerradas aquel que tenía mayor concentración de HA y tratado con PPy-I.

Estos resultados constituyen un avance en el conocimiento de diseño de biomateriales para conformación de hueso que no habían sido descritos con anterioridad, lo cual abre una nueva posibilidad en este campo. Sin embargo a pesar de estos resultados satisfactorios, se requieren realizar más experimentos *in vivo*, configurando un segmento óseo largo para establecer su potencial clínico.

PERSPECTIVAS

Debido a que se obtuvieron buenos resultados en la proliferación celular in vitro e in vivo en las matrices de PLA e HA, se procederá a utilizar dichas matrices de PLA/HA para insertarlas directamente en una sección de fémur de conejo previamente extraída utilizando como soporte una prótesis metálica, se espera inducir y promover la osteointegración entre el material implantado y el tejido nativo, y obtener un hueso mecánicamente funcional, Figura 49; para después caracterizar el neo-tejido mediante las técnicas utilizadas en este trabajo. Cabe mencionar además, que se ampliará el número de matrices para obtener una estadística mayor al comparar sus diversas propiedades y características físicas, cualitativas y cuantitativas.

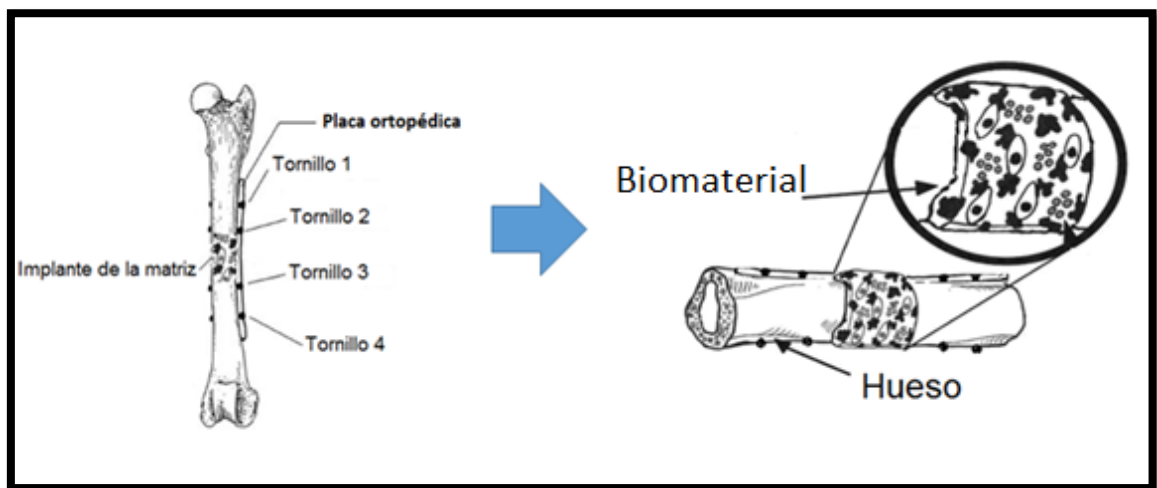


Figura 49. Inserción del biomaterial en el espacio debido a la extracción de una sección de fémur en conejo.

REFERENCIAS

- Alvarez., e. a. (2015). Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training. *26*, 209.
- Arenas., e. a. (2010). *Biología celular e histología médica*. Obtenido de http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/tejido_oseo_2010.pdf
- Barón., e. a. (2006). Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Ciruj*, 74:217-222.
- Botero., e. a. (2002). Parámetros del plasma obtenido durante el proceso de producción de recubrimientos poliméricos. *Revista Colombiana de física*, 34.
- Cajero., e. a. (2010). Armazones Celulares por la Técnica de Electrohilado. *Revista CENIC*, 41.
- Chaya., e. a. (2015). In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing. *18*, 262–269.
- Cruz., e. a. (2012). Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *Volume 23, Issue 10, pp 2583-2592* .
- Díaz., e. a. (2007). Cultivo de células de linaje osteogénico de periostio de porcino para la evaluación de un biomaterial. *Revista Med*, v.15 n.2.
- Estrada., e. a. (2006). Ingeniería de tejido: consideraciones básicas. *Revista EIA*.
- Fernández., e. a. (2005). Bases fisiológicas de la regeneración ósea, histología y fisiología del tejido óseo. *Cirugía Bucal*.
- Ferreira., e. a. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *8*, 3191–3200.
- Gentile., e. a. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *15(3)*, 3640-3659.
- Grazón D., R. M. (2014). Bases fisiológica y anatómicas del tejido óseo. En *Análisis por elementos finitos del proceso de regeneración ósea*. Colombia.
- Hutmacher., e. a. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(2529-2543).
- Kai., e. a. (2015). Composite mesoporous silica nanoparticle/chitosan nanofibers for bone tissue engineering. *RSC Advances*, 17541-17549.
- Khan., e. a. (2008). Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am*, 90, 36-42.
- Khon., e. a. (1991). Materials science and technology: a comprehensive treatment, medical and dental materials. *14*.
- Kumar., e. a. (2015). Strontium eluting graphene hybrid nanoparticles augment osteogenesis in a 3D tissue scaffold. *Nanoscale*, 7: 2013-33.
- Li., e. a. (2012). Mg-Zr-Sr alloys as biodegradable implant materials. *Acta Biomater*, 8, Issue: 8 , 3177-88.

- Liu., e. a. (2013). Bone regeneration in strong porous bioactive glass (13-39) scaffolds with an oriented microstructure implanted in rat calvarial defects. *Acta Biomater*, 9, 4889-4898.
- Lizarbe., e. a. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los materiales a la ingeniería tisular . *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 101, 227-249.
- McCall., e. a. (January de 2010). Treatment of large segmental bone defects with reamer-irrigator-aspirator bone graft: technique and case series. *Orthopedic Clinics of Northamerica*, 41, 63–73.
- Mohammad., e. a. (2015). Development of composite scaffolds in the system of gelatin–calcium phosphate whiskers/fibrous spherulites for bone tissue engineering. *Ceramics International*, Volume 41, 6013-6019.
- Morales., e. a. (2005). Estudio inmunohistoquímico del colágeno tipo I y tipo III en piel de pacientes con hernia inguinal primaria. Immunohistochemical measurement of type I and III collagen content of the skin of patients with primary inguinal hernia. *Rev. Chilena de Cirugía.*, 57, 489-49.
- Palazzo., e. a. (2014). Bio-hybrid scaffolds for bone tissue engineering: nano-hydroxyapatite/chitosan composites. *Key Engineering Materials*, 26, 300-305.
- Pastor., e. a. (2003). Caracterización de materiales poliméricos durante la utilización de microscopía vibracional (RAMAN, FTIR Y FT-RAMAN). *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4.
- Pressaccoa., e. a. (2015). Additive manufacturing of trabecular titanium orthopedic implants. *40 /Issue 02* .
- Prockop., e. a. (1981). El colágeno. *191* .
- Ramírez., e. a. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17, 42-55.
- Ravaglioli., e. a. (1992). Bioceramics; materials properties and applications.
- Relman., e. a. (Sep de 1998). Detection and identification of previously unrecognized microbial pathogens. *Emerg Infect.*
- Robles, e. a. (2014). Aplicaciones biomédicas, textiles y alimentarias de nanoestructuras elaboradas por electrohilado. *Biotecnia*, 16.
- Saiz., e. a. (2013). Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dent mater*, 29:103-115.
- Salgado., e. a. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *4(8):743-65*.
- Santhanam., e. a. (2015). Synthesis and characterization of synthetic and natural nano hydroxyapatite composites containing poloxamer coated demineralized bone matrix as bone graft material: a comparative study. *64, Issue 13*.
- Sheikhet., e. a. (2015). Hybrid scaffolds based on PLGA and silk for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Tom., e. a. (July de 2006). Lab-grown cartilage fixes damaged knees. *New Scientist Space*.
- Tuney., e. a. (May de 2011). Lymphadenopathy during lyme borreliosis is caused by spirochete migration-induced specific bone cell activation. *PLoS Pathology*.

Van., e. a. (2015). Cryogel-PCL combination scaffolds for bone tissue repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26:123.

Zúñiga., e. a. (2014). Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *Polymer Edition*(25).

ANEXO A

FONDOS

Se agradece a CONACyT por la beca proporcionada, CVU 329323.

ANEXO B

CONDICIONES ÉTICAS

Para la realización de este trabajo, se siguieron los estándares éticos de investigación internacional en salud establecidos para el manejo de animales, basados en la Declaración de Helsinki y la Secretaría General de Salud.

Las cirugías para extracción de biopsia de fémur de conejo y para la inserción de matrices porosas fueron realizadas por un cirujano capacitado y auxiliado por el médico veterinario institucional en instalaciones y con procedimientos de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los animales vivos se mantuvieron en jaulas de 0.14 m² por conejo, como mínimo; temperatura local entre 16 y 26 °C, humedad 40-70%; con una dieta basada en conejina purina y consumo libre de agua potable. Las puertas y ventanas del área del bioterio donde se albergaron los conejos cuenta con puertas seguras que no permitan la entrada de fauna nociva. Sin ventanas que den al exterior del recinto, para evitar que la definición ambiental y los experimentos pudieran verse afectados.

BIOSEGURIDAD

Para la realización de este trabajo, se siguió protocolo de bioseguridad en base al siguiente formato:

**FORMATO COMITÉ DE BIOSEGURIDAD – HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GÓMEZ
APROBADO MARZO-2009**

Comité de Bioseguridad

FECHA	DIA	MES	AÑO
	10	MAY	17

NÚMERO ASIGNADO POR LA DIRECCION DE INVESTIGACIÓN A SU PROYECTO:

CO-2009-005

TÍTULO COMPLETO DE SU PROYECTO:

CONFORMACIÓN DE UN NUEVO BIOMATERIAL A BASE DE PLA/HA/PPy(PPy)/I(I), PARA CONFORMACIÓN DE HUESO PARA REEMPLAZO DE HUESOS LARGOS: ESTUDIO EXPERIMENTAL EN MODELO ANIMAL.

Evaluación

PREGUNTA		SELECCIONE	
A	¿En el proyecto se utilizará(n) agente(s) biológico(s) (muestras clínicas, tejidos humanos y/o cualquier producto derivado de humanos, otros animales o microorganismos, plásmidos o cualquier producto u organismo modificado genéticamente, etc.)?	SI XX	NO
B	¿En el proyecto se utilizará(n) agente(s) corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos, inflamables, etc.?	SI	NO XX
C	¿En el proyecto se utilizara cualquier fuente de radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma, partículas alfa, beta, neutrones o cualquier material radiactivo)?	SI	NO XX

Si la respuesta es "NO" a los tres incisos anteriores lea el siguiente párrafo, firme y entregue únicamente esta hoja.

Como investigador responsable del protocolo de investigación sometido a revisión por el Comité de Bioseguridad CERTIFICO, bajo protesta de decir verdad, que la información proporcionada es verdad.

Nombre y firma del(los) investigador(es) responsable(s)

En caso de que la respuesta sea "SI" a cualquiera de las preguntas anteriores continúe proporcionando toda la información que se solicita a continuación:

NO MODIFICAR ESTE FORMATO

#	PREGUNTA	SELECCIONE	
		SI	NO
1	Conoce(n) el investigador responsable del protocolo y/o investigador corresponsable de éste, todo lo relacionado al manejo integral (recepción, uso, desecho, etc.) de residuos peligrosos, productos y/o materiales infectocontagiosos y/o biológicos de cualquier tipo y/o potencialmente peligrosos por cualquier causa y es responsable de que cualquiera y cada uno de los productos mencionados en los incisos A, B y/o C de esta página sean manejados, utilizados y/o desechados de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas (en primer lugar o internacionales en caso de no existir en México) y/o Reglamentos oficiales vigentes en la materia y/o de acuerdo a las guías y/o manuales debidamente aprobados y autorizados (por la Secretaría de Salud, Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias, Institutos Nacionales de Salud, Hospital Infantil de México Federico Gómez)	SI XX	NO
2	¿Cuenta el investigador con las instalaciones (ej. sala de toma de muestras, habitación, consultorio, laboratorio, instalación radiactiva, sala de rayos X, sala de radioterapia, etc.) y equipo de seguridad que se emplearán directa o indirectamente para la realización de este proyecto de investigación?	SI XX	NO
3	¿En el proyecto se utilizarán <u>agentes infecciosos</u> y/o <u>microorganismos</u> o sus productos de cualquier tipo?	SI	NO XX
3-A	Especifique <u>género y especie</u> de cada uno: Debe enlistar los agentes infecciosos escribiendo genero y especie -		
3-B	Especifique el tipo de <u>tratamiento a los desechos</u> . Señalar que el tratamiento de los desechos lo realizará personal autorizado del área de control de medio ambiente del HIMFG -		
4	¿Usará productos modificados genéticamente (ej. bacterias recombinantes, plásmidos, etc.)? Especifique el <u>tipo, manejo y desecho de estos productos</u> . -	SI	NO XX
5	¿En su proyecto se manejarán muestras o tejidos de origen humano de cualquier tipo?	SI	NO XX
5-A	Especifique el <u>tipo de muestras (ej. heces, orina, sangre, etc.)</u>		
5-B	Indique el(los) <u>lugar(es) específico(s)</u> donde se realizará(n) la(las) <u>toma(s)</u> de las muestras Debe de señalar en que lugar del Hospital, o laboratorio se tomaran las muestras del protocolo		
5-C	Mencione el(los) lugar(es) específico(s) donde se realizará(n) el(los) <u>análisis de las muestras</u>		

	Debe de señalar específicamente en que laboratorio del hospital se realizaran las pruebas, ensayos o manejo de tejidos		
6	¿En el proyecto se manejarán muestras clínicas o patológicas de <u>origen animal de cualquier tipo?</u>	SI xx	NO
6-A	Especifique la o las <u>especies</u> animales -Conejos especie Nueva Zelanda		
6-B	Señale el o los <u>tipos de muestras</u> -Biopsias de médula de fémur de conejo y controles a base de células grasas diferenciadas		
6-C	Especifique el o los <u>lugares donde realizarán</u> la <u>toma</u> de muestras -Debe de señalar en que lugar del hospital o laboratorio en donde se tomaran las muestras -Bioterio del Hospital Infantil de México.		
7	¿Se generarán <u>residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI)</u> (ej. sangre, fluidos corporales, cultivos, cepas, tejidos, órganos, materiales de curación, etc.?)	SI xx	NO
7-A	Especifique el tipo de <u>tratamiento para inactivación del producto RPBI (cloración, calor, etc.)</u> INACTIVACION POR CALOR (ESTERILIZACION) PROCESO QUE SERA REALIZADO POR EL PERSONAL DEL RPBI DEL HIMFG TODO EL MATERIAL DESECHABLE DEL CUARTO DE CULTIVO (CAJAS PETRI, TUBOS DE PLASTICO, PUNTAS DE MICROPIPETA, Y DEMAS MATERIAL QUE ESTE EN CONTACTO CON CELULAS) SERA INACTIVADO CON SOLUCION DE HIPOCLORITO DE SODIO AL 6% Y POSTERIORMENTE INACTIVADOS POR CALOR. (ESTERILIZACION)		
7-B	Describa el <u>método de desecho del (de los) producto(s) RPBI</u> TODOS LOS DESECHOS QUE TENGAS CONTACTO CON CELULAS SERAN SOMETIDOS A UN TRATAMIENTO CON HIPOCLORITO DE SODIO AL 6% Y SE DESECHARAN EN CONTENEDORES DE PLASTICO CON BOLSAS ROJAS		
7-C	Especifique el <u>lugar de desecho del (de los) producto(s) RPBI</u> EL LABORATORIO CUENTA CON CONTENEDORES ESPECIFICOS CONFINADOS EN AREAS EXCLUSIVAS DEL MISMO, PARA RESIDUOS BIOLOGICO INFECCIOSOS. UNA VEZ QUE EL CONTENEDOR SE ENCUENTRA AL 75% DE SU CAPACIDAD, LA BOLSA ROJA SE RETIRA Y LOS DESECHOS SON CANALIZADOS AL AREA DEL RPBI		
8	Si las muestras (desechos o cualquier producto o sustancia de origen humano, animal o microorganismos) tuvieran que ser transportadas fuera de nuestra Institución especifique : -CÓMO: Debe señalar las condiciones (tipo de envase, temperatura....) en que se transportarán las muestras y los cuidados necesarios. -QUIÉN: Nombre de la persona responsable del envió (personal del hospital) -DESTINO: lugar a donde se entregarán las muestras y en su caso el nombre de la compañía que los transportará -PERIODICIDAD: Con qué frecuencia se realizará el transporte de muestras		

9	¿En el proyecto se manejarán muestras que pudieran ser contaminantes ambientales?	SI	NO XX
9-A	Tipo de muestras que sean o pudieran ser <u>contaminantes ambientales y los riesgos que podría implicar su manejo</u> : -		
9-B	Indique <u>lugar, frecuencia, método</u> y forma en que <u>desechará las muestras</u> que sean o pudieran ser <u>contaminantes ambientales</u> : -		
10	¿El proyecto contempla el uso de materiales peligrosos: <u>corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos, inflamables (CRETI)</u> ?	SI	NO XX
10-A	Especifique cuáles <u>sustancias y de qué tipo</u> son Enliste las sustancias y el tipo (corrosivo, reactivo....) de las mismas que utiliza en el ensayo, o procedimiento de su protocolo. -		
10-B	Indique el <u>lugar, método, frecuencia y forma de desecho de cada una</u> Debe de señalar, el lugar en donde colocan los desechos, el color de los envases en que los deposita, la frecuencia en que los desecha y como controla que se los lleve el personal de RPBI -		
11	¿En el proyecto se utilizarán <u>fuentes de radiaciones ionizantes</u> (aparatos generadores de rayos X, aceleradores de partículas, etc.?)	SI	NO XX
12	¿En el proyecto se utilizarán <u>fuentes radiactivas no encapsuladas</u> ?	SI	NO XX
12-A	Indique el <u>número de licencia de la CNSNS</u> y nombre del <u>encargado de seguridad radiológica autorizado</u> para uso de dichas fuentes y lugar (ej. nombre del laboratorio, dirección, teléfono, etc.) de asignación. Debe de escribir el número de la licencia de la CNSNS así como su fecha de vencimiento, quien es la persona ESR, cual es el laboratorio con todos los datos.		
12-B	Señale el <u>tipo de material radiactivo y actividad</u> (utilizada por día y/o experimento, estudio, etc.): Que tipo de radiación maneja, alfa, beta o gamma, y cual es su actividad especifica permitida y en que tipo de ensayo la utiliza.		
12-C	<u>Lugar</u> donde se realizará la manipulación del material radiactivo Señale el sitio donde se realizara el estudio, ensayo etc., permitido para manejar material radiactivo.		

12-D	Describa el <u>procedimiento</u> que usará para el <u>desecho de los residuos radiactivos</u> Haga una pequeña descripción sobre como separa los desechos radiactivos en su laboratorio, antes de que se lo lleven el personal de RPBI
------	---

NOTA: Cuando el protocolo se realice en colaboración con otras instituciones e incluya el manejo de cualquier muestra de origen humano, animal o de algún microorganismo, así como el manejo de algún reactivo peligroso (CRETI), se requiere anexar el formato de aprobación por parte de la Comisión de Bioseguridad de la o las instituciones que se responsabilizarán de tomar, procesar, transportar y/o desechar las muestras o reactivos; así mismo, en estos proyectos se deberá anexar un apartado de bioseguridad detallando como se manejarán y desecharán los RPBI o CRETÍ.

Se deberá anexar el comprobante de asistencia a cursos de manejo de residuos peligrosos, productos y/o materiales infectocontagiosos de algún participante del proyecto de investigación

DRA. ATLANTIDA M. RAYA RIVERA.

Nombre y firma del investigador responsable

Nombre y firma del técnico responsable

ANEXO D

Histología

Fijación del tejido

El primer paso para realizar pruebas de histologías es el proceso de fijación, el cual no sólo preserva los tejidos deteniendo la autólisis, sino que también permite que los tejidos permanezcan sin cambios después de subsecuentes tratamientos. Idealmente, los tejidos se endurecen ligeramente pero no se fragmentan permitiendo que las estructuras tisulares no se encojan y que estén muy cerca de la estructura que se posee *in vivo*. La fijación debe hacerse inmediatamente ya que cualquier demora seca el tejido y acelera su autólisis. Entonces, una vez obtenida la muestra, esta se introduce en un recipiente con formol al 10% en buffer de fosfatos. El tiempo que debe permanecer la muestra en formol dependerá del tamaño de esta, siendo las secciones óptimas de no más de 5 mm, y un tiempo aproximado de 12 – 14 horas. El volumen del fijador deberá de ser 10 veces el volumen del tejido. Los tiempos mínimos y máximos de fijación son de 3 y 24 horas, respectivamente.

Procesamiento del tejido: deshidratación, aclaramiento e infiltración

Los tres pasos del procesamiento del tejido son secuenciales para remover el agua que pueda hallarse en los tejidos y reemplazarla con un medio que se solidifique para así permitir el corte de estos tejidos; para ello, se utilizó un procesador automático que perfecciona el procesamiento de los tejidos mediante el uso de calor, vacío presión y agitación.

- a) El procesador automático va introduciendo la muestra en las diversas soluciones, de acuerdo a como se muestra en la Figura 50:

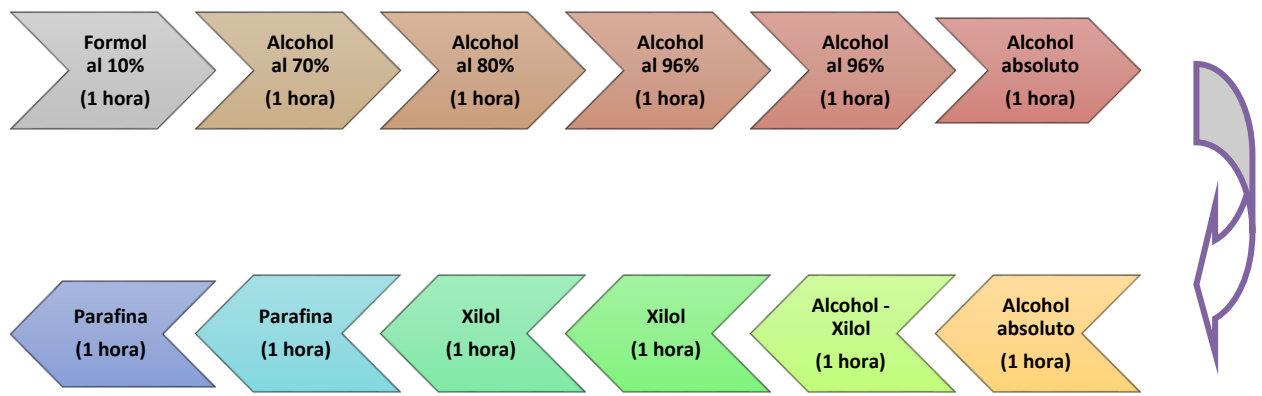


Figura 50. Procesador automático de las distintas soluciones en las histologías.

Inclusión del tejido

Es el proceso de rodear el tejido con una sustancia firme para poder obtener secciones delgadas. La parafina es el medio de inclusión más usado, y es una mezcla de hidrocarburos sólidos derivados del petróleo. Generalmente es blanca o incolora, más o menos traslúcida, inodora, y hay varias, cada una con un punto de fusión distinto, entonces, para la inclusión del tejido se procedió como sigue:

- Usando pinzas calentadas en el mechero para prevenir que la parafina se adhiera a las pinzas, se removió una cajilla procesadora que contiene el tejido impregnado del área de espera en parafina, después se abrió la cajilla para examinar la muestra del tejido y se seleccionó el molde adecuado de acuerdo con el tamaño de la muestra y se llenó parcialmente con parafina.
- Se recalentaron las pinzas, se removió el tejido de la cajilla y se colocó centradamente en el fondo del molde.
- Se transfirió el molde del plato caliente al plato frío. La cera rápidamente formó una capa delgada pero sólida en el fondo del molde. Suavemente se oprimió la superficie del tejido que se iba a cortar contra la capa sólida que lo mantuvo en la posición deseada.

Las secciones de tejido deben ser incluidas perfectamente planas para asegurarse de que se tenga una sección completa. Debe usarse la presión justa para mantener la sección plana contra la superficie del molde. La orientación debe ser tal que la resistencia que el tejido ofrece a la cuchilla vaya de un grado menor a uno mayor a medida que se vaya cortando el bloque. Esto hace que los tejidos más duros no compriman los tejidos más blandos evitando por lo tanto secciones irregulares. Debe haber un margen adecuado (2 mm

mínimo) de medio de inclusión rodeando el tejido por todos lados para que el apoyo al cortar sea el máximo posible.

Microtomía

Es el proceso de corte de la muestra incluida en la parafina, para lo cual se emplea un aparato llamado micrótopo. El bloque de parafina debe estar perfectamente asegurado al micrótopo y la cuchilla limpia y con suficiente filo, para este procedimiento se consideró lo siguiente:

a) Grosor de las secciones. Durante el corte rutinario de tejidos lo usual es escoger un grosor de 6 μm , pero esto dependerá del tipo de tejido a ser estudiado y el estudio para el que se requiera. Para este caso se utilizaron especímenes de grosor de 30 μm .

b) Orientación del bloque. La colocación correcta de bloques bien incluidos en el micrótopo resultará en preparaciones que incluyan toda la superficie del tejido y libres de desgarramientos, líneas, dobleces o distorsión celular.

c) Rebanamiento inicial, empapamiento y enfriamiento. Antes de cortar un bloque, se debió examinar y establecer cómo iba a ser orientado en el porta-bloques. Se removió el exceso de parafina de los lados, dejando márgenes más generosos en los extremos superior e inferior del bloque. Una vez que el bloque estuvo asegurado en el porta-bloques, se ajustó hasta estar seguro de que no tropezara con la cuchilla. Hecho lo anterior, se procedió a tomar rebanadas gruesas del bloque hasta que la superficie tisular entera quedó expuesta. Posteriormente, se enfrió brevemente la cuchilla y el bloque usando un cubo de hielo.

d) Producción de cintas o bucles de tejido. Para producir una cinta, la rueda de mano debió usarse de manera uniforme y lenta, ya que si se hace girar demasiado rápido las secciones pueden salir de grosores diferentes. Una vez hecho esto, se colocó la cinta en la superficie del baño de flotación.

e) Flotación. El baño de flotación debe estar a una temperatura unos cuantos grados por debajo del punto de fusión de la parafina por lo que se usó agua destilada en el baño de agua para eliminar burbujas de aire. Después, la cinta se colocó suavemente en el baño de flotación para eliminar arrugas y aire atrapado debajo, después, el portaobjetos se retiró gentilmente por debajo de la cinta arrastrando con ello las burbujas

y se permitió que las secciones permanecieran en el baño de agua hasta que se aplanaran. después las secciones se separaron individualmente y se colocaron en portaobjetos limpios y previamente marcados. Se dejaron escurrir verticalmente por varios minutos antes de colocarlos en la estufa a una temperatura de 58° C – 60° C por 20 o 30 minutos. Posteriormente se colocarlas en xilol durante 5 minutos para quitar el exceso de parafina y fijar bien el tejido.

* Las muestras sin desparafinar en el portaobjetos se pueden quedar a temperatura ambiente por meses o incluso años antes de que sean procesadas inmunohisto o inmunocitoquímicamente.

f) Sellado de los bloques. Una vez que las secciones deseadas se cortaron, se removi6 el bloque del porta-bloques y se sell6 la superficie expuesta con parafina derretida. Esto hace que los tejidos no se sequen y que no se pongan duros y quebradizos, facilitando así la obtenci6n de nuevas secciones durante semanas, meses, y aún años más tarde.

Tinci6n con hematoxilina y eosina

La hematoxilina, un colorante natural, se usa para teñir de un color azul – morado el núcleo celular. En la actualidad, hay dos procedimientos de hematoxilina usados los laboratorios de histopatología, los métodos de Mayer y de Harris. La hematoxilina a ser usada en este protocolo fue la de Harris, un método regresivo, ya que la descalcificaci6n a menudo disminuye las propiedades basofílicas de los núcleos. Este método tiñe todas las estructuras tisulares (núcleos, citoplasma, tejido conectivo, etc.) y continúa con una descolorizaci6n controlada y “azulamiento” hasta llegar a una tinci6n nuclear que sea 6ptima.

Después de la aplicaci6n de hematoxilina, las soluciones de eosina se usan convencionalmente para contrastar ya que la eosina tiñe citoplasma. Una vez que las muestras fueron desparafinadas en la estufa, se procedió a realizar la siguiente secuencia de tinci6n, Figura 51:

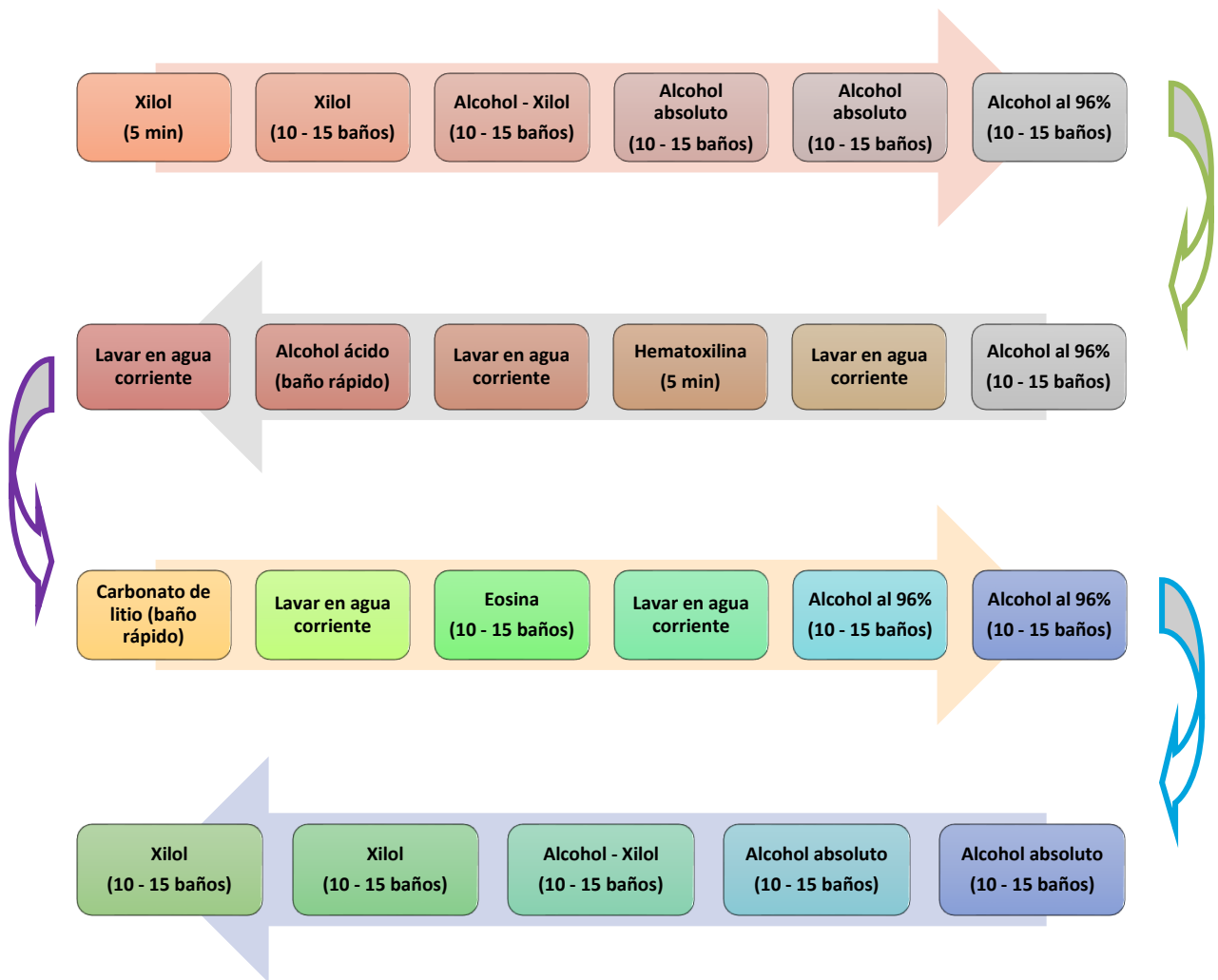


Figura 51. Secuencia de tinción.

Montaje

El paso final en la preparación histológica de las muestras es el de cubrir la porción que contiene el tejido con el cubreobjetos. Esto hace que la lámina sea permanente y permite el examen microscópico. Así que una vez que se seleccionó el cubreobjetos con el tamaño apropiado para el espécimen, se agregó la cantidad adecuada de Entellan, el medio de montaje, sobre el portaobjetos con la muestra, después se rodó el cubreobjetos sobre el portaobjetos para expulsar el aire atrapado y se limpió el exceso de medio de montaje para poder observar la muestra.

Prueba de inmunohistoquímica

Dependiendo del tipo de muestra sobre la que se desea aplicar el procedimiento inmunohistoquímico es necesario tratarla para conseguir por ejemplo una superficie hidrofóbica que permita la entrada de las

soluciones acuosas, desenmascarar los epítopes que bloqueados por efecto del fijador, bloquear todas las uniones inespecíficas, grupos reactivos, etc.

El método que se utilizó en este trabajo fue llamado "Procesamiento en portaobjetos y por flotación 'free floating'" se emplea para los tejidos incluidos en plástico o en parafina. Los cortes obtenidos mediante vibratomo, micrótomo de congelación y criostato se pueden procesar tanto sobre portaobjetos como por flotación.

En el procesamiento sobre portaobjetos es necesario unir los cortes a la superficie del portaobjetos. Esto se consigue empleando bien portas previamente gelatinados (gelatina 0.5% alúmina de cromo 0.01%), con poli-lisina de 350000 Da (0.05 al 0.1%) o empleando portaobjetos con carga positiva.

En el caso de los cortes adheridos al portaobjetos es importante tener cuidado con los tratamientos proteolíticos pues pueden facilitar el despegamiento de los cortes.

Las incubaciones se realizan mediante una gota (5 a 50 microL) que se deposita sobre la sección histológica.

Para evitar la extensión de la gota se puede delimitar un area circular con lapiz hidrofobo. En el proceso de flotación los cortes se recogen y procesan en recipientes especialmente diseñados: cilindros abiertos por la base que se ha cubierto con una fina malla (media). El protocolo inmunocitoquímico es rápido y sencillo. En cada recipiente se pueden procesar de 50 a 100 secciones. Todas las incubaciones y lavados se hacen con agitación constante, en un agitador rotatorio u orbital. Este procedimiento asegura la máxima penetración y homogeneidad de tinción.

Las preparaciones completas o 'whole mount' también se procesan por el procedimiento de flotación. En este caso, según el tipo de muestras de que se trate se usan tubos eppendorf.

Las principales ventajas e inconvenientes de uno y otro método son las siguientes :

Ventajas

- los cortes pueden ser finos (<4 micrones) y seriados

- apropiado para tejidos poco homogéneos
- una vez finalizado el proceso inmunohistoquímico el montaje es inmedia
- se precisa poca cantidad de anticuerpo

Desventajas

- proceso más lento y laborioso
- se procesan pocos cortes pos experimento
- la reacción puede no ser homogénea

Protocolos

Método inmunohistoquímico directo

En este protocolo se siguen los pasos del 1 al 4 (omitiendo los pasos e-h)

Método Inmunohistoquímico Indirecto

En este protocolo se siguen los pasos del 1 al 4

Fijación del tejido o las células con paraformaldehído (PFA) 4% durante unas horas.

Crioprotección del tejido en sacarosa al 30% en tampón fosfato (PB) 0,1M a 4°C toda la noche (este paso sólo se realizará en el caso de secciones de criostato).

Secciones de 10 a 25 mm de grosor.

Inmunoreacción: Para eliminar la actividad de las peroxidasas endógenas, el tejido se preincuba en una solución de 0,3% H₂O₂ in metanol durante 20 min (este paso no es necesario en el caso de técnicas de inmunofluorescencia).

a) Lavar 2x10 min en tampón fosfato salino (PBS) 0,1M a pH 7,4 conteniendo 0,25% Triton (PBST).

b) Preincubar durante 30 min con PBST conteniendo 1% de suero de albumina bovina (BSA) a fin de reducir el marcaje inespecífico.

c) Incubar durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario (específico contra la sustancia que queremos detectar) (los anticuerpos siempre se diluirán en la solución PBST-BSA).

d) Lavar las secciones con PBST 2x10min.

e) Incubar las secciones durante 1 hora en el anticuerpo secundario (biotinilado, unido a peroxidasa o a fluorescencia) a temperatura ambiente.

f) Lavar 2x10 min con PBS.

g) Incubar las secciones en el complejo ABC durante 1 hora a temperatura ambiente.

h) Lavar 1x10 min en PBST.

i) Lavar 1x10min con tampón Tris-HCl 0,1M pH. 7,2.

j) Incubar las secciones en una solución de 3,3'-diaminobezidina tetrahidroclorido (DAB) al 0,05% en tampón Tris-HCl conteniendo 0,025% de H₂O₂ durante 5 a 10 min.

Controles -Omisión del anticuerpo en cada uno de los pasos. -Sustitución del anticuerpo primario por suero inmune. -Pre-incubación del antígeno con el anticuerpo primario diluido a la concentración a la que se usa en la reacción. Todos los experimentos control tienen que dar como resultado la eliminación del marcaje.

*La duración de las incubaciones y lavados dependerá del grosor del corte entre otros factores.

Ensayo MTT

Materiales

- (MTT (bromuro de 3 - (4,5 dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difenil - tetrazolio)
- Solución de stock 5mg / mL en PBS filtro A través de filtro de 0,2 micras (sigma)
- Medio D-MEM (1x) (GIBCO 31600-091), con 0,37%, antibiótico y antimicótico
- Muestra de membrana celular para medir la viabilidad de las células sembradas en ella

- Isopropanol ácido 0,4% (0,4 mL de HCl + 100 mL de isopropanol)
- PBS (1x)
- Bisturí, pinzas estériles

Protocolo

La metodología para esta técnica se describe brevemente a continuación:

- 1.- Cortar con bisturí y fórceps la muestra de membrana para evaluar. En condiciones estériles. Esta muestra se dividió en tres fracciones y se colocó cada una en un tubo Eppendorf de 1,8 mL que contenía 1 mL de medio.
2. - Añadir 200 µl de MTT para homogeneizar cada uno y cubrir con papel aluminio. Incubar durante 3-4 horas a 37°C.
- 3.- Centrifugar a 5000 rpm, 5 min. Se retira el sobrenadante y se lava con 1 mL de PBS
- 4.- Centrifugado nuevamente a 5.000 rpm, 5 minutos extraer el sobrenadante y añadir 200 µl de Isopropanol ácido
- 5.- Resuspender, tomar sobrenadante para la lectura, si no es el caso, refrigerar perfectamente cubrir con papel de aluminio a -4 ° C hasta la lectura.



Matrices de PLA/HA cubiertas con PPy/I mediante Polimerización por Plasma para la generación de Neotejido Óseo *in vivo*: Estudio en conejo

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 13 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ
DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES
DRA. ATLANTIDA MARGARITA RAYA RIVERA
DR. RAMON GONZALEZ CAMARENA

Bajo la Presidencia de la primera 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: MARIA GUADALUPE FLORES SANCHEZ

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


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

SE
GUADALUPE F.




MARIA GUADALUPE FLORES SANCHEZ
ALUMNA

REVISÓ




LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBI



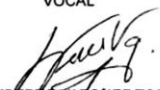
DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTA



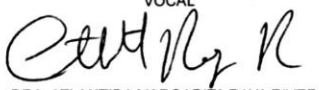
DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

VOCAL



DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES

VOCAL



DRA. ATLANTIDA MARGARITA RAYA RIVERA

SECRETARIO



DR. RAMON GONZALEZ CAMARENA