

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

Desarrollo y caracterización de andamios de poli(L-lactida) e hidroxiapatita generados por electrohilado para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos óseos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A

I.Q. EYLEEN VANESSA MORENO RONDÓN

Tutor: Dr. Ricardo Vera Graziano

México, D. F.

2011

Dr. Ricardo Vera Graziano

Dr. Alfredo Maciel Cerda

Dr. Carlos Álvarez Gayosso



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

En la actualidad existen numerosos problemas de salud referentes a la pérdida de tejido duro causado por enfermedades, accidentes, lesiones entre otros. Los implantes actuales no permiten regenerar el tejido y en algunos casos causan necrosis y apoptosis.

El uso de biomateriales es una herramienta útil en ingeniería de tejidos para la producción de andamios para la regeneración de tejidos en particular tejido óseo. La mezcla de poli(L-lactida) con hidroxiapatita permite obtener un biocompuesto, donde se fusionan las propiedades mecánicas y biológicas de ambos componentes. No obstante, existe una baja interacción entre el polímero y la biocerámica. A pesar de ser la hidroxiapatita un material rígido, no se logra un incremento en las propiedades mecánicas en comparación con el polímero puro. Por otro lado, al disminuir dicha interacción se incrementa la posibilidad de formar aglomerados del biocerámico en el polímero y, en consecuencia se obtienen andamios con presencia de zonas con bajo contenido del componente activo, lo cual puede reducir la citocompatibilidad de las células con el andamio. Por estos motivos, es de vital importancia buscar mejorar la interacción entre la matriz de poli(L-lactida) y las partículas de hidroxiapatita para incrementar las propiedades mecánicas y la respuesta celular.

Es importante resaltar que los andamios para la regeneración de tejido óseo deben cumplir con características específicas y, esto va a depender de la técnica empleada para fabricarlos. Actualmente, el proceso de electrohilado permite obtener de manera económicamente viable y sencilla, andamios altamente porosos utilizando diferentes tipos de polímeros y mezclas.

En vista de los problemas mencionados, en este trabajo se desarrolló un injerto de poli(L-lactida) en la superficie de las nanopartículas de hidroxiapatita. Se evidenció, mediante espectroscopía de infrarrojo y resonancia magnética nuclear, la formación del ion carboxilato generado por la unión entre la hidroxiapatita y la poli(L-lactida). La cantidad de injerto fue 6.13 y 1.81% en peso para la síntesis con y sin catalizador, respectivamente. El injerto mejora la conductividad y colección de las fibras para la fabricación de andamios.

Posteriormente, se prepararon las soluciones de poli(L-Lactida) con hidroxiapatita pura e injertada, se descartó el uso del injerto obtenido con catalizador por su posible citotoxicidad.

Los andamios obtenidos mediante la técnica de electrohilado presentaron fibras continuas y con diámetros homogéneos a lo largo de ellas, con valores entre 500 nm y 1.5µm. De igual forma, mostraron un alto contenido de poros con un porcentaje entre 52 y 73% del área total.

Los andamios con menor contenido de hidroxiapatita injertada, PLLA/HAI_{nj}_4, presentaron mayores valores de propiedades mecánicas en comparación con los otros andamios fabricados de PLLA puro, PLLA con HA y PLLA con HAI_{nj} al 10, 20 y 30% en peso. Tales valores son: módulo de elasticidad de 168 MPa, esfuerzo de cedencia de 2.70 MPa, resistencia a la tensión de 3.93 MPa y deformación a la resistencia de tensión de 103.47%.

Los andamios con 4, 10 y 20% de hidroxiapatita pura e injertada permitieron la adhesión de las células con morfología fibroblastoide con núcleo centrado en el citoesqueleto. La constitución morfológica obtenida es característica de las células que se adhieren exitosamente a un andamio para regeneración de tejido óseo

Los andamios de poli(L-lactida) con 4, 10 y 20% de hidroxiapatita injertada presentaron una estructura y dispersión de hidroxiapatita favorable para la proliferación celular y diferenciación osteoblástica. Las células cultivadas sobre estos andamios, inducidos a la diferenciación osteoblástica, presentaron una respuesta positiva en la maduración de osteoblastos y mineralización de la matriz extracelular ósea.

Con resultados obtenidos se demuestra que la mezcla con un contenido del 4% de hidroxiapatita injertada permite fabricar andamios, mediante el proceso de electrohilado, con altas propiedades mecánicas y excelente respuesta biológica para la regeneración de tejido óseo.

SUMMARY

Nowadays there are numerous health complications linked to loss of hard tissue as a consequence of diseases, accidents, injuries. Current implants do not allow the regeneration of the tissue and in some cases provokes necrosis and apoptosis.

The use of biomaterials is a useful tool in tissue engineering to produce scaffolds for bone tissue regeneration. The poly(L-lactide), PLLA, when mixed with hydroxyapatite, HA, generates a bio-composite material, merging the mechanical and biological properties of the two components. However, there is a low level of interaction between the polymer and the bioceramic. Even though the hydroxyapatite is a rigid material, its mechanical properties cannot be boosted compared to the pure polymer. In addition this poor interaction brings about more possibilities to create highly heterogeneous scaffolds with large areas having a low concentration of the active component. This effect may reduce the cells cytocompatibility with the scaffold. Hence the relevancy of finding ways to improve this interaction between the poly(L-lactide) and hydroxyapatite particles with the underlying objective to rise the mechanical properties and the cell answer.

It is worth mentioning that for the bone tissue regeneration, the scaffolds need to fulfill specific characteristics, which in turn depends on the technique used to produce them. Currently, the electrospinning process provides good results, it is simple and economical and the resulting scaffolds are highly porous, using different types of polymers and mixtures.

Considering those challenges, this work includes grafting poly(L-lactide) on the surface of the hydroxyapatite nano-particles, HAInj. Infra-red and nuclear magnetic resonance spectroscopies results indicated the formation of the chemical link between the components through the carboxylate ion signal. The amount of graft was 6.13% for the synthesis with initiator and 1.81% in weight without it. The results show the positive graft of the poly(L-lactide) on the surface of the hydroxyapatite nano-particles, improving conductivity and fibers collection for the generation of scaffolds.

Subsequently, some solutions of poly(L-Lactide) with pure and grafted hydroxyapatite were prepared but using the graft obtained with catalyst proved to be misleading due to potential citotoxicity.

The scaffolds obtained through the electrospinning technique showed continuous fibers with homogenous diameters, between 500 nm and 1.5µm. and a high porosity percentage, between 52 and 73% of the total area.

The scaffolds with lower content of grafted hydroxyapatite, PLLA/HAIinj_4, displayed higher mechanical properties values compared to scaffolds made with pure PLLA, PLLA with HA and PLLA with HAIinj weighing 10, 20 and 30%. Those values are: tensile modulus of 168 MPa, yield point of 2.70 MPa, tensile strength of 3.93 MPa and elongation under tensile strength of 103.47%.

The scaffolds with 4, 10 and 20% of pure and grafted hydroxyapatite allowed the adherence to fibroblastoid cells with the nucleus centered on the cytoskeleton. The resulting morphology is typical of those cells adhering to a scaffold for bone tissue regeneration.

The scaffolds with 4, 10 and 20% of grafted hydroxyapatite showed a structure and diffusion of hydroxyapatite favourable to cell proliferation and osteoblastic differentiation. Cells cultivated on those scaffolds, led to osteoblastic differentiation, showed positive results with regards to osteoblasts development and the extracellular matrix mineralization.

The conclusion of this work proves that the mixing with a 4% grafted hydroxyapatite leads to the development of scaffolds, through the electrospinning technique, with high mechanical properties and excellent biological answer for bone tissue regeneration.

DEDICATORIA

Este libro se lo dedico a todos los seres que han contribuido en mi crecimiento espiritual.

A DIOS el ser supremo que me ha bendecido y rodeado de personas tan maravillosas en el camino de la vida y ha permitido que cada una de ellas me enseñe el valor de vivir y crecer espiritualmente.

A mi madre Omaira y mi padre Omar que gracias ustedes soy una persona con valores y principios. Los cuales me han permitido con fortaleza y valentía subir cada uno de los peldaños que me han traído a este gran logro. Gracias por guiar y respetar mis decisiones, por las palabras de aliento, por los abrazos y besos de apoyo, todo lo que soy se lo debo a ustedes. Los Amo y agradezco a DIOS por dárme los como padres.

Mi hermanita de cuartel, mi Jovys querida por ser una hermana ejemplar siempre aguerrida, inteligente, divertida, sincera y llena de amor. Por todos los momentos que pasamos juntas y por los que nos faltan por vivir.

Mis hermanitos “los Omares”, Andrew y Omar, los quiero mucho y me han demostrado que son el ejemplo de hermanos donde la unión hace la fuerza. Gracias por las palabras, besos y por demostrarme que la confianza, unión, el respeto y apoyo son esenciales para vivir en paz. Gracias Andrew por ser el padre de tan linda princesa y a ti Omar por ser el padrino consentidor.

A ti Mariette Valeria por ser la nena más hermosa del mundo y porque has llegado a traer paz a nuestra familia. Hoy y siempre recordaré que me diste tanta felicidad y energía una noche cuando las luces parecían apagarse, te quiero mucho y gracias por nacer.

A mi nonita flor, mi ejemplo a seguir, esa mujer sabia, fuerte, inteligente, sincera, amorosa y audaz. Gracias nonita por todas las enseñanzas y consejos, que solo una madre los dice desde su corazón. Eres la flor más linda en el jardín de la vida, la que nunca se marchita.

A ti Clément Le Gouvello, por ser este chico intrépido que llegó a mi vida para hacerla más armoniosa. Gracias por enseñarme que existen prioridades y mostrarme que la vida está compuesta de múltiples colores donde su combinación crea la verdadera felicidad.

A mis lindos bebés, Samuel “El chato”, Shaggy “El abuelo”, Lucas “El gordo”, Tato “Tatico”, Thomas “Lilo” y Lulú “Linda”, gracias por cada ladrido, corrida, lengüetazo, mordida y sobre todo por ser mis oídos externos. Luquitas y tatico los llevo siempre en mi corazón y sé que en el paraíso perruno corren de felicidad.

Gracias a todos por enseñarme a ser como una flor de loto, que ante los problemas debo ser fuerte y valiente. Ustedes son los seres más especiales que DIOS me ha dado, son como El Zahir, no pasaron desapercibidos en mi vida LOS AMO.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Ricardo Vera Graziano por su dirección y apoyo en el proyecto, por ser una persona transparente y humana. Siempre llevando la investigación de la mano con los valores humanos. Gracias por sus consejos y apreciaciones, por mostrarme que toda situación y resultados siempre dejan enseñanzas positivas.

Al Dr. Alfredo Maciel Cerda por su hospitalidad al momento de mi llegada a México, por su apoyo en la gestión de lo requerido para llevar a cabo mi proyecto de maestría. Gracias por su colaboración, por brindarme una amistad y, por conocer a mi familia que tanto lo aprecia.

Al Dr. Carlos Álvarez Gayosso por su orientación y análisis realizados durante el desarrollo del proyecto. De igual manera, por su apoyo y colaboración en préstamo de equipos de laboratorios para la separación de muestras.

Al Dr Raúl Montiel Campos por traer al grupo de investigación sus ideas innovadoras, su ingenio, por inducirnos en el mundo nano donde aunque no se vea ahí está. Gracias por enseñarnos que para todo existe solución y se logra dejando volar la imaginación.

A la Dra Lizeth Fuentes Mera y Q.F.B. Margarita Leyva por su apoyo en las pruebas biológicas. Gracias especialmente a la Dra Lizeth por enseñarme que la vida está llena de escalones y para subir cada uno de ellos es necesario estar en equilibrio.

Al Dr Francisco Sánchez Arévalo y al M en C Edwin Gómez por su apoyo en las pruebas mecánicas. Gracias Edwin por orientar una parte de mi investigación y, por los consejos que han sido muy fructíferos. El hombre sabio no es aquel que todo lo sabe, es aquel que puede planear su futuro con medida.

Al jurado Dra María Cristina Piña, Dr Ricardo Vera Graziano, Dra Lizeth Fuentes Mera, Dra Loudmila Fomina y Dr Ernesto Rivera, por disponer de su tiempo para la revisión de este trabajo.

Al Dr. Filiberto Rivera y M en C Cristóbal García por su orientación en el uso de material de laboratorio y por sus dedicadas explicaciones sobre síntesis y caracterización de materiales.

Al grupo de investigación: Dr Ricardo Vera, Dr. Alfredo Maciel, Dr Raúl Montiel, M en C Edwin Gómez, M en C Cristóbal García, estudiantes de maestría Alida Ospina, Evelyn, Lizeth y Nohemi, y estudiantes de licenciatura Rodolfo y Eulises porque cada uno de ustedes ha contribuido al crecimiento del grupo en el ámbito académico y personal. Gracias por hacer los seminarios amenos, productivos y divertidos.

Al Dr Juan Paulo Hinestroza con incursionar al grupo de investigación en el desarrollo de andamios electrohilados y por su colaboración en la construcción del equipo.

A la Dra Mónica Castillo por su colaboración en mi estancia en la universidad de sonora, por su hospitalidad y confianza.

A los técnicos académicos del Instituto de Investigaciones en Materiales: Omar Novelo, Esteban Fregoso, Gerardo Cedillo, Miguel Canseco y Erika Contreras por su apoyo en las pruebas de microscopía electrónica de barrido, análisis termogravimétrico, resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojo y análisis superficial, respectivamente.

Al biólogo Gabriel Orozco Hoyula del Instituto de Fisiología Celular por su colaboración en la toma de imágenes por microscopía confocal.

Al Ingeniero José de Jesús Camacho por gestionar y agilizar cada uno de los trámites requeridos para la fabricación de equipos y material para el laboratorio.

A Griselda Pablo Trinidad y Leticia Barrera Resendiz por su atención y colaboración en trámites administrativos requeridos para la evolución de mi proyecto de maestría. También por compartirme una sonrisa, un abrazo, un detalle y por todos los momentos vividos.

A Señor Miguel Pineda por su colaboración en el apoyo de diseño y fabricación de material requerido en el laboratorio.

A la licenciada Teresa Vasquez por los servicios bibliotecarios prestados y su colaboración en la búsqueda de información.

A mis amigos y amigas Ira, Nini, Adri, Carlitos, Jairsillo, Luis y Pablito por ser unas grandes personas transparentes y sinceras que me apoyaron moral y espiritualmente para alcanzar este gran logro.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por abrirme sus puertas y permitirme continuar mi preparación profesional.

Al Posgrado de Ciencia e Ingeniería de Materiales por aceptarme como estudiante de maestría, por los trámites para mi estadía y por brindarme apoyo económico en la participación de eventos, estancia y material de laboratorio. Gracias especialmente al Dr Tatsuo Akashi, actual coordinador, por todo el apoyo brindado.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM por su organización y permitir el uso de sus instalaciones para que los estudiantes tengamos la posibilidad de adquirir nuevo conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por otorgarme la beca durante el periodo de la maestría.

Al Espacio Común de Educación Superior de la UNAM, ECOES-UNAM, por brindarme la beca para mi estancia de investigación en la Universidad de Sonora.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, ICyTDF, por otorgar al Dr Ricardo Vera Graziano el proyecto número 180/2009, el cual proporcionó fondos para la compra de material y equipos de laboratorio y, complementos de becas.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT; por otorgar al Dr. Ricardo Vera Graziano el proyecto número IN116809-3, con el cual se realizaron las compras de equipos y materiales para el laboratorio.

INDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABLAS	xix
Capítulo 1.	
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	1
JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
Capítulo 2.	
FUNDAMENTO TEÓRICO	6
2.1 Tejido óseo.....	6
2.1.1 Generalidades	6
2.1.2 Biomecánica del tejido óseo	7
2.1.3 Células óseas.....	10
2.1.4 Regulación del remodelado óseo	12
2.2 Ingeniería de Tejidos	13
2.2.1 Generalidades	13
2.2.2 Andamios para regeneración ósea.....	14

2.3 Técnicas para la fabricación de andamios para regeneración de tejidos	17
2.3.1 Electrohilado	18
2.4 Biomateriales para regeneración ósea.....	21
2.4.1 Metales.....	21
2.4.2 Cerámicos	22
2.4.3 Polímeros	23
2.4.4 Materiales Compuestos.....	25
2.5 Hidroxiapatita	26
2.5.1 Características estructurales de la hidroxiapatita	27
2.5.2 Propiedades de la hidroxiapatita.....	30
2.5.3 Aplicaciones biomédicas de la hidroxiapatita.....	31
2.6 Poli(ácido láctico).....	31
2.6.1 Ácido Láctico	31
2.6.2 Lactida	32
2.6.3 Síntesis de poli(ácido láctico).....	32
2.6.4 Propiedades del poli(ácido láctico).....	36
2.6.5 Aplicaciones Biomédicas del poli(ácido láctico).....	37
 Capítulo 3	
MATERIALES Y METODOLOGÍA	38
3.1 Materiales.....	38
3.1.1 Reactivos para síntesis y proceso de electrohilado	38
3.1.2 Reactivos para pruebas biológicas.....	38
3.2 Metodología.....	39
3.2.1 Polimerización por apertura de anillo de L-lactida en presencia de nanocristales de hidroxiapatita	39

3.2.2 Preparación de soluciones poliméricas de PLLA.....	41
3.2.3 Preparación de las mezclas de PLLA con hidroxiapatita pura e injertada	41
3.2.4 Proceso de electrohilado	42
3.2.5 Parámetros del proceso de electrohilado para las soluciones y las mezclas compuestas.....	43
CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN	44
3.2.6 Espectroscopía de infrarrojo.....	44
3.2.7 Resonancia magnética nuclear de Carbono 13 y Fósforo 31.....	44
3.2.8 Análisis termogravimétrico	44
CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS.....	45
3.2.9 Conductividad eléctrica de las soluciones poliméricas y mezclas compuestas.	45
3.2.10 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	45
3.2.11 Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).....	45
3.2.12 Determinación del diámetro promedio de las fibras y porcentaje de área porosa de los andamios.	46
3.2.13 Caracterización Mecánica	52
3.2.14 Caracterización Biológica.....	56
Capítulo 4	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
4.1 Caracterización de la hidroxiapatita injertada (HAI _n)	60
4.1.1 Espectroscopía de Infrarrojo	60
4.1.2 Caracterización por resonancia magnética nuclear de ¹³ C.....	68
4.1.3 Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ³¹ P.....	70
4.1.4 Porcentaje de injerto por termogravimetría	71
4.2 Parámetros para la obtención de andamios electrohilados a partir de las soluciones de PLLA. ...	76
4.2.1 Efecto de la concentración, flujo de inyección y diferencia de potencial sobre la morfología de las fibras.....	76

4.3 Caracterización de los andamios electrohilados de PLLA con hidroxiapatita pura e injertada	83
4.3.1 Variación de la conductividad de las soluciones de PLLA con el incremento de hidroxiapatita pura e injertada.....	83
4.3.2 Evaluación de la morfología de las fibras con hidroxiapatita pura e injertada.....	84
4.3.3 Distribución de hidroxiapatita en las fibras de PLLA	91
4.4 Caracterización mecánica.....	92
4.4.1 Comportamiento mecánico de los andamios de PLLA.....	92
4.4.2 Comportamiento mecánico de andamios de PLLA/HA	98
4.4.3 Comportamiento mecánico de andamios de PLLA/HAIinj.....	100
4.4.4 Comparación morfológica y mecánica de los andamios de PLLA/HA y PLLA/HAIinj.....	102
4.5 Caracterización Biológica.....	112
4.5.1 Análisis de la organización del citoesqueleto y presencia de vinculina en las células madre mesenquimales cultivadas sobre los andamios.	112
4.5.2 Evaluación de la capacidad de proliferación de las células madre mesenquimales cultivadas sobre los andamios.....	116
4.5.3 Evaluación de la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales cultivadas sobre los andamios.....	122
CONCLUSIONES.....	126
PERSPECTIVAS	128
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
ANEXO 1.	
ESPECTROS FTIR Y TGA.....	139
ANEXO 2.	
TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	149
Espectroscopía de Infrarrojo (IR).....	149
Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	152

Análisis termogravimétrico (TGA).....	154
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	155
Conductividad eléctrica (CE)	156
Propiedades Mecánicas.....	157
Propiedades Biológicas.....	162

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1. Organización jerárquica del hueso a diferentes escalas. (a) Capa compacta calcificada en la zona exterior del hueso, (b) sistema de harvest u osteonas en la capa externa, (c) célula rodeada de receptores de membrana celular y (d) nanoarquitectura de la matriz extracelular	7
Figura 2.2. Curva esfuerzo-deformación de hueso cortical, su módulo de elasticidad y esfuerzo de ruptura aumentan con el incremento de la velocidad de deformación.....	9
Figura 2.3. Curva de esfuerzo-deformación del hueso esponjoso.....	10
Figura 2.4. Tipos de células presentes en el tejido óseo.....	11
Figura 2.5. Representación esquemática del enfoque de la ingeniería de tejidos. Población de células específicas son cultivadas en andamios, posteriormente son implantadas en el paciente.....	14
Figura 2.6. Micrografía de hueso trabecular	16
Figura 2.7. Equipo de Electrohilado Básico (a) Vertical y (b) Horizontal.....	19
Figura 2.8. Formación de cono de Taylor. El voltaje incrementa en cada etapa hasta alcanzar el equilibrio entre la tensión superficial y la fuerza electrostática en la etapa 3.	20
Figura 2.9. Polarización de la solución polimérica en la formación del cono de Taylor	21
Figura 2.10. Propiedades Mecánicas de varios biomateriales.....	26
Figura 2.11. Composición del Hueso.....	27
Figura 2.12. Estructura reticular de los hidróxidos de calcio	27
Figura 2.13. Celda unitaria de la hidroxiapatita	28
Figura 2.14. Estructura de la hidroxiapatita a lo largo del eje c	29
Figura 2.15. Esfera de coordinación Ca_I-O	29
Figura 2.16. Esfera de coordinación $Ca_{II}-O$	29
Figura 2.17. Enantiómeros de ácido láctico.....	32
Figura 2.18. Esteroisómeros de Lactida	32
Figura 2.19. Métodos de síntesis para la obtención de poli(ácido láctico) de alto peso molecular.	33
Figura 2.20. Polimerización por apertura de anillo aniónica	34
Figura 2.21. Reacción de depolimerización	34
Figura 2.22. Polimerización por apertura de anillo catiónica.	35
Figura 2.23. Polimerización por apertura de anillo mediante coordinación-inserción.....	36

Capítulo 3.

Figura 3.1. Montaje de reflujo para la reacción de injerto.....	40
Figura 3.2. Equipo de electrohilado fabricado en el laboratorio.....	43
Figura 3.3 Procedimiento para la determinación del diámetro promedio empleando Image J.....	47
Figura 3.4. Procedimiento para la determinación del porcentaje de área promedio.....	49
Figura 3.5. Máquina de ensayo de tensión Minibionix.....	52
Figura 3.6. Curva esfuerzo-deformación.....	53
Figura 3.7. Ampliación zona elástica de la curva esfuerzo-deformación para determinar el módulo elástico.....	54
Figura 3.8 Determinación esfuerzo de cedencia de la curva-esfuerzo deformación.....	55
Figura 3.9. Determinación de la resistencia a la tensión y su deformación.....	55
Figura 3.10. Microscopio de epifluorescencia acoplado con un láser confocal.....	58

Capítulo 4

Figura 4.1. Espectro infrarrojo de hidroxiapatita.....	61
Figura 4.2. Espectro infrarrojo de poli(L-lactida).....	63
Figura 4.3. Espectro de Infrarrojo RLA-HA50.....	64
Figura 4.4. Comparación espectros IR de síntesis con catalizador.....	66
Figura 4.5. Comparación espectros IR de síntesis en ausencia de catalizador.....	67
Figura 4.6. Espectros RMN ¹³ C de LLA (imagen A) y PLLA (imagen B).....	68
Figura 4.7. Espectros RMN ¹³ C de RLA-HA50-C (imagen superior) y RLA-HA50 (imagen inferior).....	69
Figura 4.8. Espectros RMN ³¹ P de HA, RLA-HA50-C y RLA-HA50.....	71
Figura 4.9. Termogramas TGA de los injertos con catalizador.....	72
Figura 4.10. Termogramas TGA de los injertos sin catalizador.....	73
Figura 4.11. Termograma TGA y la primera derivada de RLA-HA10.....	74
Figura 4.12. Termograma TGA y la primera derivada de RLA-HA50-C.....	74
Figura 4.13. Termograma TGA y la primera derivada de RLA-HA50.....	75
Figura 4.14. Efecto de la variación de la concentración y el flujo de inyección con la diferencia de potencial en 25kV. (A) 10%p/v – 0.6mL/h; (B) 10%p/v – 0.8mL/h; (C) 12%p/v – 0.6mL/h; (D) 12%p/v – 0.8mL/h; (E) 13%p/v – 0.6mL/h; (F) 13%p/v – 0.8mL/h; (G) 16%p/v – 0.6mL/h; (H) 16%p/v – 0.8mL/h. Micrografías de 10000 aumentos, escala de 1µm.....	78
Figura 4.15. Determinación de la distribución de diámetro de las fibras: (A)13%p/v – 0.6mL/h, (B) 16%p/v – 0.6mL/h; y porcentaje de área porosa: (C) 13%p/v – 0.6mL/h, (D) 16%p/v – 0.6mL/h. Micrografías de 10000 (A y B) y 2000 (C y D) aumentos, escala de 1 y 10µm, respectivamente.....	79

Figura 4.16. Efecto de la variación de la concentración y el voltaje aplicado con un flujo de inyección de 0.6mL/h. (A) 10%p/v – 15kV; (B) 10%p/v – 25kV; (C) 13%p/v – 15kV; (D) 13%p/v – 25kV; (E) 15%p/v – 15kV; (F) 15%p/v – 25kV; (G) 16%p/v – 15kV; (H) 16%p/v – 25kV. Micrografías de 5000 aumentos, escala de 1µm.....	81
Figura 4.17. Determinación de distribución de diámetro de las fibras: (A) 15%p/v – 15kV, (B) 16%p/v – 15kV; y porcentaje de área porosa: (C) 13%p/v – 15kV, (D) 16%p/v – 15kV. Micrografías de 10000 (A y B) y 2000 (C y D) aumentos, escalas de 1 y 10 µm, respectivamente.	82
Figura 4. 18. Conductividad eléctrica de las mezclas de PLLA con hidroxiapatita pura e injertada.	84
Figura 4.19. Micrografías de membranas obtenidas con las soluciones (A) PLLA/HA_10; (B) PLLA/HAInj_10; (C) PLLA/HA_20; (D) PLLA/HAInj_20; (E) PLLA/HA_30; (F) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 2000 aumentos y escala de 10µm.....	86
Figura 4.20. Micrografías de andamios electrohilados para determinación de porosidad: (A) PLLA; (B) PLLA/HA_4; (C) PLLA/HAInj_4; (D) PLLA/HA_10; (E) PLLA/HAInj_10; (F) PLLA/HA_20; (G) PLLA/HAInj_20; (H) PLLA/HA_30; (I) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 2000 aumentos, escala de 10µm.....	89
Figura 4.21. Micrografías de andamios electrohilados para determinación de diámetro promedio: (A) PLLA; (B) PLLA/HA_4; (C) PLLA/HAInj_4; (D) PLLA/HA_10; (E) PLLA/HAInj_10; (F) PLLA/HA_20; (G) PLLA/HAInj_20; (H) PLLA/HA_30; (I) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 10000 aumentos, escala de 1µm.....	90
Figura 4. 22. Distribución de calcio (Ca) y fósforo (P) para los andamios PLLA/HA (imágenes A y C) y PLLA/HAInj (imágenes B y D) empleando la técnica EDS.	91
Figura 4.23. Curva esfuerzo-deformación de los andamios de PLLA.....	92
Figura 4.24. Desviaciones pequeñas en el comportamiento elástico en la zona I.	93
Figura 4.25. Micrografía de defectos en andamios de PLLA con distribución aleatoria.	94
Figura 4.26. Determinación del esfuerzo de cedencia y presencia de la zona pseudoplástica.	95
Figura 4.27. Alineación de las fibras en la zona plástica de la curva esfuerzo-deformación.....	96
Figura 4.28. Ampliación zona III de la curva esfuerzo-deformación.....	96
Figura 4.29. Módulo elástico de andamios de PLLA.	97
Figura 4.30. Esfuerzo de cedencia de andamios de PLLA	98
Figura 4.31. Esfuerzo último de los andamios de PLLA.....	98
Figura 4.32. Curvas esfuerzo-deformación de los andamios con hidroxiapatita pura (A) PLLA/HA_4, (B) PLLA/HA_10; (C) PLLA/HA_20 y (D) PLLA/HA_30	99
Figura 4.33. Curvas esfuerzo-deformación de andamios con hidroxiapatita pura (A) PLLA/HAInj_4; (B) PLLA/HAInj_10; (C) PLLA/HAInj_20 y (D) PLLA/HAInj_30	101

Figura 4.34. Comparación de membranas electrohiladas con hidroxiapatita pura e injertada: (A) PLLA/HA_4, (B) PLLA/HAInj_4, (C) PLLA/HA_10, (D) PLLA/HAInj_10, (E) PLLA/HA_20; (F) PLLA/HAInj_20, (G) PLLA/HA_30; (H) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 1000 aumentos, escala de 1µm.	103
Figura 4.35. Determinación de la distribución de diámetro de las fibras:(A) PLLA/HA_4; (B) PLLA/HA_10, (C) PLLA/HA_20 y (D) PLLA/HA_30. Micrografías 10000 aumentos, escala 1 µm.	104
Figura 4.36. Determinación de la distribución de diámetro de las fibras:(A) PLLA/HAInj_4i, (B) PLLA/HAInj_10, (C) PLLA/HAInj_20 y (D) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 10000 aumentos, escalas de 1 µm.	105
Figura 4.37. Determinación del porcentaje de área porosa de los andamios: (A) PLLA/HA_4, (B) PLLA/HA_10, (C) PLLA/HA_20, (D) PLLA/HA_30, (E) PLLA/HAInj_4, (F) PLLA/HAInj_10, (G) PLLA/HAInj_20 y (H) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 2000 aumentos, escala de 10 µm.	106
Figura 4.38. Módulo elástico en relación al porcentaje de HA o HAIInj.....	108
Figura 4.39. Esfuerzo de cedencia de andamios de PLLA/HA y PLLA/HAInj	109
Figura 4. 40. Resistencia a la tensión de los andamios con hidroxiapatita pura e injertada.....	110
Figura 4.41. Deformación al esfuerzo último de los andamios con HA y HAIInj.....	110
Figura 4.42. Comparación curvas esfuerzo-deformación PLLA, PLLA/HA_4 y PLLA/HAInj_4	111
Figura 4.43. Inmunofluorescencia para observar la presencia de vinculina en la CMM cultivadas sobes los andamios de PLLA, PLLA/HA_4, PLLA/HA_10, PLLA/HA_20 y PLLA/HA_30. Panel izquierdo núcleos teñidos con DAPI. Panel central morfología celular. Panel derecho colocación del componente celular sobre el andamio.	114
Figura 4.44. Gráfico de barras de absorbancia para la evaluación de la proliferación celular sobre los andamios, en un periodo de 4 días.....	119
Figura 4.45. Gráfico de barras de absorbancia para la evaluación de la proliferación celular inducida con dexametasona sobre los andamios, en un periodo de 4 días.....	122
Figura 4.46. Concentración de rojo de alizarina en células cultivadas en DMEM	123
Figura 4.47. Comparación de la concentración de rojo de alizarina en células cultivadas en andamios inducidos a la diferenciación, andamios no inducidos a la diferenciación osteoblástica y andamios en ausencia de cultivo celular:.....	124
Figura 4.48. Concentración de rojo de alizarina en células cultivadas sobre andamios de PLLA/HA y PLLA/HAInj inducidos con DEX.	125

Anexo 1.

Figura A1.1. Espectro de Infrarrojo RLA-HA10-C.....	140
---	-----

Figura A1.2. Espectro de Infrarrojo RLA-HA30-C.....	141
Figura A1.3. Espectro de Infrarrojo RLA-HA50-C.....	142
Figura A1.4. Espectro de Infrarrojo RLA-HA70-C.....	143
Figura A1.5. Espectro de Infrarrojo RLA-HA100-C.....	144
Figura A1.6. Espectro de Infrarrojo RLA-HA10.....	145
Figura A1.7. Espectro de Infrarrojo RLA-HA100.....	146
Figura A1.8. Espectro infrarrojo de la mezcla física PLLA con HA	147
Figura A1.9. Termograma de PLLA sintetizado	148
Figura A1.10. Termograma de L-lactida	148

Anexo 2.

Figura A2.1. Vibraciones fundamentales de tensión y flexión	150
Figura A2.2. Método de reflexión múltiple	152
Figura A2.3. Orientación de los núcleos en presencia de un campo magnético	153
Figura A2.4. Termograma o curva termogravimétrica	155
Figura A2.5. Esquema general de un microscopio electrónico de barrido.....	156
Figura A2.6. Puente Wheastone para medir la conductividad.....	157
Figura A2.7. Fuerzas externas: (a) tensión, (b) compresión, (c) cortante y (d) torsión	157
Figura A2.8. Comparación curva esfuerzo-deformación real e ingenieril.....	159
Figura A2.9. Curva esfuerzo-deformación para materiales ingenieriles.	160
Figura A2.10. Ensayo de tensión mediante puente o cabeza móvil.....	162
Figura A2.11. Diferenciación de células madres mesenquimales	163

LISTA DE TABLAS

Capítulo 2.

Tabla 2.1. Requerimientos generales para andamios en regeneración de tejido óseo.....	17
Tabla 2.2. Algunos polímeros comunes en aplicaciones biomédicas	25
Tabla 2.3. Propiedades físicas de la hidroxiapatita	30

Capítulo 3.

Tabla 3.1. Condiciones de reacción en 10mL de xileno durante 18 horas.....	40
Tabla 3.2. Soluciones de PLLA	41
Tabla 3.3. Mezclas de PLLA con HA y HAInj	42
Tabla 3.4. Condiciones de electrohilado soluciones de PLLA	43
Tabla 3.5. Número de probetas por andamio electrohilado	53

Capítulo 4.

Tabla 4.1. Asignación de señales infrarrojo de hidroxiapatita.....	60
Tabla 4.2. Asignación de Señales infrarrojas del poli(L-lactida)	62
Tabla 4.3. Señales de RMN ¹³ C de LA, PLLA, RLA-HA50-C y RLA-HA50.....	70
Tabla 4.4. Pérdida de peso en las muestras injertadas	75
Tabla 4.5. Conductividades eléctricas de las soluciones y mezclas	84
Tabla 4.6. Determinación de diámetro promedio de las fibras y porosidad en las membranas.....	88
Tabla 4.7. Características de la deformación mecánica de los andamios de PLLA	97
Tabla 4.8. Propiedades mecánicas de los andamios de PLLA/HA, se reporta PLLA como referencia.....	100
Tabla 4.9. Propiedades mecánicas de los andamios de PLLA/HAInj, se reporta PLLA como referencia.	101
Tabla 4.10. Diámetro promedio y porcentaje de área porosa para andamios con refuerzo HA y HAInj. Se reporta los resultados de los andamios de PLLA como referencia.	107
Tabla 4.11. Registro de la cantidad celular medida con absorbancia	116
Tabla 4.12. Evaluación de la proliferación de los andamios en presencia de DMEM durante 4 días.	117
Tabla 4.13. Evaluación de la proliferación de los andamios en presencia de dexametasona (DEX), durante 4 días.	120

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

La ingeniería de tejidos ofrece la posibilidad de ayudar a la regeneración del tejido dañado por enfermedad o lesión y, en algunos casos, crear un nuevo tejido y reemplazar órganos con disfunciones [1-6]. Esto se consigue con el apoyo de materiales bioactivos y biodegradables que inducen el crecimiento celular [7-11]. El procesamiento de estos materiales permite obtener andamios (“scaffolds” en inglés) o soportes temporales de células trasplantadas.

La selección de un material adecuado para producir un andamio es un factor importante dado que sus propiedades intrínsecas determinarán en gran extensión las características finales del andamio [12]. No obstante, el método de producción influirá profundamente en sus propiedades ya que el tipo y grado de porosidad, las características mecánicas, la degradabilidad, las propiedades superficiales e incluso la biocompatibilidad del material depende de buena medida del proceso para elaborar el andamio [13-15].

Las mejoras a la microestructura incluyen variaciones espaciales en la morfología porosa para ayudar la orientación de las células o variaciones en las propiedades superficiales para facilitar la adhesión y/o migración celular. Asimismo los andamios deben proveer actividad biológica para inducir la respuesta de migración y proliferación a las poblaciones de células cercanas. Otros requerimientos necesarios en andamios son: propiedades mecánicas similares al tejido, permeabilidad macromolecular, fácil procesabilidad y biodegradabilidad [16].

El objetivo principal en la restauración de un tejido implica recuperar su funcionamiento y estructura natural, esto se logra con la aplicación de andamios temporales. Un andamio biodegradable adecuado permite reemplazar gradual y ordenadamente el tejido óseo en el proceso de regeneración [17].

Las técnicas tradicionales de elaboración de andamios difícilmente proporcionan la morfología y porosidad requerida para que las células se puedan adherir a ellos, proliferar y diferenciarse. En cambio, la técnica de electrohilado (“electrospinning” en inglés), permite fabricar andamios de diversos polímeros y mezclas que cumplen con las características requeridas en el campo de la biomedicina [18-20].

En la actualidad el desarrollo de materiales compuestos para aplicaciones biomédicas ha sido ampliamente estudiado. La mezcla de biomateriales, tales como polímeros biodegradables y biocerámicos ha permitido obtener biocompuestos con propiedades similares a las del tejido óseo [21].

La hidroxiapatita es una biocerámica ampliamente usada para regeneración de hueso por su alta bioactividad [22-23]. Sin embargo, en biomedicina es aplicada únicamente en zonas donde no se requiere soportar alta carga. Esto último impide su uso directo para restaurar tejido óseo [24].

En contraste, la poli(L-lactida) es un poliéster alifático biodegradable y biocompatible. Este polímero presenta excelentes propiedades mecánicas [25]. Sin embargo, su uso en ingeniería de tejidos se ha limitado por la baja bioactividad que presenta para promover crecimiento celular y regenerar tejido, así como su alta hidrofiliidad [26-27].

La mezcla de poli(L-lactida) e hidroxiapatita permite obtener los denominados biocompuestos, estos materiales ofrecen ventajas de resistencia mecánica, biocompatibilidad y biodegradabilidad [28]. La biocerámica le proporciona bioactividad al polímero, lo cual genera un microambiente para las células madres mesenquimales [29-31]. No obstante, este compuesto presenta limitantes mecánicas causadas por la baja compatibilidad de la matriz polimérica con la biocerámica [32-34].

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, los materiales compuestos de polímeros biodegradables con cerámicas bioactivas han atraído considerablemente la atención en el desarrollo de andamios para aplicaciones en biomedicina. La combinación tanto de las propiedades mecánicas como biológicas favorece la regeneración de tejido óseo [28-31].

Los andamios deben cumplir con características específicas, tales como: diseños estructurales con poros interconectados, materiales biológicamente activos, permitir esterilización, ser biocompatibles, poseer biodegradabilidad, y tener propiedades mecánicas que soporten la carga antes y durante el proceso de cicatrización. En el desarrollo de este tipo de andamios es importante, tanto la selección de los materiales como el método de fabricación [12-16]

La técnica de electrohilado es un método empleado para fabricar andamios, a partir de soluciones poliméricas o mezclas, que permite mitigar las características de la matriz extracelular ósea [18-19, 35-36].

Recientes estudios han demostrado que la hidroxiapatita es la cerámica bioactiva que mejores resultados presenta en crecimiento celular [23-24, 37]. Por otra parte, la poli(L-lactida) es ampliamente usada en aplicaciones biomédicas por su biocompatibilidad, así como su biodegradabilidad, ya que los subproductos de degradación no generan toxicidad y son excretados por el organismo humano [17, 25, 38]. La combinación de estos dos materiales permite generar un material compuesto altamente calificado para aplicaciones biomédicas. Este material ofrece ventajas de resistencia mecánica, biocompatibilidad y biodegradabilidad [39].

Aunque la hidroxiapatita le proporcione bioactividad al andamio; este compuesto presenta fallas en sus propiedades mecánicas causadas por la baja compatibilidad entre la matriz polimérica y las partículas de biocerámica [32-34]. Esto ha llevado a que varios autores planteen diversos métodos para solucionar esta incompatibilidad y, entre estos la polimerización por apertura de anillo de la L-lactida sobre la superficie de partículas de hidroxiapatita en presencia de octoato de estaño [32-33, 40-41]. Sin embargo, el uso de la poli (L-lactida), sintetizada con catalizadores metálicos, en aplicaciones biomédicas se ve limitada por la citotoxicidad que generan las trazas metálicas en el organismo humano [42-43].

No se ha encontrado en la literatura, investigaciones relacionadas con la polimerización de L-lactida en la superficie de nanopartículas de hidroxiapatita en ausencia de catalizador, ni se han evaluado las propiedades mecánicas ni biológicas de los andamios electrohilados, empleando este tipo de injerto, para aplicaciones en regeneración de tejido óseo.

OBJETIVOS

En la búsqueda de andamios adecuados para regeneración de tejido óseo, a partir de biomateriales, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

➤ OBJETIVO GENERAL

Desarrollar andamios de poli(L-lactida) con nanopartículas de hidroxiapatita pura e injertada y, caracterizarlos mecánica y biológicamente, para determinar su potencial aplicación en ingeniería de tejidos óseos.

➤ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Injertar poli(L-lactida) en la superficie de las nanopartículas de hidroxiapatita, y caracterizar el producto obtenido mediante espectroscopía de infrarrojo, resonancia magnética nuclear de carbono 13 y fósforo 31 y análisis termogravimétrico.
2. Optimizar las condiciones del proceso de electrohilado y concentración de la solución de poli(L-lactida) con la finalidad de obtener andamios homogéneos.
3. Desarrollar andamios compuestos de poli(L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada a diferentes concentraciones.
4. Caracterizar mecánicamente los andamios obtenidos mediante la evaluación del módulo elástico, esfuerzo de cedencia, resistencia a la tensión y deformación a la resistencia a la tensión.
5. Caracterizar biológicamente los andamios mediante la evaluación de su capacidad para estimular la proliferación, adhesión y diferenciación celular.

Capítulo 2

FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Tejido óseo

2.1.1 Generalidades

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado y altamente vascularizado que continuamente se está remodelando en el transcurrir de la vida del ser humano [46]. Éste juega un rol importante en la locomoción, el esqueleto posee una adecuada capacidad de soportar carga y actúa como protector de los órganos del cuerpo [8].

El hueso es un material compuesto constituido de una variedad de tipos de células y una matriz orgánicas que están fuertemente asociados a una matriz de minerales de calcio hidratados (principalmente fosfatos de calcio en forma de hidroxiapatita). La matriz orgánica consiste principalmente de colágeno (alrededor del 95%), los componentes orgánicos restantes 5% son proteoglicanos y proteínas no colagenosas [9, 16].

Al igual que todos los órganos del cuerpo, el hueso tiene una organización jerárquica que abarca órdenes de magnitud de escala macro (centímetro) hasta componentes nanoestructurados (matriz extracelular), ver figura 2.1. Como muchos materiales compuestos, la integración de los minerales en la matriz orgánica permite al hueso poseer mejores propiedades mecánicas en comparación con las propiedades de sus componentes puros, es decir el uso de los minerales (material frágil) o la matriz orgánica (material elástico) por separado [16]. En adición a sus funciones estructurales, el hueso está íntimamente envuelto en la homeostasis a través del almacenaje de iones de calcio (Ca) y fósforo (P) y la regulación de electrolitos en la sangre.

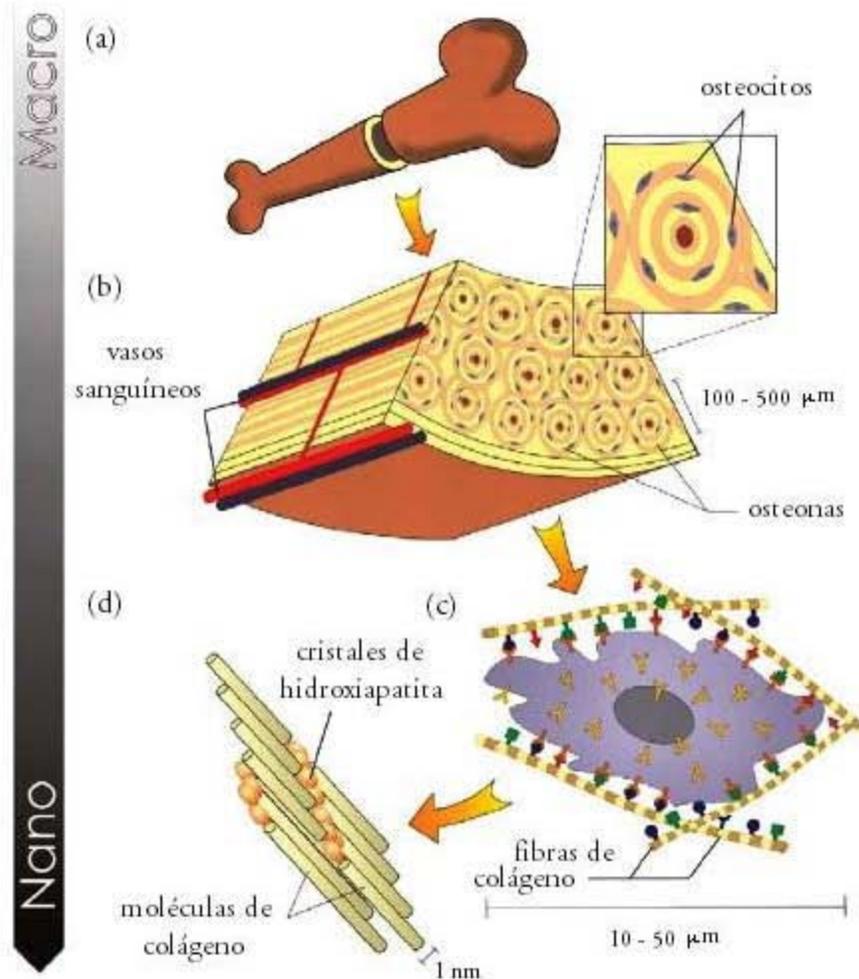


Figura 2.1. Organización jerárquica del hueso a diferentes escalas. (a) Capa compacta calcificada en la zona exterior del hueso, (b) sistema de哈佛 u osteonas en la capa externa, (c) célula rodeada de receptores de membrana celular y (d) nanoarquitectura de la matriz extracelular [2].

2.1.2 Biomecánica del tejido óseo

El tejido óseo posee la capacidad de regenerarse y modificar su estructura para adaptarle a las condiciones del medio. Por otra parte, se trata de un compuesto anisotrópico y, en consecuencia sus propiedades mecánicas varían dependiendo de la magnitud y dirección de las cargas aplicadas, en relación con la composición mineral y orgánica.

Los dos tipos de tejido óseo, cortical (compacto) y trabecular (esponjoso), presentan características biomécanicas diferentes que muestran estructuras particulares. Mientras el primero es una estructura sólida, el segundo es una malla de placas y cilindros interconectados, orientados predominantemente según la dirección principal de las fuerzas locales. El grado de porosidad es el parámetro elegido para definir su diferenciación. En el tejido compacto esta distribución varía en 10 – 30%, mientras en el tejido trabecular oscila entre 50 – 90%. Por otra parte, los procesos de remodelación y envejecimiento son diferentes en uno y otro tipo.

El hueso compacto es claramente anisotrópico. Dada la disposición longitudinal de los sistemas de Harvest el módulo elástico es 1.5 veces mayor en dirección coaxial que en transversal, es decir, 190 MPa en compresión y 130 MPa en tracción frente a 130 y 50, respectivamente (figura 2.2). El módulo de elasticidad y la razón de Poisson de las corticales son relativamente homogéneas, 17000 MPa y 0.6, mientras que en la esponjosa el intervalo es muy disperso, dependiendo de la edad y la localización oscila entre 10 – 9650 MPa y 0.06 – 0.95, respectivamente.

La resistencia de uno y otro tipo de hueso, tiene una particular importancia para decidir su zona de aplicación. Dadas las cifras antes mencionadas, se deduce que el hueso compacto es más resistente en compresión que en tensión o torsión. El punto de fluencia y la fuerza de rotura son cercanos, lo cual demuestra un comportamiento relativamente quebradizo en tensiones transversales, y relativamente dúctil bajo tensiones axiales. En el eje longitudinal, la tenacidad de las corticales les permite absorber gran cantidad de energía antes de fracturarse. En general, el hueso trabecular, parece diseñado para soportar compresión con gran eficiencia (en relación con su masa), ya que puede sufrir deformaciones del 50% antes de fracturarse. En su curva esfuerzo-deformación se aprecian tres zonas que reflejan su comportamiento. Al principio, las cargas producen deformaciones proporcionales característicamente elásticas. Posteriormente, mientras algunas trabéculas se rompen, otras ceden por deformación plástica. Finalmente, al hundirse la estructura, las trabéculas fracturadas terminan por rellenar espacios medulares, aumentando la rigidez del material, lo que permite soportar grandes deformaciones por encima del punto de fluencia, ver figura 2.3.

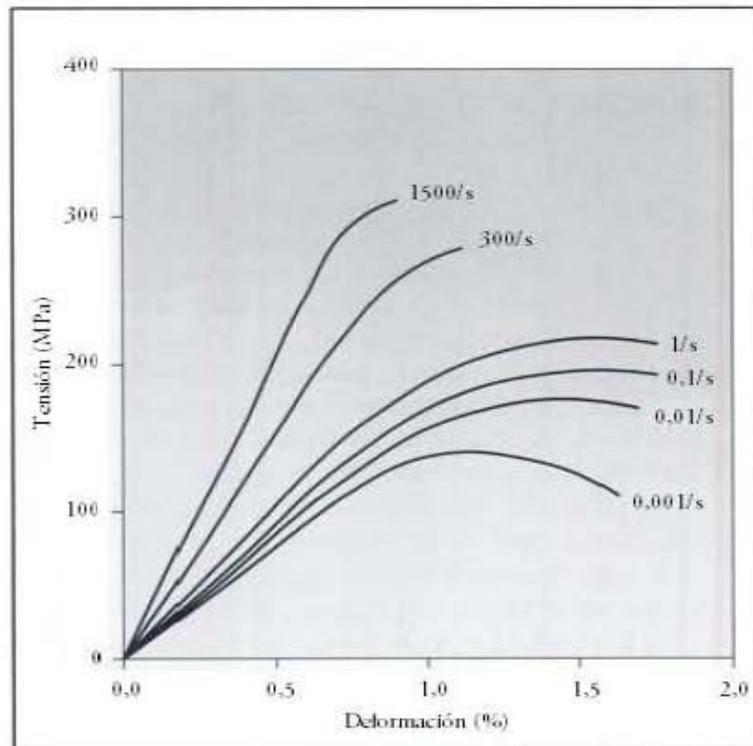


Figura 2.2. Curva esfuerzo-deformación de hueso cortical, su módulo de elasticidad y esfuerzo de ruptura, aumentan con el incremento de la velocidad de deformación.

Las propiedades viscoelásticas del hueso compacto permiten un aumento del 15% en el módulo de elasticidad en los intervalos de deformidad de actividades habituales, como andar o correr. Sometido a una carga continua, la cortical se deforma por fluencia y llega a fracturarse en niveles inferiores al punto de fluencia y al de rotura. En el hueso esponjoso, el aumento en el módulo de elasticidad y la resistencia es menos marcado y solamente alcanza el 30% entre la marcha lenta y los impactos capaces de producir una fractura. Es importante señalar que la presencia de tejidos medulares en los poros contribuye a la resistencia estructural en el intervalo de la velocidad de aplicación de la fuerza a causa de la resistencia al desplazamiento de los mismos poros.

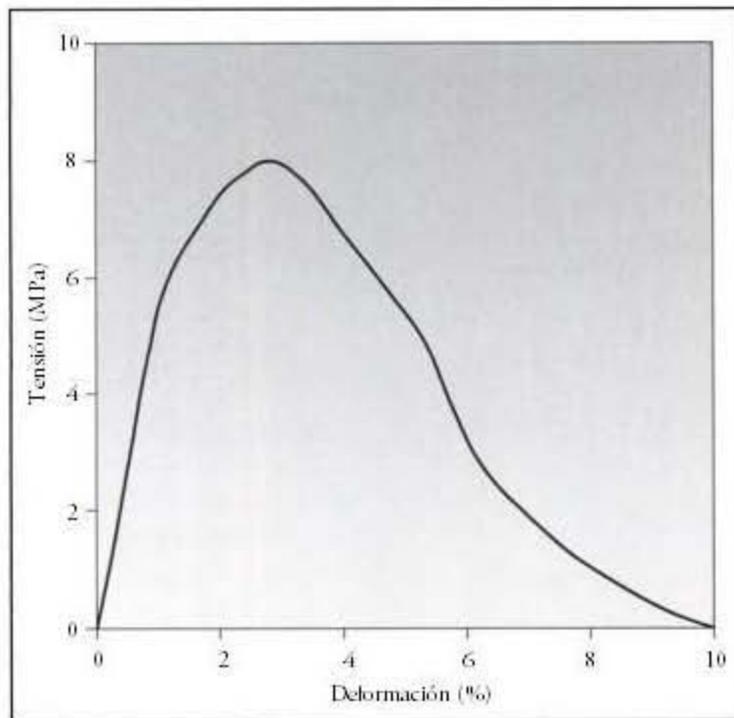


Figura 2.3. Curva de esfuerzo-deformación del hueso esponjoso [8].

Las propiedades biomédicas del tejido óseo se modifican de manera considerable con el paso de los años, estimándose la pérdida de resistencia y la reducción del módulo de elasticidad del hueso en y la tenacidad en 2 y 7% respectivamente por década a partir de los 20 años [8].

2.1.3 Células óseas

El hueso está formado por dos tipos de linajes celulares: 1) Células a partir de un linaje osteoblástico, incluyendo osteoprogenitores, preosteoblastos, células de revestimiento óseo y osteocitos y 2) osteoclastos. En la figura 2.4 se muestran los diferentes tipos de células encontradas en el tejido óseo.

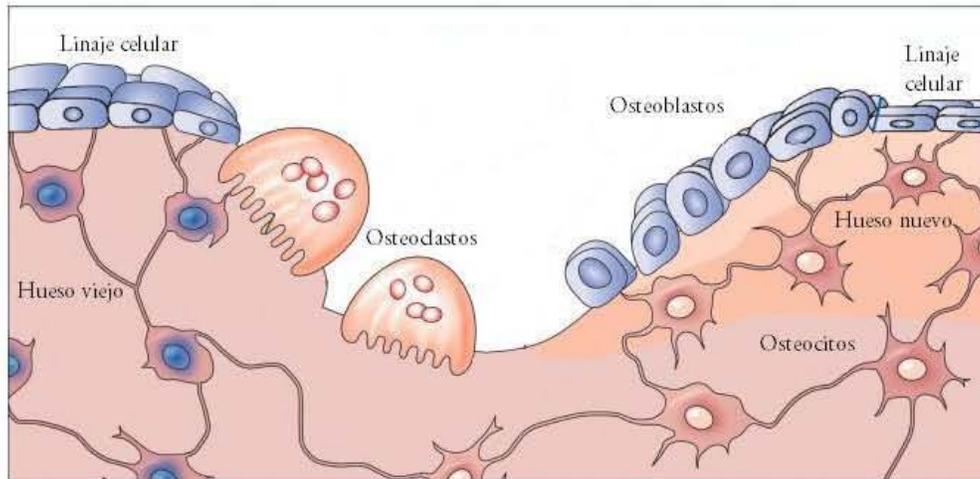


Figura 2.4. Tipos de células presentes en el tejido óseo.

El osteoblasto es la célula encargada de la síntesis de la matriz extracelular del tejido óseo. Al estar en actividad presenta polaridad y morfología cúbica. Cada osteoblasto posee muy desarrollado su retículo endoplasmático rugoso y aparato de golgi, lo cual es característico en las células que producen grandes cantidades de proteínas. El colágeno tipo I es la principal proteína segregada por parte de los osteoblastos, sustancia esencial para la posterior mineralización de la hidroxiapatita. También sintetiza proteínas no colágenas, como los glicosaminoglicanos, la osteocalcina, la osteopontina, la sialoproteína ósea, que interactúan con las integrinas. Son responsables de la regulación de calcio y de fósforo, mecanismo primordial para el depósito de los cristales de hidroxiapatita. Eventualmente, la actividad sintética de las células disminuye y estas quedan embebidas en la matriz formada y son llamadas osteocitos [2].

Los osteoblastos se derivan de células mesenquimales (células madre de la médula ósea y células madres del tejido conjuntivo). Estas células se pueden diferenciar en varias estirpes celulares en función de los mediadores o reguladores de la transcripción a los que son sometidos. Así, una célula madre pluripotente (unidad formadora de colonias de fibroblastos, CFU-F) puede terminar diferenciándose en un osteoblasto, un adipocito, un condroblasto, un mioblasto o un fibroblasto. Los osteoblastos siempre revisten la capa de la matriz ósea que producen antes de calcificarse, momento en el que se denominan osteoide. Dicho tejido es producido en la formación de la matriz y el proceso de calcificación.

El osteocito, osteoblasto diferenciado, es la célula ósea madura en mayor abundancia en el cuerpo, en relación 10:1 con respecto a los osteoblastos. Se encuentra rodeado por la matriz ósea y su morfología es

plana. A su vez, establecen conexiones entre ellos, garantizando la impermeabilidad de la matriz mientras se produce la mineralización del osteoide. Los osteocitos pasan por varias fases de maduración hasta quedar completamente embebidos en la matriz ósea y se mantienen en un estado de aparente reposo. Son los responsables del mantenimiento de la matriz controlando la concentración de fosfatos y calcio y son directamente estimulados por calcitonina e inhibidos por la hormona paratiroide. Poseen la capacidad de sintetizar y resorber la matriz de manera limitada. Estas actividades contribuyen a la homeostasis de la calcemia. Finalmente en la fase degenerativa caracterizada por pycnosis y fragmentación del núcleo de los osteocitos se produce apoptosis. Es importante el recambio óseo, aunque si es masiva puede ser perjudicial para la estructura ósea.

El osteoclasto es una célula polinucleada de gran tamaño cuya función principal es la resorción del tejido óseo. En actividad se localiza en la superficie ósea donde se produce la resorción, como producto de su actividad se forma una excavación poco profunda denominada laguna de resorción o lagunas de Howship. Los osteoclastos reabsorben las trabéculas, y van formando tejido óseo a manera de laminillas [9].

2.1.4 Regulación del remodelado óseo

La salud de los huesos es consecuencia del proceso de remodelado, ésto se logra mediante el equilibrio de absorción y formación de la matriz ósea. El control de la homeóstasis parece estar influenciado por un gran número de citocinas, hormonas y factores de crecimiento. El hueso es un tejido que presenta gran actividad y que se encarga de mantener la homeostasis del calcio, reparar las microfracturas y reaccionar a los traumatismos. El hueso renueva cada año el 25% del hueso trabecular y el 3% del hueso cortical. La finalidad de la remodelación ósea es evitar aparición de lesiones por fatiga, manteniendo una estructura que permita la adaptación a los esfuerzos mecánicos, variables en cada momento. El remodelado completo del esqueleto se logra en un periodo alrededor de 10 años. El remodelado se logra en tres fases 1) Activación es la fase de atracción de los osteoclastos, 2) Resorción es la fijación de los osteoclastos y labrado de cavidades y 3) Formación es la etapa donde los osteoblastos rellenan las cavidades con componentes orgánicos de la matriz ósea, los cuales se depositan en forma de laminillas concéntricas (hueso cortical) o paralelas (hueso trabecular). El conjunto de osteoclastos y de osteoblastos que de manera coordinada actúan en un lugar concreto de una superficie ósea se denomina unidad de remodelación ósea o unidad multicelular básica [6, 46].

2.2 Ingeniería de Tejidos

2.2.1 Generalidades

La ingeniería de tejidos se define como un campo interdisciplinario, en el cual se aplican los principios de ingeniería y las ciencias básicas para el desarrollo de sustitutos biológicos que permitan restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos vivos [1]. El desafío en ingeniería de tejidos es solventar el problema que existe con los implantes actuales, tales como escasez de donantes, empleo de medicamentos inmunosupresores, morbilidad de la zona donde se extrae tejido, formación de tumores, implantes que carecen de mecanismos biológicos, problemas con el sistema inmune al producir rechazo crónico y destrucción del tejido con el paso del tiempo. Estas limitaciones han generado el planteamiento de nuevas soluciones para la producción de tejidos. El enfoque de la generación de tejidos que han sido afectados por lesiones, enfermedades o cirugías, se ha logrado empleando células vivas asociadas a una matriz o andamiaje para guiar el desarrollo del tejido [7]. Lo ideal en ingeniería de tejidos es aislar células específicas del paciente mediante una pequeña biopsia, crecerlas en andamios bajo condiciones controladas, implantarlo en el sitio del defecto del paciente y así dirigir la formación de nuevo tejido al mismo tiempo que el andamio se va degradando [44-45], como se observa en la figura 2.5. En la actualidad tres vías han sido exploradas para proveer una solución a la pérdida de tejido, éstas son: la inyección de células aisladas, el desarrollo de sistemas encapsulados y el trasplante de células sobre matrices o andamios [45].

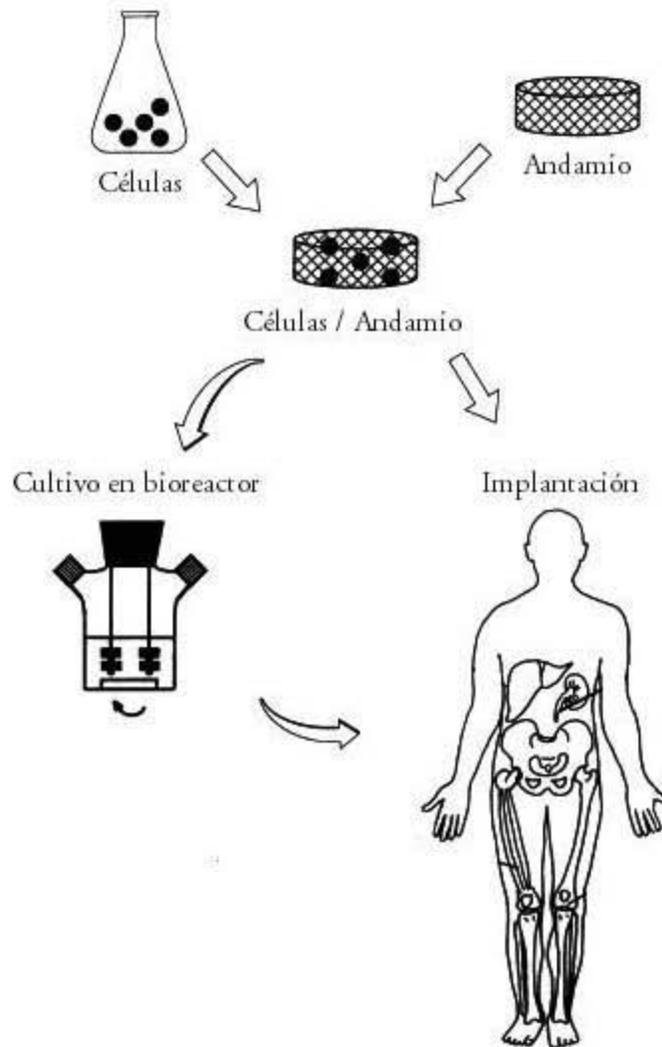


Figura 2.5. Representación esquemática del enfoque de la ingeniería de tejidos. Población de células específicas son cultivadas en andamios, posteriormente son implantadas en el paciente [45].

2.2.2 Andamios para regeneración ósea

Desde la antigüedad, la ingeniería de tejidos ha usado técnicas y métodos empíricos para la óptima restauración de los defectos óseos. Los traumas y las enfermedades de los huesos frecuentemente conllevan a daños estructurales en la superficie del tejido óseo, esto produce dolencias y discapacidad de millones de personas alrededor del mundo. Los métodos actuales para aliviar este tipo de afecciones sin mejorar las lesiones subyacentes, incluyen el uso de autoinjertos (hueso obtenido del paciente), aloinjertos (hueso obtenido de cadáveres humanos) y xenoinjertos (hueso a partir de una fuente animal).

Éstos poseen muchas limitaciones, debido a problemas como fuentes limitadas de obtención de hueso, morbilidad de los sitios donantes, problemas de rechazo del injerto y transmisión de enfermedades [2-4]. Por tal motivo, investigadores proponen nuevas estrategias para la regeneración de tejido óseo, mediante la fabricación de andamios que sean biológicamente activos, biocompatibles, biodegradables y que ofrezcan un soporte mecánico para las células.

Los andamios celulares para ingeniería de tejido óseo requieren un diseño estructural interno altamente poroso y con una grande relación superficie a volumen. Estas características soportan la adhesión de las células, promueven el crecimiento celular y ayudan a la distribución de nutrientes y remoción de desechos. Los andamios para reparación de tejidos deben tener buena biocompatibilidad, ser biodegradables y poseer la capacidad de interactuar con las células de interés [7].

Los andamios activos biológicamente son materiales altamente porosos, análogos de la matriz extracelular, los cuales inducen la síntesis de tejidos y órganos. Estos deben poseer una alta fracción volumétrica de poros, superior a 0.9 y un diámetro de poro promedio entre 5 a 500 μm . Sin embargo, varios investigadores han explorado el tamaño de poro óptimo para osteoconducción *in vivo* y se han reportado un diámetro óptimo entre 150 – 500 μm [5-6, 8]. Dichos estudios no se enfocaron en la interconexión de los poros, sino en el tamaño del poro. Sin embargo, tanto la tasa y la distribución de la osteogénesis dentro y fuera del implante se ven afectados por el tamaño y el número de canales interconectados. En la micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido se puede observar la interconexión y variabilidad del tamaño de poros, (ver figura 2.6). Es importante recalcar que el tamaño de poro y la interconectividad no son parámetros principales para la osteoconductividad.

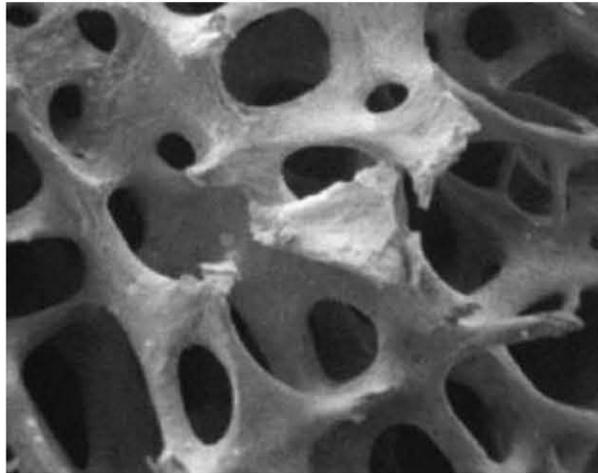


Figura 2.6. Micrografía de hueso trabecular

La actividad de los andamios ha sido descrita en términos de la calidad de productos inductores. Algunos autores han propuesto que las superficies de materiales bioactivos soportan la diferenciación osteoblástica de las células madres mesenquimales, donde materiales no bioactivos no pueden soportar esta diferenciación [3,8]. La diferenciación osteoblástica de células madres se pueden encontrar en implantaciones subcutáneas de compuestos de células madres/andamio [16]. La formación del hueso refleja la bioactividad de los implantes. La diferenciación ocurre directamente en la superficie de los materiales bioactivos, mientras que la diferenciación en materiales no bioactivos ocurre lejos de la superficie [9].

Los materiales bioactivos pueden mostrarse enlazados con el hueso cuando son implantados en los sitios del defecto. Los compuestos presentan adhesión de las CMM seguido por la diferenciación osteoblástica [4]. El proceso de diferenciación u osteogénesis envuelve la adhesión de células madre de morfología fibroblastoide, las cuales luego se transforman en células más pequeñas redondeadas (preosteoblastos) y finalmente madura a osteoblastos, los cuales se depositan en la superficie del cerámico en forma de una capa delgada [46].

Los andamios o matrices artificiales son consideradas guías temporales para que las células se adhieran, crezcan, se diferencien, se sintetice la matriz extracelular y, finalmente, se genere nuevo tejido. Después de la formación de los tejidos naturales y órganos, el andamio debe de alguna manera desvanecerse (reemplazo temporal) para permitir un reemplazo del tejido totalmente natural. Los andamios temporales son empleados en zonas donde el tejido ha sido debilitado por alguna lesión, enfermedad o cirugía y se requiere algún soporte artificial hasta que sane y se recupere su función.

En la actualidad, el término andamio biodegradable se asocia específicamente a materiales de estructura tridimensional y porosa, que sirven de soporte para el crecimiento celular *in vitro*, con la finalidad de construir un sustituto biológico para un órgano o tejido que ha perdido su función [9-11]. En la tabla 2.1 se resumen los requerimientos generales que deben cumplir los andamios para regeneración ósea.

Tabla 2.1. Requerimientos generales para andamios en regeneración de tejido óseo [12, 18]

Requerimientos	Descripción
Biológico	Habilidad para crecer osteoblastos y observar la formación de tejido <i>in vitro</i>
Estructura	Permitir en el diseño tridimensional, variación del tamaño de poros e interconectividad entre ellos, entre otras
Biocompatibilidad	No tóxico, no carcinogénico, no inflamatorio, no mutagénico, no provoque pirogenicidad, no alergénico, no oncogénico, hemocompatible, carecer de trombogenicidad entre otras.
Biodegradabilidad	Productos de degradación no causen ninguna infección o reacción inflamatoria. No deben ser tóxicos, alergénicos, trombogénicos ni carcinogénicos.
Esterilizable	Autoclave, calor seco, rayos ultravioleta, rayos plasma, óxido de etileno, gas-plasma de peróxido de hidrógeno, entre otras
Propiedades Mecánicas	Capacidad de soportar la carga antes y durante el proceso de cicatrización. Mantener la integridad estructural del tejido prediseñado.

2.3 Técnicas para la fabricación de andamios para regeneración de tejidos

La matriz extracelular natural es clave en la integridad de los tejidos. Posee una estructura en forma de malla de micro/nanofibras que anclan las células, proveen suficiente resistencia mecánica para soportar el tejido y participa en la regulación del comportamiento de las células en sus alrededores. Por lo tanto, se hace necesario emplear técnicas de microfabricación de andamios que permitan mitigar la estructura y funciones de la matriz extracelular para regeneración de tejidos. Diferentes técnicas han sido propuestas para la fabricación de andamios, tales como: liofilización, separación de fases, evaporación

de disolventes y disolución de partículas, polimerización *in situ*, electrohilado entre otras. Liofilización implica enfriar una solución polimérica hasta temperaturas inferiores a la de solidificación del sistema, seguidamente el disolvente se elimina por sublimación a vacío manteniendo el sistema congelado. La morfología del sistema poroso está controlada por la transición líquido-líquido o sólido-líquido [4]. Separación de fases consiste en preparar una solución polimérica, seguida de una gelación por un enfriamiento, el gel resultante es inmerso en un no solvente que subsecuentemente es retirado por liofilización [59]. En la técnica de evaporación de disolventes y disolución de partículas, se dispersan partículas solubles en agua (como cloruro de sodio o sacarosa con tamaño y forma controlada) en una solución homogénea, seguidamente se retira el disolvente por evaporación o liofilización y finalmente las partículas son disueltas en agua obteniendo un andamio poroso, la desventaja en esta técnica es la lenta evaporación del disolvente y precipitación de las partículas. El método es sensible a variables como velocidad de enfriamiento o concentración del sistema polimérico y el tamaño de poros máximo está limitado a 100 μ m. Polimerización *in situ*, aplicación de hidrogeles mediante inyección directa en la zona afectada y, posteriormente es llevada a cabo la polimerización en condiciones fisiológicas, la desventaja de este método es el desprendimiento de calor durante la polimerización y puede causar necrosis. El método de electrohilado consiste en someter a un campo eléctrico una solución polimérica polarizable para inducir la formación de fibras que finalmente se pueden recolectar de manera aleatoria u ordenada. Este último método permite obtener andamios con una gran variedad de poros interconectados. Las fibras obtenidas le ofrecen al andamio alta energía superficial, lograda por su elevada relación superficie a volumen. Esta característica mejora la adhesión de las células, en comparación con los métodos mencionados anteriormente [18].

2.3.1 Electrohilado

Electrohilado es un proceso enfocado en la producción de fibras micrométricas y nanométricas, en el cual se aplica un campo eléctrico a soluciones poliméricas o polímeros fundidos polarizables [25]. El proceso y equipo de electrohilado fue patentado por Anton Formhals en 1934 [61]. Esta invención emplea fuerzas mecánicas y electroestáticas para la producción de hilos poliméricos. [62]. El equipo básico de electrohilado, tanto vertical como horizontal, consta de tres partes fundamentales: sistema de inyección, sistema de colección y fuente de alto voltaje (Figura 2.7). El sistema de inyección se compone de una bomba dosificadora, jeringa y capilar. Se emplea para inyectar el polímero en solución o fundido. El sistema de colección fijo o móvil permite recolectar la fibras con distribución aleatoria o

alineadas y, la fuente de alto de voltaje genera un campo eléctrico entre el sistema de inyección y colección capaz de hilar el polímero [63-66].

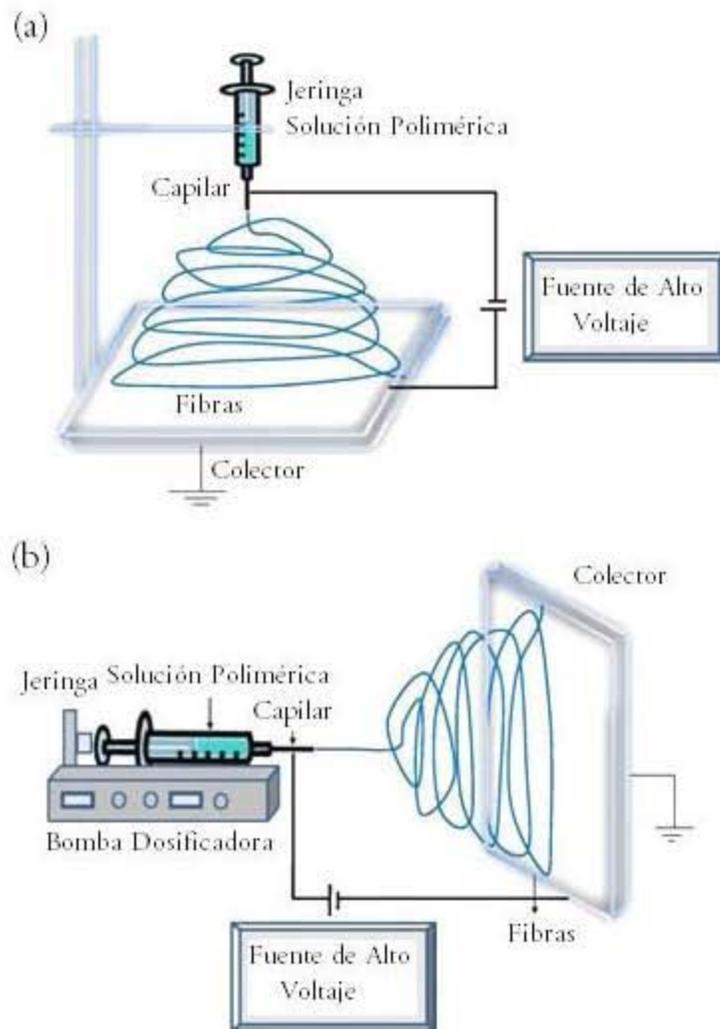


Figura 2.7. Equipo de Electrohilado Básico (a) Vertical y (b) Horizontal [65].

Debido a la baja conductividad y alta viscosidad del polímero fundido se obtienen fibras con diámetros superiores, en comparación con las fibras finas producidas a partir de una solución polimérica. Esto se explica por la posibilidad de controlar las propiedades de la solución, tales como: viscosidad, concentración, conductividad eléctrica y demás [67].

Inicialmente, para llevar a cabo el proceso de electrohilado, se carga la solución polimérica en la jeringa y se ubica en la bomba dosificadora para impulsar el contenido a una presión y flujo constante. Luego, se conecta un electrodo al capilar del sistema de inyección y el otro electrodo con carga opuesta al

sistema de colección. El campo eléctrico generado entre el capilar y el colector orienta los dipolos de la solución para formar el cono de Taylor (ver figura 2.8). Al aumentar el voltaje, la fuerza electrostática supera la tensión superficial de la solución, lo que provoca el desplazamiento de la punta del cono hacia el colector y favorece la formación de un haz de la solución polimérica. La distribución de carga se observa en la figura 2.9. Durante este trayecto, el disolvente es evaporado y las fibras completamente secas son colectadas [62,68].



Figura 2.8. Formación de cono de Taylor. El voltaje incrementa en cada etapa hasta alcanzar el equilibrio entre la tensión superficial y la fuerza electrostática en la etapa 3 [69].

Aunque el proceso de electrohilado parece relativamente fácil de usar, existen una serie de parámetros que afectan la formación y estructura de la fibra [70-72]. Estos son generalmente divididos en tres clases: (1) Parámetros de la solución, (2) Parámetros del proceso y (3) Parámetros ambientales. Dentro de los parámetros de la solución se tiene: concentración, peso molecular, viscosidad, tensión superficial, tipo de disolvente y conductividad eléctrica. Entre los parámetros del proceso se encuentra: la diferencia de potencial, la distancia entre el colector y capilar, el flujo de inyección de la solución, el orificio del capilar y el tipo de colector. En los parámetros ambientales están la temperatura, la humedad relativa y la velocidad del aire, generalmente despreciable. Con la variación de uno o más de estos parámetros se producen fibras con diferentes características. Encontrar las condiciones óptimas para una solución específica es fundamental para determinadas aplicaciones.

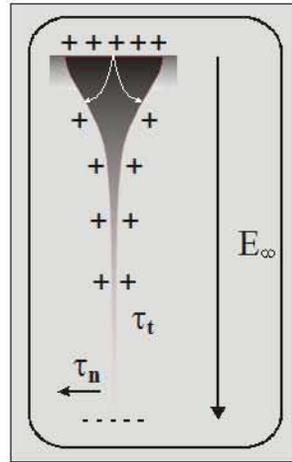


Figura 2.9. Polarización de la solución polimérica en la formación del cono de Taylor [45]

2.4 Biomateriales para regeneración ósea

En la actualidad, la tecnología ha desarrollado varios materiales aplicables para uso clínico en cirugía ortopédica, dental y maxilofacial. La ciencia de los materiales ha experimentado un avance en el desarrollo de materiales como metálicos, cerámicos, poliméricos y compuestos para diversas aplicaciones biomédicas permanentes o temporales.

2.4.1 Metales

Los materiales metálicos y sus aleaciones presentan mejores propiedades mecánicas comparación con otros materiales. Estas características los enfocan en aplicaciones estructurales, como prótesis articulares, placas de osteosíntesis, tornillos de fijación, implantes dentales entre otras. Sin embargo, algunos presentan rechazo del tejido debido a que no son biocompatibles con el organismo, es decir presentan citotoxicidad por la liberación de iones metálicos. Las aleaciones metálicas son las más empleadas por contener elementos que inhiban la oxidación del metal, mejorando así la aceptación por el organismo. El titanio puro es la excepción de lo mencionado anteriormente y es empleado para implantes dentales. No obstante, para mejorar sus propiedades mecánicas se le incorporan elementos de aleación como vanadio y aluminio, esto con el fin de ampliar su campo de aplicación en ortopedia.

Los tejidos toleran por un periodo de tiempo no tan prolongado la presencia de los metales. Debido a la corrosión del material en el sitio implantado, se producen productos de corrosión en las zonas

circundantes del tejido, por ésto la biocompatibilidad de los metales es de considerable precaución. Otros problemas son encontrados en el diseño de los implantes metálicos, los cuales incluyen el modelamiento en magnitud y dirección de las fuerzas, diseños limitados a la anatomía, propiedades físicas de los tejidos y reacciones del tejido con el implante y viceversa [13].

2.4.2 Cerámicos

Los materiales cerámicos son aquellos constituidos de compuestos inorgánicos no metálicos, tales como vidrios y cementos. Las cerámicas empleadas en la reparación y reconstrucción de partes del cuerpo dañadas o enfermas se denominan biocerámicas [1]. La gran inercia química de las cerámicas, su alta resistencia a la comprensión y su apariencia estética, hicieron que estos materiales se empezarán a emplear en odontología, especialmente en coronas dentales. Posteriormente se extendió su uso en el sistema locomotor como implante óseo [44-45]. Los cerámicos más empleados en aplicaciones dentales, cirugías maxilofaciales y ortopédicas son fosfatos tricálcicos, hidroxiapatita, vidrio, vitrocerámicos, alumina, sulfato cálcico, circonia y carbonos pirolíticos. Comúnmente la cerámica ha estado limitada, en cuanto a sus aplicaciones, por su fragilidad, baja resistencia mecánica a tracción y/o flexión y su baja resistencia al impacto.

2.4.2.1 Clasificación de las Biocerámicas

Las biocerámicas se pueden clasificar en bioinertes, bioactivas, biodegradables, densas y porosas.

Bioinertes: Son aquellas cerámicas que no reaccionan con el medio al ser implantadas, tales como alumina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), circonia (ZrO_2) y carbonos pirolíticos.

Bioactivas: Se caracterizan por unirse directamente al hueso sin la formación de un tejido fibroso en la interfase. El ejemplo típico y único que se une directamente al hueso es la hidroxiapatita, HA, $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ compuesto similar a la fase mineral del sistema óseo. Por otro lado, otras cerámicas bioactivas se unen al hueso formando previamente una capa de hidroxiapatita en su superficie. Igualmente se encuentran en este grupo los biovidrios y las vitrocerámicas.

Biodegradables o Reabsorbibles: Biomateriales que al ser injertados se disuelven con el tiempo y son reemplazados gradualmente por el tejido natural. Este tipo de biocerámicas son ideales, dado que permanecen en el cuerpo mientras se recupera el funcionamiento del tejido. Su mayor inconveniente es que su resistencia disminuye durante el proceso de reabsorción. Un ejemplo de este tipo de biocerámicas es el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Biocerámicas densas: Son materiales con porosidad nula. Su unión con el hueso es morfológica y se realiza de tres formas: por crecimiento del tejido en las irregularidades superficiales del implante, por unión a través de cemento acrílico o por acoplamiento del implante en el defecto mediante presión.

Biocerámicas porosas: La unión al hueso es mecánica y la fijación biológica, ya que se produce crecimiento del hueso en los poros del implante. Existen tanto bioinertes como bioactivas, tales como la alúmina policristalina y la hidroxiapatita, respectivamente.

2.4.2.2 Cerámicas Bioactivas

La aparición de este tipo de cerámicas nace de la necesidad de eliminar el movimiento interfacial que se produce con la implantación de cerámicas bioinertes. En 1967 se realizaron modificaciones químicas de las cerámicas y los vidrios para proporcionarles reactividad química con el sistema fisiológico y promover la unión química entre el implante y el tejido. Dentro de las cerámicas bioactivas se incluye la hidroxiapatita, los vidrios, las vitrocerámicas y materiales compuestos con actividad superficial. Sin embargo, la naturaleza frágil de los materiales inorgánicos bioactivos, es decir su resistencia no alcanza la del hueso, le impide su aplicación en zonas donde se requiera soportar altas cargas.

2.4.3 Polímeros

La investigación de los polímeros como biomateriales ha evolucionado potencialmente en los últimos 30 años. Actualmente se disponen de una variedad de polímeros para aplicaciones intracorpóreas, paracorpóreas o extracorpóreas, o productos hospitalarios de diversa etiología. Los polímeros son materiales altamente atractivos para ingeniería de tejidos por su gran versatilidad, ya que mediante las combinaciones estructurales e incluso procesos de fabricación, pueden presentar una amplia gama de propiedades. En la actualidad existen numerosos polímeros empleados en el campo biomédico. Algunos son estables y se utilizan para aplicaciones permanentes, tales como poli(metil metacrilato) y el poli(etileno). Sin embargo, en los últimos años se han fabricado polímeros biodegradables, para aplicaciones temporales [1, 7]. Los polímeros biodegradables se han empleado en aplicaciones dentales y dispositivos ortopédicos de fijación. La ventaja principal de estos implantes en comparación con implantes metálicos es la transferencia de carga progresiva al tejido en la fase de regeneración. Estos materiales bioabsorbibles se clasifican en polímeros naturales (obtenidos de fuentes naturales) y polímeros sintéticos (sintetizados mediante reacciones químicas). Entre los polímeros de origen natural se tienen celulosa, colágeno, glucosaminoglicanos, polisacáridos, quitosán, poli(hidroxialcanoatos) PHA,

entre otros. Los polímeros sintéticos más estudiados y comúnmente empleados son los poliésteres en general, tales como poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico) (PLA) y sus copolímeros. Estos poli(α -hidroxiácidos) abarcan la mayor parte del mercado actual en el ámbito biomédico.

2.4.3.1 Polímeros Naturales

Son macromoléculas de origen natural, ofrecen la ventaja de ser similares a la matriz orgánica lo cual le permite al medio biológico aceptarlas y metabolizarlas. Polímeros naturales, tales como colágeno y ácido hialurónico, son candidatos interesantes para ingeniería de tejidos y contienen información biológica para favorecer el crecimiento celular. No obstante, presentan propiedades mecánicas débiles y existe preocupación alto riesgo de transmisión de enfermedades. Otras desventajas son la variabilidad en su estructura macromolecular y su procesabilidad, se modifican o degradan a las temperaturas de proceso de los termoplásticos [4].

2.4.3.2 Polímeros Sintéticos

Este tipo de macromoléculas son sintetizadas mediante diversas rutas y pueden ser procesados por diferentes técnicas para obtener características específicas de geometría y porosidad. Su morfología macromolecular y su microestructura pueden ser modificadas por medio de reacciones químicas y mediante procesos de transformación para adoptar geometrías complejas. Algunos polímeros sintéticos usados ampliamente para dispositivos biomédicos e implantes son enlistados en la tabla 2.2.

Los poliésteres alifáticos han sido investigados detalladamente debido a su biocompatibilidad y no toxicidad. Poli(L-lactida), poli(glicólico) y poli(dioxanona) han recibido aceptación y aprobación por la FDA (Food and Drugs Administración) para aplicaciones in vivo como materiales de sutura, placas y tornillos a partir de los años 80s. Estos polímeros ofrecen fácil procesabilidad y control en su perfil de degradación [17].

El poli(L-lactida) o poli(L-ácido láctico), PLLA, es uno de los mejores polímeros biodegradables seleccionados por poseer excelente función metabólica. Adicionalmente, se ha reportado que el PLLA participa en la remodelación del hueso circundante, es osteocompatible y no presenta citotoxicidad.

Aunque las matrices poliméricas son candidatos promotores como andamios para regeneración de tejidos no poseen la capacidad de proveer las señales específicas necesarias para el crecimiento y la

diferenciación celular. Por lo tanto, los materiales compuestos han ganado mayor interés debido a sus propiedades físicas y biocompatibles. En particular un polímero con un material conductor provee la conductividad eléctrica del andamio para facilitar la migración, proliferación y diferenciación celular.

Tabla 2.2. Algunos polímeros comunes en aplicaciones biomédicas [12]

Polímero Sintético	Aplicaciones biomédicas
Poli(metilmetacrilato)	Lentes de contacto, cementos óseos, prótesis dentales
Poli(etileno)	Catéteres
Poli(tereftalato de etilo)	Arterias
Poli(uretanos)	Catéteres
Poli(hidro etil metacrilato)	Lentes de contacto, liberación de fármacos, apósitos para heridas
Poli(propileno)	Suturas, válvulas cardíacas, articulaciones interfalángicas
Poli(cloruro de vinilo)	Tubos, diafragmas, apósitos y recubrimientos, implantes, marcapasos
Siliconas	Implantes mamarios, dispositivos faciales
Nylon	Suturas biodegradables, articulaciones
Poly(glicólico)	Suturas biodegradables
Poli(L-Lactida)	Placas y tornillos para fijación ósea

2.4.4 Materiales Compuestos

Los materiales compuestos son una combinación de dos o más fases, están diseñados para proporcionar una combinación de propiedades que no se puede lograr con un material en una sola fase. Un claro ejemplo es la incorporación de fibras de vidrio en resina poliméricas, las fibras se emplean para proporcionarle rigidez a la resina y permite obtener una material compuesto resistente. El hueso es un material compuesto de colágeno e hidroxiapatita,

La figura 2.10 muestra las propiedades mecánicas de algunos materiales compuestos bioactivos, las cuales son cercanas a las propiedades del hueso en comparación con algunos materiales metálicos y cerámicos. Los diferentes materiales permiten fabricar dispositivos ligeros o pesados, con algunas propiedades anisotrópicas similares a los huesos naturales.

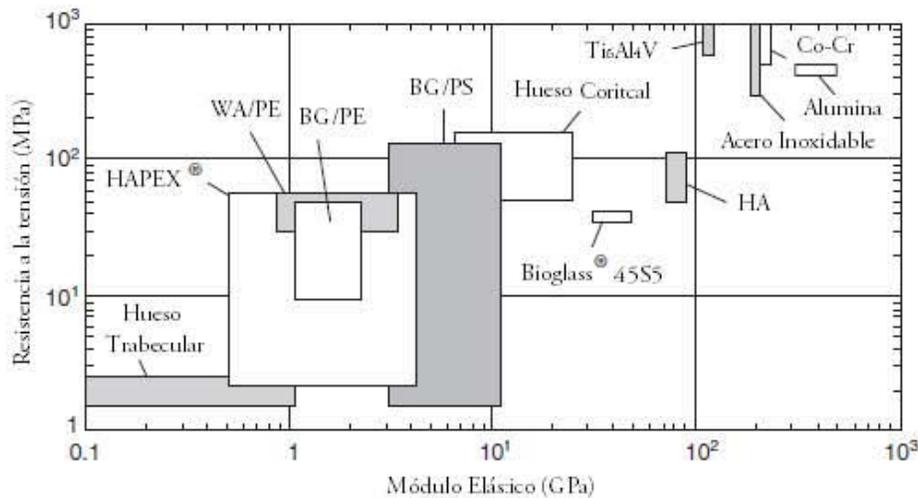


Figura 2.10. Propiedades Mecánicas de varios biomateriales

Aplicaciones de compuestos en ambientes fisiológicos son frecuentemente limitadas por la estabilidad de los enlaces entre las fases. En caso de las rupturas de los enlaces interfaciales ocurre el rápido deterioro mecánico y la producción de productos de degradación nocivos para la salud [12].

Una variedad de materiales compuestos polímero/cerámico ha emergido en aplicaciones biomédicas con el objetivo de fusionar las propiedades mecánicas de estos materiales, al igual que su osteoconductividad y biodegradabilidad.

2.5 Hidroxiapatita

Una de las cerámicas bioactivas más estudiadas extensivamente es la Hidroxiapatita. La Hidroxiapatita (HA) es químicamente similar al componente mineral del hueso y dientes. Muestra excelente biocompatibilidad con tejido duro, es bioactiva y promueve la osteointegración [1-3, 7-8, 44-45]. La composición del hueso es fosfato de calcio (69% en peso), agua (10% en peso), colágeno (20% en peso) y otros materiales orgánicos en pequeñas cantidades, tales como proteínas, polisacáridos y lípidos como se muestra en la figura 2.11 [1]. El colágeno es formado por finos filamentos con diámetros entre 0.1-2 μm . La principal función del colágeno es la de dar elasticidad y soporte estructural al tejido del hueso. Los fosfatos de calcio se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita y fosfatos de calcio amorfos. La principal función es proveer rigidez al tejido óseo. Los cristales de HA, en forma de agujas y placas, son paralelos a los filamentos de colágeno. En el diente, existen tres tipos de tejidos duros: esmalte, dentina y cemento. El esmalte es el tejido más duro del cuerpo y consiste en 97% peso de

cristales de HIA y 3% en peso de sustancias orgánicas y agua, (ver figura 2.11). La dentina tiene la composición similar al hueso. El cemento está compuesto de 45% en peso de minerales y 55% en peso de materiales orgánicos y agua. En el cuerpo, los más importantes fosfatos de calcio son HIA con una relación Ca:P de 1.67 y fosfatos tricalcico con una relación Ca:P de 1.5

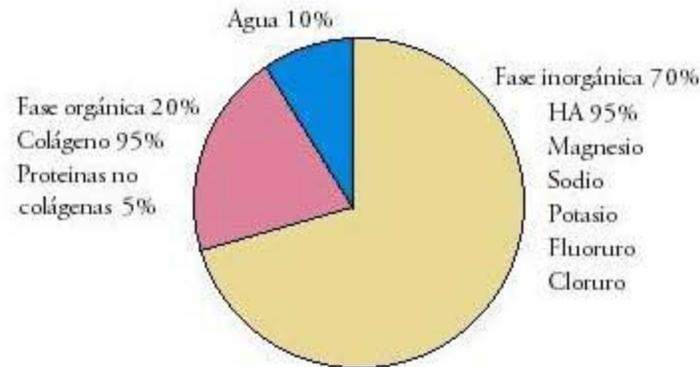


Figura 2.11. Composición del Hueso [1]

2.5.1 Características estructurales de la hidroxiapatita

La estequiometría de la HIA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_3)_6(\text{OH})_2$) consiste de iones Ca^{2+} , PO_4^{3-} , y OH^- . La estructura reticular es esquemáticamente mostrada en la figura 2.12. Los iones de calcio forman columnas y los iones OH^- residen dentro de los canales [89].

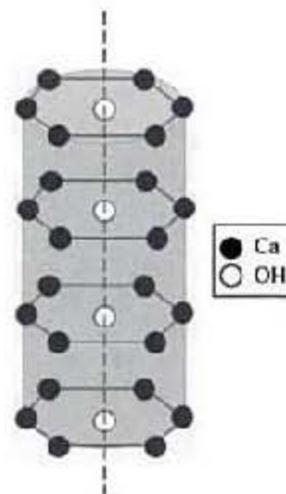


Figura 2.12. Estructura reticular de los hidróxidos de calcio [89]

La estructura de HA pertenece a un sistema hexagonal con un grupo espacial $P6_3/m$. El arreglo global de HA es caracterizado por un eje C perpendicular a tres ejes a equivalentes de 120° uno del otro. Las dimensiones la celda unitaria, la construcción de unidad más pequeña y un complemento representativo de cristales de HA, son $a=b=9.42 \text{ \AA}$ y $c=6.88 \text{ \AA}$ (ver figura 2.13) [91].

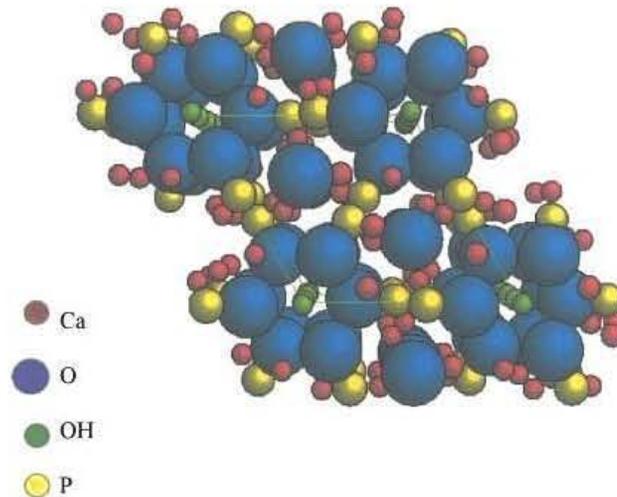


Figura 2.13. Celda unitaria de la hidroxiapatita [91]

La celda unitaria de la hidroxiapatita contiene 10 iones de calcio localizados en sitios no equivalentes, cuatro en el sitio I (Ca_I) y seis en el sitio II (Ca_{II}). Los iones de Ca_I están alineados en columnas y los iones Ca_{II} en triángulos equiláteros perpendiculares al eje c de la estructura (ver figura 2.14) [90]. Los iones del sitio I están coordinados a 6 átomos de oxígeno pertenecientes a diferentes tetraedros de PO_4 y también a 3 átomos de oxígeno relativamente distantes. Los iones Ca_I poseen 6 átomos de oxígeno a distancia 2.4 \AA , en cambio el sitio de los Ca_{II} posee 3 oxígenos a distancia de 2.2 \AA , 2.3 \AA y 2.5 \AA . Las esferas de coordinación de los iones de calcio en los sitios I y II son mostradas en las figuras 2.15 y 2.16, respectivamente.

Una de las características estructurales interesantes de la HA, es que ella permite que los iones hidroxilos sean retirados con relativa facilidad, generando canales vacíos entre los hexágonos, formados por los iones de calcio, por donde pueden ser conducidos otros iones o moléculas. Las sustituciones pueden alterar el parámetro de red y las dimensiones de los cristales, la textura superficial, la estabilidad y la solubilidad de la hidroxiapatita [48]

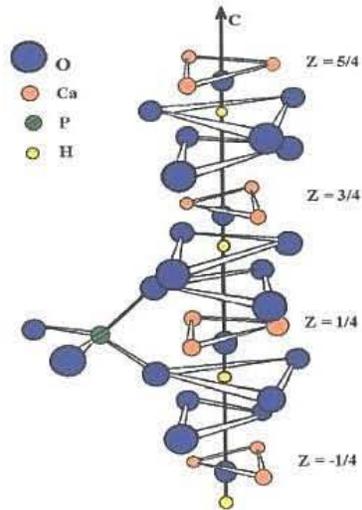


Figura 2.14. Estructura de la hidroxiapatita a lo largo del eje c [90]

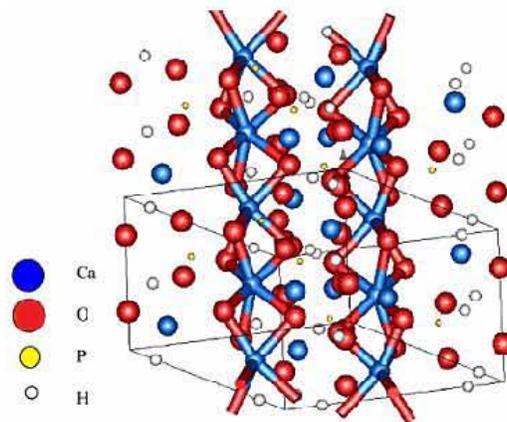


Figura 2.15. Esfera de coordinación $\text{Ca}_1\text{-O}$ [90]

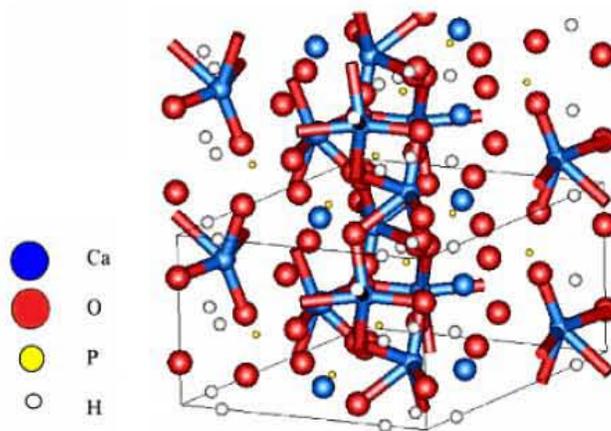


Figura 2.16. Esfera de coordinación $\text{Ca}_2\text{-O}$ [90]

2.5.2 Propiedades de la hidroxiapatita

Existe una amplia variación de propiedades mecánicas de los fosfatos sintéticos, como se muestra en la tabla 2.3 [1]. Estas variaciones son el resultado de la modificación de la estructura policristalina de los fosfatos de calcio policristalinos, a su vez resulta de los diferentes procesos de manufactura. Dependiendo en las condiciones, el fosfato de calcio puede ser hidroxiapatita o beta-*whitlockita*.

La hidroxiapatita policristalina tiene un alto módulo elástico entre 40–117GPa. El tejido óseo, la dentina y el esmalte dental son materiales compuestos que contienen hidroxiapatita así como otros materiales orgánicos. El esmalte dental, la dentina y el hueso compacto poseen un módulo elástico de 71, 21 y 12–18 GPa, respectivamente. La relación de Poisson para la hidroxiapatita sintética es 0.27, el cual es menor al del hueso 0.3 [14].

Entre las propiedades más interesantes de la hidroxiapatita es su excelente biocompatibilidad, su bioactividad, su no toxicidad, su osteoinductividad, su osteoconductividad y su osteointegración [2,14-15, 47-48].

Tabla 2.3. Propiedades físicas de la hidroxiapatita [48].

Propiedad	Magnitud
Módulo Elástico (GPa)	40–117
Resistencia a la compresión (MPa)	294
Resistencia a la flexión (MPa)	147
Dureza (Vickers, GPa)	3.43
Relación de Poisson	0.27
Densidad teórica (g/cm ³)	3.16

2.5.3 Aplicaciones biomédicas de la hidroxiapatita

La hidroxiapatita es empleada como reemplazo de partes pequeñas del hueso, relleno de cavidades en odontología, recubrimiento de superficies de metales para implantes, refuerzo en materiales compuestos, liberador de medicamentos, entre otros. No obstante, aunque se han empleado con éxito algunos materiales cerámicos biodegradables y bioabsorbibles como el fosfato tricálcico o el coral marino, poseen limitaciones ya que, normalmente, son frágiles y difíciles de transformar en materiales porosos con formas complejas [47-48].

2.6 Poli(ácido láctico)

La poli(ácido láctico) es un poliéster alifático biodegradable ampliamente estudiado en las últimas dos décadas, este puede ser obtenido mediante diversas rutas de polimerización del ácido láctico. Su biocompatibilidad y su no toxicidad, sumada a la aceptación de la FDA, son factores predominantes para su gran interés y aplicación en el área biomédica [10, 38, 51-53]. No obstante dicho polímero presenta baja hidrofiliidad. Esto le impide su uso directamente como material para reconstrucción de tejido por su baja afinidad celular.

2.6.1 Ácido Láctico

El ácido láctico es un componente que juega un papel muy importante en varios procesos bioquímicos. Por ejemplo, el lactato es constantemente producido mediante el ejercicio físico y es eliminado por el metabolismo. El ácido láctico ha sido producido a escala industrial desde finales de los años 90s. Se emplea principalmente en la industria de alimentos, cosméticos, fármacos y alimento para animales [28]. Adicionalmente es el precursor monomérico para la síntesis de poli (ácido láctico). El ácido láctico puede ser obtenido tanto por fermentación de carbohidratos como por síntesis química [54-55]. El ácido láctico (ácido 1-hidroxipropanoico) posee un carbón asimétrico, el cual le permite dos configuraciones ópticamente activas. En la Figura 2.17 se presentan los enantiómeros del ácido láctico [11].

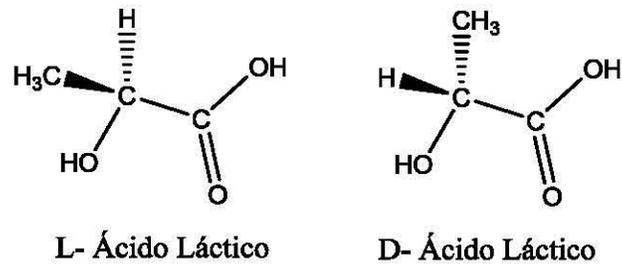


Figura 2.17. Enantiómeros de ácido láctico [11]

2.6.2 Lactida

Lactida (3,6 dimetil 1,4-dioxano 2,5 diona) es un dímero cíclico logrado mediante la unión de dos moléculas de ácido láctico y dan lugar a L-lactida, D-lactida y meso-lactida (una molécula de L-ácido láctico asociada con otra molécula de D-ácido láctico), en la figura 2.18 se muestran estos esteroisómeros [11]. Una mezcla de L-lactida y D-lactida se conoce como una mezcla racémica (rac-lactida) [54-55]. Es usualmente sintetizada por la depolimerización a presión reducida del poli (ácido láctico) de bajo peso molecular. Mediante este método se obtiene mezcla de L-lactida, D-lactida y meso-lactida [56-57]. Los diferentes porcentajes obtenidos de isómeros dependen del ácido láctico empleado en la policondensación, de la temperatura y de la naturaleza y cantidad del catalizador. Es importante la separación de los esteroisómeros, para controlar la estructura final del polímero de alto peso molecular, la cual se basa en las diferencias del punto de ebullición entre ellos [25, 58].

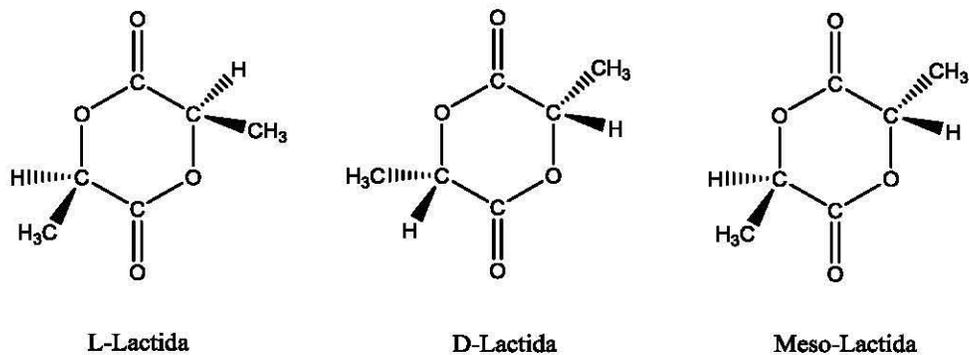


Figura 2.18. Esteroisómeros de Lactida [11]

2.6.3 Síntesis de poli(ácido láctico)

La síntesis de Poli(ácido láctico), PLA, es un proceso multietapas, el cual inicia en la producción del ácido láctico y termina en su polimerización. La Figura 2.19 muestra tres rutas principales para obtener

PLA [11]. En la policondensación de ácido láctico se obtiene polímero frágil de bajo peso molecular, oligómeros, poco usuales para aplicaciones biomédicas debido a su fragilidad. La segunda ruta es la destilación azeotrópica del ácido láctico. Esta técnica puede obtener polímero de alto peso molecular sin emplear agentes de acoplamiento. Por último, se tiene la polimerización por apertura del anillo de la lactida, para obtener altos pesos moleculares. Este proceso ha sido patentado por Cargill (US) en 1992 [11]. Es importante recalcar que a partir de L-ácido láctico ó L-Lactida se obtiene poli(L-ácido láctico) o poli(L-Lactida), respectivamente. Ambos son el mismo tipo de polímero pero provienen de diferentes monómeros y rutas de polimerización. La poli(L-lactida) proviene de la polimerización por apertura de anillo de la L-lactida.

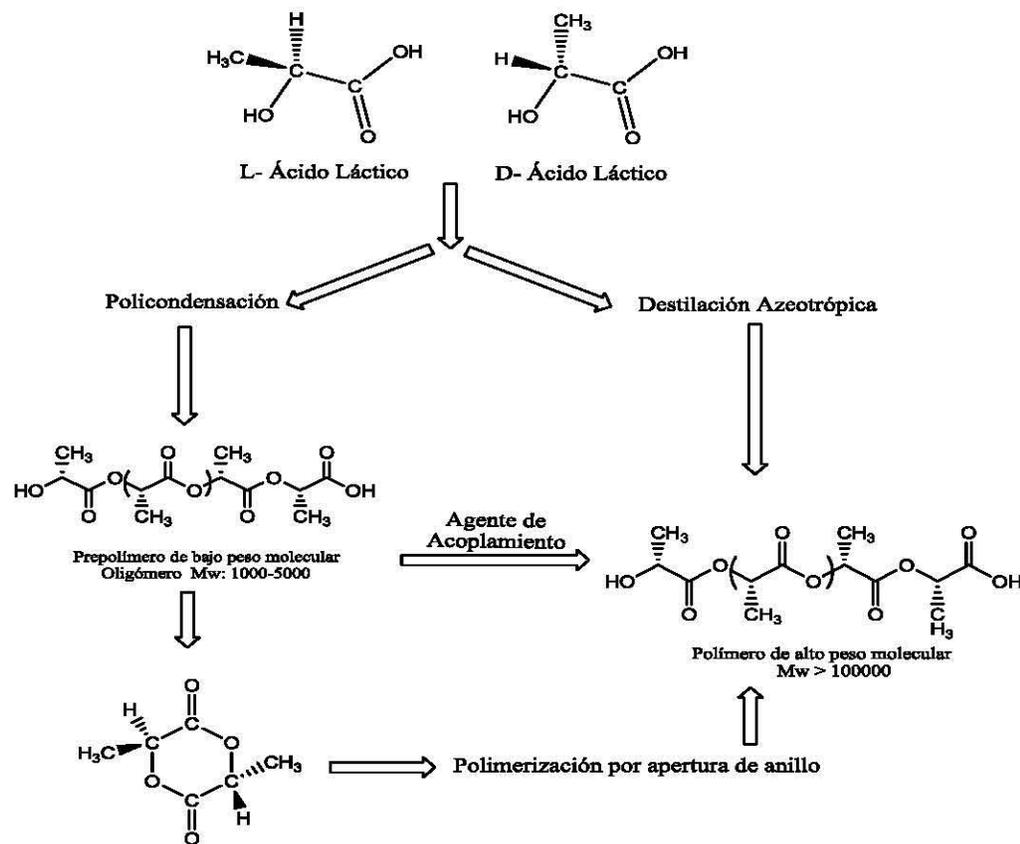


Figura 2.19. Métodos de síntesis para la obtención de poli(ácido láctico) de alto peso molecular [11].

2.6.3.1 Polimerización por apertura de anillo

La polimerización por apertura de anillo ocurre por reacciones de transesterificación intramolecular e intermolecular. Esta reacción es ampliamente estudiada debido a la posibilidad de controlar la química

y, por tanto, las propiedades de los polímeros resultantes. Este método es usualmente empleado para la síntesis de polímeros de alto peso molecular con un alto grado de estereoregularidad. Las polilactonas y polilactidas son exclusivamente obtenidas mediante esta ruta. La polimerización por apertura de anillo es clasificada en tres tipos de mecanismo: polimerización aniónica, polimerización catiónica y mecanismo de inserción-coordinación.

2.6.3.1.1 Polimerización Aniónica

Esta polimerización es iniciada cuando el anión nucleofílico del iniciador ataca el grupo carbonilo de la lactida, lo que resulta en la ruptura del enlace entre el carbono del carbonilo y el oxígeno endocíclico (acil-oxígeno). Este oxígeno es ahora el nuevo anión, alcóxido, el cual continúa propagándose para permitir el crecimiento de la cadena molecular (Figura 2.20). Sin embargo, los iniciadores altamente nucleofílicos son tan básicos que pueden deprotonar el monómero y conducir a una racemización con lo que la estereoquímica del polímero formado no se puede controlar (Figura 2.21). Por lo tanto, es muy difícil obtener polímero de alto peso molecular a partir de este método. Los ejemplos de iniciadores que dan polimerización aniónica son los alquil y alcoxi derivados de litio, potasio y magnesio.

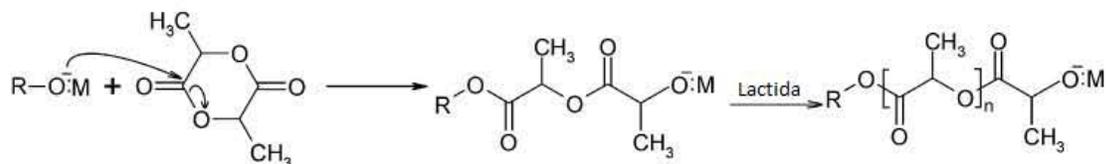


Figura 2.20. Polimerización por apertura de anillo aniónica [26].

Depolimerización Intermolecular



Depolimerización Intramolecular



Figura 2.21. Reacción de depolimerización [26].

2.6.3.1.2 Polimerización Catiónica

Los catalizadores para este método pueden ser carbocationes y algunos ácidos fuertes como trietiloxonio, tetrafluoroborato, trifluoruro de boro y ácido trifluoroacético. La etapa de iniciación de la polimerización cationica ocurre cuando uno de los oxígenos exocíclicos de la lactida es alquilado y protonado por el iniciador. De aquí, resulta un enlace O-CH cargado positivamente. El ataque nucleofílico por un segundo monómero rompe este enlace y crea otro ion carbenio. La etapa de propagación de esta polimerización se repite como un ataque nucleofílico por continua adición de monómeros, hasta que la polimerización es terminada por nucleófilos monofuncionales como el agua (ver Figura 2.22). La polimerización cationica a altas temperaturas causa racemización, desde que el segundo monómero ataca el centro quiral de la cadena propagante. Sin embargo, la racemización puede ser minimizada a una temperatura $> 50^{\circ}\text{C}$, pero a esta temperatura la velocidad de reacción es muy lenta y no se obtienen polímeros de alto peso molecular.

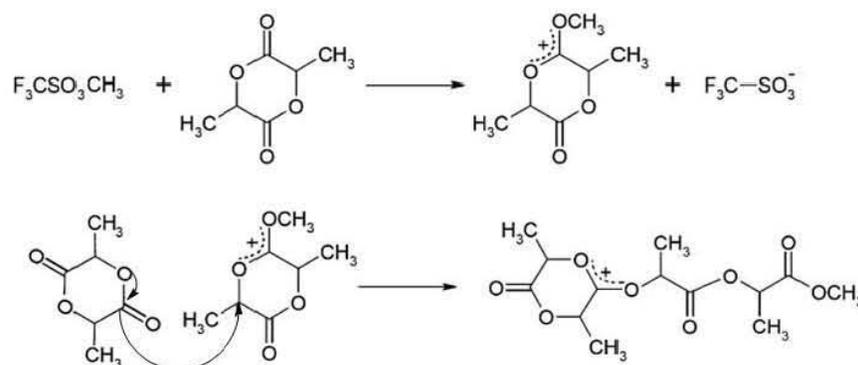


Figura 2.22. Polimerización por apertura de anillo cationica [26].

2.6.3.1.3 Mecanismo de coordinación-inserción

Este es el más ampliamente estudiado para la síntesis de poli(ácido láctico) de alto peso molecular. En este método, se emplean catalizadores como alcóxidos metálicos. Los alcóxidos de Magnesio (Mg), Zinc (Zn), Aluminio (Al), Estaño (Sn), Titanio (Ti), Zirconio (Zr), Samario (Sm), Itrio (Y), estos metales poseen orbitales libres p, d o f con energías favorables. Adicionalmente poseen un enlace covalente entre átomo metálico y el átomo de oxígeno comportándose como ácido de Lewis. La primera etapa ocurre cuando uno de los oxígenos exocíclicos de la lactida comienza temporalmente a coordinarse con el átomo metálico del iniciador. Esta coordinación incrementa la nucleofilicidad de la parte alcóxida del

iniciador, al igual que la electrofilicidad del grupo carbonilo de la lactida. En la segunda etapa, el enlace acil-oxígeno (enlace entre el grupo carbonilo y el oxígeno endocíclico) de la lactida se rompe y se inserta entre el enlace metal-oxígeno del iniciador. La polimerización continúa con la coordinación e inserción de moléculas de lactida (Figura 2.23) [26].

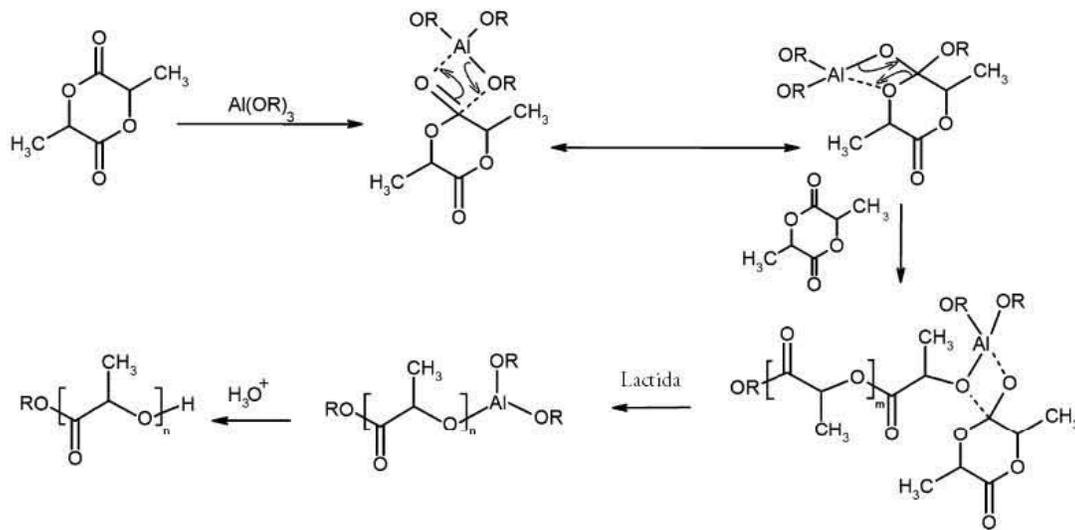


Figura 2.23. Polimerización por apertura de anillo mediante coordinación-inserción [26]

Un gran número de catalizadores han sido estudiados para la polimerización por apertura de anillo de la lactida. Los efectos en las propiedades como peso molecular, distribución del peso molecular y racemización del PLA han sido ampliamente estudiados. Los catalizadores para la síntesis del PLA consisten en diferentes metales y sus sales.

Los catalizadores usados principalmente consisten de polvos metálicos, ácidos de Lewis, bases de Lewis, compuestos organometálicos y diferentes sales de metales. Sin embargo, los compuestos organometálicos son muy efectivos en la síntesis de PLA de alto peso molecular particularmente alquilmetales y halogenuros, óxidos y carboxilatos. El catalizador más empleado es el octoato de estaño.

2.6.4 Propiedades del poli(ácido láctico)

En el proceso de obtención de poli(ácido láctico), tanto el método de síntesis como la relación de los enantiómeros D y L modifican las propiedades del producto resultante. El método de policondensación es usado para la síntesis de polímeros de bajo peso u oligómeros ($M_w < 5000$). Por el contrario, la

polimerización por apertura de anillo permite sintetizar polímeros de alto peso molecular ($M_w > 100000$). En relación a la cristalinidad, el PLLA y PDLA son materiales semicristalinos y su periodo de degradación supera los dos años. Por otro lado, el PDLLA es amorfo y degrada en aproximadamente 16 meses. La cristalización, el grado de cristalinidad, y las propiedades térmicas del PLLA depende del peso molecular, condiciones de polimerización, su historial térmico, su pureza, entre otras [10]. En cuanto a sus propiedades térmicas las propiedades mecánicas, el poli(ácido láctico) presenta menor resistencia al impacto y estabilidad térmica del PLA en comparación con los polímeros termoplásticos convencionales.

2.6.5 Aplicaciones Biomédicas del poli(ácido láctico)

El poli(L-ácido láctico) o la poli(L-lactida) ha sido ampliamente estudiado en las últimas cuatro décadas. Su producto de degradación por hidrólisis es el L-ácido láctico. Este último es metabolizado por nuestro organismo, a diferencia del monómero D-ácido láctico el cual se acumula y no sufre una degradación enzimática. Sus ventajas sobre materiales no degradables, son contrarrestar los largos periodos de tiempo que tardan en ser aceptados por el organismo y su remoción una vez que han cumplido su función.

El PLA se ha empleado para la fabricación de dispositivos de fijación tales como tornillos, placas y barras. También se han elaborado fibras, conocidas en el campo médico como “biotextil”, empleadas en suturas, industria farmacéutica, implantes y andamios para reconstrucción de tejidos.

Capítulo 3

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos para síntesis y proceso de electrohilado

L-Lactida (LLA) de PURAC. Octoato de estaño, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, de Reaxis CI29. Nanopolvo de Hidroxiapatita (n-HA) de Sigma-Aldrich. Poli(L-ácido láctico) de Natureworks. Xileno anhidro, Trifluoretanol, Cloroformo, Etanol y Acetona de Sigma-Aldrich usados sin previo secado.

3.1.2 Reactivos para pruebas biológicas

PBS (solución buffer, solución salina amortiguada de fosfatos) preparado en el laboratorio. Antibióticos (penicilina, estreptomicina y anfoterina). EDTA (ácido etil amino tetra acético) de ICN biomedical. Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium ,10% de suero fetal bovino, D-glucosa, 0.1 mM de aminoácidos) y Colagenasa tipo II de GIBCO. Tripsina. Solución amortiguadora de citoesqueleto (CB, 10 mM de MES, 150 mM de cloruro de sodio, 5 mM de ácido etilen glicon tetra acético, 5 mM de cloruro de magnesio, 5 mM de glucosa, pH 7). Paraformaldehído (PFA). Triton X-100. Gelatina. Anticuerpo primario (anti-vinculina de humano hecho en ratón). Anticuerpo secundario (anticuerpo de ratón tipo IgG (H+L) acoplado a fluoresceína (FITC)) de Zymed. Medio de montaje para fluoresceína (vectashield) de Vector Laboratories. Faloidina rodaminada de Sigma. DAPI (4,6 diamino 2 fenilidona). Dexametasona (DEX), L-ácido ascórbico y beta-glicerofosfato (sal disódica) de Sigma. Alamar azul y rojo de alizarina.

3.2 Metodología

3.2.1 Polimerización por apertura de anillo de L-lactida en presencia de nanocristales de hidroxiapatita

El material de vidrio se secó previamente a 130 °C durante 24 horas para eliminar trazas de agua. Seguidamente se realizó el montaje de la figura 3.1, antes de adicionar los reactivos se realizaron 3 ciclos de vacío y nitrógeno para garantizar una atmósfera inerte. Previamente se secaron los nanopulvos de hidroxiapatita a 130 °C durante 24 horas y se recristalizó el monómero L-Lactida con acetato de etilo. Se adicionaron al sistema 10 mL de xileno, se introdujeron 10, 30, 50, 70 y 100% en peso de hidroxiapatita en relación con el peso de lactida. Se empleó 0.5 μL de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ para todas las pruebas con catalizador (C), la cantidad de octoato de estaño se determinó manteniendo una relación LLA/C de 5000, la mezcla se agitó durante una hora a 90 °C. En presencia de nitrógeno se adicionó 1g del monómero L-Lactida y se aumentó la temperatura a 130 °C. Para llevar a cabo la polimerización por apertura de anillo, el sistema se dejó reaccionar durante 18 horas. Posteriormente, la reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. El injerto sintetizado se separó mediante lavado con 30mL de cloroformo y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm, esto para separar la poli(L-Lactida) formada que no se injertó. Finalmente se removieron las trazas de disolvente a 40 °C en un horno al vacío durante 3 días. Las condiciones de reacción se resumen en la tabla 3.1. En este estudio, la selección de la cantidad de catalizador y temperatura se basó en previas investigaciones realizadas por otros autores, para promover la polimerización por apertura de anillo [26, 32-33, 38, 40-41, 53, 60]. Las reacciones sin catalizador se realizaron bajo las mismas condiciones a excepción de la adición de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

El esquema de reacción propuesto por Helwig y colaboradores para la ϵ -caprolactona en presencia de hidroxiapatita se considera aplicable para esta reacción, dado que la L-lactida de igual manera reacciona por el grupo carbonilo, el más reactivo de la molécula [32]. En presencia de catalizador, inicialmente la reacción se lleva a cabo por la formación de un complejo de estaño con la hidroxiapatita, que posteriormente se coordina temporalmente con el diéster cíclico para realizar la apertura de anillo y permitir que este se injerte en la superficie de la hidroxiapatita. Por otra parte, las reacciones obtenidas en ausencia de catalizador son promovidas por los grupos hidroxilos presentes en la superficie de la hidroxiapatita. Esta reacción se logra mediante el ataque nucleofílico del ion OH^- sobre el enlace del aciloxígeno presente en el anillo. Después se da una transferencia de carga y la hidroxiapatita queda

iónicamente enlazada al grupo carbonilo del poli(L-lactida) y el grupo final hidroxilo del polímero continúa promoviendo la polimerización por apertura de anillo.



Figura 3.1. Montaje de reflujo para la reacción de injerto

Tabla 3.1. Condiciones de reacción en 10ml. de xileno durante 18 horas

Nombre de la Reacción	Hidroxiaparita [%]	Catalizador [μ L]
RLA-HA10-C	10	0.5
RLA-HA30-C	30	0.5
RLA-HA50-C	50	0.5
RLA-HA70-C	70	0.5
RLA-HA100-C	100	0.5
RLA-HA10	10	-----
RLA-HA50	50	-----
RLA-HA100	100	-----

3.2.2 Preparación de soluciones poliméricas de PLLA

Se prepararon soluciones de concentraciones de 10,12, 13 y 16% p/v de PLLA en trifluoretanol. En la tabla 3.2 se enlistan las soluciones preparadas. Aunque en algunos trabajos se reporta en uso de cloroformo, cloroformo/acetona, cloroformo/etanol y diclorometano para el poli(L-ácido láctico) [81], en este trabajo se seleccionó trifluoretanol por poseer un parámetro de solubilidad muy cercano al PLLA [118] y una mayor conductividad en comparación con los disolventes mencionados anteriormente [119].

Tabla 3.2. Soluciones de PLLA

Nombre de la solución	Concentración %p/v [g/mL]
10PLLA TEF	10
12PLLA TEF	12
13PLLA TEF	13
15PLLA TEF	15
16PLLA TEF	16

3.2.3 Preparación de las mezclas de PLLA con hidroxiapatita pura e injertada

La cantidad de PLLA se introdujo en un matraz aforado de 50mL. Posteriormente, se adicionó trifluoretanol hasta cubrir completamente el polímero. En presencia de agitación, se dejó disolver durante toda la noche. Seguidamente se adicionó hidroxiapatita pura (HA) o injertada (HAInj) a la solución de PLLA y se dejó agitar durante 1 hora para favorecer la dispersión de las partículas en el sistema. Finalmente se adicionó trifluoroetanol hasta aforar. La cantidad de HA y HAIinj está en relación al peso de PLLA medido para cada solución y se adicionó en porcentajes del 4, 10, 20 y 30% en peso. Estas cantidades son registradas en la tabla 3.3. Se empleó como hidroxiapatita injertada el producto obtenido de la reacción RLA-HA50, para esta selección se tuvieron en cuenta dos condiciones muy importantes: 1) producto con mayor porcentaje de injerto donde sólo se evidencie un evento de descomposición y 2) injerto obtenido sin trazas de metales, es decir, en ausencia de catalizador. La primera condición se explica en la sección 4.1.4 y, la segunda se estableció porque algunos autores

reportan que la presencia de metales en andamios para regeneración ósea puede causar daños en el organismo humano [42-43].

Tabla 3.3. Mezclas de PLLA con HA y HAInj

Nombre de la mezcla compuestas	Peso PLLA [g]	HA [%]	RLA-HA50 [%]
PLLA/HA_4	0.79	4	-----
PLLA/HA_10	0.78	10	-----
PLLA/HA_20	0.78	20	-----
PLLA/HA_30	0.78	30	-----
PLLA/HAInj_4	0.81	-----	4
PLLA/HAInj_10	0.80	-----	10
PLLA/HAInj_20	0.79	-----	20
PLLA/HAInj_30	0.80	-----	30

3.2.4 Proceso de electrohilado

El proceso de electrohilado emplea fuerzas electroestáticas para la producción de fibras. Una diferencia de potencial, medida en voltios, se emplea para hilar la solución y/o mezcla polimérica. Los parámetros empleados para la fabricación de andamios a partir de las soluciones poliméricas y mezclas compuestas son enlistadas en las tablas 3.4 y 3.5, respectivamente. El proceso se realizó bajo condiciones ambientales. Algunos parámetros se mantuvieron constantes, tales como: diámetro del capilar en 0.4 mm, peso molecular promedio en peso (\overline{M}_w) del poli(ácido láctico) en 282,000 gmol^{-1} , distancia entre el colector y el inyector de 30 cm y tipo de colector, lámina metálica de aluminio para repujado de 10 cm^2 . El equipo empleado para el proceso de electrohilado se fabricó en el laboratorio (ver figura 3.2).

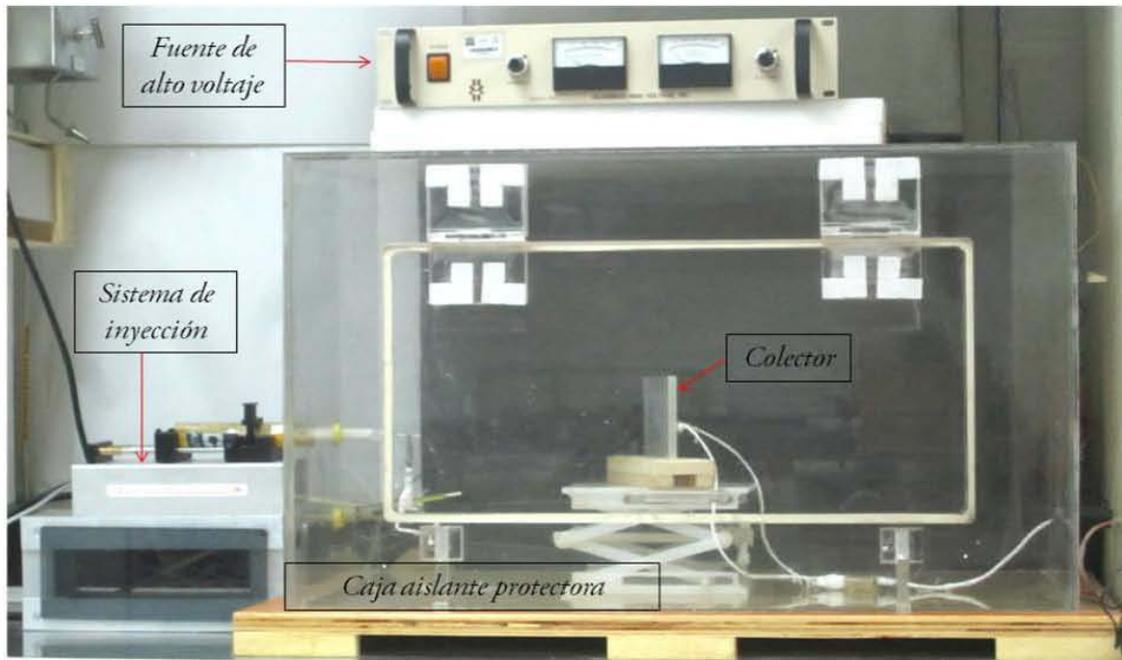


Figura 3.2. Equipo de electrohilado fabricado en el laboratorio

3.2.5 Parámetros del proceso de electrohilado para las soluciones y las mezclas compuestas.

3.2.5.1 Soluciones de PLLA

En la tabla 3.4 se muestran las condiciones de electrohilado que se emplearon para electrohilar las soluciones poliméricas. Donde Q y ΔV corresponden al flujo de inyección y a la diferencia de potencial, respectivamente.

Tabla 3.4. Condiciones de electrohilado soluciones de PLLA

Nombre de la solución	Q [mL/h]	ΔV [kV]
10PLLA TEF	0.6; 0.8	15; 25; 35
12PLLA TEF	0.6; 0.8	25
13PLLA TEF	0.6; 0.8	25
15PLLA TEF	0.6	15; 25
16PLLA TEF	0.6; 0.8	15; 25; 35

3.2.5.2 Soluciones de PLLA con HA y HAInj

Las condiciones de electrohilado para las mezclas compuestas fueron: flujo de inyección de 0.6mL/h, diferencial de potencial de 15kV y la distancia entre el colector y el inyector de 30 cm. Los parámetros empleados se determinaron con base en los resultados obtenidos del proceso anterior. Esto se explica a detalle en la sección 4.2.

CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN

3.2.6 Espectroscopía de infrarrojo

Espectroscopía de infrarrojo por transformada de fourier por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) se empleó un equipo ATR-Thermo Scientific Nicolet 6700. Los espectros se obtuvieron en el intervalo de 4000-400 cm^{-1} . Las mediciones se realizaron directamente sobre las muestras sin previa preparación. Esta técnica se empleó para obtener información de los grupos funcionales presentes en los productos de reacción.

3.2.7 Resonancia magnética nuclear de Carbono 13 y Fósforo 31

En la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de Fósforo (^{31}P -RMN) y Carbono (^{13}C -RMN) en sólidos, se empleó un equipo Bruker Avance III Microbay a 400 MHz con ángulo mágico, con una sonda de sólidos MAS 400 SB-01. La cantidad de muestra analizada fue de aproximadamente 500 miligramos. El mismo equipo con sonda para líquidos se empleó para la medición de ^{13}C de soluciones de PLLA y LA en cloroformo deuterado. Se pesaron 20mg de cada muestra y se disolvieron en 2mL de cloroformo deuterado. Mediante esta técnica se corroboró el enlace iónico de los grupos carbonilos del poli(L-lactida) con los grupos hidroxilos de la hidroxiapatita.

3.2.8 Análisis termogravimétrico

Mediante análisis termogravimétrico se determinó la cantidad de poli(L-lactida) injertado en la superficie de las nanopartículas de hidroxiapatita. Se utilizó un equipo Perkin-Elmer 7 series thermal analysis system. Las mediciones se realizaron desde temperatura ambiente hasta 500°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La cantidad injertada se supuso como la pérdida de peso del compuesto durante el proceso de calentamiento.

CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS

3.2.9 Conductividad eléctrica de las soluciones poliméricas y mezclas compuestas.

La conductividad eléctrica de las soluciones se midió con un conductímetro CDM210. Previamente a las mediciones se calibró la constante de la celda de conductividad con una solución de KCl 0.1M. La conductividad se midió a temperatura ambiente (25°C). Inicialmente se transvasó la solución a un tubo de ensayo. Seguidamente se introdujo la celda de conductividad a una altura media sin tocar las paredes del tubo y, finalmente, se midió la conductividad por un periodo de 10 minutos. Este proceso se realizó para cada una de las soluciones y mezclas. Cada tubo de ensayo se selló en la parte superior con papel parafinado para evitar influencia de las moléculas presentes en el ambiente. Antes de cada medición, la celda se limpió con cloroformo y etanol.

3.2.10 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología y distribución de las fibras electrohiladas se observó mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM, en inglés *Scanning Electronic Microscope*), en un microscopio Leica-Cambridge Stereoscan 440, equipado con filamento de tungsteno. El voltaje de operación para el haz de electrones fue de 20 kV. Las muestras fueron previamente recubiertas con oro, para hacerlas eléctricamente conductoras. El recubrimiento se realizó al vacío, a una corriente de 30mA durante 3 minutos.

3.2.11 Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)

La técnica de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS, en inglés *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) se usó para entender la distribución de partículas de hidroxiapatita pura e injertada en los andamios electrohilados. Se realizó un mapeo elemental de carbono (C), calcio (Ca) y fósforo (P) a las muestras de PLLA/HA_4 y PLLA/HAIinj_4. Se empleó un espectrómetro de energía dispersiva de rayos X, marca Oxford Inca X-ACT, acoplado a un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, Jeol JSM-7600F. El voltaje de operación fue de 15kV. Las muestras se cargaban electrostáticamente en la superficie, para evitar acumulaciones de carga fue necesario aterrizarlas recubriéndolas con oro.

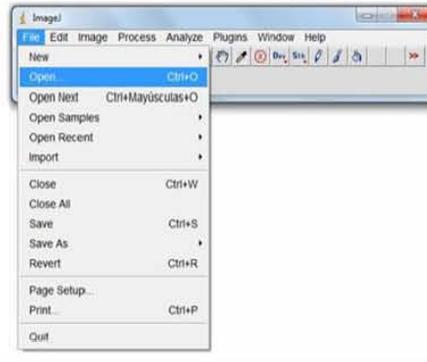
3.2.12 Determinación del diámetro promedio de las fibras y porcentaje de área porosa de los andamios.

El programa Image J es empleado para la medición del diámetro promedio de las fibras y el porcentaje de área porosa de las membranas. Las imágenes seleccionadas para estas mediciones son micrografías de 10000 y 2000 aumentos, respectivamente.

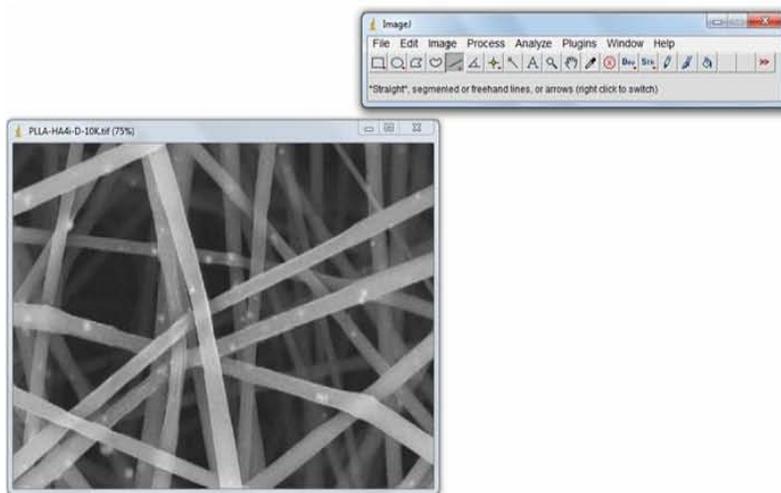
El procedimiento para la medición de diámetro promedio consta de 6 pasos: 1) Se abre la imagen a evaluar con el programa Image J, 2) se selecciona la herramienta de medición, 3) se determina la escala de medición, estableciendo una relación entre micras y píxeles, 4) se mide el diámetro de las fibras, 5) se almacenan los datos medidos en un archivo de texto, posteriormente se evalúa la desviación estándar de los diámetros y 6) se determina la distribución, los datos obtenidos de distribución son graficados en forma de barras con Excel. Para la medición de diámetros, las fibras en las micrografías deben presenciarse en el primer plano y ser continuas. Se miden 35 diámetros por cada micrografía. En las figuras 3.3 a 3.4 se explican paso a paso el uso del programa Image J para la determinación de diámetros promedios.

El procedimiento para la determinación del porcentaje de área porosa o espacios vacíos se obtiene en 5 pasos: 1) Se abre la imagen con el programa Image J, 2) se mide la escala de micras en píxeles, 3) se establece un diferencia de colores o umbral en la imagen, para diferenciar poros de fibras, 4) se analiza la imagen con una herramienta del programa y 5) se determina el porcentaje de área porosa. En las figuras 3.5 a 3.7 se explican paso a paso el procedimiento anterior.

1



2



3

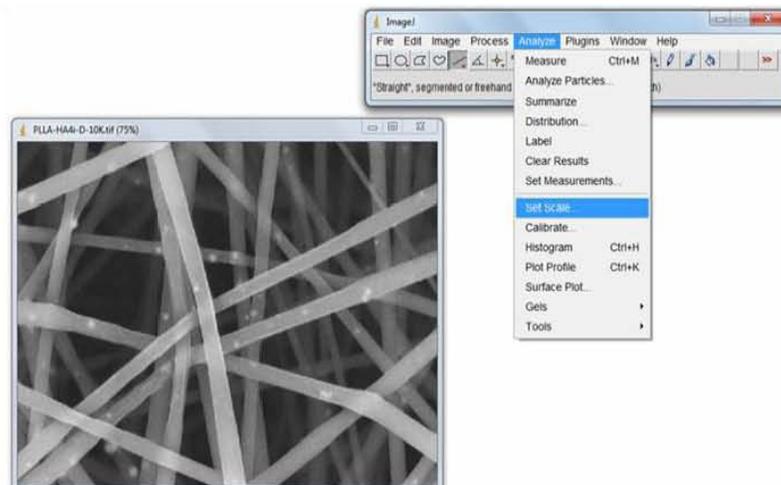
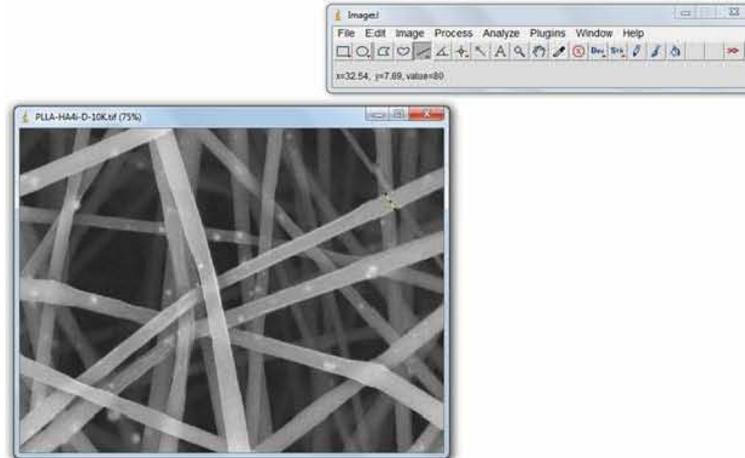
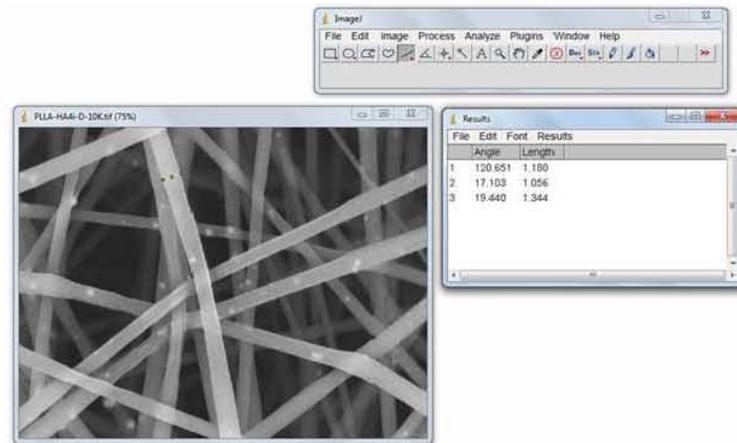


Figura 3.3 Procedimiento para la determinación del diámetro promedio empleando Image J, paso 1 a 3.

4



5



6

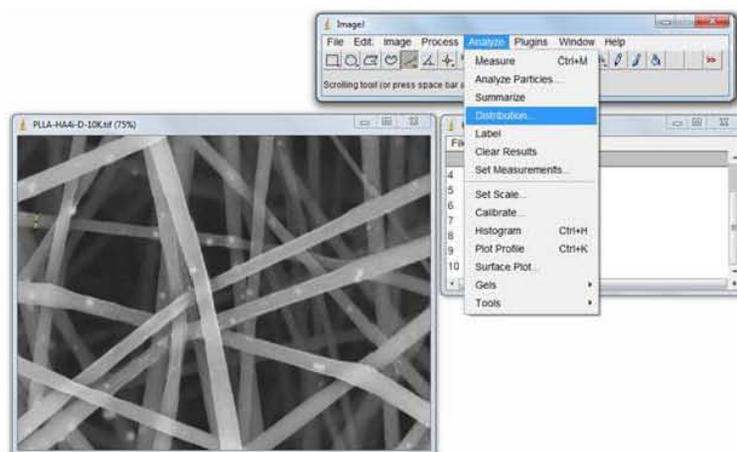
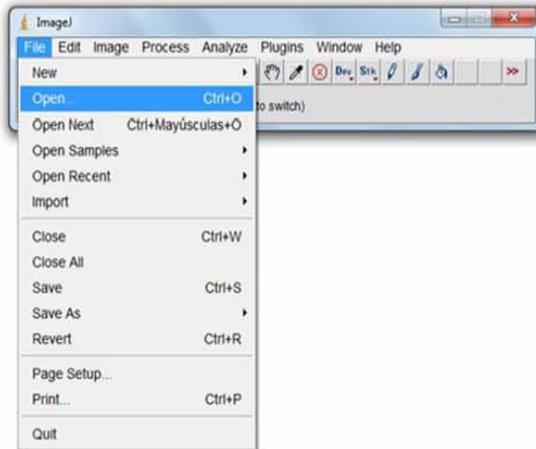


Figura 3.4. Procedimiento para la determinación del diámetro promedio empleando Image J, paso 4 a 6.

1



2

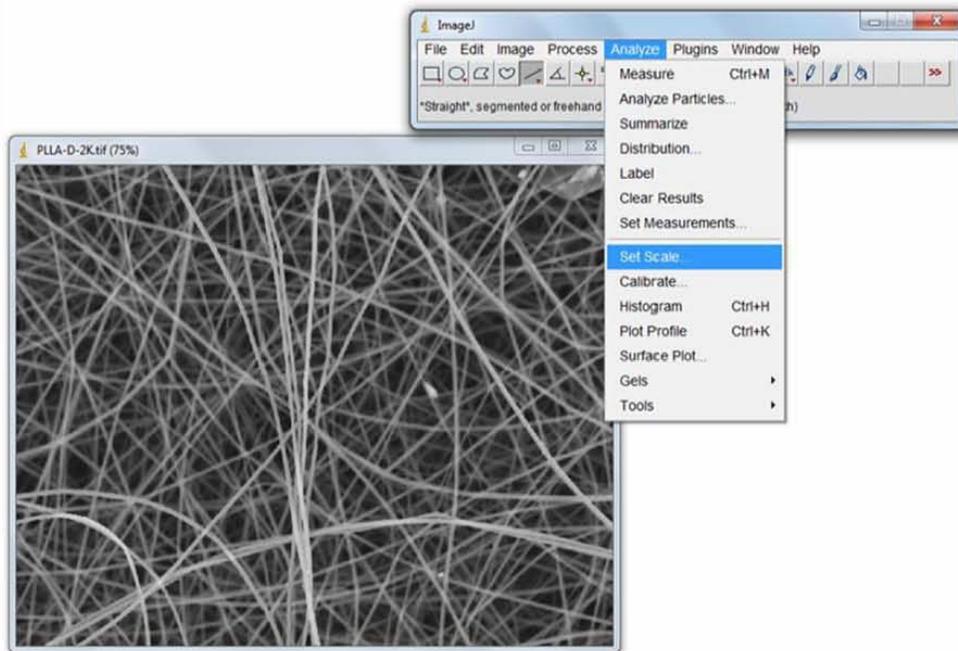


Figura 3.5. Procedimiento para la determinación del porcentaje de área porosa, paso 1 a 2.

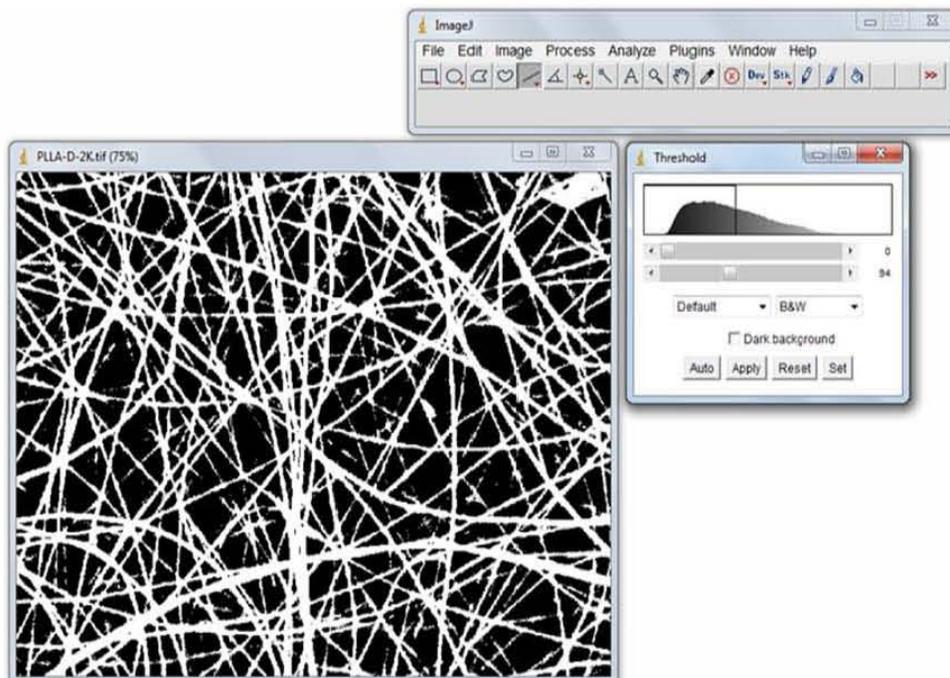
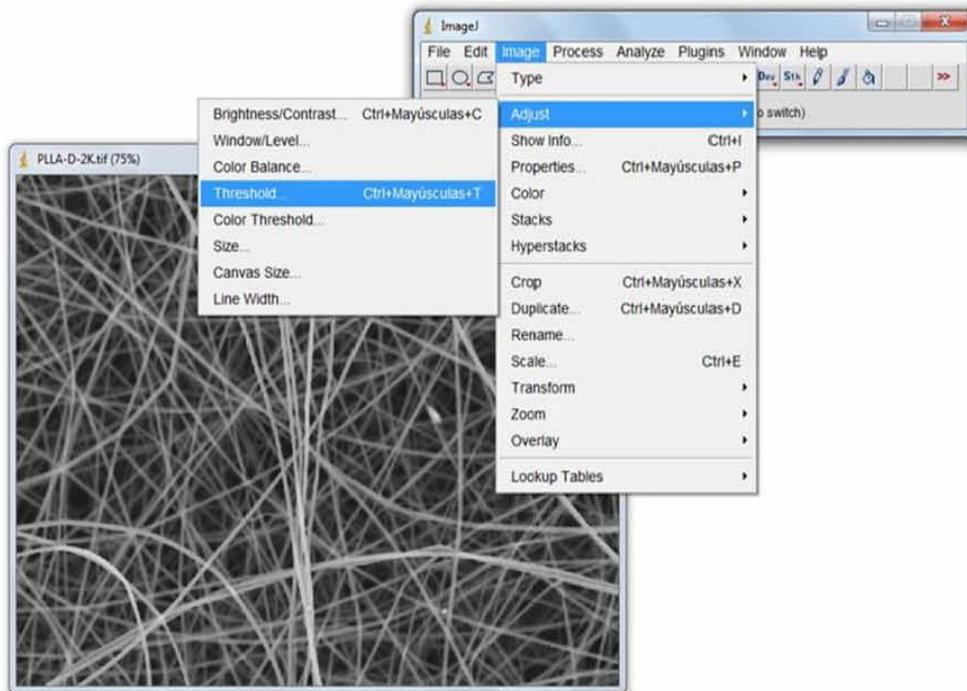
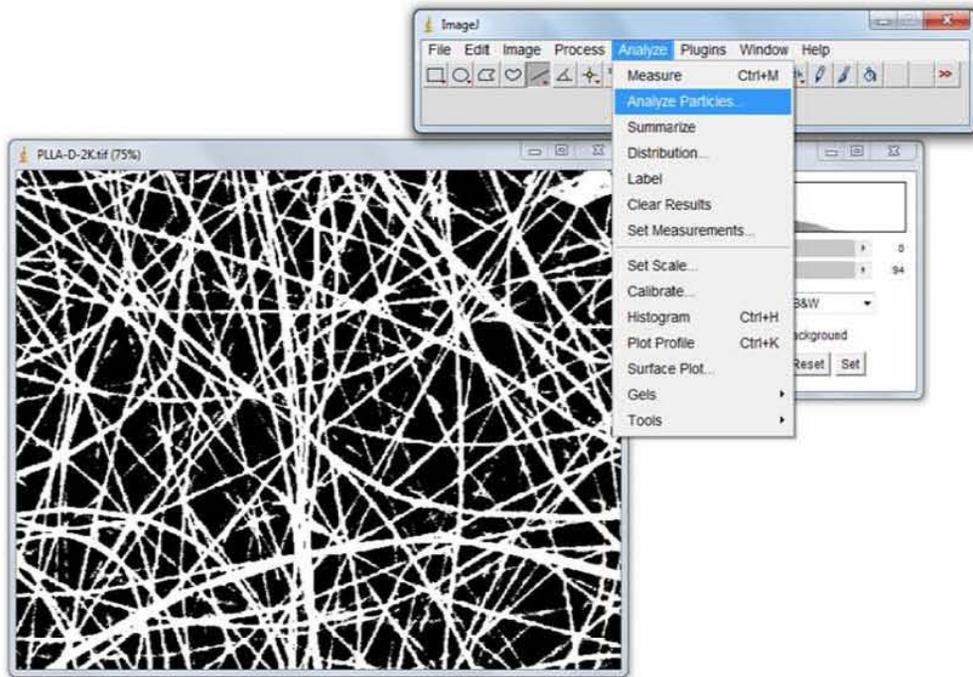


Figura 3.6. Procedimiento para la determinación del porcentaje de área porosa, paso 3.

4



5

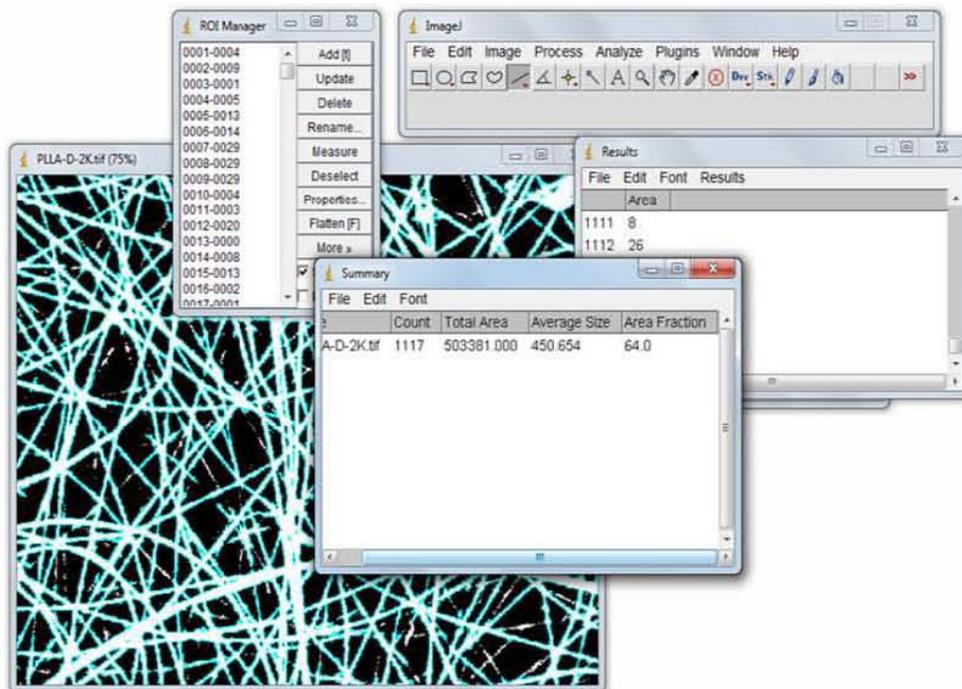


Figura 3.7. Procedimiento para la determinación del porcentaje de área porosa, pasos 4 y 5.

3.2.13 Caracterización Mecánica

Las propiedades mecánicas de los andamios obtenidos de la solución de PLLA puro y mezclado con HA ó HAInj se midieron en un equipo marca MTS minibionix 858, (ver figura 3.8). Las probetas se prepararon según la norma ASTM D1708 [99], se cortaron sobre papel aluminio repujado sin presentar desperfectos en sus curvaturas y se obtuvieron con espesores entre 0.04-0.1mm. De cada andamio se extrajeron entre 5-7 probetas, como se observa en la tabla 3.6. Para todos los ensayos se empleó una velocidad de 10mm/min y una carga de 110N. Los datos obtenidos de cada ensayo de tensión se generaron en un archivo de texto, debido a la cantidad de datos fue necesario procesarlos con el programa Matlab 2010R para calcular el esfuerzo y la deformación en cada punto de muestreo. Seguidamente, estos datos se graficaron para obtener la curva esfuerzo-deformación. De estas curvas se determinaron los valores de módulo elástico (E), esfuerzo de cedencia (σ_c), resistencia a la tensión (σ_{TS}) y su deformación (ϵ_{TS}).



Figura 3.8. Máquina de ensayo de tensión Minibionix

Tabla 3.5. Número de probetas por andamio electrohilado

Nombre de Andamio	Cantidad de probetas	Nombre de Andamio	Cantidad de probetas
PLLA	5	PLLA/HAlnj_4	5
PLLA/HA_4	5	PLLA/HAlnj_10	6
PLLA/HA_10	5	PLLA/HAlnj_20	6
PLLA/HA_20	5	PLLA/HAlnj_30	6
PLLA/HA_30	7		

La curva esfuerzo deformación presentó tres zonas, como se muestra en la figura 3.9.

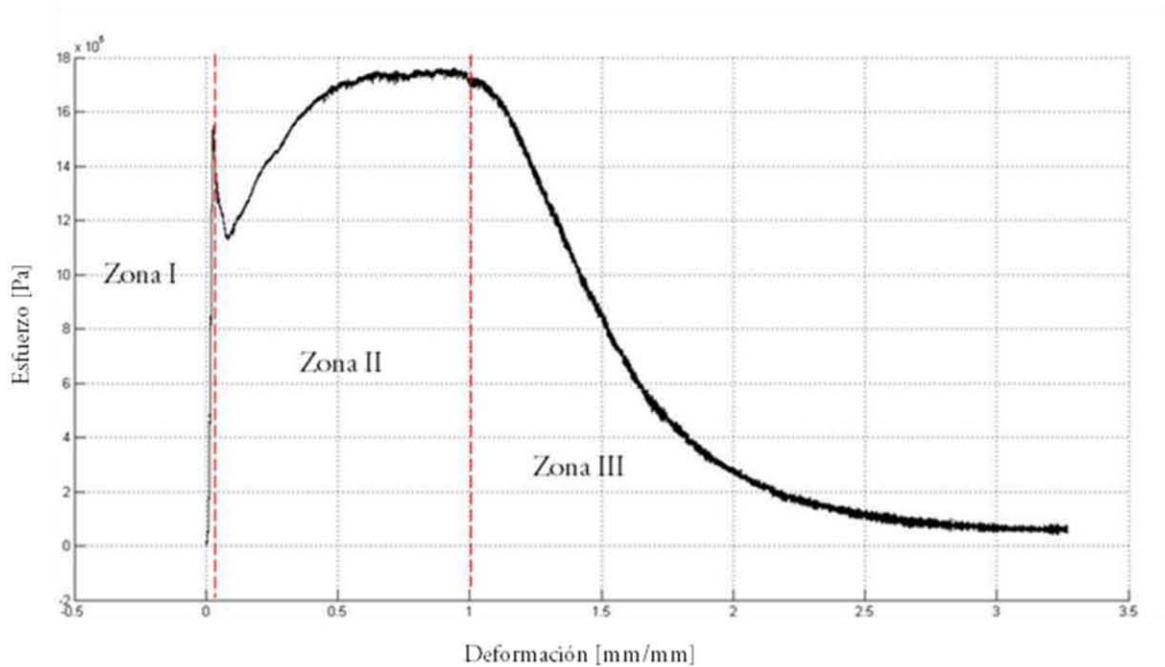


Figura 3.9. Curva esfuerzo-deformación

Para la determinación del módulo elástico se amplió la primera zona, para observarla mejor, con Matlab 2010R y se determinó la pendiente empleando dos puntos medio sobre la recta, ver figura 3.10.

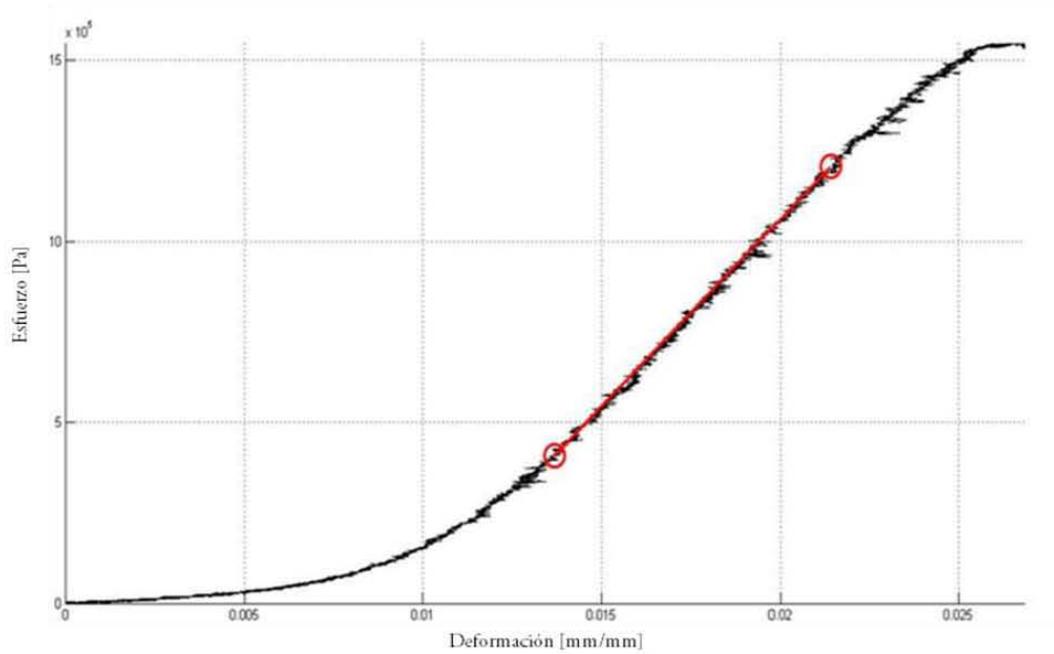


Figura 3.10. Ampliación zona elástica de la curva esfuerzo-deformación para determinar el módulo elástico.

El esfuerzo de cedencia es el punto máximo de la zona I, este se determina trazando una línea horizontal hacia el eje de las ordenadas, figura 3.11.

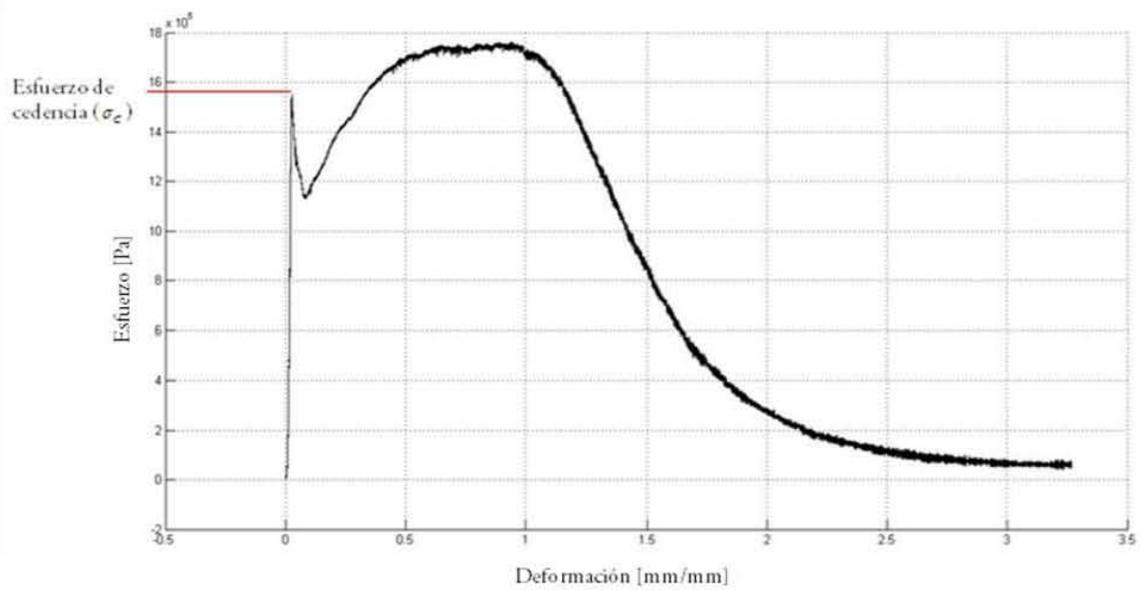


Figura 3.11 Determinación esfuerzo de cedencia de la curva-esfuerzo deformación.

La resistencia a la tensión se observó como un punto máximo en la zona II, esta zona se amplió y se determinó σ_{TS} de la misma manera que el esfuerzo de cedencia. La deformación en este punto se midió trazando una línea vertical hasta cortar con el eje de las abscisas, ver figura 3.12.

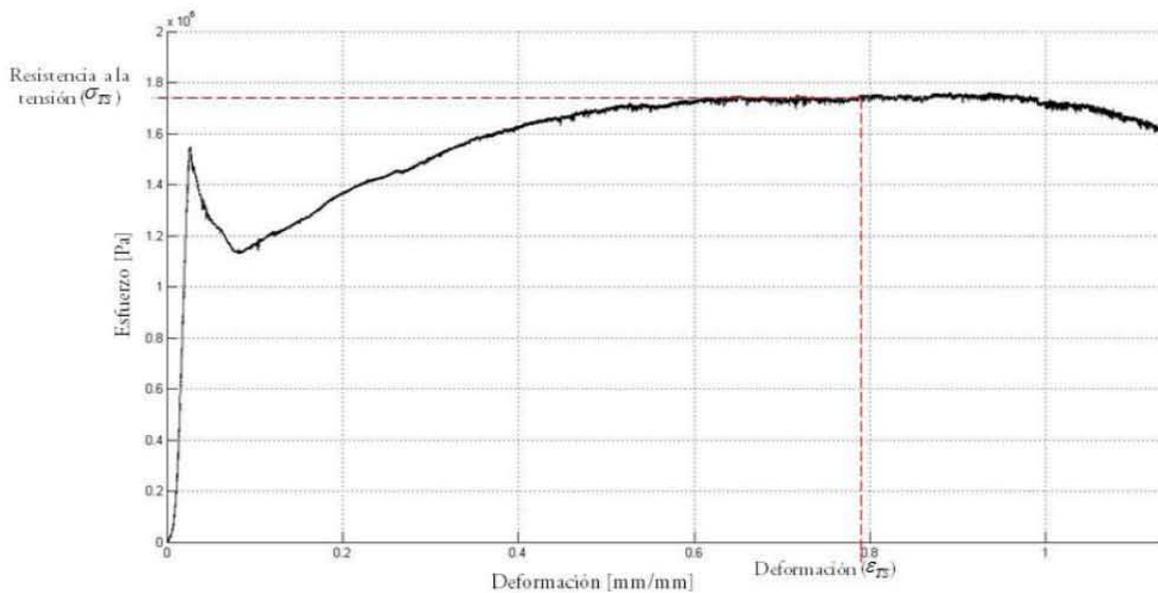


Figura 3.12. Determinación de la resistencia a la tensión y su deformación

3.2.14 Caracterización Biológica

3.2.14.1 Proceso de elección y obtención de las muestras de placenta

Para la elección de las pacientes candidatas para la donación de la placenta se tomaron en cuenta los siguientes criterios de selección: se incluyeron placentas provenientes de mujeres embarazadas que tras valoración de la historia obstétrica en el momento de la llegada a la maternidad, ésta se considere normal y con los controles serológicos de rutina efectuados durante el embarazo con resultado negativo (HBsAg, HCV y HIV como mínimo). Asimismo se excluyeron del estudio: placentas provenientes de una gestación inferior a 32 semanas, en las que existió ruptura de la membrana de 12 o más horas antes del parto, placentas de mujeres que presentaron fiebre superior a 38°C, aquellas que provenían de gestaciones con inmunización feto-materna, en las que se detectó sufrimiento fetal y finalmente aquellas placentas que provenían de mujeres con alguna patología adicional (pre/ eclamsia, diabetes, hipertensas). Con estos criterios se aseguró de no intervenir en embarazos y/o partos de alto riesgo y por otro lado de eliminar placentas con evidencias de procesos infecciosos. Una vez que se seleccionaron las pacientes, se les informó acerca del uso que se le daría a la placenta y en caso de aceptar participar, se les invitó a firmar una carta de consentimiento informado. Luego del alumbramiento se tomó toda la placenta y se envió al departamento de biología molecular para proceder a la obtención de la membrana amniótica bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

3.2.14.2 Obtención y cultivo de las células madre de la membrana amniótica

La membrana amniótica es un tejido delgado, semitransparente y avascular que constituye la capa más interna de las membranas fetales que conforman la placenta y delimitan el saco o cavidad amniótica, la zona de la cual se realiza la toma es aquella que está más proximal del sitio de unión con el cordón umbilical. La muestra se toma del área interna (aproximadamente 1 cm³) del lóbulo central de la placenta, los fragmentos de membrana son lavados con PBS y una mezcla de antibióticos con la finalidad de reducir el riesgo de contaminación. Posteriormente, las células son liberadas del tejido mediante digestión con tripsina al 0.25% en EDTA durante 30 min a 37°C en agitación constante y posteriormente con un tratamiento con colagenasa tipo II 100 U/ml pH 5.6 durante 2 hrs a 37°C, con este tratamiento se asegura obtener la mayor cantidad de células presentes en la membrana amniótica. La células en suspensión son contadas en cámara de newbauer y llevadas a una densidad de aproximadamente 100,000 células/ml en control de DMEM y, posteriormente son plaqueadas en placas

de cultivo a una densidad de 10000 a 15000 células por cm² de área de crecimiento e incubadas a 37°C con 5% CO₂. Las células son mantenidas en este medio durante 72 hrs para permitir que se adhieran y posteriormente el medio es cambiado cada tercer día por medio control fresco. Entre los días 14 y 16, las células son tripsinizadas mediante incubación con tripsina al 0.25%, luego replaqueadas a una densidad entre 5000 y 6000 células por cm² para su expansión.

Para realizar el cultivo celular en los diferentes andamios, éstos fueron esterilizados previamente mediante exposición a la luz UV durante 1 hora. Posteriormente con la finalidad de acondicionar y humectar los andamios fueron sumergidos en medio de cultivo DMEM suplementado durante 12 horas aproximadamente, a 37°C, se ha reportado que este procedimiento permite la adhesión de las proteínas provenientes del suero fetal bovino en la superficie de los andamios, facilitando así la adhesión celular. A continuación, los diferentes andamios fueron colocados en placas de 12 pozos. Se depositaron 400 células/pozo (en un volumen aproximado de 100 µL de medio) sobre cada uno de los andamios, se incubó por 30 min a 37°C y posteriormente se añadieron 500 µL de medio de cultivo en cada pozo. Los pozos de la placa de cultivo de poliestireno fueron utilizados como controles bidimensionales.

3.2.14.3 Inmunofluorescencia indirecta evidenciar presencia de vinculina

Para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, las células cultivadas sobre cubreobjetos ó bien sobre los diferentes andamios de PLLA, PLLA/HA y PLLA/HAInj, se mantuvieron en una cámara húmeda durante todo el proceso. Con la finalidad de mantener la estructura del citoesqueleto, las células fueron lavadas con la solución CB. Inicialmente, las células se fijaron con una solución de PFA al 3 % durante 15 min. a temperatura ambiente, posteriormente, la membrana celular se permeabilizó por 5 min. con una solución de Tritón x-100 al 0.1 % y PFA al 3% en CB. En este punto es importante no sobrepasar el tiempo para conservar la integridad de la membrana. Para bloquear los sitios inespecíficos se utilizó gelatina al 0.5% en PBS durante 20 min. a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario diluido 1:100, se realizó durante toda la noche a 4°C, protegiendo en todo momento las muestras de la luz; finalmente se incubó durante 1 hr con el anticuerpo secundario diluido 1:100 en PBS. Para proteger la calidad y la intensidad de la fluorescencia, las muestras se montaron sobre los portaobjetos con el medio de montaje vectashield. Todas las muestras fueron contrateñidas con faloidina rodaminada (citoplasma) y DAPI (núcleo). Para la tinción con faloidina, las células se incubaron durante 2 hrs. a temperatura ambiente en una solución con una concentración final de 0.5 µg/ml, mientras que para DAPI se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente en una solución con una concentración

final de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Las imágenes se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia (Nikon) acoplado al sistema de láser confocal Bio-Rad MRC 600 (figura 3.13), para lo cual se realizaron una serie de 8-12 cortes en Z.

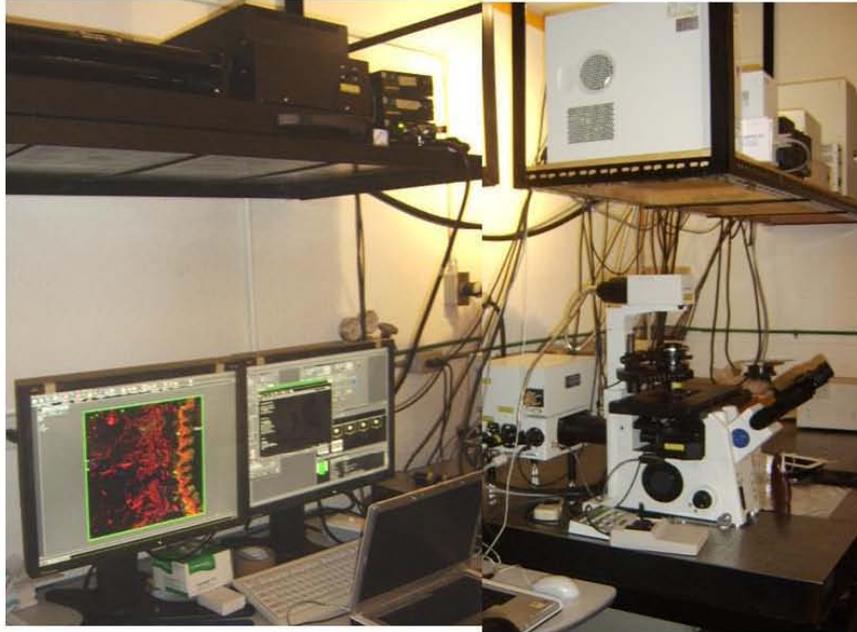


Figura 3.13. Microscopio de epifluorescencia acoplado con un láser confocal

3.2.14.4 Ensayo de proliferación con alamar azul

Este ensayo está basado en la detección de la actividad metabólica. Para medir la tasa de proliferación se empleó el método colorimétrico, el cual se basa en la conversión de resazurina a resorufina. La resazurina (constituyente principal del “Alamar azul” MR), es un colorante indicador, no – fluorescente el cual se convierte a un tinte color rojo intenso, fluorescente (resorufina) mediante reacciones de reducción en las células metabólicamente activas. La cantidad de fluorescencia producida es directamente proporcional al número de células vivas. Para el ensayo, las células se cultivaron en una concentración inicial de 1000 cel/cm^2 en una placa de 6 pozos. Cada 24 horas de cultivo, el alamar azul se adicionó asepticamente a los pozos en cantidades equivalentes a 10% del volumen incubado. La reducción de la coloración en los cultivos es un reflejo de la proliferación celular y es cuantificada, después de cuatro horas de incubación, mediante la medición de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. La medición de la absorbancia

se realizó con un equipo Fluormicroplate reader (Bio-tek Instrument) durante cuatro días. Este ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los andamios y en cada tiempo.

3.2.14.5 Diferenciación osteogénica

La diferenciación hacia la línea osteoblástica es inducida con una mezcla osteogénica que consiste en medio DMEM suplementado, 10nM de dexametasona, 0.1 mM de L-ácido ascórbico y 10 mM de beta-glicerofosfato (DEX+). Para obtener osteoblastos completamente diferenciados, los cultivos son mantenidos en esta medio durante 21 días.

3.2.14.6 Tinción con rojo de alizarina para evaluar depósitos de calcio

Una serie de experimentos de control se realizaron para determinar por un lado si la cristalización del calcio ocurría en aquellos cultivos celulares mantenidos en medio DMEM, asimismo para registrar la absorbancia generada tan solo por los andamios en ausencia de células.

El rojo de alizarina-S (AR-S) es un colorante que se une selectivamente a las sales de calcio y es ampliamente utilizado para la histoquímica del calcio. AR-S se une 2 moles de Ca/mol de colorante en la solución. Para el ensayo, las células en cultivo se lavaron con PBS seguido de la fijación con formaldehído al 10%. Posteriormente, se enjuagaron con agua y se tiñeron durante 20 minutos con 40 mM AR-S, pH 4.2, a temperatura ambiente con agitación. Los cultivos se enjuagaron cinco veces con agua y, se lavaron finalmente durante 15 minutos con PBS (con rotación) para reducir la tinción inespecífica de AR-S. Posteriormente, se realizó la extracción del material calcificado con una solución de ácido clorhídrico 0.6 N durante 8 -12 hrs. Este extracto ácido, es neutralizado con hidróxido de amonio al 10% y la absorbancia se midió a 405 nm. Para calcular la concentración de AR-S, se construyó una curva estándar a partir de 2mM y sucesivas diluciones seriadas con un factor de 2.

Los principios teóricos de las técnicas empleadas en esta sección son explicados en el Anexo 2.-

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la hidroxiapatita injertada (HAI_{nj})

En esta sección se analiza la reacción de L-lactida con hidroxiapatita en presencia y ausencia de octoato de estaño. Los productos obtenidos se caracterizaron por espectroscopía de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de ^{13}C y ^{31}P , resultados con los cuales se corroboró el injerto de PLLA en la superficie de las partículas de hidroxiapatita. La cantidad de injerto se evaluó por análisis termogravimétrico.

4.1.1 Espectroscopía de Infrarrojo

En la figura 4.1 se muestra el espectro de infrarrojo de la hidroxiapatita con sus señales características. La asignación de bandas por grupo funcional se basó en el estudio reportado por Martínez-Valencia y colaboradores [92] y se muestran en la tabla 4.1. Las vibraciones más representativas, para el análisis de los injertos sintetizados en este trabajo, son las del grupo fosfato en 1085 y 1016 cm^{-1} y grupo hidroxilo en 3572 cm^{-1} , estas señales son resaltadas con óvalos en la figura 4.1.

Tabla 4.1. Asignación de señales infrarrojo de hidroxiapatita

Grupo Funcional	Número de onda [cm^{-1}]
O-H (ν)	3572
C-O (ν)	1455; 1413
P-O (δ_{as})	1085; 1016; 961
C-O (δ)	874
P-O (δ_s)	599
O-P-O (ν)	562; 473

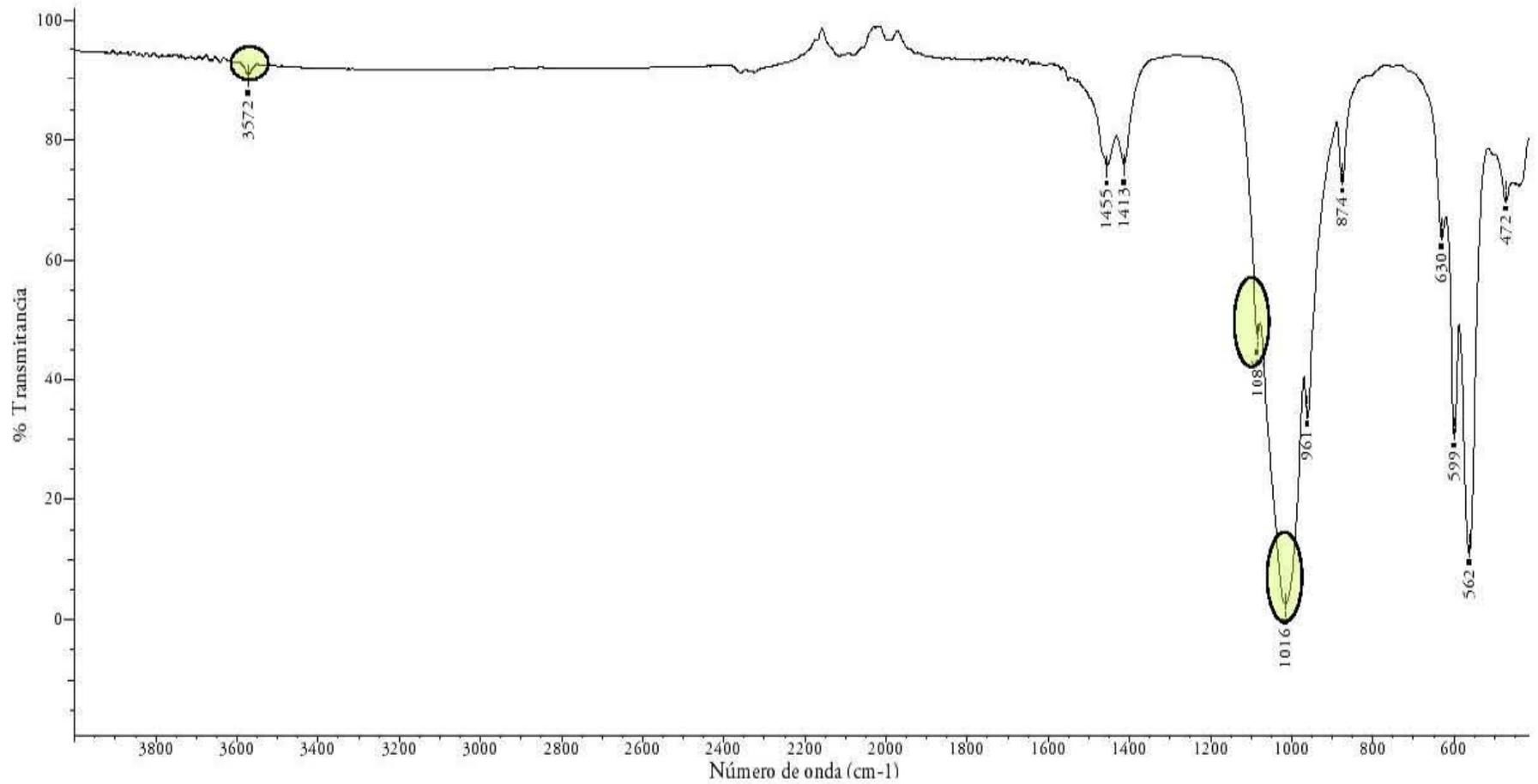


Figura 4.1. Espectro infrarrojo de hidroxiapatita

En la figura 4.2 se muestra el espectro de infrarrojo del poli(L-lactida) y en la tabla 4.2 la asignación de estas señales. La señal de 1745cm^{-1} está referida al grupo carbonilo presente en el PLLA. Las señales entre 2900-3100 son las vibraciones de los grupos metilo y metileno constituidos en la cadena carbonada. Las señales entre 500-1000 (-CH) son movimientos de flexión de los grupos metilo y metileno. Para el análisis de los injertos es importante la presencia del grupo carbonilo, señal resaltada con un óvalo en la figura 4.2.

Tabla 4.2. Asignación de Señales infrarrojas del poli(L-lactida)

Grupo Funcional	Número de onda [cm^{-1}]	Grupo Funcional	Número de onda [cm^{-1}]
CH_3 (ν_{as})	2946 – 2996	COC (ν_{as}) + CH_3 (γ_{as})	1181
CH (ν)	2878	CH_3 (γ_{as})	1128
C=O (ν)	1745	C-OH (δ)	1083
CH_3 (δ_{as} , δ_s)	1356 – 1450	CH_2 (γ)	1041
CH (δ)	1301	CH_3 (γ) + CC (ν)	956
CH (δ) + COC (ν)	1265	C-COO (ν)	867 – 755

Los espectros obtenidos de las reacciones de injerto presentan la formación del grupo carbonilo entre $1749 - 1760\text{ cm}^{-1}$ y de carboxilato en $1580-1600$, en algunos se observan las señales con mayor intensidad. En esta sección se analiza el espectro obtenido para el producto de reacción RLA-HA50, figura 4.3. Los espectros de las demás reacciones RLA-HA10-C, RLA-HA30-C, RLA-HA50-C, RLA-HA70-C, RLA-HA100-C, RLA-HA10 y RLA-HA100 se pueden observar a partir de la figura A1.1 hasta la A1.7 en el Anexo 1. En la figura 4.3 se observa una señal de 1749 cm^{-1} característica del grupo carbonilo y otra en 1593 cm^{-1} correspondiente al grupo carboxilato. La primera señal indica la formación de la poli(L-lactida) y, la del grupo carboxilato se atribuye a un enlace iónico formado entre las partículas de hidroxiapatita y el polímero formado

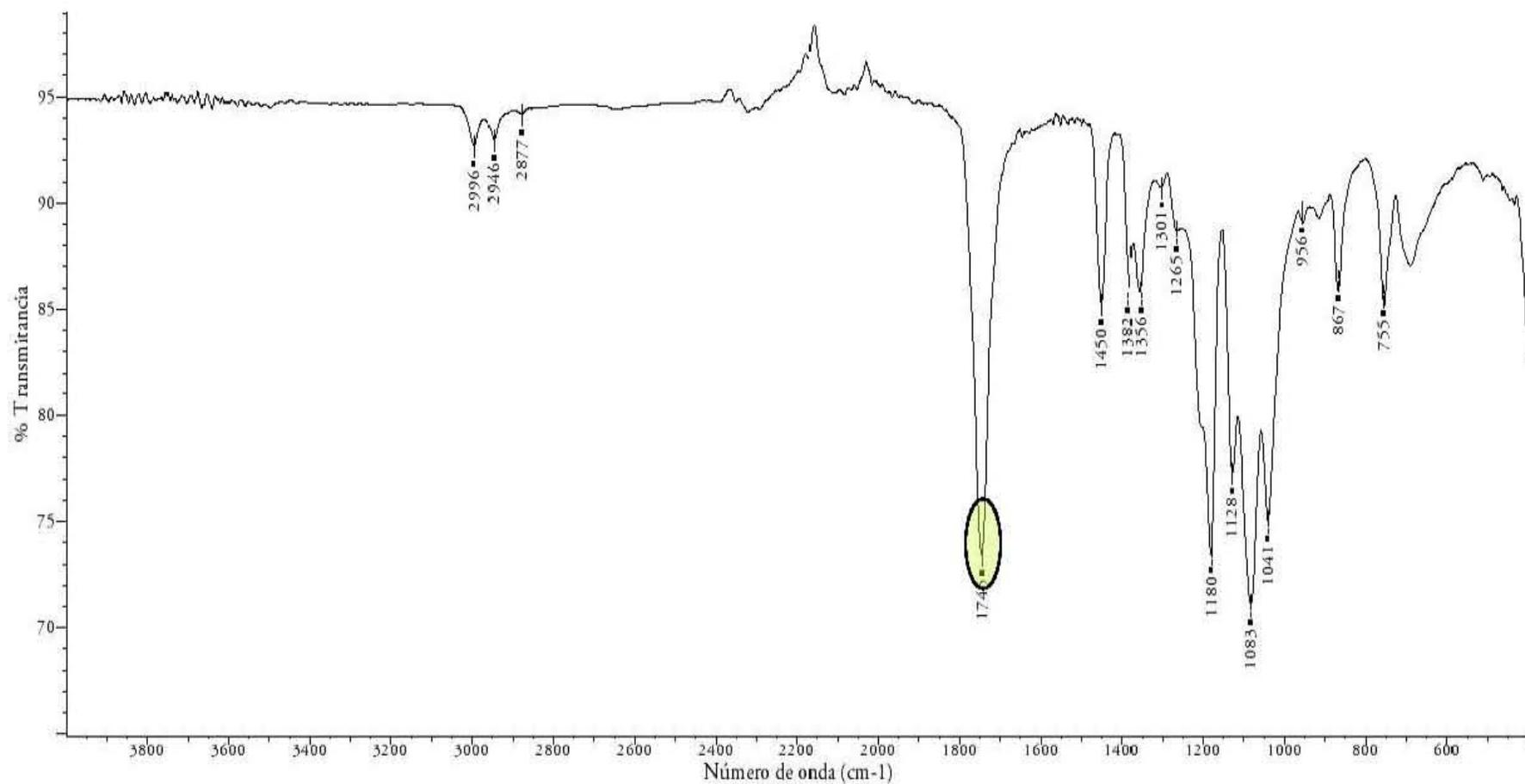


Figura 4.2. Espectro infrarrojo de poli(L-lactida)

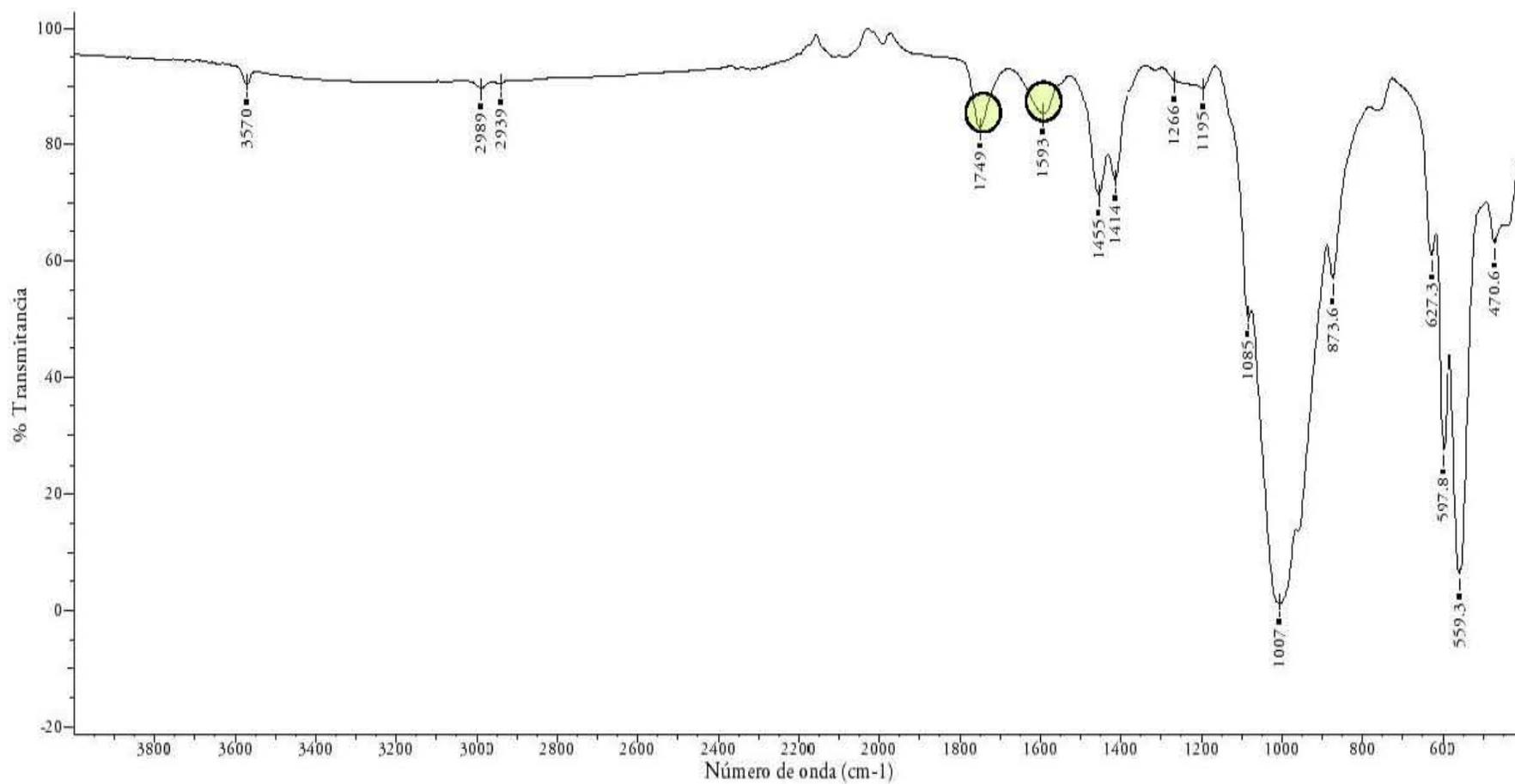


Figura 4.3. Espectro de Infrarrojo RLA-HA50

El resultado encontrado de la polimerización en presencia de catalizador concuerda con los reportados por otros autores [32, 41, 93-94]. También se observa la misma señal de carboxilato presente en las reacciones sin catalizador, lo cual indica que se logró el mismo tipo de enlace. No se encontró en la literatura resultados reportados de la polimerización en ausencia de catalizador para L-lactida. La señal del grupo carbonilo del poli(L-lactida) y las señales relevantes de la hidroxiapatita son observadas en cada uno de los espectros, también se aprecian los grupos metileno con señales de muy baja intensidad. En los espectros se observa que el grupo fosfato no se modifica, esto lleva a pensar que los grupos hidroxilos unidos al calcio son probablemente los que promueven la reacción. Sin embargo, la señal del grupo hidroxilo de la hidroxiapatita no desaparece por completo, esto se atribuye a que no todos los hidroxilos participan en la reacción. Lo anterior se fundamenta en la estructura hexagonal de la hidroxiapatita, donde se albergan varios iones OH^- , la que impide que todos participen en la reacción y solamente reaccionan los iones expuestos en la superficie [91].

Comparando los espectros se puede observar que al incrementar la cantidad de hidroxiapatita incrementa la intensidad de la señal grupo carbonilo (1745 cm^{-1}) hasta una concentración de 50% de hidroxiapatita, esto ocurre en ambos casos, en presencia y ausencia del catalizador, como se puede observar en las figuras 4.4 y 4.5, respectivamente.

La intensidad de las señales del grupo carboxilato ($1580\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$) también aumentan con el contenido de hidroxiapatita, sin embargo esta tendencia se observa solamente en las reacciones sin catalizador (ver figura 4.5). Es posible que a los grupos hidroxilos les tome más tiempo promover la ruptura de anillo, lo que posiblemente provoca la formación de más uniones carboxilato en comparación con las reacciones en presencia de catalizador. En espera que al formarse el complejo de octoato de estaño se promueva rápidamente el crecimiento de la cadena del polímero, evidenciándose en el espectro de infrarrojo que las señales del grupo carbonilo más predominan respecto a las señales del grupo carboxilato.

Cabe destacar que en el espectro de la mezcla física del PLLA con nanopartículas de HA en solución no se observa la formación del ion carboxilato (ver figura A1.8 en el Anexo 1), esto indica que la formación del injerto requiere de la reacción química entre la hidroxiapatita y la L-lactida.

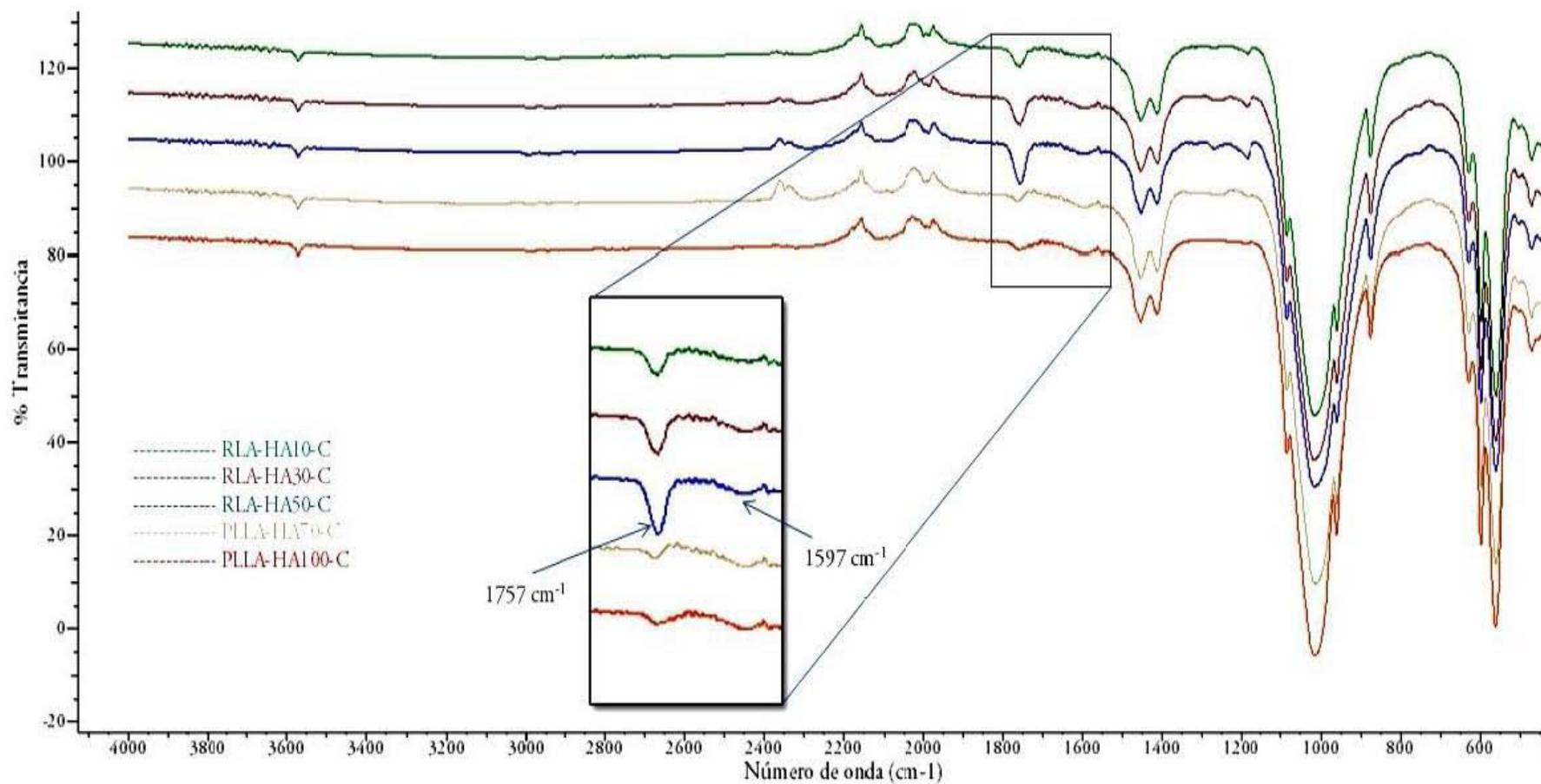


Figura 4.4. Comparación espectros IR de síntesis con catalizador

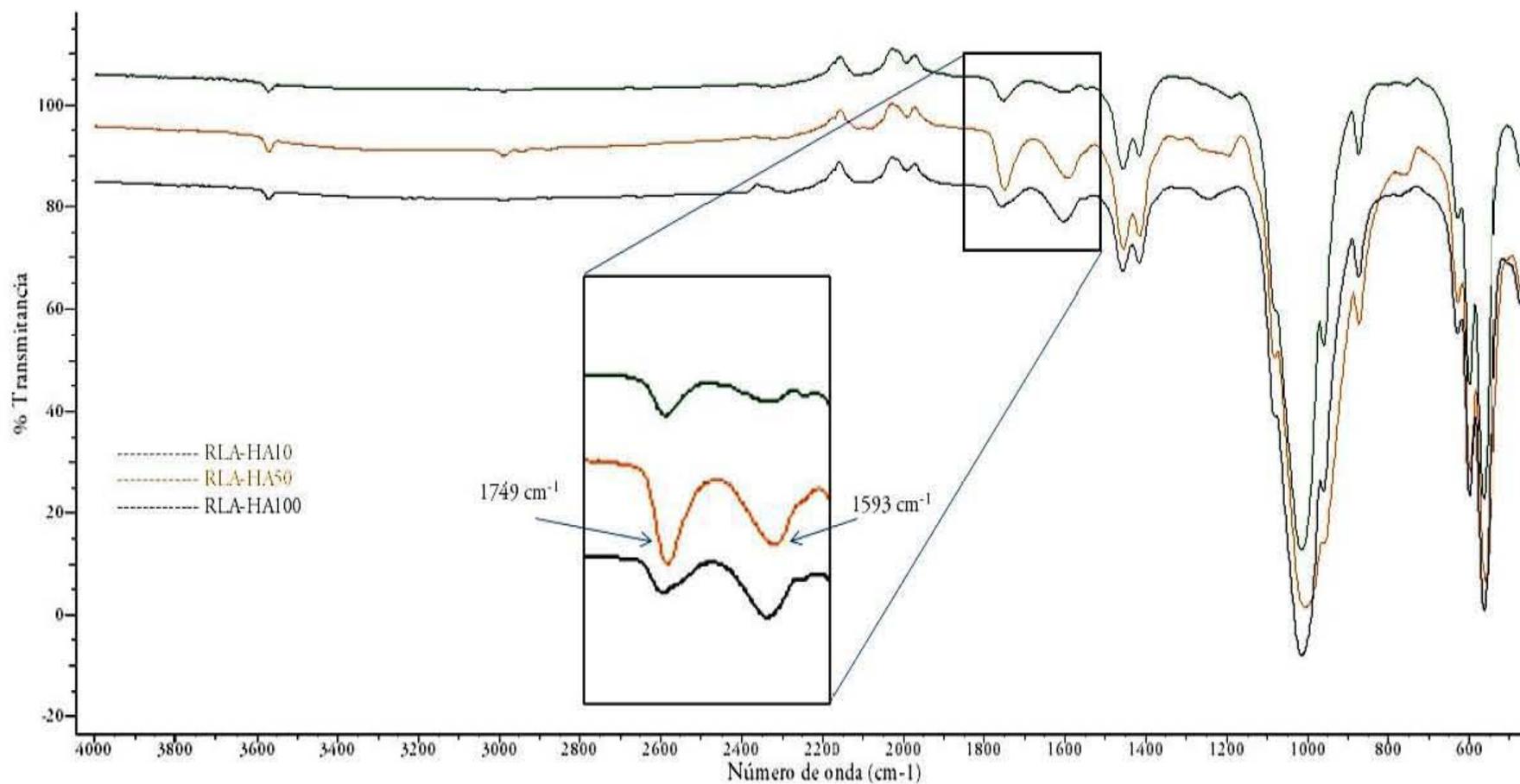


Figura 4.5. Comparación espectros IR de síntesis en ausencia de catalizador

4.1.2 Caracterización por resonancia magnética nuclear de ^{13}C

En la figura 4.6 se muestran los espectros de RMN ^{13}C de la L-lactida y la poli(L-lactida), imágenes A y B, respectivamente. En cada espectro se observan las tres señales pertenecientes de los grupos carbonos carbonilo, metileno y metilo. Las señales pertenecientes a L-lactida son (a') $\delta_{\text{C=O}} = 167.16$ ppm, (b') $\delta_{\text{C-H}} = 72.42$ ppm y (c') $\delta_{\text{C-H}_3} = 15.78$ ppm. Las correspondientes al PLLA son (a) $\delta_{\text{C=O}} = 169.38$ ppm, (b) $\delta_{\text{C-H}} = 68.98$ ppm y (c) $\delta_{\text{C-H}_3} = 16.54$ ppm. En ambos espectros se observa un triplete en la región entre 76 y 77 ppm, correspondiente al cloroformo deuterado empleado para disolver las muestras.

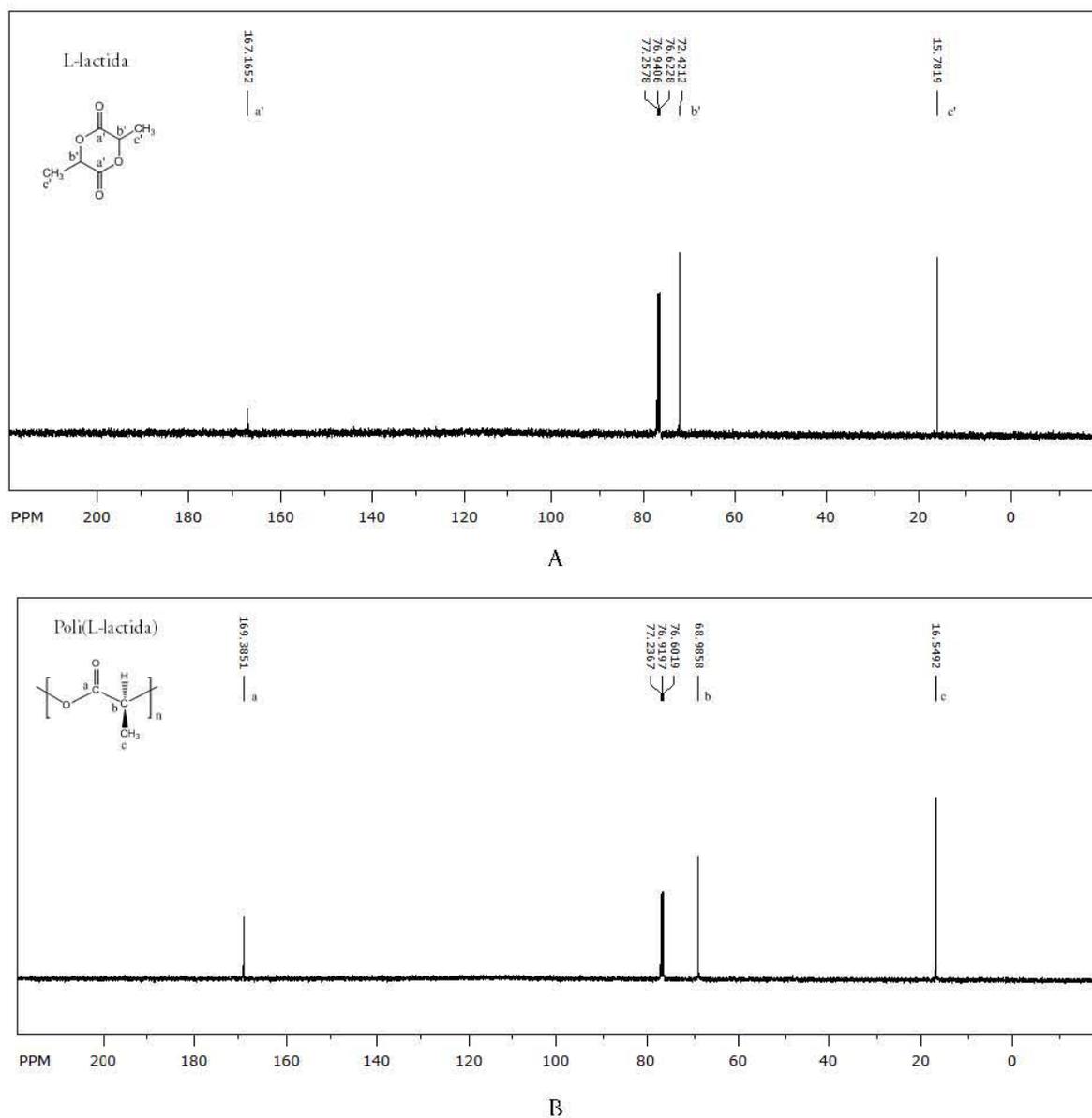


Figura 4.6. Espectros RMN ^{13}C de LLA (imagen A) y PLLA (imagen B).

En la figura 4.7 se presentan los espectros de RMN ^{13}C de los injertos RLA-11A50-C y RLA-11A50, siendo estos representativos de los espectros de los otros injertos obtenidos en presencia y ausencia de catalizador, respectivamente. En ambos espectros se aprecian las señales $\delta = 169.61$ ppm, (b') $\delta = 69.44$ ppm y (c') $\delta = 17.06$ ppm. Estas señales concuerdan con las vistas en la imagen B de la figura 4.6, correspondiente al PLLA, esto indica que sí se logra la polimerización tanto en las reacciones con octoato de estaño como en las reacciones en ausencia de catalizador. También se observan dos nuevas señales $\delta = 119.53$ ppm y $\delta = 219.21$ ppm, resaltadas con óvalos. Estas son atribuidas al enlace correspondiente entre el poli(L-lactida) y la hidroxiapatita. En la tabla 4.3 se resumen las señales obtenidas en los espectros de RMN ^{13}C de las figuras 4.6 y 4.7

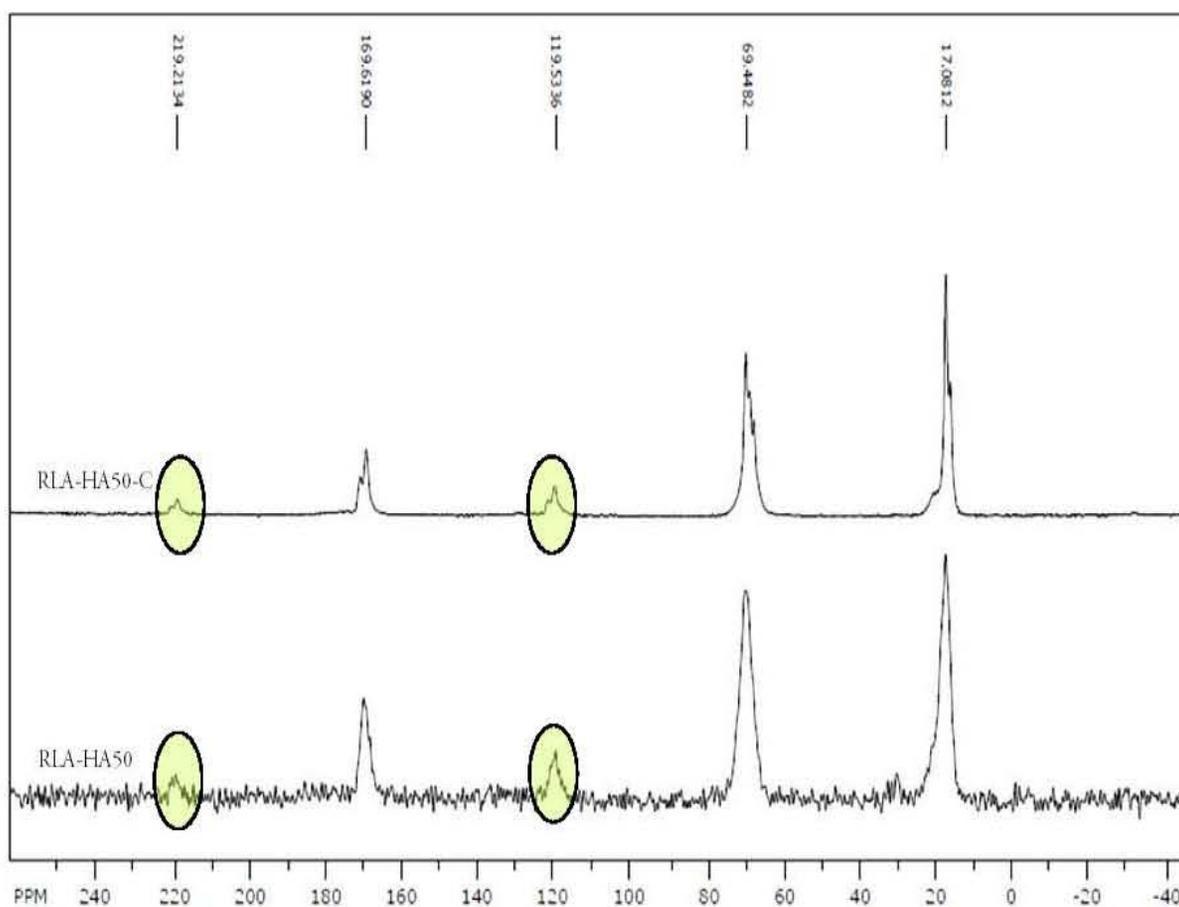


Figura 4.7. Espectros RMN ^{13}C de RLA-HA50-C (imagen superior) y RLA-HA50 (imagen inferior).

Tabla 4.3. Señales de RMN ^{13}C de LA, PLLA, RLA-HA50-C y RLA-HA50

Nombre de la muestra	$\delta_{\text{C=O}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C-H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C-H3}}$ [ppm]	δ [ppm]	δ [ppm]
LA	167.16	72.42	15.78	-----	-----
PLLA	169.38	68.98	16.54	-----	-----
RLA-HA50-C	169.61	69.44	17.06	119.53	219.21
RLA-HA50	169.61	69.44	17.06	119.53	219.21

4.1.3 Caracterización por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{31}P

Los espectros de RMN ^{31}P de la hidroxiapatita y las muestras injertadas RLA-HA50-C y RLA-HA50 se reportan en la figura 4.8. La señal de la hidroxiapatita se observa en $\delta_{\text{p}} = 2.56$ ppm, esta es usada como referencia para comparar los desplazamientos de las señales obtenidas de los injertos. El injerto RLA-HA50-C presenta una señal en $\delta_{\text{p}} = 8.42$ ppm, esta se desplaza a campos bajos en comparación con la señal de la hidroxiapatita. Por otra parte, el injerto RLA-HA50 muestra una señal en $\delta_{\text{p}} = 2.73$ ppm, su desplazamiento es muy pequeño en relación a la referencia. La variación en la posición de las señales de los injertos, en comparación con la señal de hidroxiapatita, se debe al cambio del entorno químico del núcleo de fósforo. Es posible inferir que esto se debe a que las moléculas injertadas de polímero en RLA-HA50-C sean de un mayor tamaño en comparación con las injertadas en RLA-HA50. Esta interpretación fortalece el análisis realizado en la siguiente sección.

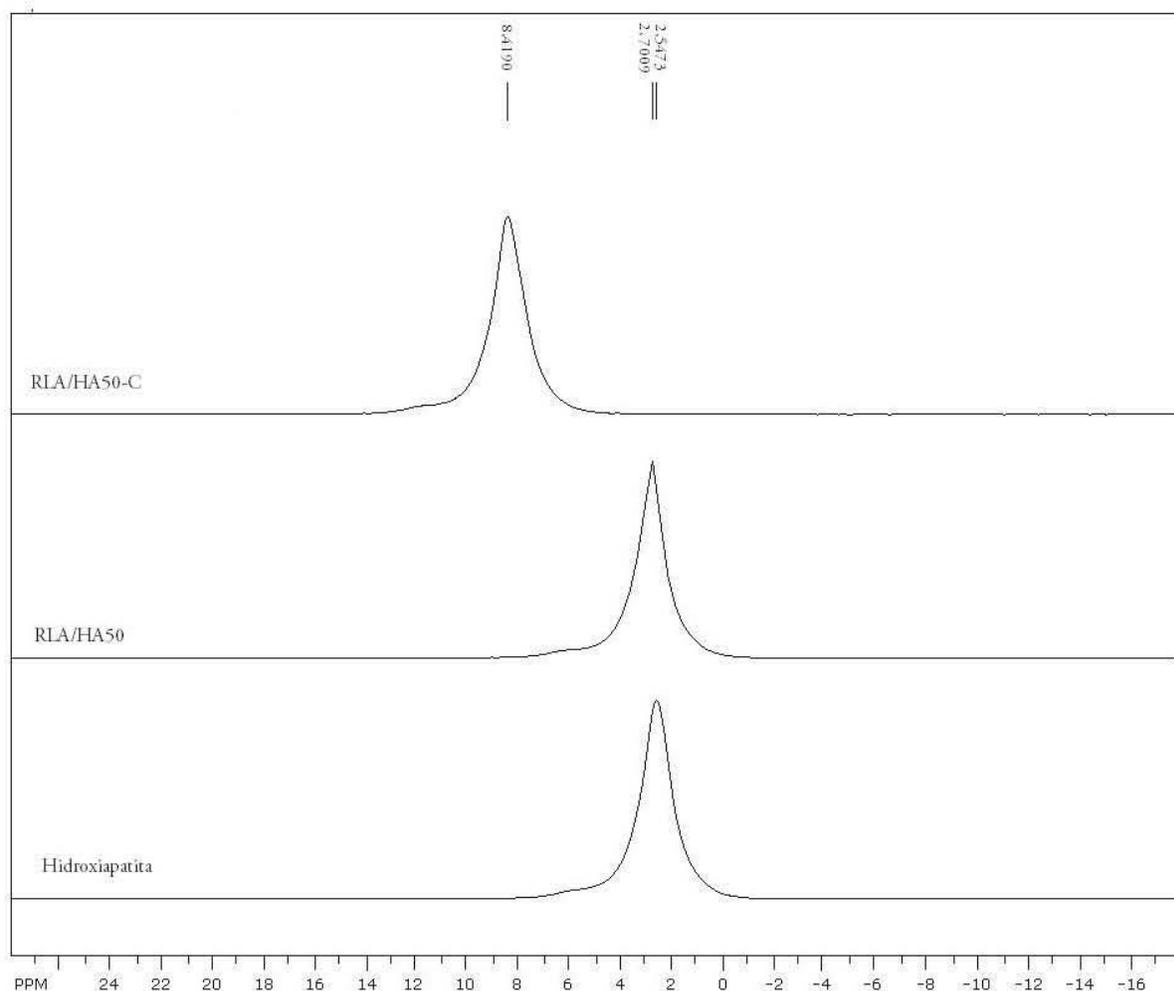


Figura 4.8. Espectros RMN ^{31}P de HA, RLA-HA50-C y RLA-HA50.

4.1.4 Porcentaje de injerto por termogravimetría

La cantidad de poli(L-lactida) injertada en la superficie de las partículas de hidroxiapatita se estimó mediante la diferencia de pérdida de peso del producto y la pérdida de peso de la referencia (hidroxiapatita). A continuación se muestra la ecuación empleada para determinar el porcentaje de injerto:

$$\% \text{ Injerto} = \% \text{ pérdida de peso del producto} - \% \text{ pérdida de peso HA}$$

En la figura 4.9 se presenta la gráfica de la pérdida de peso de los injertos obtenidos en la síntesis con catalizador en función de la temperatura. La hidroxiapatita presenta un pequeña pérdida de peso, que se atribuye a las moléculas de agua asociadas a la HA mediante enlaces de puente de hidrógeno. La curva de RLA-HA50-C indica mayor cantidad injertada en comparación con las otras curvas de injerto. Todas las curvas presentan un evento de descomposición, esto se corrobora al graficar la primera derivada del peso con respecto a la temperatura. La primera derivada muestra claramente los cambios de fase y/o evento de descomposición, esto se determina con la presencia de máximos y mínimos. En la gráfica 4.9 se presenta la segunda derivada de la muestra de mayor injerto RLA-HA50-C, donde se observa un pico máximo y se atribuye a un evento de descomposición. La temperatura en que inicia la descomposición, T_i : 190°C, de cada una de las muestras concuerda con la temperatura inicial de descomposición de P.I.A sintetizado bajo las mismas condiciones en ausencia de hidroxiapatita, ver figura A1.9 en anexo 1

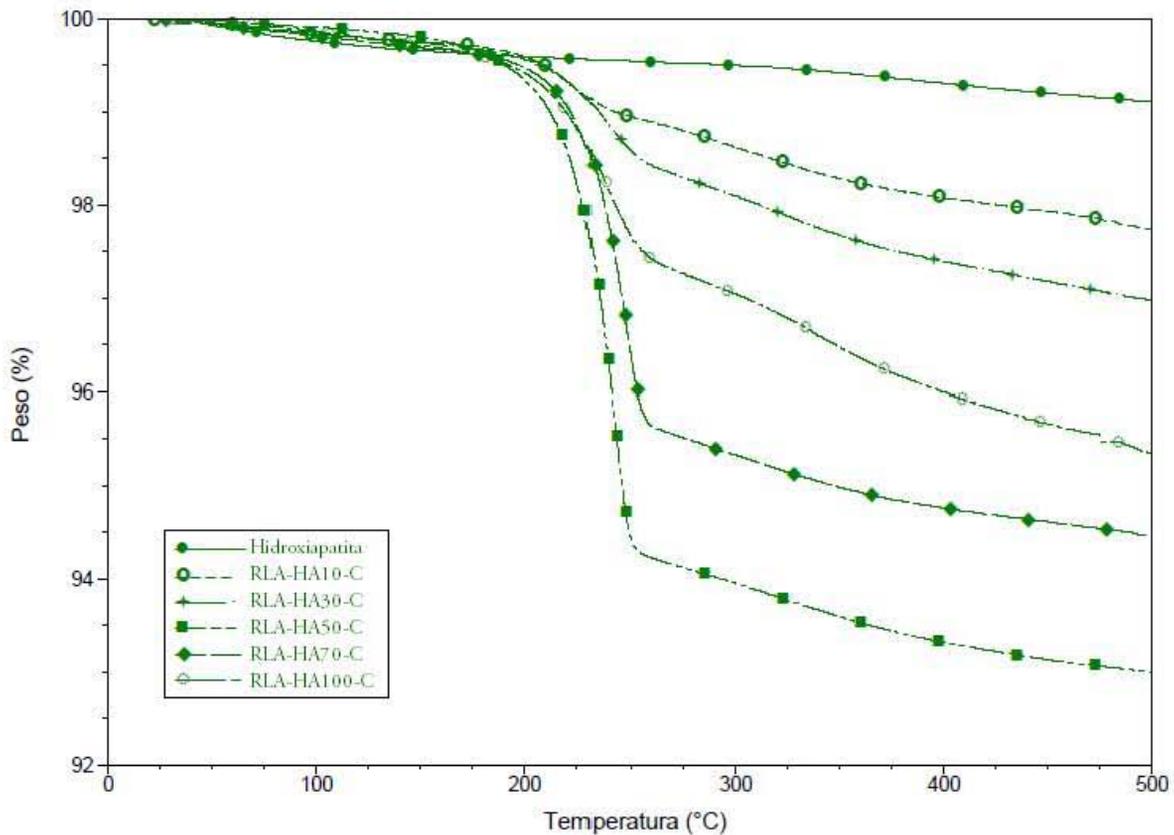


Figura 4.9. Termogramas TGA de los injertos con catalizador

En la figura 4.10 se muestran las curvas de los injertos sin catalizador. Aunque se observa un mayor injerto para la muestra RLA-HA10, la pérdida de peso en la región de interés ocurre en diferentes

eventos de descomposición, ver figura 4.11. Los eventos entre 100 y 170 °C, corresponden a la pérdida de peso del monómero residual, esto se atribuye a la falta de purificación de la muestra, y a partir de 190°C se evidencia la pérdida de peso de la poli(L-lactida). El termograma del monómero se muestra en la figura A1.10 en anexo 1.

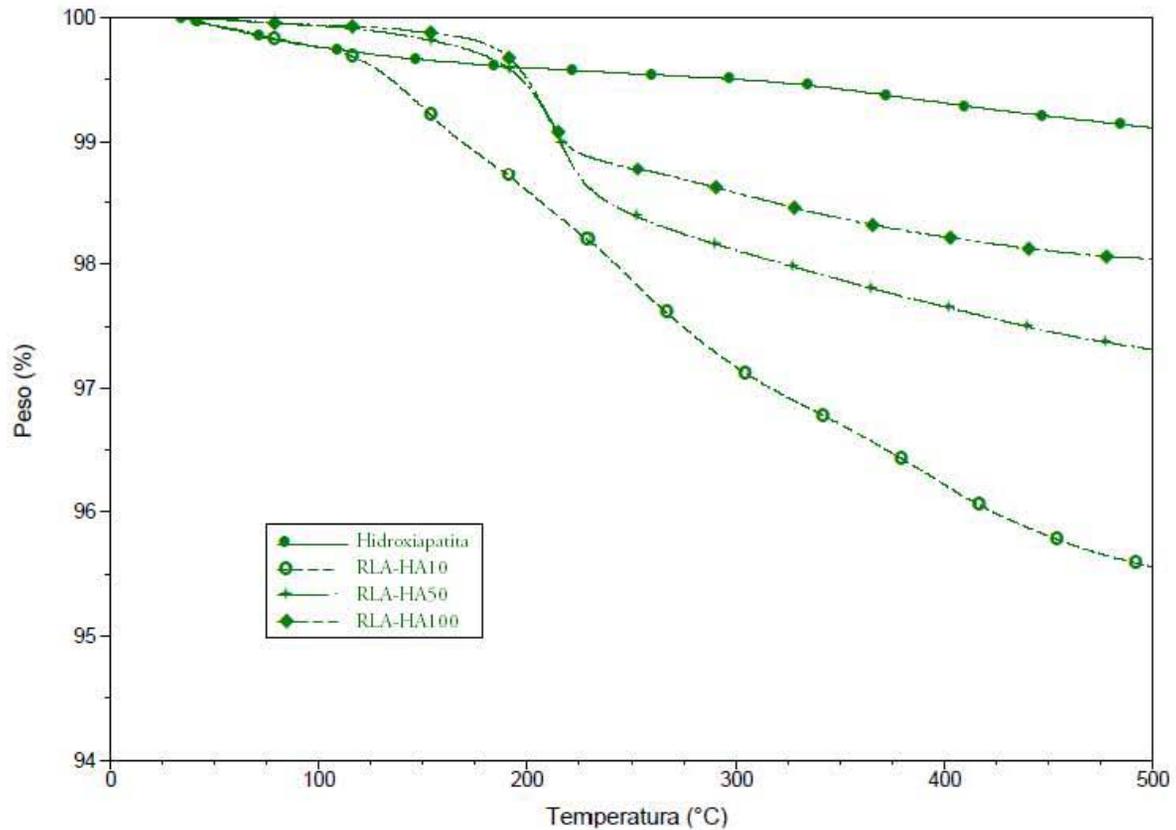


Figura 4.10. Termogramas TGA de los injertos sin catalizador

Por otra parte el injerto RLA-HA50 presenta un solo evento de descomposición, ver figura 4.11. Tanto en la figura 4.12 y 4.13 se observa el inicio de la descomposición del PLLA injertado, en un intervalo de temperaturas entre 190 y 200°C.

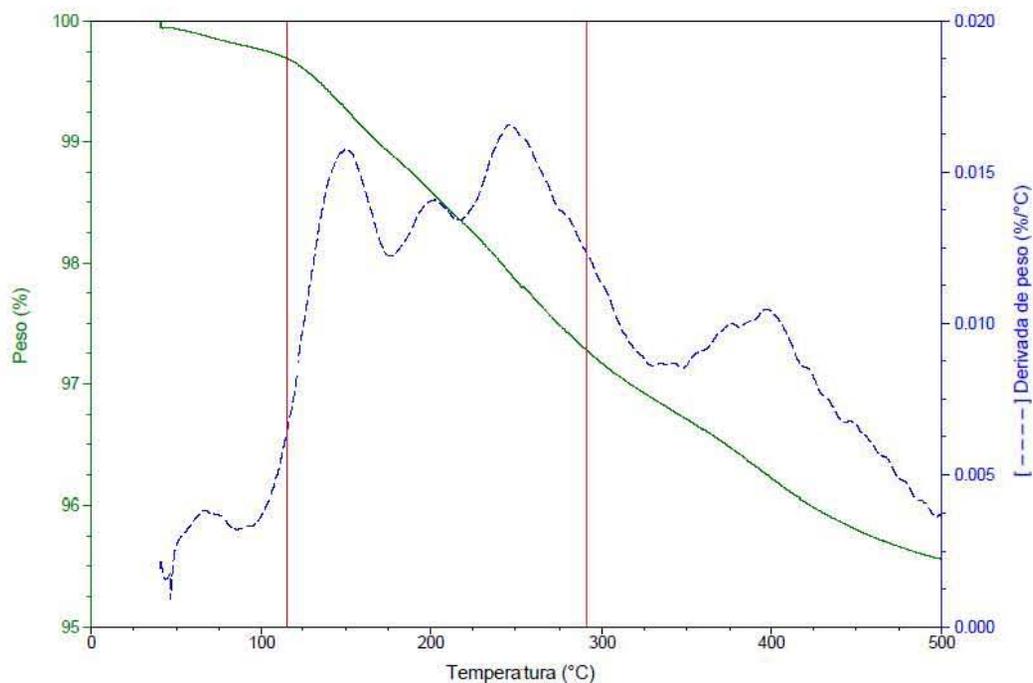


Figura 4.11. Termograma TGA y la primera derivada de RLA-HA10

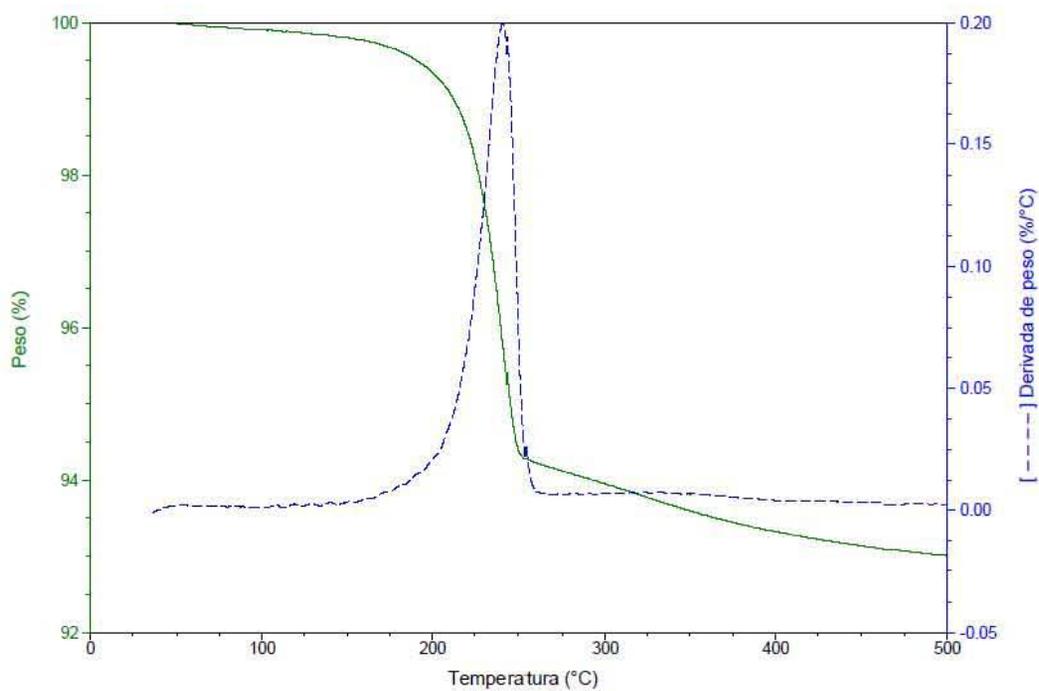


Figura 4.12. Termograma TGA y la primera derivada de RLA-HA50-C

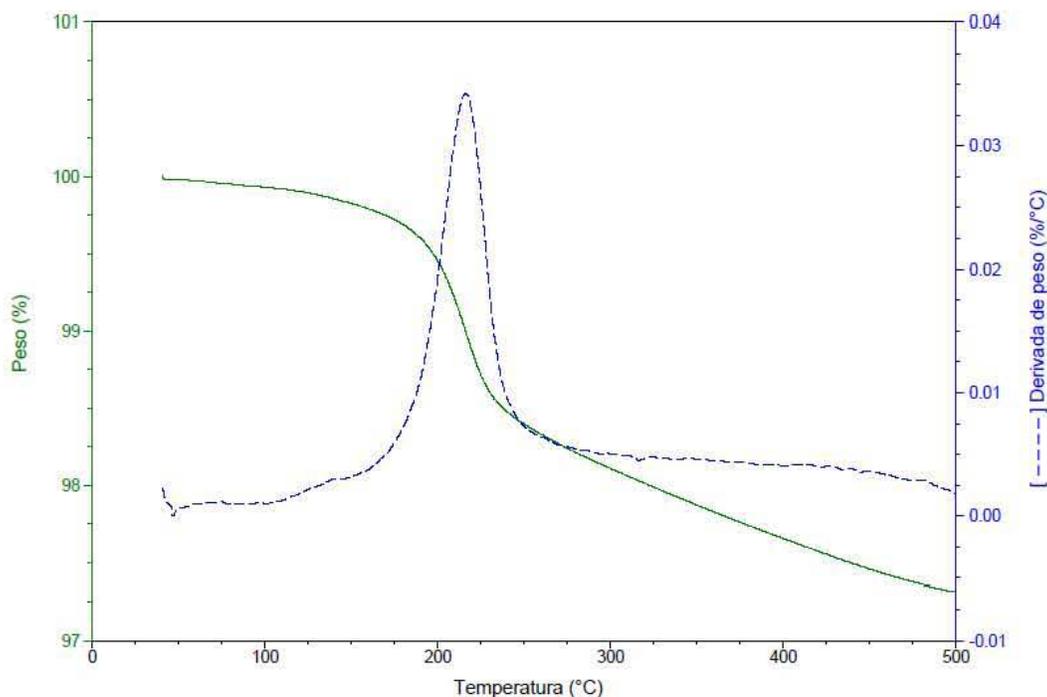


Figura 4.13. Termograma TGA y la primera derivada de RLA-HA50

En la tabla 4.4, se resumen los valores de porcentaje de injerto de cada una de las muestras. El porcentaje de injerto logrado en la síntesis con catalizador coincide con los valores reportados por Zhongkui y colaboradores [41]. Por otra parte, no se encontraron reportes sobre el porcentaje de injerto de PLLA en hidroxiapatita en ausencia de octoato de estaño. Los recuadros sombreados corresponden a las muestras con mayor injerto y, en las cuales ocurrió solo un evento de descomposición.

Tabla 4.4. Pérdida de peso en las muestras injertadas

Nombre de la muestra	Pérdida de peso [%]	Nombre de la muestra	Pérdida de peso [%]
RLA-HA10-C	1.39	RLA-HA100C	3.77
RLA-HA30-C	2.12	RLA-HA10	3.55
RLA-HA50-C	6.13	RLA-HA50	1.81
RLA-HA70-C	4.67	RLA-HA100	1.09

4.2 Parámetros para la obtención de andamios electrohilados a partir de las soluciones de PLLA.

Los parámetros constantes establecidos en el proceso de electrohilado fueron seleccionados con base en la literatura [19, 70-77]. Un factor importante en el proceso es el peso molecular, los polímeros de bajo peso molecular (oligómeros) no logran hilarse ni siquiera con el incremento de su concentración [71]. La distancia entre el colector e inyector es otro parámetro. Algunos autores reportan disminución en el diámetro de las fibras conforme se incrementa esta distancia [72]. Igualmente al reducir el diámetro de la boquilla se disminuye el diámetro de las fibras [75]. Todas las pruebas se realizaron a condiciones ambientales, cabe resaltar que la humedad relativa porcentual y temperatura en la época en que se realizaron las pruebas no varió drásticamente, manteniéndose alrededor H.R.: 26% y T: 25°C, respectivamente.

4.2.1 Efecto de la concentración, flujo de inyección y diferencia de potencial sobre la morfología de las fibras

De las micrografías por SEM de la figura 4.14 se puede inferir el efecto de la variación de la concentración de las soluciones y del flujo de inyección cuando se mantiene constante la diferencia de potencial aplicado. Al comparar las imágenes A y B se observa que a menor flujo se reduce el diámetro de las fibras y aumenta la presencia de bulbos a lo largo de las mismas. En las imágenes A, C, E y G corresponden a condiciones de flujo constante de inyección e incremento de concentración de 10%p/v hasta 16%p/v, en la imagen A se observan bulbos, los que al incrementar la concentración se van aplanando, formando cintas (imagen E) hasta alcanzar diámetros constantes y homogéneos a lo largo de las fibras (imagen G), es decir al incrementar la concentración se logra eliminar por completo la presencia de bulbos. Esta tendencia coincide con los resultados reportados por otros autores [12-13, 38, 47]. Los bulbos son generados por la gran cantidad de moléculas de disolventes presentes en la solución. Al existir un exceso de disolvente, se requiere aumentar el tiempo de vuelo de las fibras o reducir la cantidad de moléculas presentes para favorecer el secado de estas [25]. El incremento de la concentración reduce el tiempo de vuelo requerido para secar completamente las fibras, es decir, fibras libres de disolvente.

Por otro lado, al mantener constante la concentración e incrementar el flujo de inyección, se observa una pérdida de uniformidad de las fibras (ver imágenes G y H) y la formación de grumos de polímero sobre las superficies (resaltado con un círculo en imagen F). Este efecto se atribuye al incremento del flujo que promueve la formación de gotitas en la punta de la aguja de la jeringa, que eventualmente se secan y son impulsadas por la solución polimérica para depositarse en el colector [57].

De la figura 4.14, se puede observar que las condiciones bajo las cuales se obtienen menores defectos son concentraciones del 13%p/v y 16 %p/v a un flujo de inyección de 0.6mL/h (imágenes E y G, respectivamente). A estas dos condiciones se les determinó la distribución de diámetro de las fibras, diámetro promedio y el porcentaje de área porosa del andamio. Estos resultados se presentan en la figura 4.15. Se puede observar que, para una concentración del 16%p/v la distribución de diámetros presenta menos variación entre sus valores (desviación del 17,55% en comparación con 25,71% para una concentración del 13%p/v) y el porcentaje de área porosa es mayor en comparación con los resultados obtenidos para una concentración del 13%p/v.

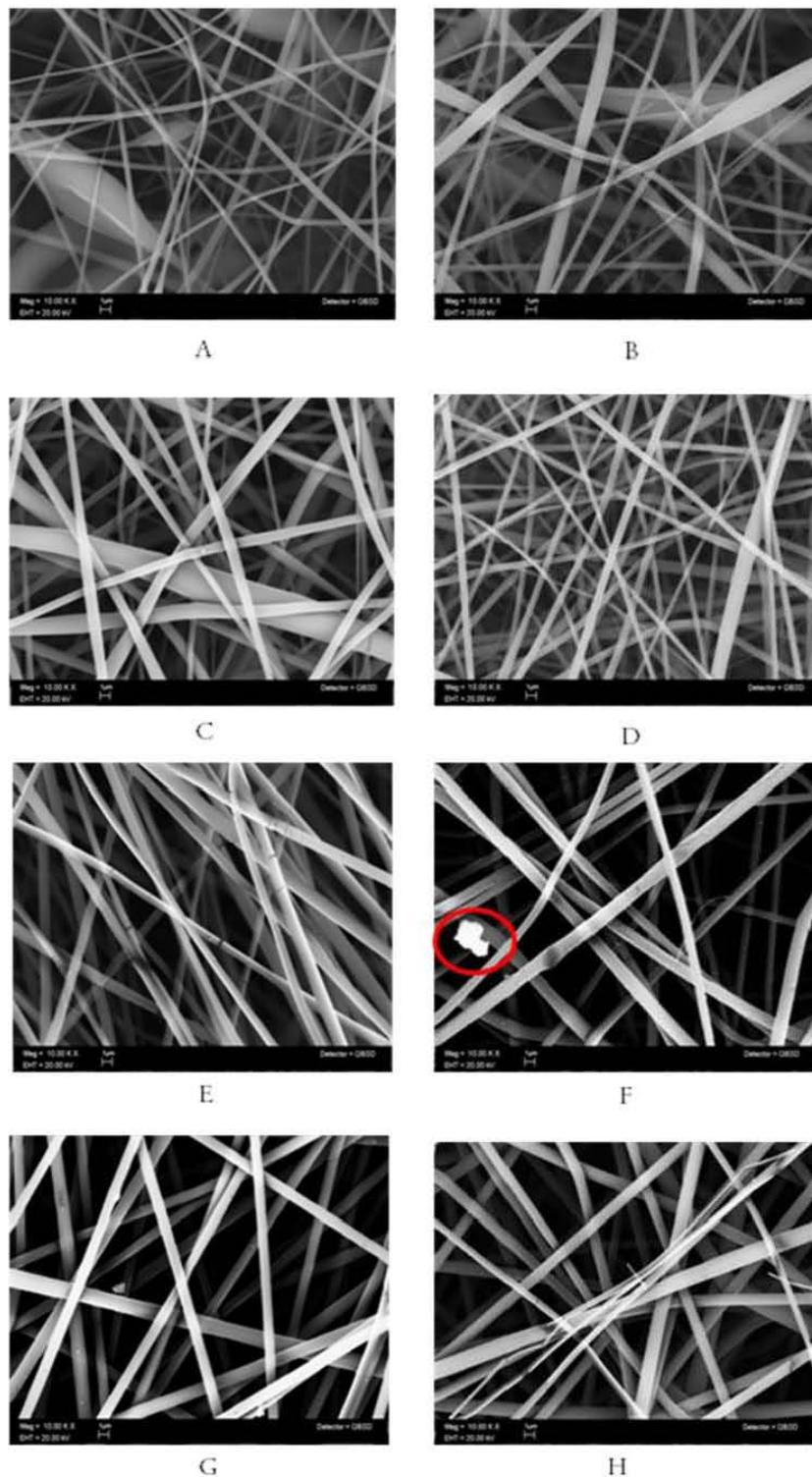
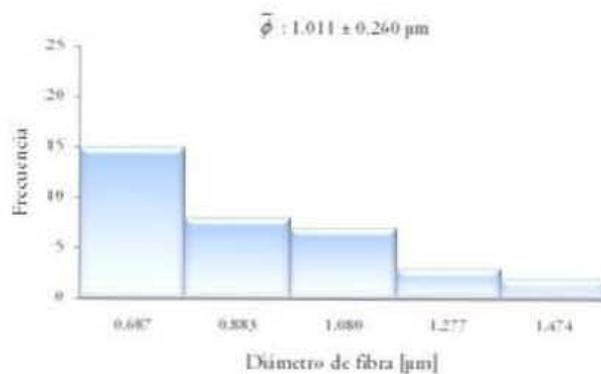
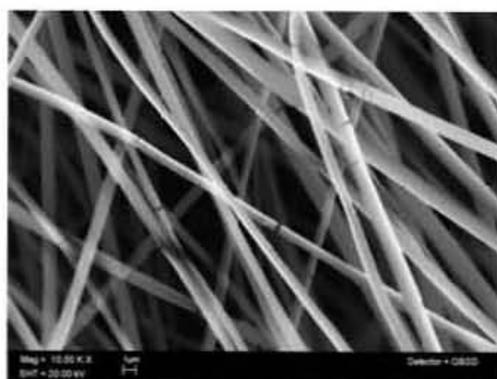
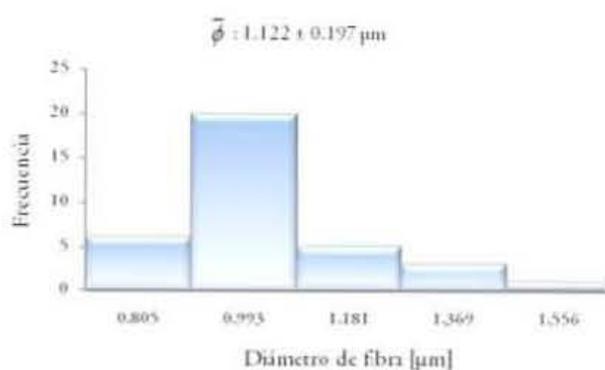
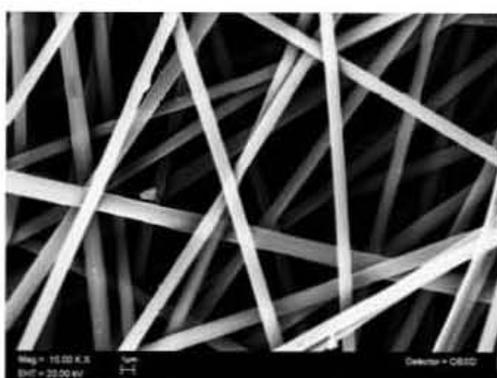


Figura 4.14. Efecto de la variación de la concentración y el flujo de inyección con la diferencia de potencial en 25kV. (A) 10%p/v – 0.6mL/h; (B) 10%p/v – 0.8mL/h; (C) 12%p/v – 0.6mL/h; (D) 12%p/v – 0.8mL/h; (E) 13%p/v – 0.6mL/h; (F) 13%p/v – 0.8mL/h; (G) 16%p/v – 0.6mL/h; (H) 16%p/v – 0.8mL/h. Micrografías de 10000 aumentos, escala de 1 μ m



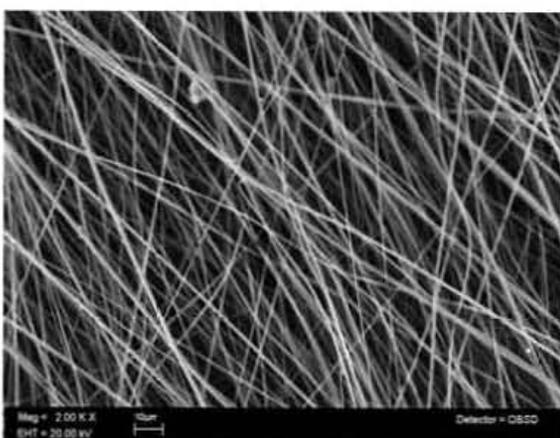
A



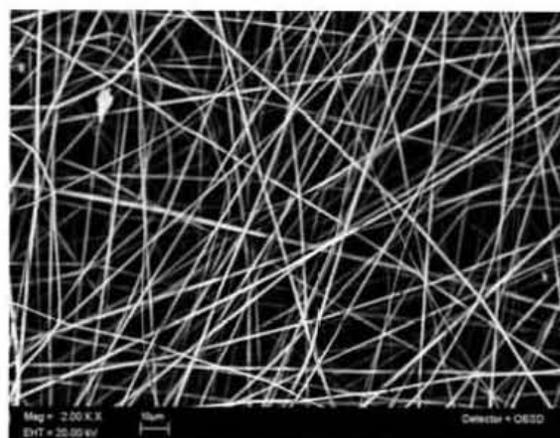
B

$\% \phi : 58.7\%$

$\% \phi : 66.6\%$



C



D

Figura 4.15. Determinación de la distribución de diámetro de las fibras: (A) 13%p/v – 0.6mL/h, (B) 16%p/v – 0.6mL/h; y porcentaje de área porosa: (C) 13%p/v – 0.6mL/h, (D) 16%p/v – 0.6mL/h. Micrografías de 10000 (A y B) y 2000 (C y D) aumentos, escala de 1 y 10μm, respectivamente.

En la figura 4.16 se muestra el efecto de la variación de la concentración y la diferencia de potencial aplicado con el flujo de inyección constante. Al aumentar la diferencia de potencial sin variar la concentración se produce la formación de bulbos a lo largo de las fibras, esto se observa al comparar las imágenes A y B de la figura 4.16. Este comportamiento se debe a la reducción de tiempo de vuelo de las fibras, el cual es requerido por las moléculas de trifluoretanol para evaporarse.

En contraste, al elevar la concentración se reduce la presencia de bulbos (ver imágenes B, D, F y H) e incrementa la homogeneidad del diámetro de las fibras. Esto concuerda con el análisis de la figura 4.14. El aumento de concentración mejora la homogeneidad de las fibras para valores bajos de diferencia de potencial (ver imágenes A, C, E y G de la figura 4.16).

Por otra parte, el incremento del voltaje, en soluciones de baja concentración, genera bulbos y ruptura de las fibras (imágenes B y D de la figura 4.16) y en concentraciones altas produce variación del diámetro a lo largo de las fibras y disminuye la homogeneidad (imágenes F y H). Es importante mencionar que en el proceso existe una interrelación compleja entre los parámetros que se modifican.

De la figura 4.16, se puede observar que a concentraciones del 15 y 16%p/v con diferencia de potencial de 15kV se evidencian diámetros homogéneos a lo largo de las fibras con reducción de bulbos y cintas, ver imágenes E y G. Para estas condiciones se realizó el mismo tratamiento que el descrito en la figura 4.15. Los resultados obtenidos, figura 4.17, muestran que a mayor concentración se observan menores diámetros y que el porcentaje de área porosa no varía significativamente.

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que las mejores condiciones para lograr un alto porcentaje de área porosa y diámetros homogéneos a lo largo de las fibras en ausencia de bulbos, cintas y grumos se obtienen con una concentración de PLLA del 16%p/v, una diferencia de potencial de 15kV y un flujo de inyección de 0,6 mL/h

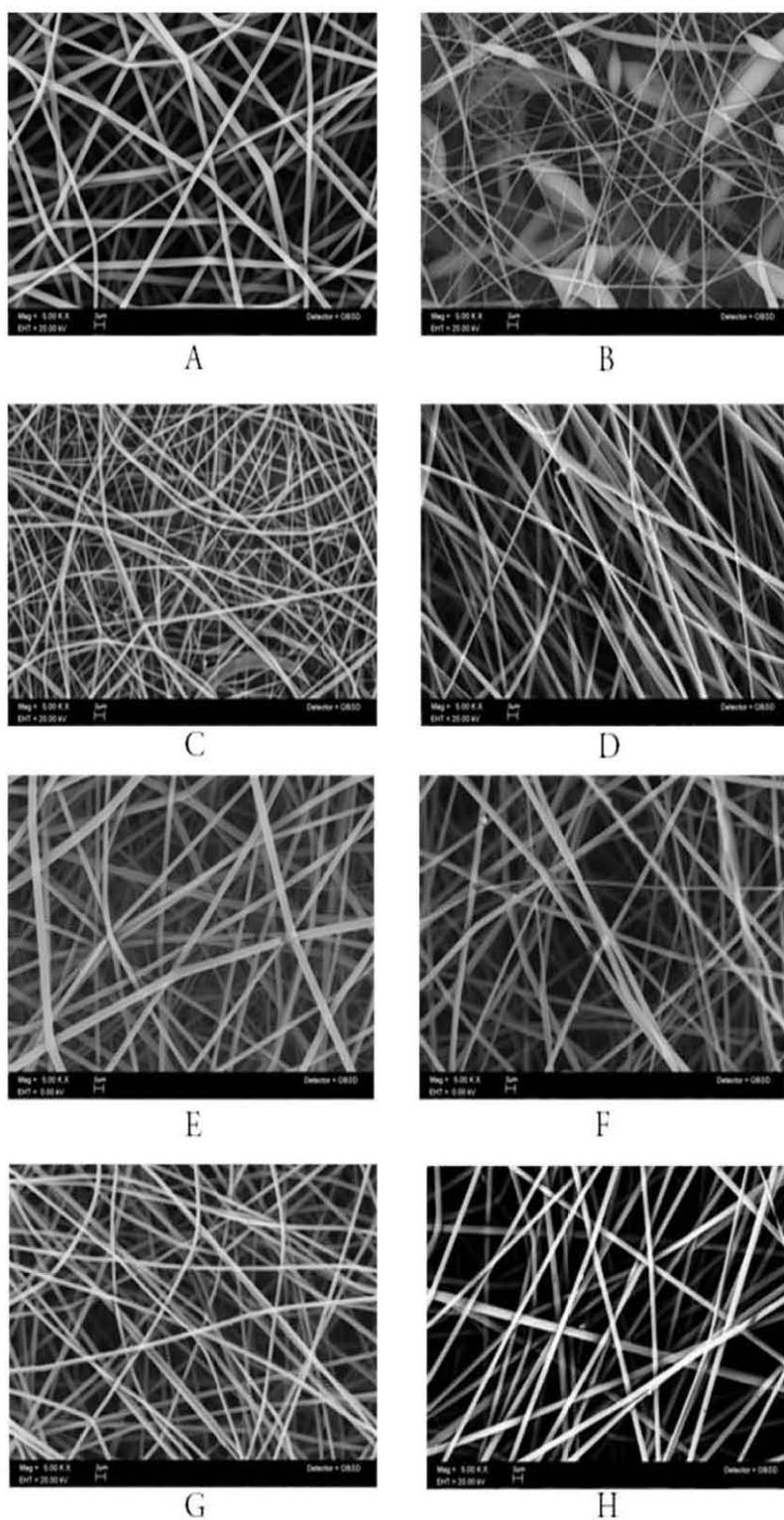
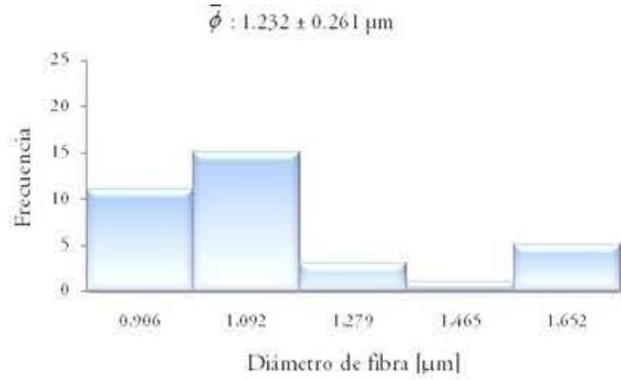
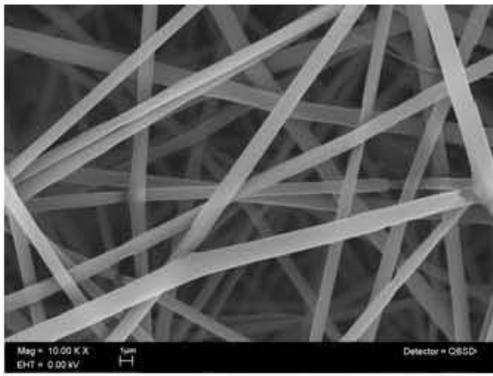
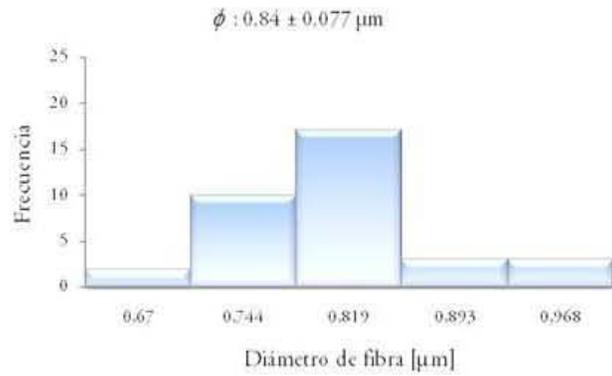
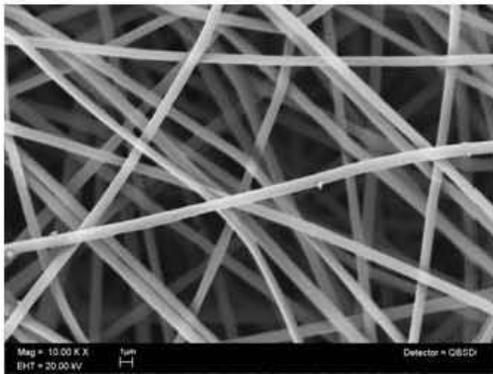


Figura 4.16. Efecto de la variación de la concentración y el voltaje aplicado con un flujo de inyección de 0.6mL/h. (A) 10%p/v – 15kV; (B) 10%p/v – 25kV; (C) 13%p/v – 15kV; (D) 13%p/v – 25kV; (E) 15%p/v – 15kV; (F) 15%p/v – 25kV; (G) 16%p/v – 15kV; (H) 16%p/v – 25kV. Micrografías de 5000 aumentos, escala de 1 μm.

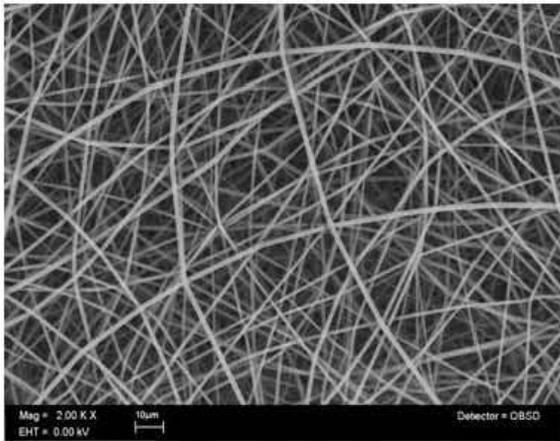


A



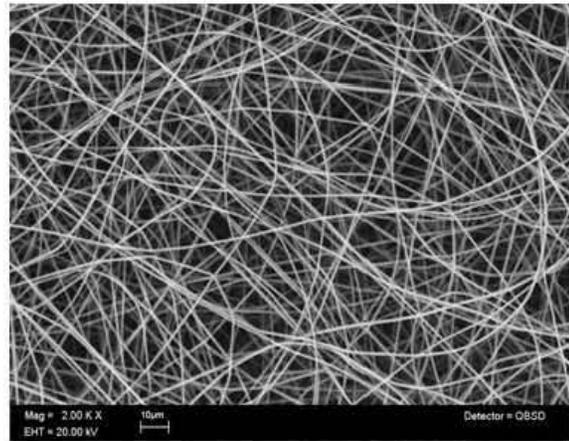
B

$\% \phi : 60.9\%$



C

$\% \phi : 61.8\%$



D

Figura 4.17. Determinación de distribución de diámetro de las fibras: (A) 15%p/v – 15kV, (B) 16%p/v – 15kV; y porcentaje de área porosa: (C) 13%p/v – 15kV, (D) 16%p/v – 15kV. Micrografías de 10000 (A y B) y 2000 (C y D) aumentos, escalas de 1 y 10 μm , respectivamente.

4.3 Caracterización de los andamios electrohilados de PLLA con hidroxiapatita pura e injertada

Las soluciones se prepararon a diferentes porcentajes de refuerzos (r) tanto con hidroxiapatita pura (PLLA/HAr) como hidroxiapatita injertada (PLLA/HAI_{nj}), las proporciones se establecieron previamente (ver tabla 3.3). En las preparaciones de las soluciones con hidroxiapatita injertada se empleó el producto obtenido de la reacción RLA-HA50.

4.3.1 Variación de la conductividad de las soluciones de PLLA con el incremento de hidroxiapatita pura e injertada

En las soluciones de PLLA con HAI_{nj} se eleva la conductividad eléctrica conforme incrementa el porcentaje de refuerzo, como se puede apreciar en la tabla 4.5. En contraste, las conductividades de las soluciones de PLLA/HA y PLLA no presentan cambios significativos entre ellas, como se muestra en la figura 4.18. Los resultados obtenidos son una evidencia indirecta de que el PLLA se injerta químicamente en la superficie de las nanopartículas de HA y que el injerto mejora en dispersión de la hidroxiapatita en la solución. Debido a la diferencia de polaridad entre la HA pura y el PLA no se mezclan fácilmente por lo que HA tiende a segregarse, lo que no ocurre en la solución de PLA/HAI_{nj}. La segregación y aglomeración se logra por la atracción entre las partículas de hidroxiapatita pura. La hidroxiapatita presente en su estructura molecular cargas iónicas debido a la presencia de los iones Ca^{2+} , PO_4^{2-} , y OH^- .

Una solución más homogénea permite que durante el electrohilado las nanopartículas de HA se encuentren mejor distribuidas a lo largo de las fibras, obteniéndose estructuras más homogéneas en diámetro y morfología. Por otro lado, al incrementar la conductividad el proceso de electrohilado mejora la producción de fibras, como se muestra en la siguiente sección.

Tabla 4.5. Conductividades eléctricas de las soluciones y mezclas

Nombre de la Solución o Mezcla	Conductividad k [S/cm]	Nombre de la Solución o Mezcla	Conductividad k [S/cm]
TEF	$1.81 \cdot 10^{-6}$	PLLA/HA_30	$0.57 \cdot 10^{-6}$
PLLA	$0.56 \cdot 10^{-6}$	PLLA/HAIinj_4	$0.94 \cdot 10^{-6}$
PLLA/HA_4	$0.45 \cdot 10^{-6}$	PLLA/HAIinj_10	$1.5 \cdot 10^{-6}$
PLLA/HA_10	$0.41 \cdot 10^{-6}$	PLLA/HAIinj_20	$2.31 \cdot 10^{-6}$
PLLA/HA_20	$0.46 \cdot 10^{-6}$	PLLA/HAIinj_30	$2.74 \cdot 10^{-6}$

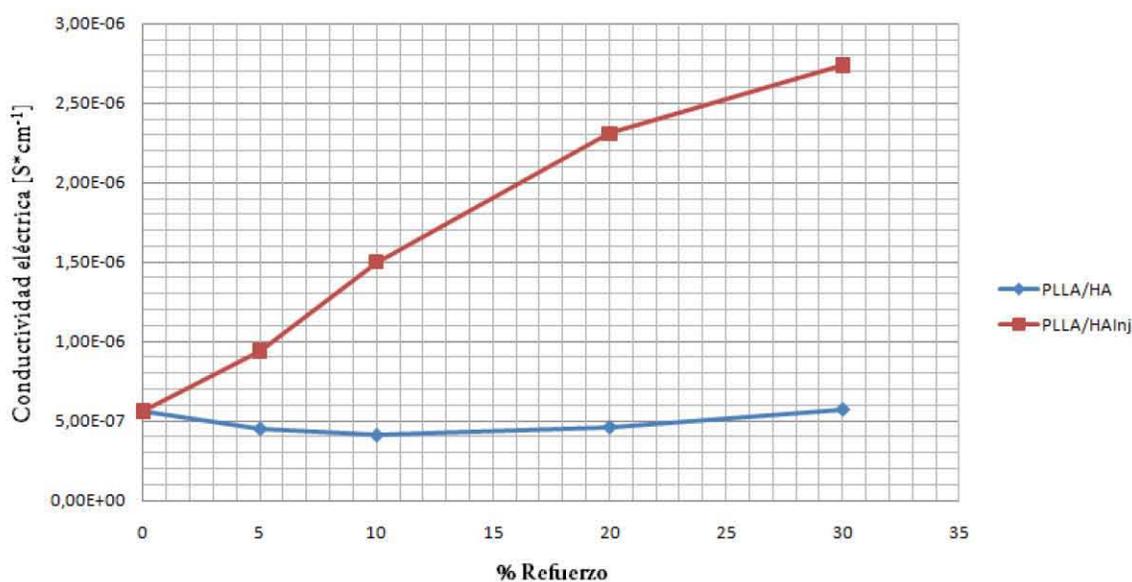


Figura 4. 18. Conductividad eléctrica de las mezclas de PLLA con hidroxapatita pura e injertada.

4.3.2 Evaluación de la morfología de las fibras con hidroxapatita pura e injertada.

Los parámetros seleccionados para el proceso de electrohilado y la concentración de PLLA en las mezclas se basaron en los análisis realizados en la sección 4.2.1. Con el propósito de obtener fibras con diámetros homogéneos y altas porosidades se seleccionaron los siguientes parámetros: 1) concentración

al 16%p/v de PLLA, 2) flujo de inyección de 0.6mL/h, 3) voltaje aplicado 15kV y 4) distancia entre el colector e inyector 30 cm. El proceso de electrohilado se llevó a cabo bajo condiciones ambientales

La incorporación de hidroxiapatita pura e injertada a las soluciones de PLLA cambia la morfología de las fibras y los andamios. En la figura 4.19 se observa que, a medida que se incrementa la cantidad de hidroxiapatita se presenta mayor variación en los diámetros de las fibras.

La morfología de las fibras se mejora con la presencia de hidroxiapatita injertada en las soluciones de PLLA en comparación con los andamios obtenidos con hidroxiapatita pura. En la figura 4.19 se comparan las fibras obtenidas de las mezclas con hidroxiapatita injertada (imágenes B, D, F) y sin injertar (imágenes A, C, E). De la imagen A se pueden observar fibras completamente fusionadas, las cuales deforman la membrana. A medida que se aumenta la cantidad de hidroxiapatita pura este comportamiento se reduce un poco pero no se elimina por completo (columna izquierda de la figura 4.19). En contraste, los andamios obtenidos a partir de las soluciones con hidroxiapatita injertada no presentaron ese tipo de defectos y se observan fibras más homogéneas en diámetro y morfología (columna derecha de la figura 4.19). La mejora en la morfología de las fibras se atribuye tanto a la distribución uniforme de la HAIinj en las soluciones como al incremento en la conductividad de las soluciones, como se discutió en sección 4.3.1.

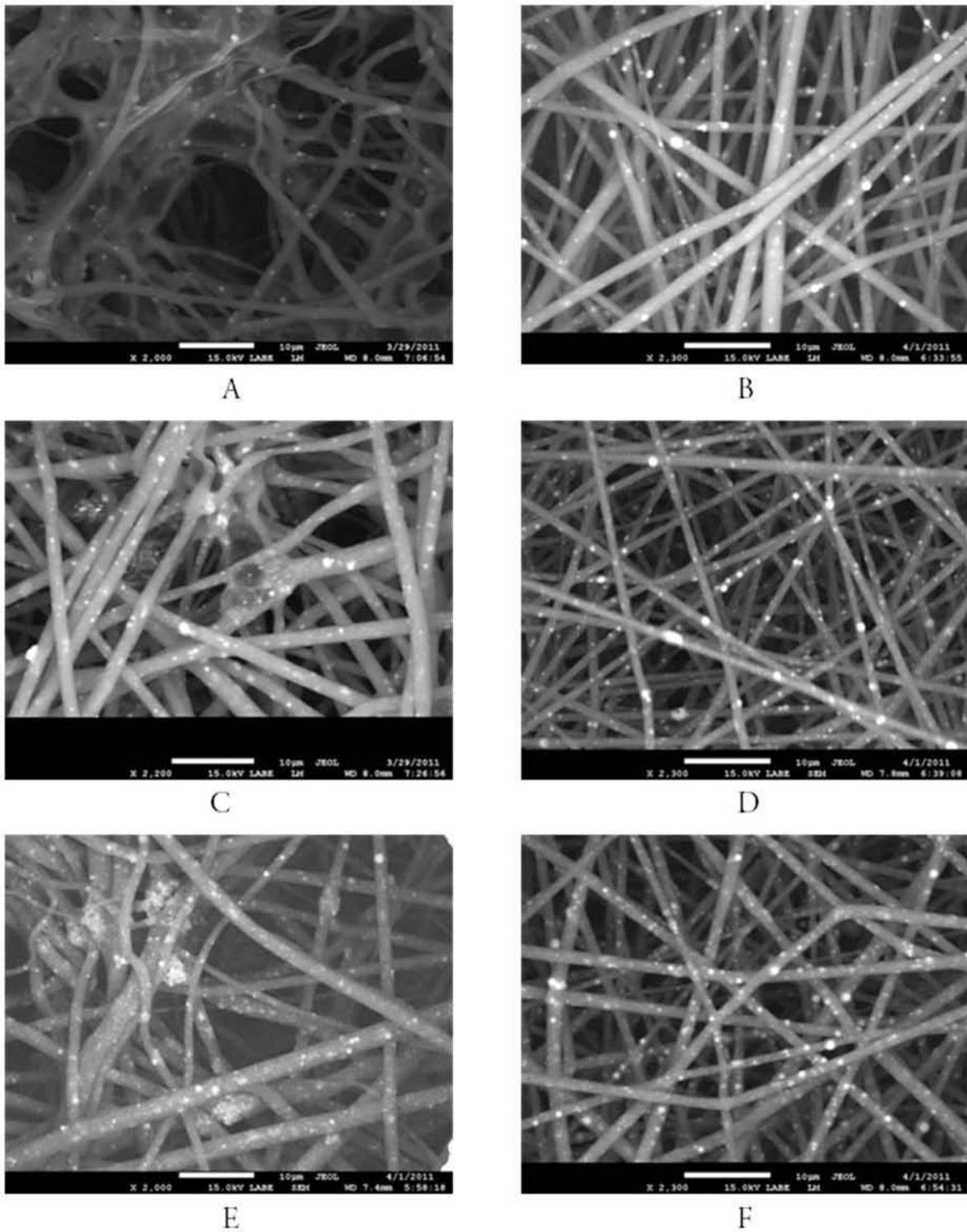


Figura 4.19. Micrografías de membranas obtenidas con las soluciones (A) PLLA/HA_10; (B) PLLA/HAInj_10; (C) PLLA/HA_20; (D) PLLA/HAInj_20; (E) PLLA/HA_30; (F) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 2000 aumentos y escala de 10µm.

A partir de la figura 4.20 y 4.21 se midieron el diámetro promedio y la porosidad de cada uno de los andamios, respectivamente. Estos resultados son reportados en la tabla 4.6. La imagen A de la figura 4.20 y 4.21 se emplearon como referencia para observar el cambio en porosidad y diámetro de los andamios con la presencia de HA ó HAInj. En la figura 4.20 se puede apreciar la diferencia morfológica entre los andamios con hidroxiapatita pura (imágenes B, D, F, H) e hidroxiapatita injertada (imágenes C, E, G, I), estas imágenes corroboran los análisis realizados en la sección 4.3.2, donde los primeros andamios mencionados presentan desperfectos en su estructura. Los resultados de porosidad reportados en la tabla 4.6 muestran que estos defectos no ocasionan cambios significativos en el porcentaje de área porosa, dicho porcentaje varía entre 60-73%. Aunque no existe un cambio significativo se observa una tendencia en los resultados, donde el porcentaje de área porosa en los andamios obtenidos con las mezclas sin injerto, disminuye a medida que incrementa la hidroxiapatita, por el contrario las membranas con injerto presentan un incremento de la porosidad con el incremento de hidroxiapatita injertada, a excepción de PLLA/HAlnj_30. Los andamios presentan altos porcentajes de área porosa, estos posiblemente sean adecuados para regeneración de tejido óseo.

Por otro lado, se observa en la figura 4.21 que, a medida que se incrementa la cantidad de hidroxiapatita, tanto en los andamios sin injerto (imágenes B, D, F, H) y con injerto (imágenes C, E, G, I), disminuye el diámetro promedio de las microfibras. Cabe resaltar que los andamios con hidroxiapatita injertada presentan un menor diámetro y desviación más baja en comparación con las mezclas sin injerto. Este comportamiento se atribuye a la conductividad de las mezclas compuestas, conforme incrementa la conductividad las fibras presentan mejoras en su morfología y disminución en el diámetro.

Tabla 4.6. Determinación de diámetro promedio de las fibras y porosidad en las membranas

Nombre de los andamios	Diámetro promedio de fibra [μm]	Porcentaje de porosidad del andamio [%]
Sin injerto		
PLLA	1.483±0.373	61.5
PLLA/HA_4	1.219±0.186	69.2
PLLA/HA_10	1.469±0.367	63.8
PLLA/HA_20	1.523±0.443	63.0
PLLA/HA_30	0.808±0.445	60.8
Con injerto		
PLLA/HAIinj_4	1.102±0.254	66.8
PLLA/HAIinj_10	1.292±0.285	72.8
PLLA/HAIinj_20	1.141±0.185	73.1
PLLA/HAIinj_30	0.447±0.080	68.3

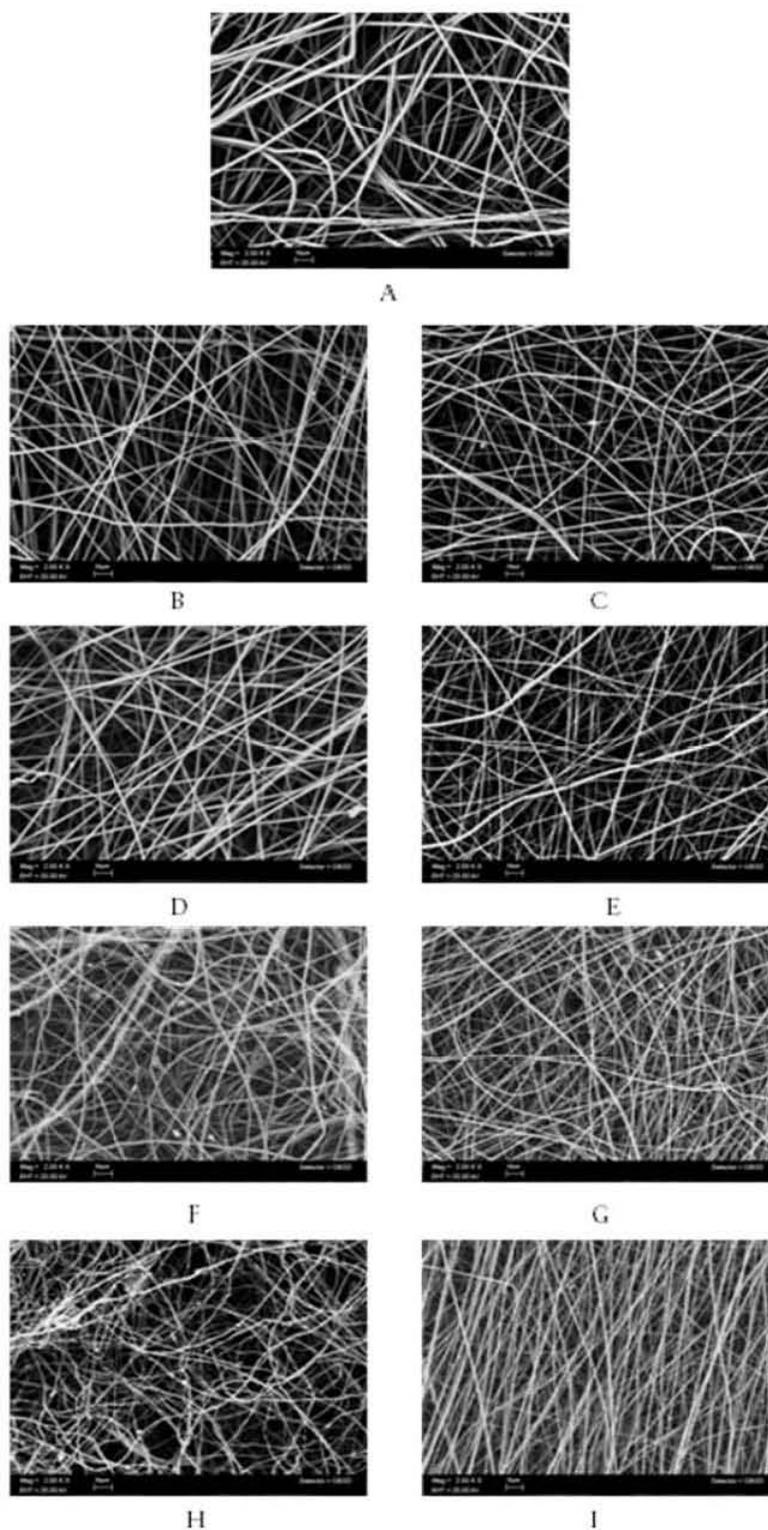


Figura 4.20. Micrografías de andamios electrohilados para determinación de porosidad: (A) PLLA; (B) PLLA/HA_4; (C) PLLA/HAlnj_4; (D) PLLA/HA_10; (E) PLLA/HAlnj_10; (F) PLLA/HA_20; (G) PLLA/HAlnj_20; (H) PLLA/HA_30; (I) PLLA/HAlnj_30. Micrografías de 2000 aumentos, escala de 10 μm .

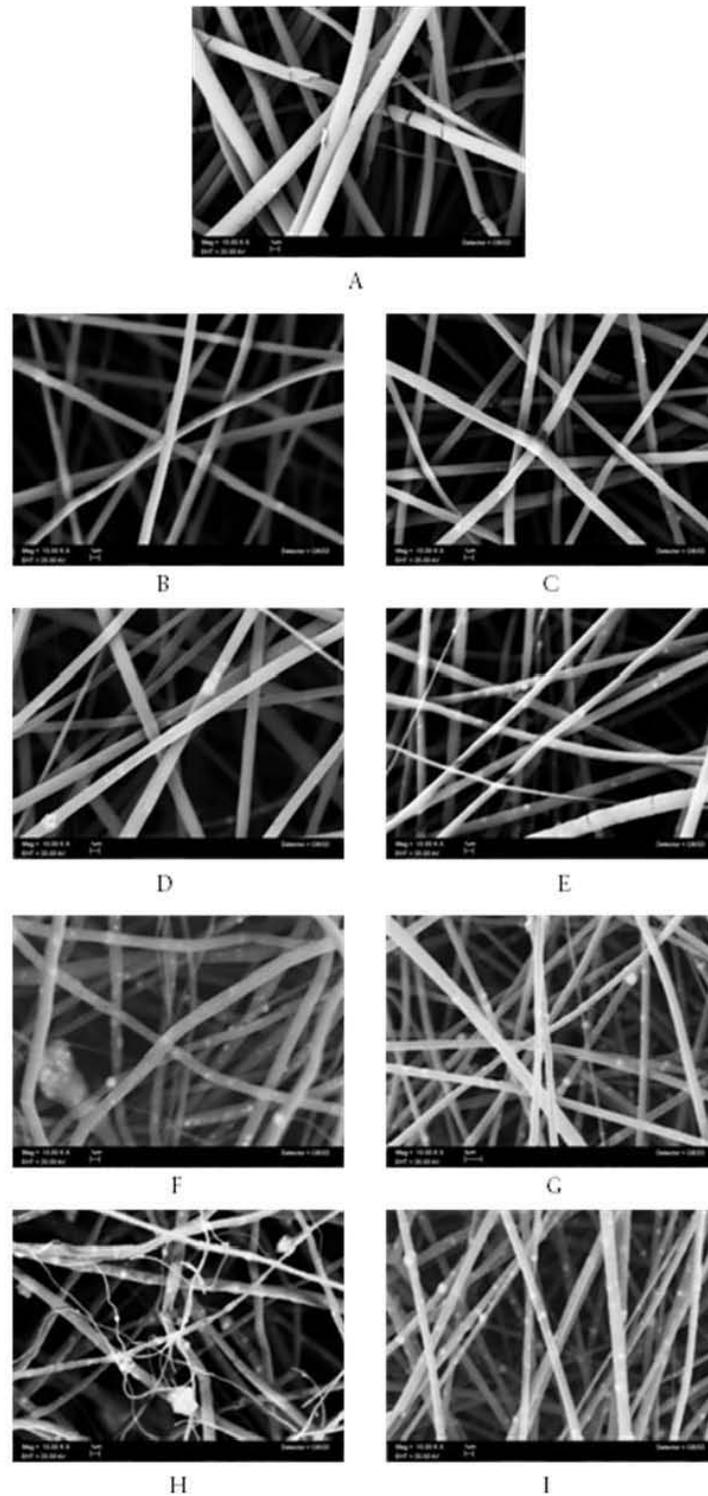


Figura 4.21. Micrografías de andamios electrohilados para determinación de diámetro promedio: (A) PLLA; (B) PLLA/HA_4; (C) PLLA/HAInj_4; (D) PLLA/HA_10; (E) PLLA/HAInj_10; (F) PLLA/HA_20; (G) PLLA/HAInj_20; (H) PLLA/HA_30; (I) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 10000 aumentos, escala de 1µm.

4.3.3 Distribución de hidroxiapatita en las fibras de PLLA

En la figura 4.22, se muestra la presencia de calcio (Ca) y fósforo (P) para los andamios de PLLA/HA (imágenes A y C) y PLLA/HAIinj (imágenes B y D). Se puede observar que las imágenes B y D presentan mayor presencia de los átomos de Ca y P en comparación con las imágenes A y C, respectivamente. Esto indica que la hidroxiapatita injertada logró distribuirse en mayor proporción que la hidroxiapatita pura presente en los andamios PLLA/HA_4. Esto corrobora los resultados obtenidos y analizados en la sección 4.3.1 y 4.3.2, donde se explican los beneficios en la mejora de la distribución de la hidroxiapatita injertada debido al incremento en la conductividad de las mezclas.

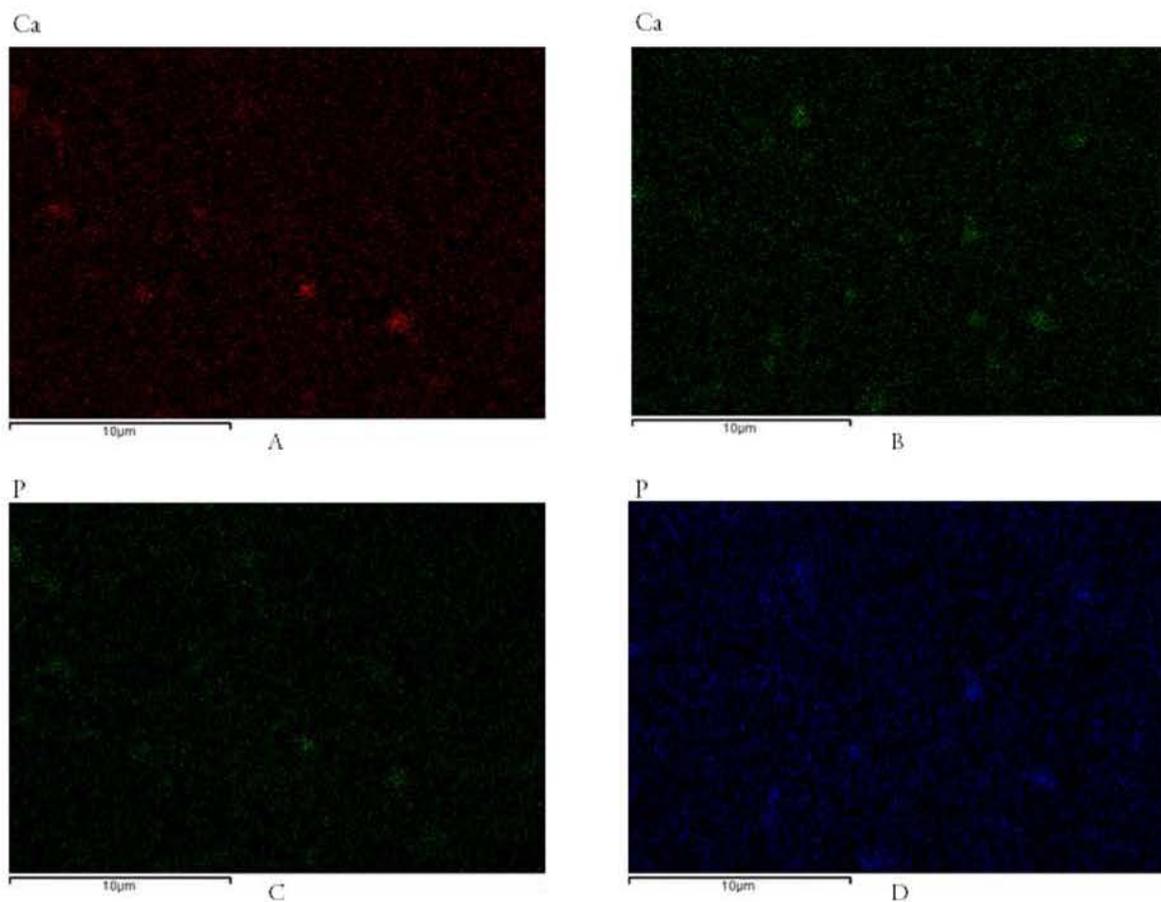


Figura 4. 22. Distribución de calcio (Ca) y fósforo (P) para los andamios PLLA/HA (imágenes A y C) y PLLA/HAIinj (imágenes B y D) empleando la técnica FDS.

4.4 Caracterización mecánica

En esta sección se presentan las propiedades mecánicas: módulo elástico, esfuerzo de cedencia, resistencia a la tensión y deformación, de los andamios de PLLA, PLLA-HA y PLLA-HAInj. Las curvas esfuerzo-deformación presentaron tres zonas, las cuales se analizaron de manera individual. En algunos casos fue necesario ampliar la zona, empleando Matlab 2010R, para evidenciar el comportamiento de la curva y su tendencia. Los resultados obtenidos de los andamios de PLLA, se emplearon como referencia para los análisis de los andamios con HA y HAInj. Al comparar las curvas y los resultados obtenidos, de los andamios con hidroxiapatita pura e injertada, se observó un incremento en las propiedades mecánicas de los andamios con injerto.

4.4.1 Comportamiento mecánico de los andamios de PLLA

La curva esfuerzo-deformación a la tensión de los andamios de PLLA puro se muestra en la figura 4.23, donde se incluyen algunas fotografías de las probetas a diferentes grados de deformación. Se pueden distinguir tres zonas características en la curva: I, II y III.

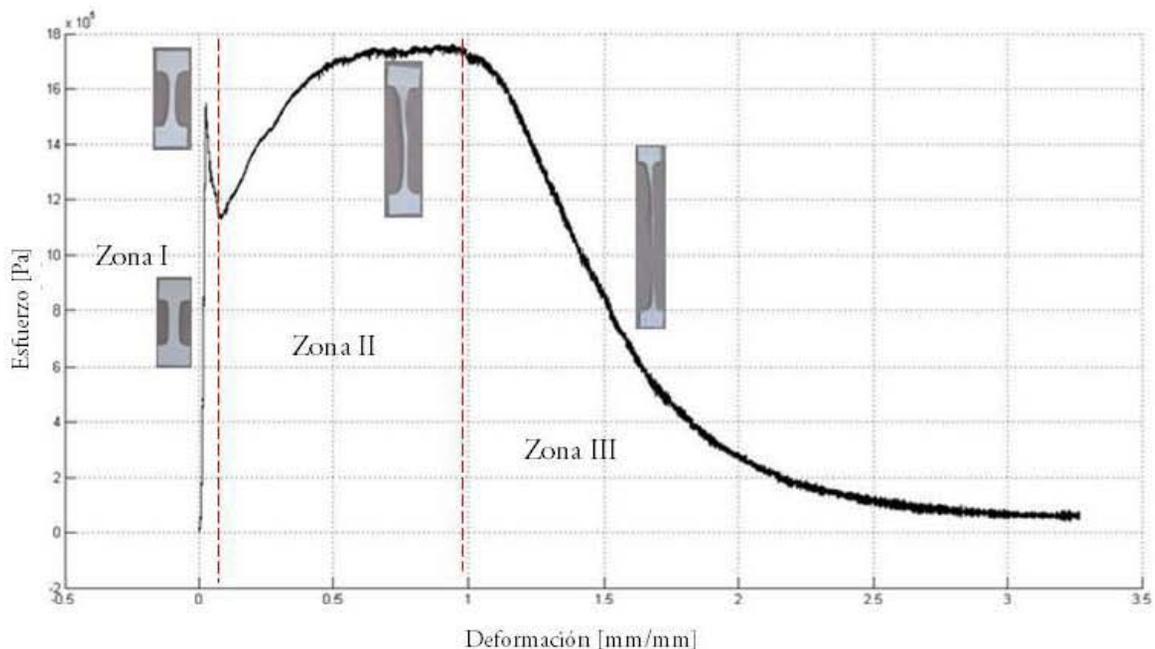


Figura 4.23. Curva esfuerzo-deformación de los andamios de PLLA

Cada zona presenta un comportamiento diferente, el que se analiza a continuación con apoyo de las micrografías obtenidas en MEB, para estimar los efectos que ocurren en cada zona.

Zona I: Se observa un comportamiento lineal que corresponde aparentemente a la de un sólido que sigue la ley de Hooke, es decir, el esfuerzo, σ , es directamente proporcional a la deformación, ε , y la pendiente de la recta es el módulo de elasticidad, E. Cabe resaltar que la ley de Hooke se aplica a materiales homogéneos, continuos e isotrópicos y los andamios no presentan estas características.

$$\sigma = E * \varepsilon$$

Al ampliar la curva, figura 4.24, se observa que en algunos puntos hay ciertas desviaciones de la tendencia lineal, esto se logró observar gracias a la sensibilidad de la celda empleada en el ensayo de tensión.

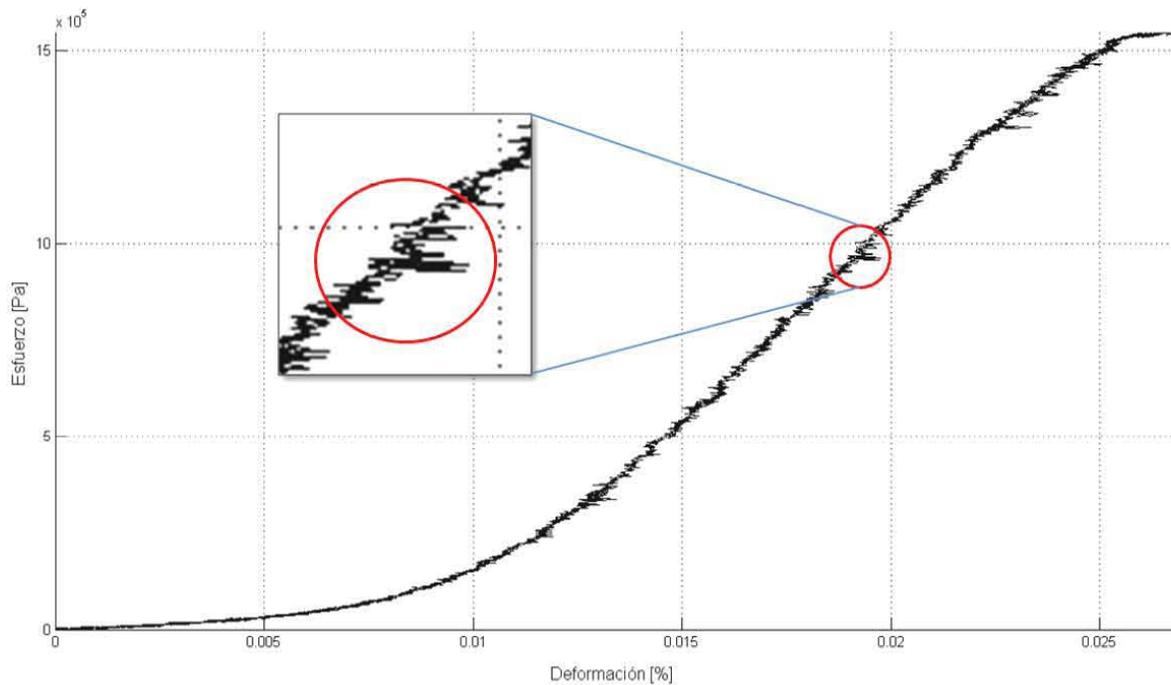


Figura 4.24. Desviaciones pequeñas en el comportamiento elástico en la zona I.

El módulo elástico se ve afectado por la estructura de la red, es decir, porosidad del andamio, presencia cúmulos ocasionados en el proceso de electrohilado, orientación aleatoria de las fibras y la traslape entre ellas (porosidad), como se muestra en la micrografía de la figura 4.25. Cuando se inicia la prueba de tensión las probetas se deforman siguiendo una relación lineal con el esfuerzo aplicado hasta alcanzar un

valor crítico denominado esfuerzo de cedencia (σ_c), aproximadamente a una deformación de 0.025 [mm/mm], es decir 2.5%, punto a partir del cual hay un cambio de régimen que se atribuye principalmente al cambio en la estructura original del andamio, provocado por la ruptura de las uniones físicas entre las fibras, ver figura 4.26. En este punto se observa una discontinuidad abrupta en la gráfica, caracterizada por una caída en el esfuerzo e inmediata recuperación con cambio de pendiente, la que ocurre entre aproximadamente 0.025 y 0.1 mm/mm, es decir, 2.5 y 10% de deformación. A este comportamiento se le denomina pseudoplástico.

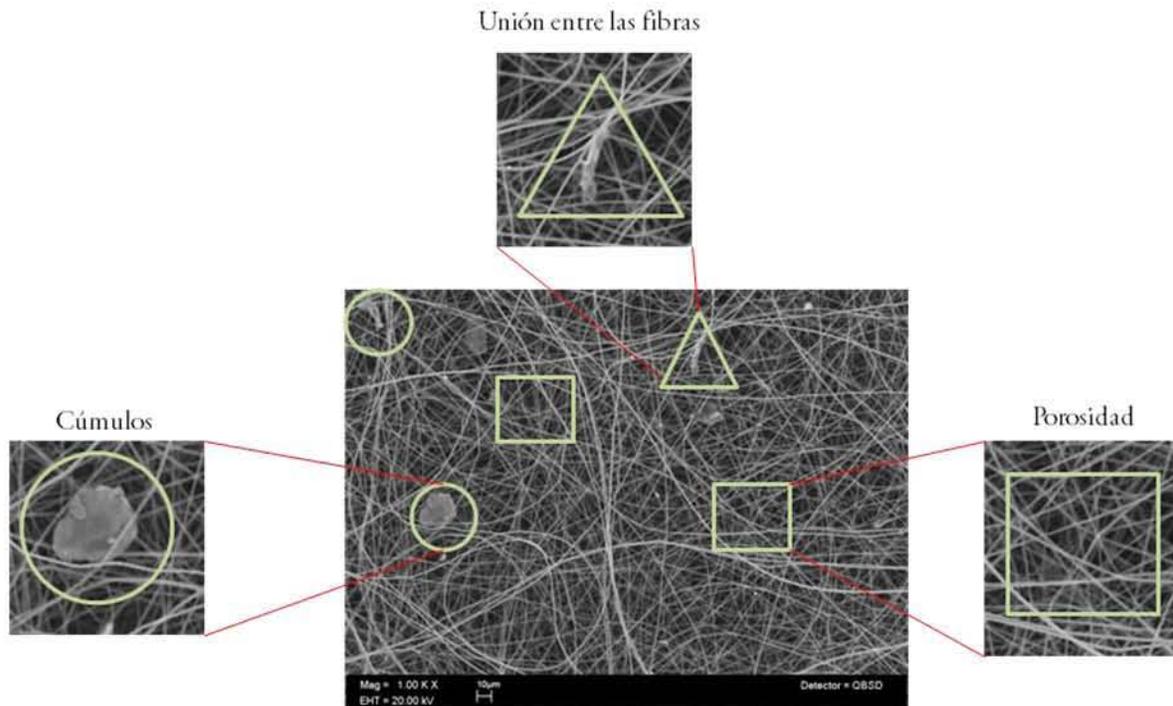


Figura 4.25. Micrografía de defectos en andamios de PLLA con distribución aleatoria.

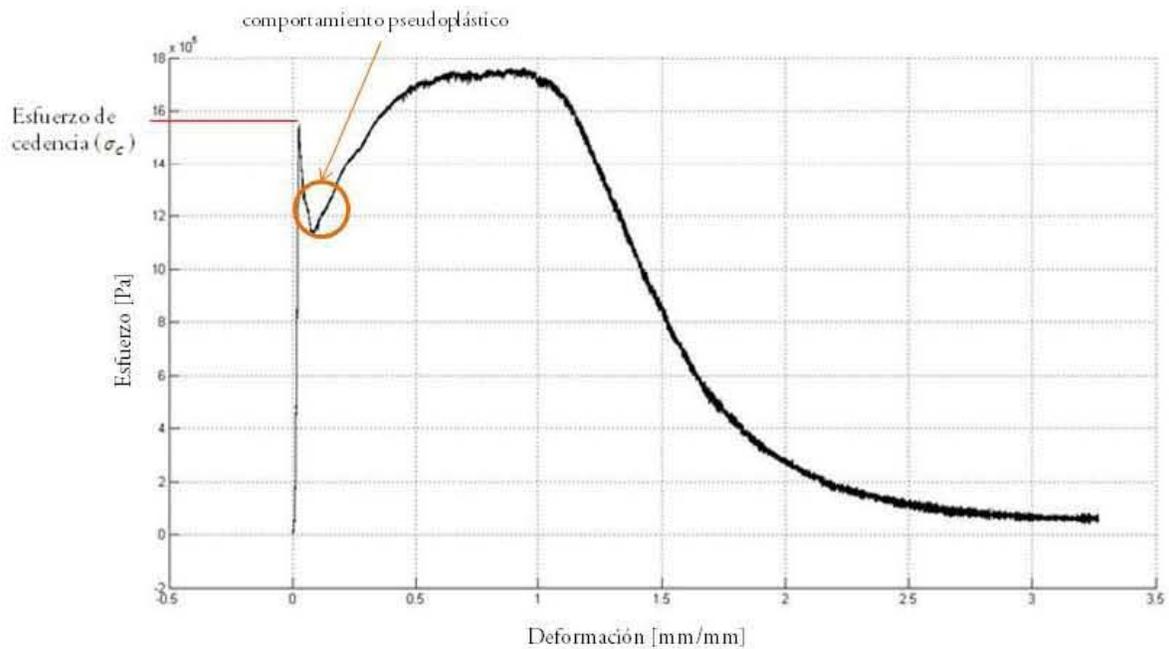


Figura 4.26. Determinación del esfuerzo de cedencia y presencia de la zona pseudoplástica.

Zona II: En esta zona se observa un comportamiento similar a la zona plástica presente en algunos polímeros, región en la cual la muestra sufre una deformación permanente por efecto del esfuerzo aplicado, denominada deformación plástica [100-101]. En esta zona las fibras empiezan deslizarse entre ellas, hay rompimiento de enlaces físicos entre las fibras para alinearse en dirección de la carga y, necesariamente se reduce la porosidad. Cerca del 0.5 mm/mm, es decir, 50% de deformación la mayoría de las fibras se encuentran alineadas paralelamente a la dirección de la carga, al ir adquiriendo este alineamiento se requiere de esfuerzos mayores para deformarse. A partir de este punto, (50%) y hasta el 100% (1 mm/mm) de deformación, las fibras se deforman plásticamente, se adelgazan, se deslizan y algunas empiezan a romperse. En esta zona el esfuerzo aparentemente es casi constante (región casi horizontal de la curva en la figura 4.27). En esta región se midió la resistencia a la tensión, este esfuerzo máximo es asignado al punto más alto dentro de la curva esfuerzo-deformación. Sin embargo, en algunos casos las curvas pueden presentar la resistencia a la tensión en el mismo punto donde se determinó el esfuerzo a la fluencia, esto se observa particularmente para andamios con alta fragilidad

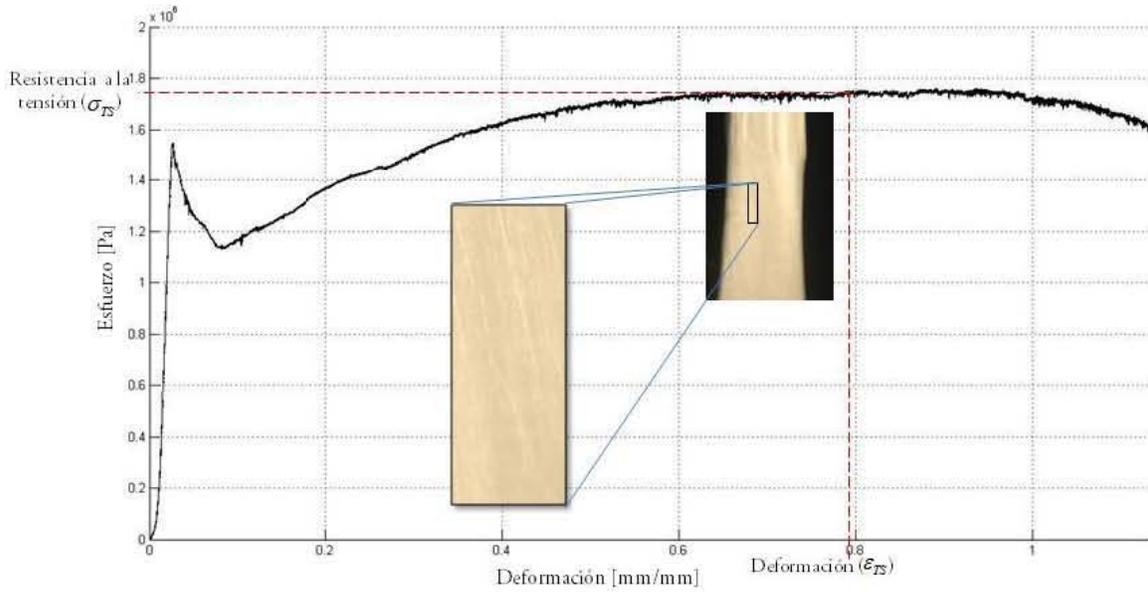


Figura 4.27. Alineación de las fibras en la zona plástica de la curva esfuerzo-deformación

Zona III: Finalmente se inicia el rompimiento masivo de las fibras por efecto de la carga aplicada y la curva esfuerzo-deformación presenta una pendiente negativa que se acentúa conforme aumenta la deformación hasta que el esfuerzo decae a cero. Esta zona se amplifica en la figura 4,28

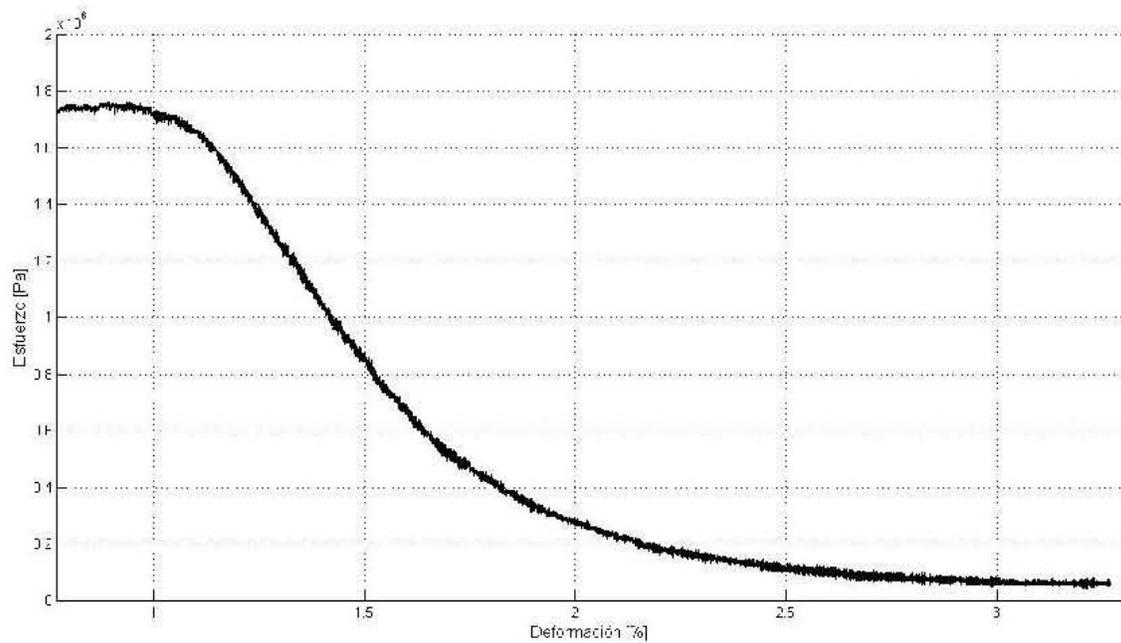


Figura 4.28. Ampliación zona III de la curva esfuerzo-deformación

De las curvas esfuerzo-deformación de las probetas ensayadas para los andamios de PLLA se determinaron los valores promedio de módulo elástico, esfuerzo de cedencia, resistencia a la tensión y deformación a la resistencia a la tensión, se observan en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Características de la deformación mecánica de los andamios de PLLA

Zona	Propiedad mecánica	Valor	Deformación [%]
Zona elástica (ZE)	Módulo elástico [MPa]	96.76 ± 32.52	
Transición de ZE a ZP	Esfuerzo de cedencia [MPa]	1.74 ± 0.18	4.24 ± 2.42
Zona Plástica (ZP)	Resistencia a la tensión [MPa]	2.77 ± 0.64	129.56 ± 32.48

El módulo elástico reportado presenta un intervalo de variaciones de una probeta a otra (figura 4.29), su desviación estándar del 32.52 MPa equivale a una variación del 33.6%. Esto es debido a que la distribución de poros, densidad y distribución de fibras y, presencia de cúmulos varían de cierta manera de una probeta a otra. Estas variaciones son normales en los andamios producidos por electrohilado.

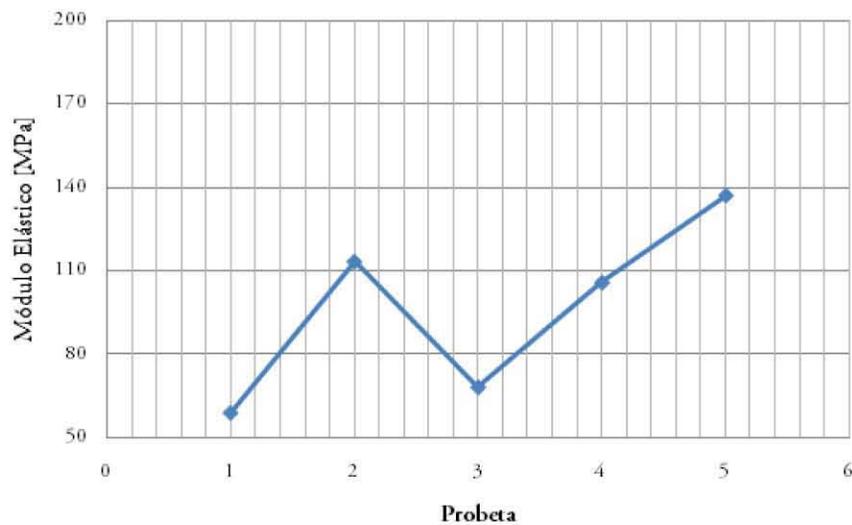


Figura 4.29. Módulo elástico de andamios de PLLA.

Sin embargo, el esfuerzo de cedencia, Figura 4.30, tiene una variación mucho menor, indicando que el deslizamiento por rompimiento de enlaces físicos entre las fibras ocurre a un esfuerzo muy definido. Los

valores de resistencia a la tensión muestran más variación, figura 4.31, y son superiores a los valores de esfuerzo de cedencia. Esta diferencia se atribuye a la densidad real de fibras en la última parte de la zona II.

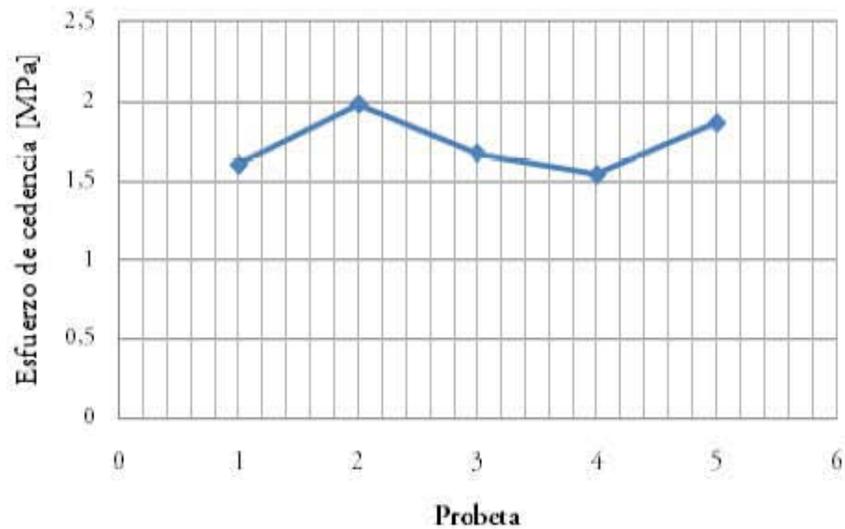


Figura 4.30. Esfuerzo de cedencia de andamios de PLLA

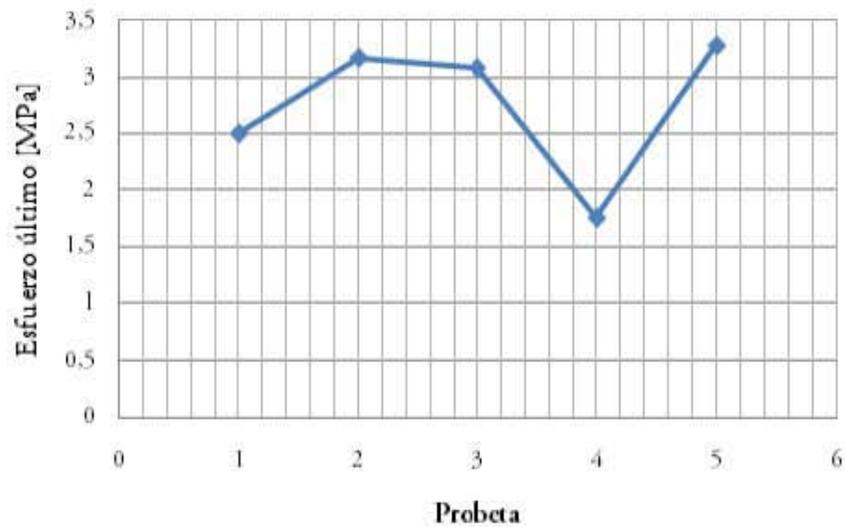


Figura 4.31. Esfuerzo último de los andamios de PLLA

4.4.2 Comportamiento mecánico de andamios de PLLA/HA

Las curvas de esfuerzo-deformación de los andamios con diferentes cantidades hidroxiapatita pura (HA) se presentan en la figura 4.32. El módulo elástico entre ellas no presenta una diferencia significativa, los valores oscilan entre 88-98MPa, indicando que hasta el punto de cedencia el módulo elástico depende

principalmente del PLLA. Debe recordarse que la HA pura no se distribuye uniformemente en las fibras. Los valores promedio de esfuerzo de cedencia, resistencia a la tensión y su deformación disminuyen conforme se incrementa la cantidad de hidroxiapatita, a excepción de las membranas de PLLA/HA_10 donde la resistencia máxima y deformación presentan valores inferiores respecto a PLLA/HA_20. Este efecto se atribuye a que la hidroxiapatita pura aumenta el grado de rigidez del andamio (pierde ductilidad) pero no la resistencia del material por no estar uniformemente ligada y distribuida en las fibras. Los valores promedio de módulo elástico, esfuerzo de cedencia, resistencia a la tensión y su deformación se muestran en la tabla 4.8.

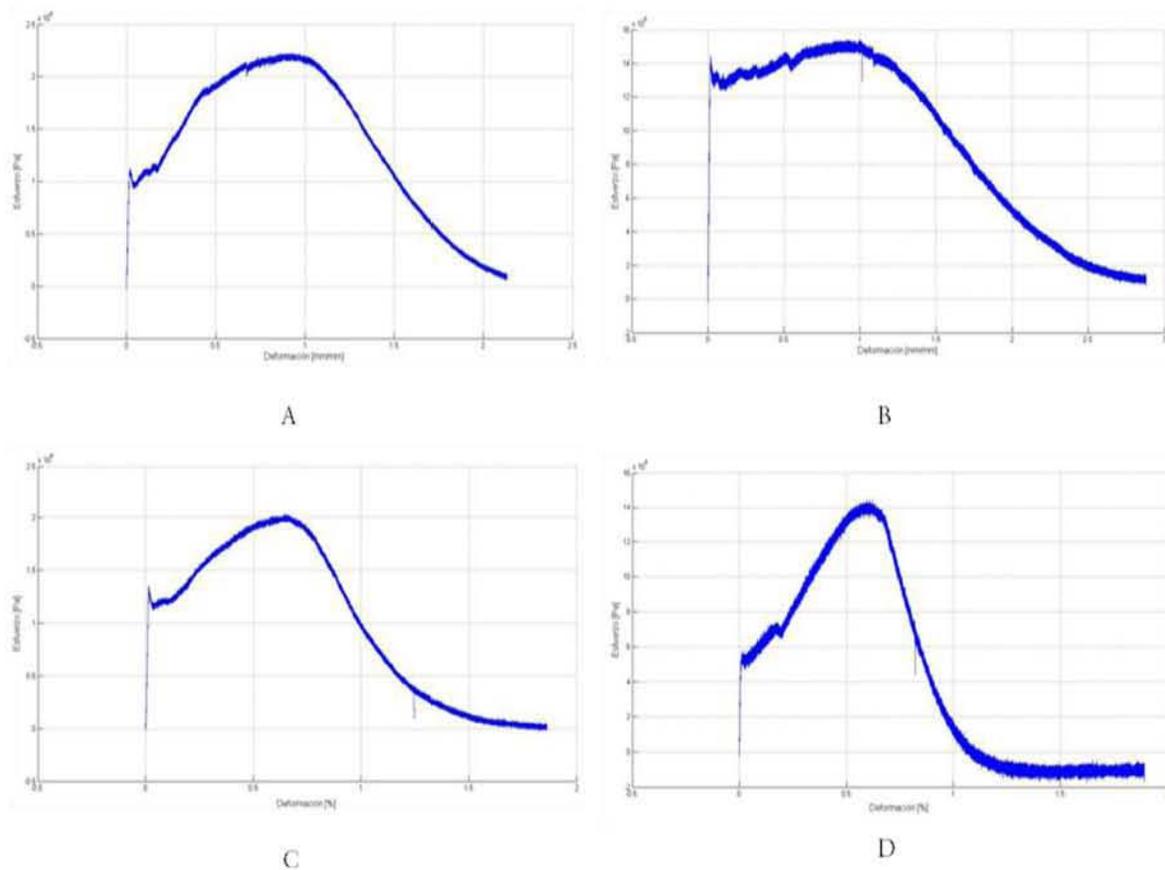


Figura 4.32. Curvas esfuerzo-deformación de los andamios con hidroxiapatita pura (A) PLLA/HA_4, (B) PLLA/HA_10; (C) PLLA/HA_20 y (D) PLLA/HA_30

Tabla 4.8. Propiedades mecánicas de los andamios de PLLA/HA, se reporta PLLA como referencia.

Nombre de los andamios	Módulo elástico (E) [Mpa]	Esfuerzo de cedencia (σ_c) [Mpa]	Resistencia a la tensión (σ_{TS}) [MPa]	Deformación (ϵ_{TS}) [%]
PLLA	96.76 ± 32.52	1.74 ± 0.18	2.77 ± 0.64	129.56 ± 32.48
PLLA/HA_4	90.34 ± 32.50	1.54 ± 0.53	2.41 ± 0.48	83.63 ± 10.41
PLLA/HA_10	98.10 ± 31.88	1.38 ± 0.53	1.23 ± 0.54	84.43 ± 6.92
PLLA/HA_20	97.71 ± 44.43	1.16 ± 0.37	1.83 ± 0.26	66.52 ± 11.61
PLLA/HA_30	88.88 ± 30.38	0.59 ± 0.18	1.43 ± 0.44	52.90 ± 6.00

4.4.3 Comportamiento mecánico de andamios de PLLA/HAInj

Las curvas esfuerzo-deformación de los andamios de PLLA con hidroxiapatita injertada, variando el porcentaje de refuerzo, se muestran en la figura 4.33. Algunas curvas se ven un poco más anchas que otras debido a la sensibilidad de la celda de carga. En la tabla 4.9 se reportan los valores promedio de módulo elástico, esfuerzo de cedencia, resistencia a la tensión y su deformación. En esta tabla, se puede observar que el módulo elástico de los andamios PLLA/HAInj en todos los casos son superiores a los de PLLA sin refuerzo. El valor a 4% de HAInj es notablemente más alto.

Respecto a la muestra con 4% de HAInj, a medida que aumenta la proporción de hidroxiapatita injertada se reduce el módulo elástico, a excepción de la muestra PLLA/HAInj_10 donde su deformación supera el valor promedio reportado para PLLA/HAInj_4. El módulo elástico disminuye a concentraciones de HAInj superiores al 10 % debido a que a concentraciones mayores se forman aglomerados que constituyen defectos en el material. Dichos defectos funcionan como concentradores de esfuerzos, los que ocasionan que la resistencia a la tensión del material disminuya en comparación con los andamios de menor contenido de injerto. La HAInj aumenta la rigidez de los andamios por lo que el esfuerzo a la cedencia, la resistencia a la tensión y su deformación disminuyen conforme se incrementa la concentración de injerto a partir del 4%.

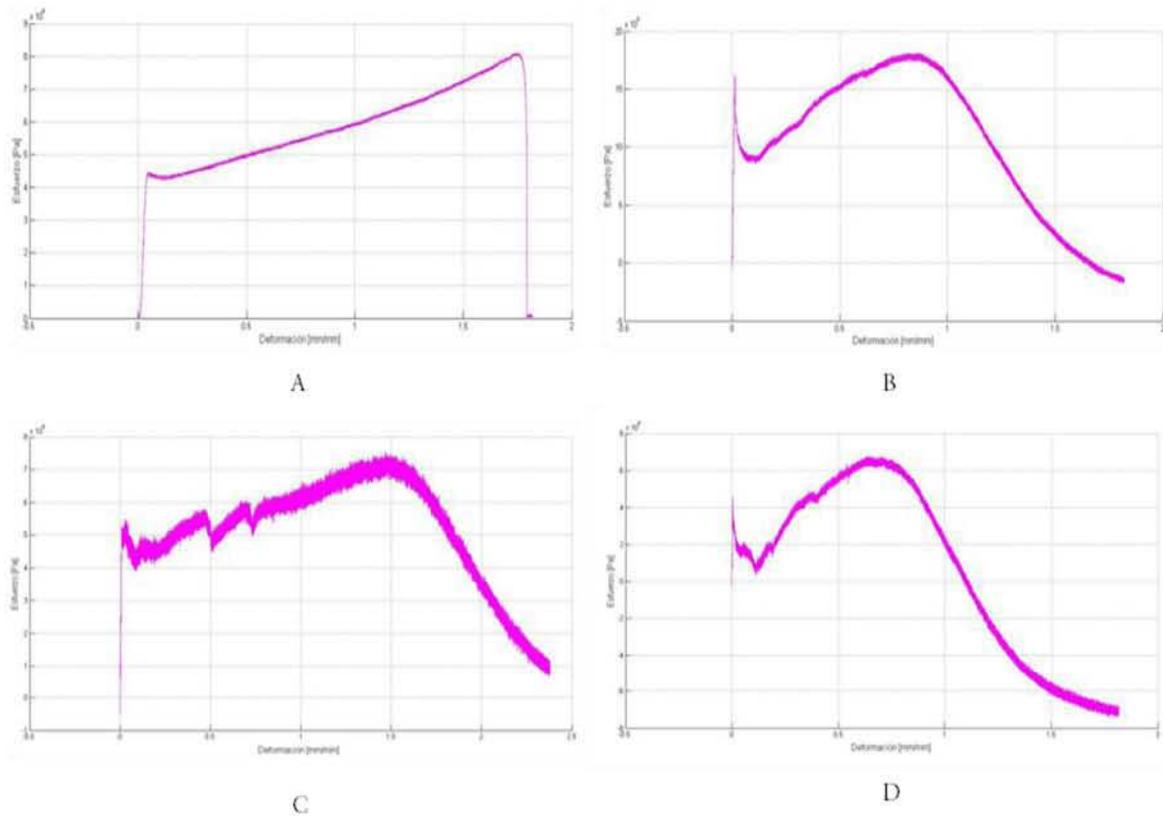


Figura 4.33. Curvas esfuerzo-deformación de andamios con hidroxiapatita pura (A) PLLA/HAInj_4; (B) PLLA/HAInj_10; (C) PLLA/HAInj_20 y (D) PLLA/HAInj_30

Tabla 4.9. Propiedades mecánicas de los andamios de PLLA/HAInj, se reporta PLLA como referencia.

Nombre de los andamios	Módulo elástico (E) [Mpa]	Esfuerzo de cedencia (σ_c) [Mpa]	Resistencia a la tensión (σ_{TS}) [MPa]	Deformación σ_{TS} [%]
PLLA	96.76 ± 32.52	1.74 ± 0.18	2.77 ± 0.64	129.56 ± 32.48
PLLA/HAInj_4	167.94 ± 34.95	2.70 ± 1.61	3.95 ± .376	103.47 ± 41.50
PLLA/HAInj_10	166.28 ± 46.48	1.53 ± 0.50	1.52 ± 0.53	134.32 ± 38.84
PLLA/HAInj_20	121.29 ± 18.88	0.99 ± 0.39	1.03 ± 0.31	84.07 ± 38.58
PLLA/HAInj_30	102.81 ± 38.24	0.48 ± 0.19	0.67 ± 0.26	61.98 ± 16.37

4.4.4 Comparación morfológica y mecánica de los andamios de PLLA/HA y PLLA/HAInj

Las membranas preparadas para caracterización mecánica fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido, esto con el propósito de observar como la morfología de las fibras y porcentaje de área porosa afectan las propiedades mecánicas. En la figura 4.34 se muestran las micrografías de los andamios con hidroxiapatita pura (imágenes A, C, E, G) e hidroxiapatita injertada (imágenes B, D, F, H). Al comparar las fibras se observa que el incremento de refuerzo (HA y HAIinj) modifica la morfología y el diámetro de las fibras. En las figuras 4.35 y 4.36 se presentan la determinación de distribución de diámetro para los andamios con hidroxiapatita pura e injertada, respectivamente. Las imágenes A, B y C, de la figura 4.34, presentan diámetros muy cercanos entre ellas con desviaciones estándar no superiores al 21%. Por otro lado, la imagen D difiere de las anteriores con diámetros un poco inferiores y desviación estándar del 37%. De la figura 4.35, la imagen A presenta el mayor diámetro con menor desviación estándar en comparación con las imágenes B, C y D de la misma figura. La imagen D corresponde al andamio con mayor cantidad de hidroxiapatita injertada y el cual presenta menor diámetro con una desviación estándar del 37%. De los resultados obtenidos se observa que la máxima cantidad de refuerzo incrementa la variación en los diámetros. Sin embargo, la mayor diferencia se nota en los andamios con hidroxiapatita injertada. Al comparar los resultados de diámetros de las figuras 4.35 y 4.36, se observa que el andamio con mayor y menor diámetro promedio son PLLA-HA4i y PLLA-HA30i, respectivamente. El porcentaje de área porosa para los andamios PLLA/HA y PLLA/HAInj se presentan en la figura 4.37. Las porosidades presentes en los andamios muestran valores muy cercanos entre ellos. Los resultados son resumidos en la tabla 4.10.

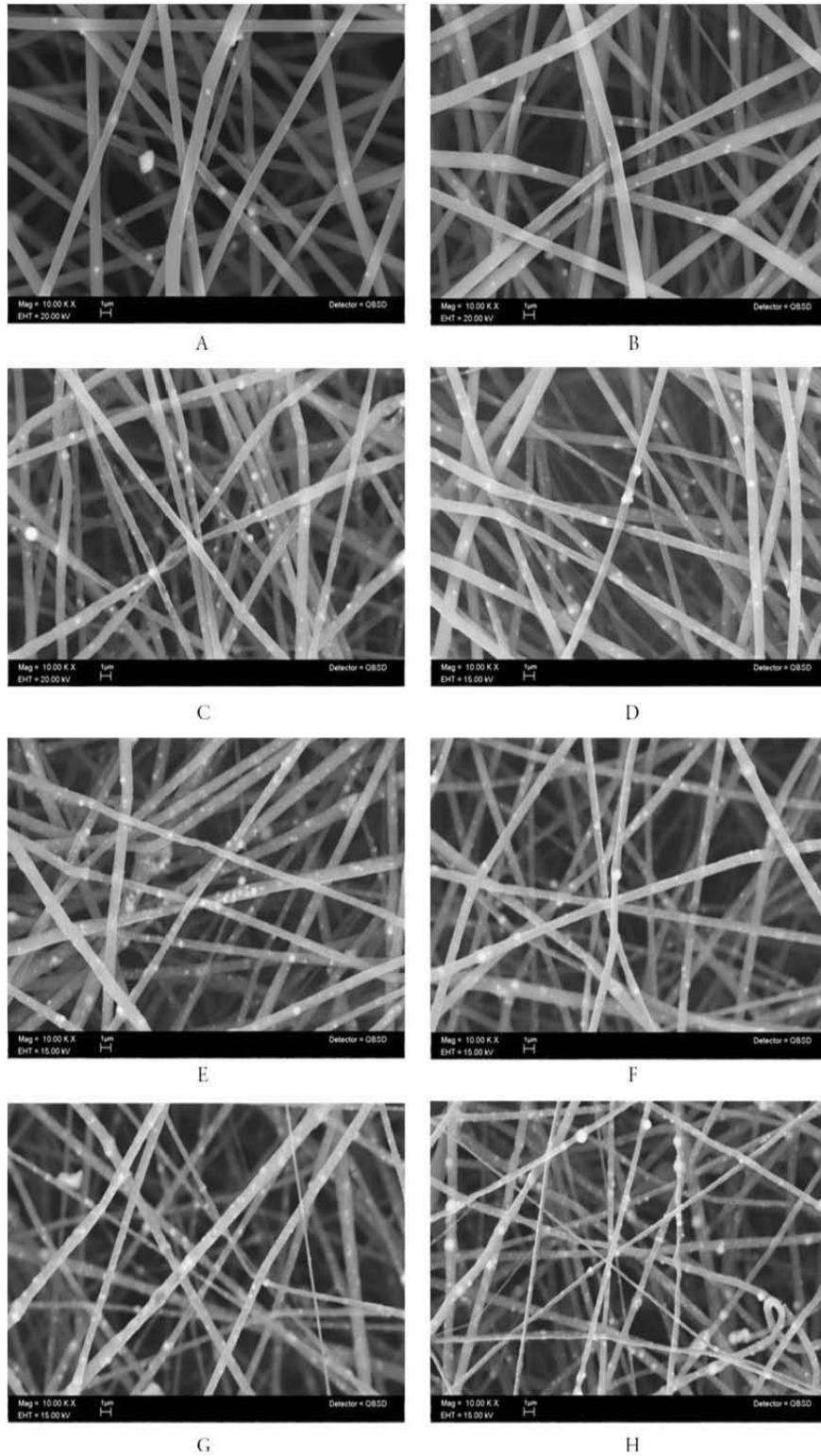
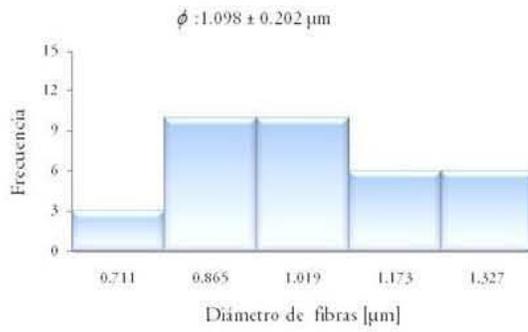
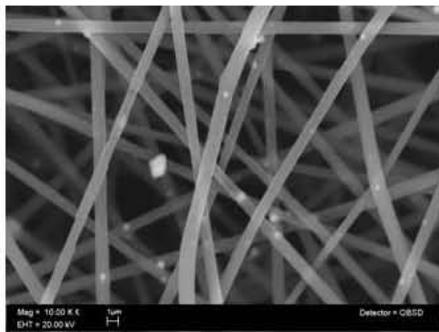
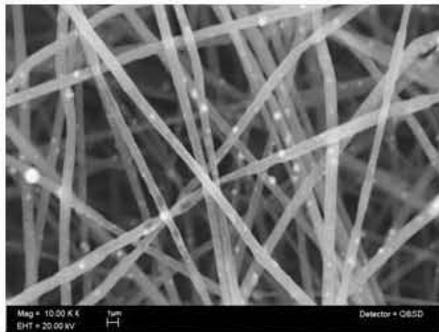


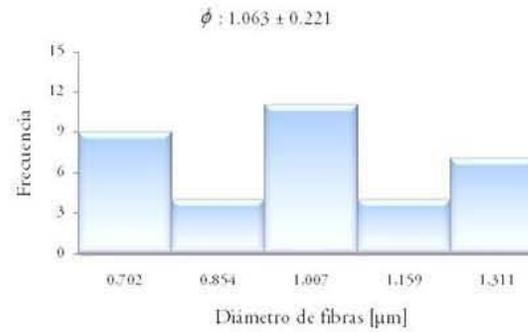
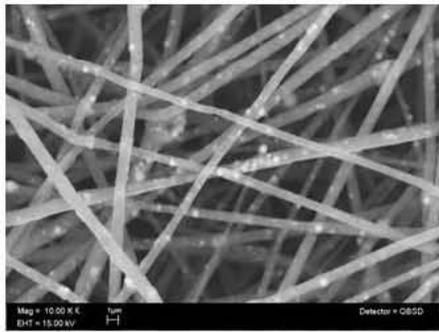
Figura 4.34. Comparación de membranas electrohiladas con hidroxiapatita pura e injertada: (A) PLLA/HA_4, (B) PLLA/HAInj_4, (C) PLLA/HA_10, (D) PLLA/HAInj_10, (E) PLLA/HA_20; (F) PLLA/HAInj_20, (G) PLLA/HA_30; (H) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 1000 aumentos, escala de 1 μ m.



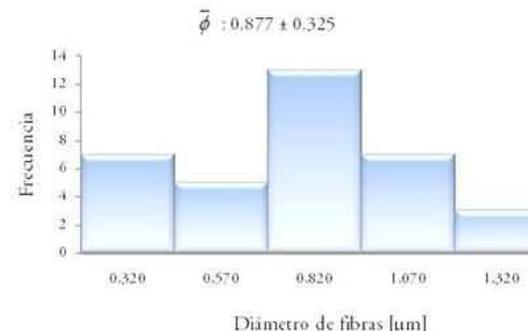
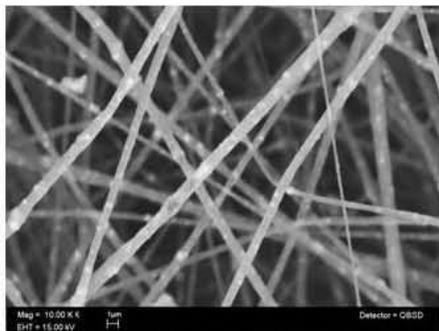
A



B



C



D

Figura 4.35. Determinación de la distribución de diámetro de las fibras:(A) PLLA/HA_4; (B) PLLA/HA_10, (C) PLLA/HA_20 y (D) PLLA/HA_30. Micrografías 10000 aumentos, escala 1 μm.

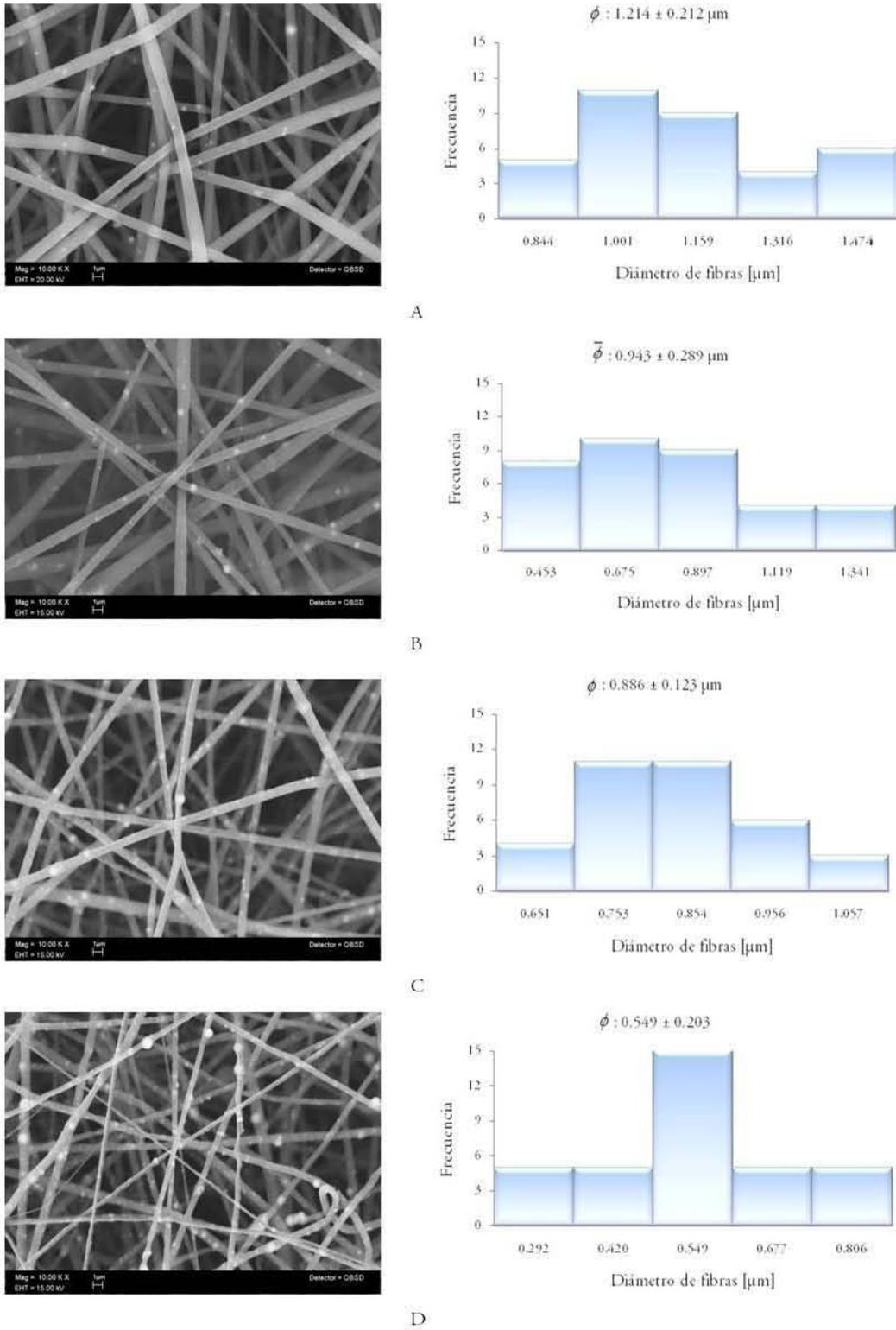


Figura 4.36. Determinación de la distribución de diámetro de las fibras:(A) PLLA/HAInj_{4i}, (B) PLLA/HAInj₁₀, (C) PLLA/HAInj₂₀ y (D) PLLA/HAInj₃₀. Micrografías de 10000 aumentos, escalas de 1 μm .

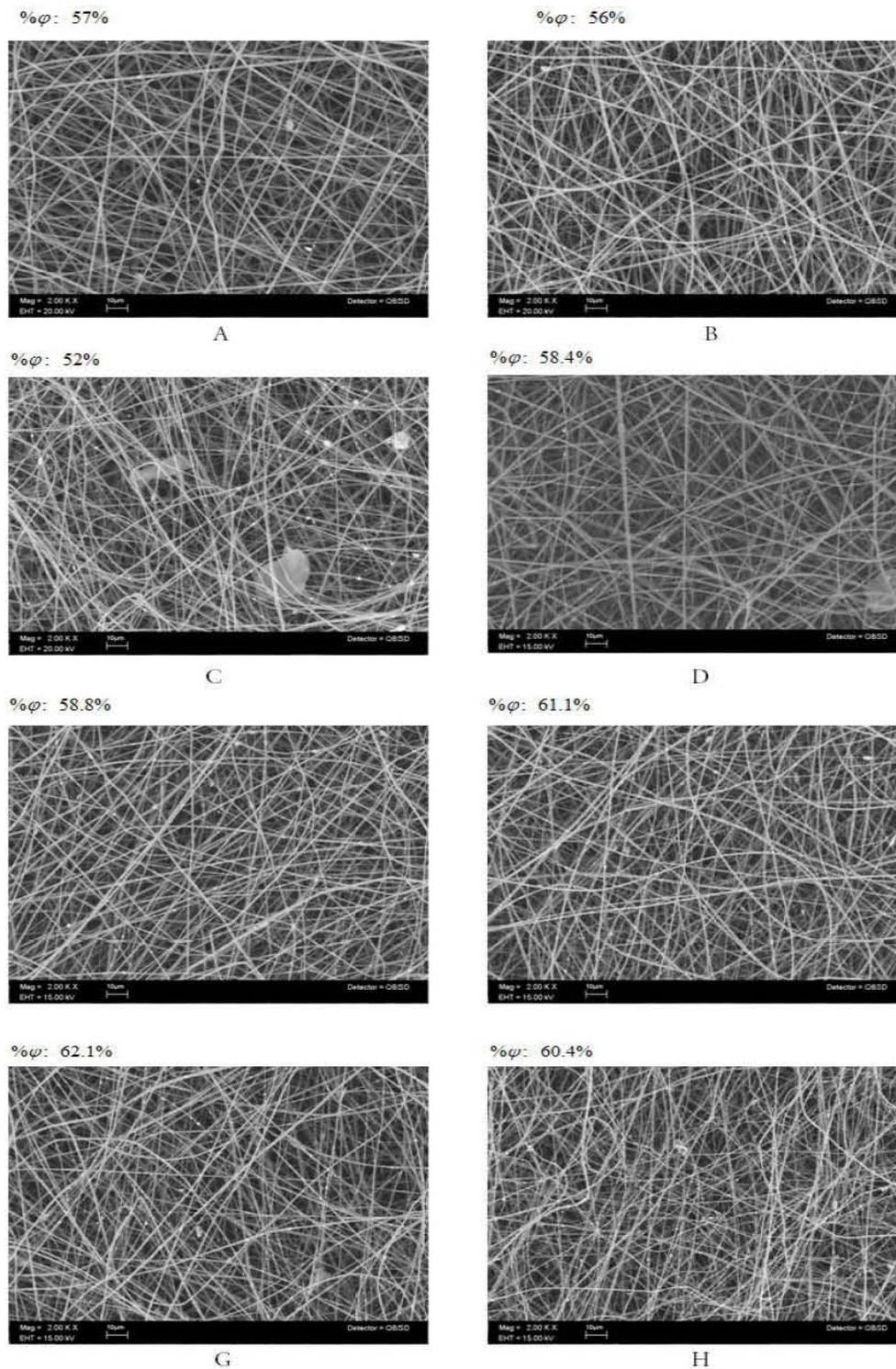


Figura 4.37. Determinación del porcentaje de área porosa de los andamios: (A) PLLA/HA_4, (B) PLLA/HA_10, (C) PLLA/HA_20, (D) PLLA/HA_30, (E) PLLA/HAInj_4, (F) PLLA/HAInj_10, (G) PLLA/HAInj_20 y (H) PLLA/HAInj_30. Micrografías de 2000 aumentos, escala de 10 µm.

Tabla 4.10. Diámetro promedio y porcentaje de área porosa para andamios con refuerzo HA y HAInj. Se reporta los resultados de los andamios de PLLA como referencia.

Nombre de los andamios	Diámetro promedio ($\bar{\phi}$) [μm]	Área porosa (φ) [%]
PLLA	1.483±0.373	61.5
Sin injerto		
PLLA/HA_4	1.098 ± 0.202	57
PLLA/HA_10	1.032 ± 0.175	52
PLLA/HA_20	1.063 ± 0.221	58.8
PLLA/HA_30	0.877 ± 0.325	62.1
Con injerto		
PLLA/HAInj_4	1.214 ± 0.212	56
PLLA/HAInj_10	0.943 ± 0.289	58.4
PLLA/HAInj_20	0.886 ± 0.123	61.1
PLLA/HAInj_30	0.549 ± 0.203	60.4

Luego de hacer los análisis morfológicos se procedió a comparar los resultados obtenidos de propiedades mecánicas para los andamios con diferente tipo de refuerzo. Los resultados de PLLA se tomaron como punto de referencia. En la figura 4.38 se presentan los resultados promedio de módulo elástico para los andamios desarrollados a partir de las soluciones de PLLA con hidroxiapatita pura e injertada. Se observa que las muestras con injerto presentan mayor módulo elástico en comparación con los resultados obtenidos para los otros tipos de andamios. Los módulos elásticos de los andamios con hidroxiapatita sin injertar presentan valores muy cercanos a los obtenidos para el PLLA puro. El mayor módulo elástico se observa para el andamio con 4% de refuerzo, muestra PLLA/HAInj₄. A partir de este porcentaje, el incremento del refuerzo provoca una disminución del módulo elástico. En esta primera parte, el efecto de la porosidad sobre el módulo elástico de los andamios se consideró

despreciable por tener valores muy cercanos entre ellos. El cambio en el módulo elástico se atribuye a la presencia de partículas o refuerzo en los andamios y su interacción con la matriz polimérica. Las partículas injertadas de polímero en su superficie mejoran la fuerza de cohesión en la interfase matriz-partícula, lo que lleva a incrementar el módulo elástico en comparación con los andamios con hidroxiapatita pura. Sin embargo, a partir del 10% de refuerzo se observa que conforme se incrementa la cantidad de refuerzo, disminuye el módulo elástico. Esto indica que las partículas pueden estar más próximas entre ellas y generar aglomeraciones que afectan la rigidez del material.

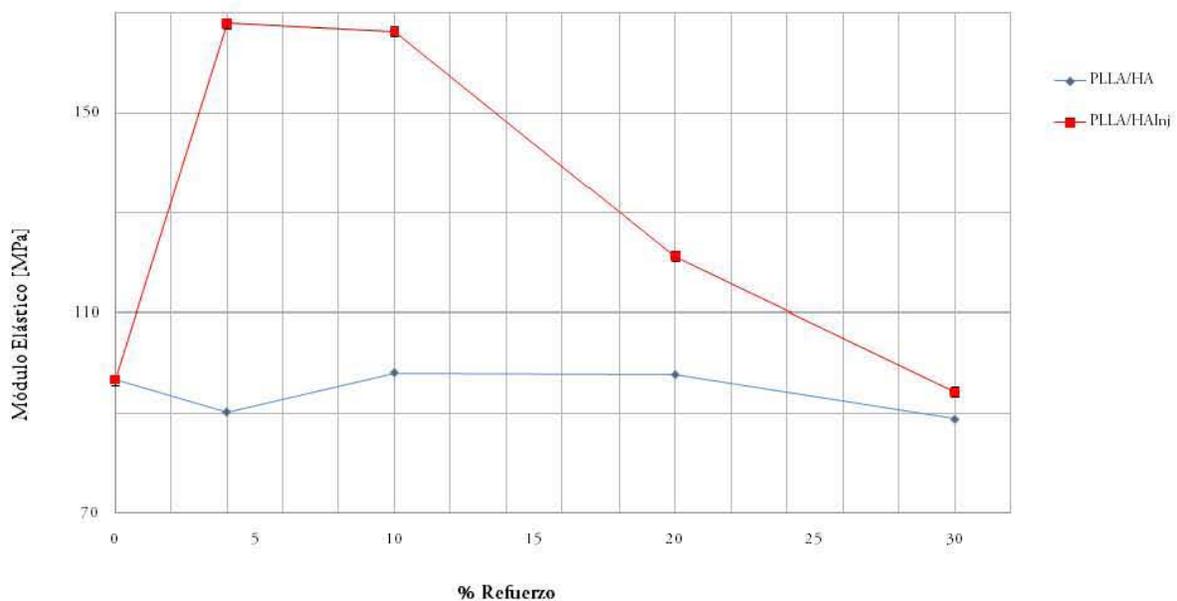


Figura 4.38. Módulo elástico en relación al porcentaje de HA o HAIInj

El esfuerzo de cedencia de igual manera se ve afectado por la presencia de partículas en los andamios. En la figura 4.39 se comparan los resultados obtenidos para los andamios con hidroxiapatita pura e injertada. Los valores de esfuerzo de cedencia de los andamios con hidroxiapatita pura conforme incrementa el porcentaje de refuerzo se encuentran por debajo de los andamios con hidroxiapatita injertada hasta el 15% aproximadamente para después superar a estos últimos. La muestra PLLA/HAInj4 presenta el mayor valor de esfuerzo de cedencia, se considera esto como una respuesta en la mejora de la interacción partícula- matriz y la baja presencia de defectos, como se observa en la imagen B de la figura 4.37.

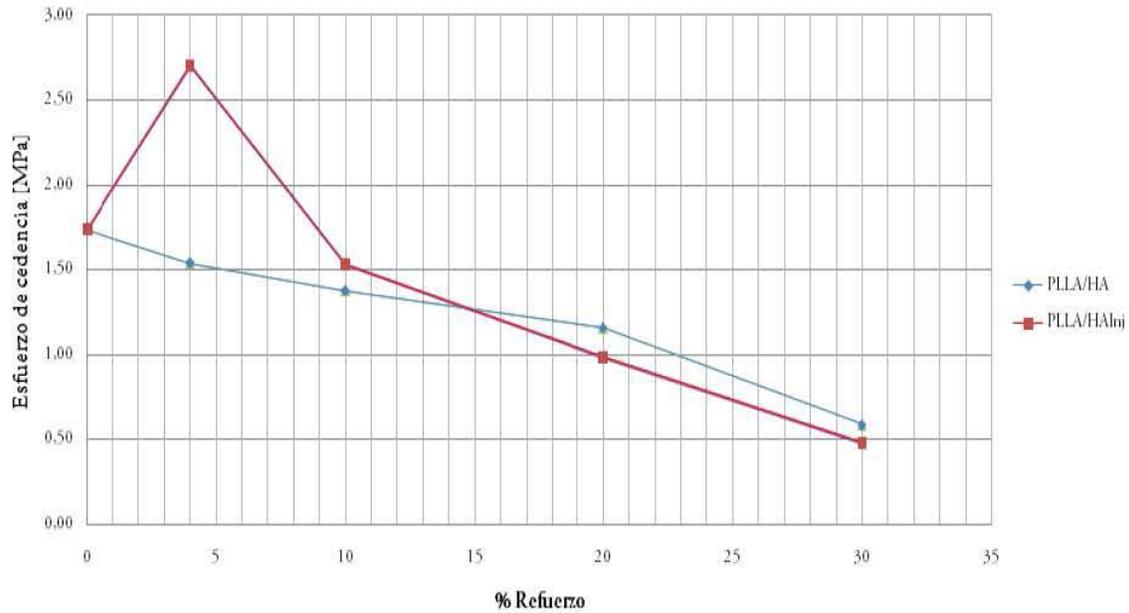


Figura 4.39. Esfuerzo de cedencia de andamios de PLLA/HA y PLLA/HAInj

La comparación entre las resistencias a la tensión de los andamios se representa en la figura 4.40. Este tipo de esfuerzo se ve afectado por la forma de las partículas, interacciones partícula-matriz, aglomeraciones de las partículas, y variación en el diámetro de las fibras. Entre mayor contacto o fuerzas de cohesión existan entre la matriz y la partícula, más se incrementará la resistencia del material. A medida que se incrementa la cantidad de refuerzo aumenta la posibilidad de generar puntos de concentradores de esfuerzos. Lo anterior se atribuye a la poca compatibilidad de partículas y la posible falta de adhesión con la matriz polimérica. Los andamios con 4% de hidroxiapatita injertada presentaron mayor esfuerzo último. Ésto se atribuye a varios factores, tales como: (1) bajo contenido de refuerzo, con lo cual se logra distribuir mejor las partículas en la matriz polimérica, (2) mayor fuerza de adhesión entre partícula y matriz, (3) diámetros homogéneos y (4) poca generación de puntos concentradores de esfuerzos. Las muestras con mayor cantidad de hidroxiapatita injertada presentan menores resultados de resistencia a la tensión, en comparación con los valores obtenidos para los andamios con hidroxiapatita pura, ésto se debe a que los primeros andamios mencionados presentan menores diámetros con alta variación, como se observa en la tabla 4.10.

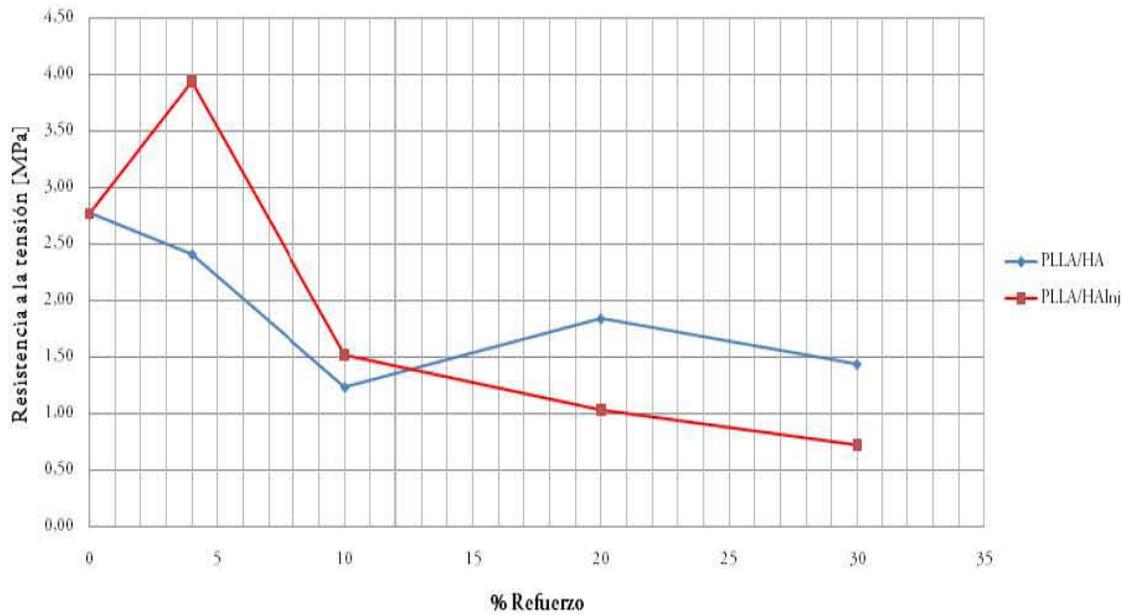


Figura 4.40. Resistencia a la tensión de los andamios con hidroxiapatita pura e injertada

En la figura 4.41 se muestra la variación de la deformación al esfuerzo último para los andamios con HA y HAINj. Se puede observar que las partículas injertadas proveen al andamio mayor ductilidad que los andamios con hidroxiapatita pura.

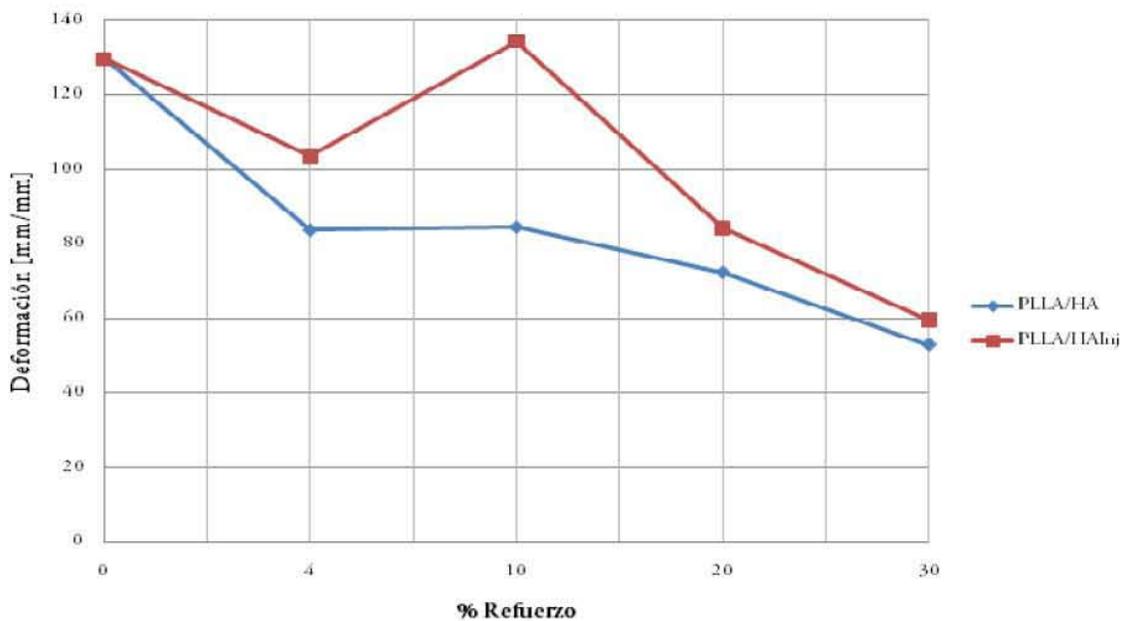


Figura 4.41. Deformación al esfuerzo último de los andamios con HA y HAINj

En la figura 4.42, se comparan las curvas esfuerzo–deformación de los andamios de PLLA, PLLA-HA_4 y PLLA-HAInj_4. Se puede observar la superioridad de la curva PLLA-HAInj_4 en comparación con las otras dos curvas. Esto indica que las partículas injertadas en bajas proporciones logran efectuar un aumento en las propiedades mecánicas de los andamios.

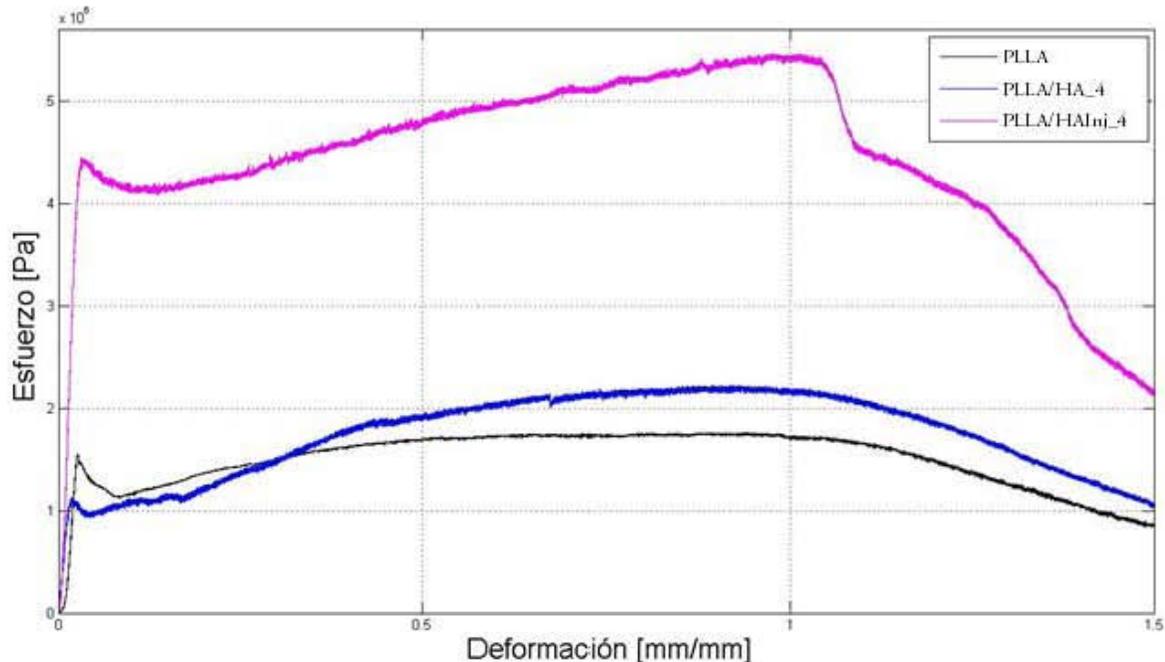


Figura 4.42. Comparación curvas esfuerzo-deformación PLLA, PLLA/HA_4 y PLLA/HAInj_4

De estos resultados se observa que los andamios con bajos porcentajes de refuerzo hasta 4%, diámetros homogéneos de las fibras y uso de partículas injertadas en la superficie con el mismo tipo de polímero, pueden aumentar significativamente las propiedades mecánicas. Esto también indica la existencia de un punto óptimo en la adición de refuerzo.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Xiuling y colaboradores, ellos encontraron que las mayores propiedades mecánicas son obtenidas en los andamios con 4 % de hidroxiapatita injertada [102]. En su trabajo ellos emplean hidroxiapatita con 6% de injerto y, adicionalmente usan un surfactante para mejorar la adhesión en las partículas y la matriz. En este trabajo se logró obtener propiedades mecánicas superiores a las reportadas por dichos autores empleando hidroxiapatita injerta con tan solo el 1,8 % de PLLA y sin ocupar surfactante.

4.5 Caracterización Biológica

En esta sección se estudió la dinámica en las estructuras del citoesqueleto y de las adhesiones focales de las células madre mesenquimales (CMM) cultivadas sobre los andamios, PLLA, PLLA-HA y PLLA-HAInj. Por otra parte, se estudió la evolución de la proliferación de las CMM y su diferenciación osteoblástica.

4.5.1 Análisis de la organización del citoesqueleto y presencia de vinculina en las células madre mesenquimales cultivadas sobre los andamios.

En esta parte se estudió, mediante ensayos de microscopía de fluorescencia acoplado al análisis confocal, la dinámica en las estructuras del citoesqueleto y de las adhesiones focales de las células madres mesenquimales cultivadas sobre los andamios de PLLA, PLLA/HA y PLLA/HAInj. El citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina para evaluar su morfología. Por otra parte, para evaluar los puntos de contacto con el andamio se analizó la distribución de la proteína vinculina. Con estos ensayos se evidenció la capacidad de cada uno de los diferentes tipos de andamios para promover la adhesión de las células madre mesenquimales. En la figura 4.43 se presentan las imágenes obtenidas en inmunofluorescencia, de los resultados para PLLA y PLLA/HAInj. El panel izquierdo corresponde a una imagen panorámica de los núcleos teñidos con DAPI. En el panel central se muestra una imagen representativa de la morfología y organización del citoesqueleto que adopta la célula al ser cultivada en cada uno de los andamios; en rojo el citoesqueleto teñido con faloidina rodaminada, en verde se observa la presencia de vinculina marcada con fluoresceína y en azul se contrasta el núcleo con DAPI. El panel derecho se presenta el solapamiento del panel central con la captura de Nomarsky, aquí se observa el posicionamiento de la célula sobre el andamio. En la figura 4.43 no se incluyeron los resultados de PLLA/HA, dado que estos andamios presentaron un comportamiento similar al de los andamios de PLLA/HAInj.

En el panel izquierdo de la figura 4.43, se muestran campos representativos de la cantidad de células que permanecían en el andamio al cabo de 6 días de cultivo. Los andamios constituidos de PLLA y PLLA/HAInj_4 mostraron un comportamiento similar con un conteo de 50-60 células por campo. Por otro lado, se evidenció que conforme aumentaba el porcentaje de HAINj en los andamios el conteo de células por campo disminuye, siendo para el PLLA/HAInj_10 un conteo entre 40-50 células por campo

y el de PLLA/HAI_{nj}_20 de 30-40 células/campo. Es importante mencionar asimismo, que al alcanzar el contenido de 30% de HAI_{nj} el conteo celular, luego de 6 días en cultivo, disminuyó drásticamente de 2-8 células por campo.

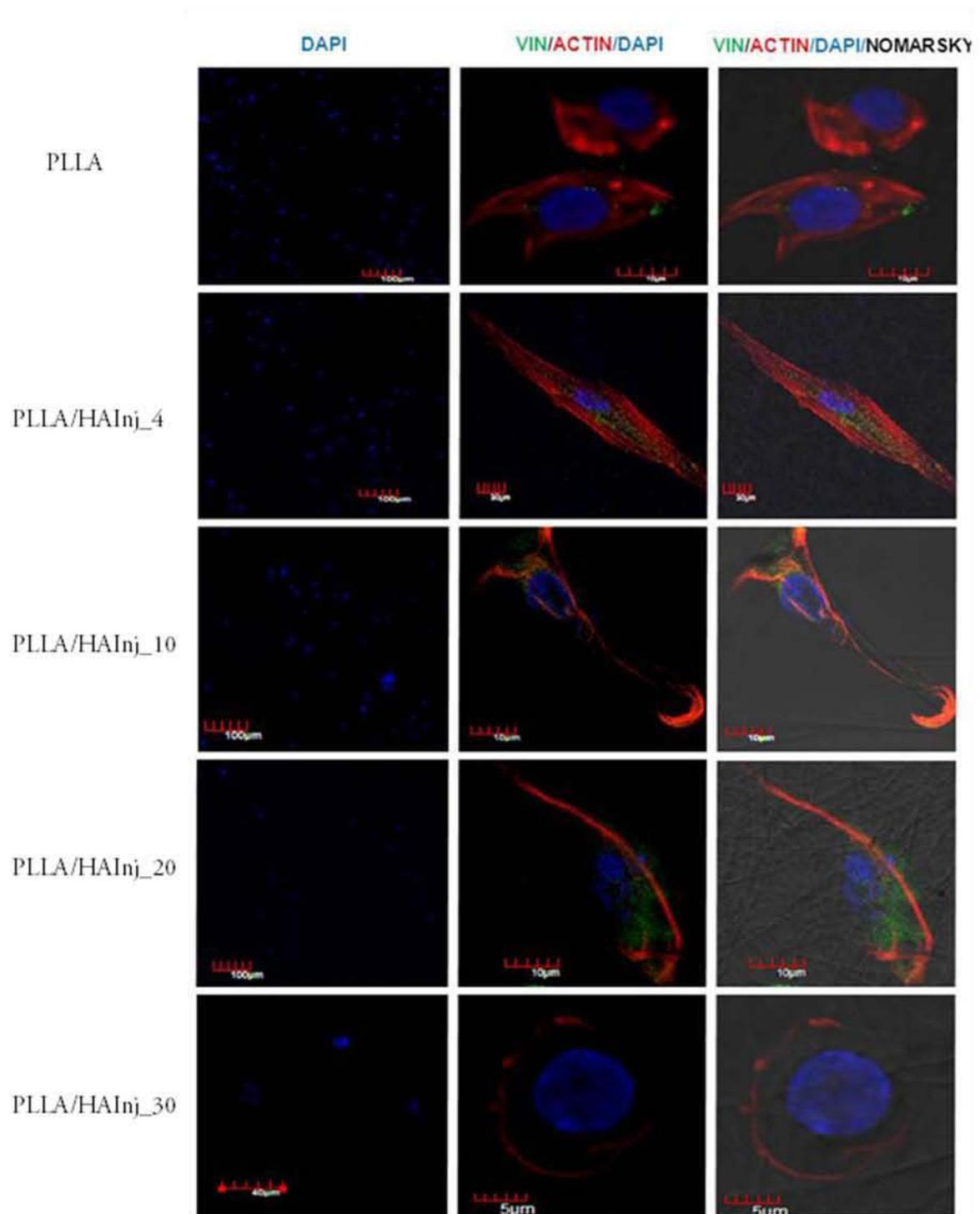


Figura 4.43. Inmunofluorescencia para observar la presencia de vinculina en la CMM cultivadas sobes los andamios de PLLA, PLLA/HA_4, PLLA/HA_10, PLLA/HA_20 y PLLA/HA_30. Panel izquierdo núcleos teñidos con DAPI. Panel central morfología celular. Panel derecho colocalización del componente celular sobre el andamio.

Una de las características que define a las CMM es su capacidad para adherirse a la caja de cultivo. Esta población celular comienza adherirse dentro de las primeras cuatro horas luego de iniciado el cultivo, el aspecto de las células normalmente es redondeado, de escaso citoplasma y con un núcleo redondo excéntrico. Conforme avanza el cultivo, aproximadamente una semana, se espera que la formación de unidades formadoras de colonias se haga evidente. Generalmente, estos grupos de células están compuestas de células con morfología más alargada, de aspecto fibroblastoide con prolongaciones de tamaño medio y núcleo central alargado.

En el panel central de la figura 4.43, se observa que las células presenta una morfología cuboide sobre los andamios constituidos de PLLA puro. Por otro lado, las células sobre los andamios con 4, 10 y 20 % de HA y HAInj, presentaron una morfología fibroblastoide extendida en íntimo contacto con el andamiaje, esto se observa con los múltiples puntos focales (punteado en verde, que corresponde a la presencia de vinculina). Por el contrario, los andamios con 30 %, tanto de HA como de HAInj, presentan una morfología redondeada con alteraciones en la organización del citoesqueleto de actina. La desestabilización estructural del citoesqueleto conduce a la pérdida de conexiones intercelulares y, provoca la reducción del volumen del osteoblasto/CMM. Los andamios de PLLA/HAInj_30 y PLLA/HA_30, son descartados en los análisis de proliferación y diferenciación por su baja población y morfología celular atípica.

En el panel derecho se observa que no existe una tendencia en el posicionamiento de las células sobre las fibras que constituyen el andamio. Esto es importante, ya que las células no adoptan las irregularidades topográficas. Es sabido que la rugosidad de la superficie condiciona la morfología y el posicionamiento de las células.

A partir de los resultados de este estudio se decidió enfocar los análisis de proliferación y diferenciación sobre los andamios con 4, 10 y 20 % de refuerzo, es decir, PLLA/HA_4, PLLA/HAInj_4, PLLA/HA_10, PLLA/HAInj_10, PLLA/HA_20 y PLLA/HAInj_20. Los andamios de PLLA y las cajas de cultivo se emplearon como referencia.

4.5.2 Evaluación de la capacidad de proliferación de las células madre mesenquimales cultivadas sobre los andamios

4.5.2.1 Eficiencia del cultivo inicial

Una vez que las CMM, mantenidas en medio básico DMEM, se sembraron sobre los andamios contenidos en los pozos de la caja de cultivo se permitió que las células comenzaran el proceso de adhesión. Al día siguiente se midió la absorbancia a 570 nm; esta refleja la cuenta celular total del inóculo inicial. Posteriormente, los andamios fueron transferidos bajo condiciones de esterilidad a una nueva caja de cultivo (caja de 12 pozos) y se registró la absorbancia desarrollada por las células que se mantuvieron adheridas sobre cada uno de los andamios. (Tabla 4.11). De los resultados obtenidos se puede observar que, entre los andamios con refuerzo, los tres con mayor eficiencia de cultivo fueron PLLA/HAlnj_20, PLLA/HAlnj_4 y PLLA/HAlnj_10, de mayor a menor eficiencia. En cambio, los andamios con hidroxiapatita sin injertar presentan eficiencias inferiores a los andamios con injerto. Una primera consideración es que la hidroxiapatita injertada mejora la eficiencia del cultivo.

Tabla 4.11. Registro de la cantidad celular medida con absorbancia

Muestra	Inoculo inicial	Inoculo basal	Eficiencia de cultivo [%]
CEL-P	1.47	1.10	
PLLA	1.44	0.91	63.19
Sin injerto			
PLLA/HA_4	1.45	0.83	57.24
PLLA/HA_10	1.42	0.86	60.56
PLLA/HA_20	1.45	0.85	58.62
Con injerto			
PLLA/HAlnj_4	1.42	0.96	67.60
PLLA/HAlnj_10	1.45	0.89	61.38
PLLA/HAlnj_20	1.87	1.45	77.54

4.5.2.2 Evaluación de la proliferación celular en presencia de DMEM

Posteriormente, se monitoreo la tendencia de proliferación de las CMM cultivadas en medio básico (DMEM) sobre cada uno de los andamios en un periodo de 4 días, los valores promedio de absorbancia son mostrados en la Tabla 4.12. Estos valores son graficados en forma de barras en la figura 4.44

Los datos de absorbancia obtenidos mediante el ensayo de alamar azul, muestran un incremento en el número de células en proliferación con el tiempo, con respecto al control (células cultivadas sobre la caja de cultivo), especialmente entre el día 1 y 2 (en estos días se registran los picos de proliferación). Los resultados indicaron que prácticamente tanto los andamios de PLLA/HAIinj como los de PLLA/HA ofrecen una buena superficie de contacto, ya que los niveles de proliferación resultaron semejantes al control positivo (CEL-P), poniendo de manifiesto su cito-compatibilidad.

Tabla 4.12. Evaluación de la proliferación de los andamios en presencia de DMEM durante 4 días.

Muestra	Inoculo basal	D-1	D-2	D-3	D-4
CEL-P	0.71 ± 0.09	0.80 ± 0.07	0.84 ± 0.00	0.83 ± 0.04	0.07 + 0.03
PLLA	0.68 + 0.04	0.61 ± 0.01	0.70 + 0.25	0.62 ± 0.06	0.46 ± 0.02
Sin injerto					
PLLA/HA_4	0.68 ± 0.02	0.53 ± 0.04	0.60 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.45 ± 0.03
PLLA/HA_10	0.66 ± 0.06	0.55 ± 0.05	0.58 ± 0.02	0.51 ± 0.02	0.46 ± 0.04
PLLA/HA_20	0.68 ± 0.02	0.55 ± 0.05	0.54 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.43 ± 0.06
Con injerto					
PLLA/HAIinj_4	0.65 ± 0.03	0.66 ± 0.11	0.53 ± 0.06	0.52 ± 0.06	0.43 ± 0.01
PLLA/HAIinj_10	0.68 ± 0.05	0.59 ± 0.03	0.53 ± 0.00	0.55 ± 0.00	0.47 ± 0.01
PLLA/HAIinj_20	0.71 ± 0.06	0.652 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.57 ± 0.01	0.45 ± 0.01

En la figura 4.44 se observa que las células cultivadas sobre los andamios de PLLA, PLLA/HA_4, PLLA/HA_10 y PLLA/HAIinj_20 presentan un leve incremento en la proliferación al segundo día y al tercer día sobre los andamios de PLLA/HAIinj_10. A diferencia, los andamios de PLLA/HA_20 no presentaron variación entre el primer y segundo, es decir, no se observa una variación en el comportamiento celular. Por otro lado, las células sobre los andamios de PLLA/HAIinj_4 presentan una disminución en la proliferación a partir del segundo día, esto podría sugerirse a que las células están dirigiéndose hacia la diferenciación. Las células sobre los andamios con HA y HAIinj presenta un decaimiento en la proliferación al cuarto día, esto indica que las células disminuyen su proliferación y probablemente inicien su diferenciación.

De los resultados obtenidos, se observa que los andamios que favorecen a la proliferación celular son PLLA/HAIinj_20, PLLA, PLLA/HA_4 y PLLA/HA_10, organizados de mayor a menor según el incremento en la proliferación Sin embargo, los andamios de PLLA presentan una gran variación en el segundo día. Este comportamiento probablemente obedece a la poca reproducibilidad en las características de la superficie de los andamios. Los andamios PLLA/HAIinj_10 aunque presentan un incremento en la proliferación al tercer día pueden incluirse en el grupo anterior. Y las células sobre los andamios de PLLA/HAIinj_4 presentan disminución gradual conforme incrementan los días de cultivo, estos andamiajes no son descartados por haber presentado previamente una alta eficiencia en el cultivo celular y es necesario evaluar su comportamiento hacia la diferenciación osteoblástica.

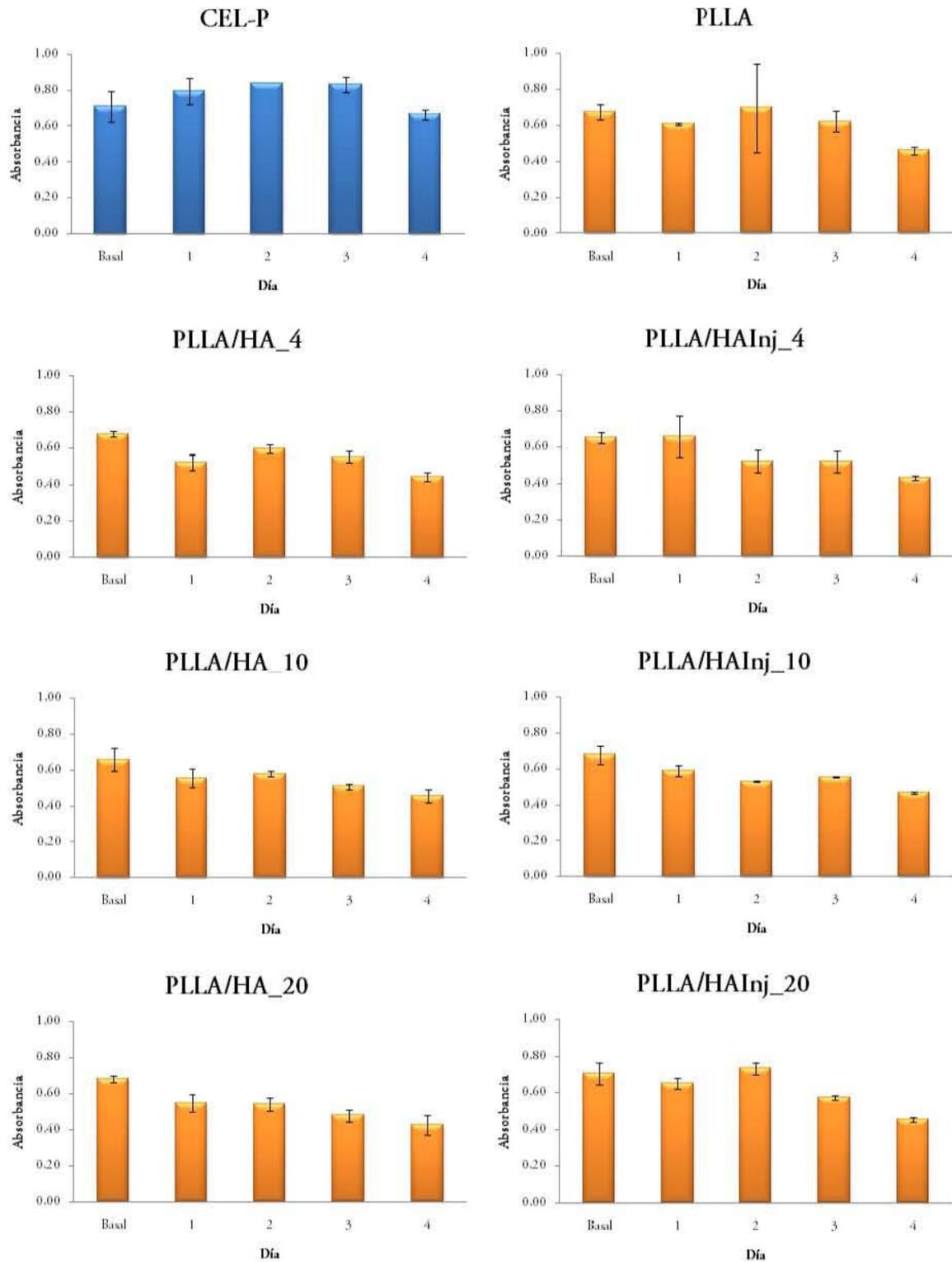


Figura 4.44. Gráfico de barras de absorbancia para la evaluación de la proliferación celular sobre los andamios, en un periodo de 4 días.

4.5.2.3 Evaluación de la proliferación celular en presencia de dexametasona

Se monitoreó a lo largo de 4 días el comportamiento del componente celular sobre cada uno de los andamios, cuando se conduce la proliferación en presencia de un agente inductor. Los resultados se muestran en la tabla 4.13.

Tabla 4.13. Evaluación de la proliferación de los andamios en presencia de dexametasona (DEX), durante 4 días.

Muestra en dexametasona(DEX)	Inoculo basal	D-1	D-2	D-3	D-4
PLLA-DEX	0.68 ± 0.01	0.81 ± 0.26	0.93 ± 0.01	0.60 ± 0.07	0.48 ± 0.02
Sin injerto					
PLLA/HA_4-DEX	0.58 ± 0.09	0.67 ± 0.06	0.60 ± 0.03	0.57 ± 0.05	0.46 ± 0.05
PLLA/HA_10-DEX	0.68 ± 0.11	0.65 ± 0.16	0.52 ± 0.00	0.48 ± 0.02	0.43 ± 0.04
PLLA/HA_20-DEX	0.60 ± 0.03	0.69 ± 0.14	0.70 ± 0.04	0.55 ± 0.03	0.42 ± 0.04
Con injerto					
PLLA/HAInj_4-DEX	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.02	0.60 ± 0.06	0.52 ± 0.06	0.43 ± 0.04
PLLA/HAInj_10-DEX	0.69 ± 0.04	0.69 ± 0.04	0.65 ± 0.12	0.49 ± 0.01	0.46 ± 0.03
PLLA/HAInj_20-DEX	0.66 ± 0.05	0.66 ± 0.00	0.73 ± 0.05	0.59 ± 0.03	0.49 ± 0.02

En la figura 4.45 se muestra, a manera de gráfica de barras, la proliferación celular medida con alamar azul en presencia del inductor de diferenciación osteoblástica (dexametasona, DEX). Estos datos representan el promedio de 3 experimentos independientes.

Normalmente, cuando el proceso de diferenciación comienza la tasa de proliferación debe ir disminuyendo de manera gradual. En la figura 4.45 se puede observar que el componente celular cultivado sobre los andamios, exceptuando PLLA/HAInj_4 y PLLA/HAInj_10, presentan un incremento en la proliferación celular al segundo día y, al tercer día comienza a descender la proliferación. Al contrario los andamios con 4 y 10 % de injerto, presenta al segundo día una reducción en la proliferación. Este comportamiento es el esperado en andamiajes donde las células se están dirigiendo hacia la diferenciación osteoblástica.

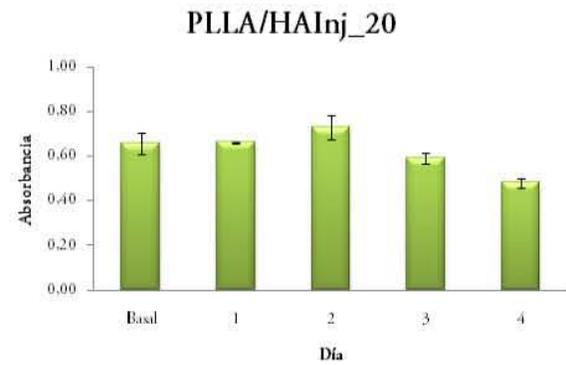
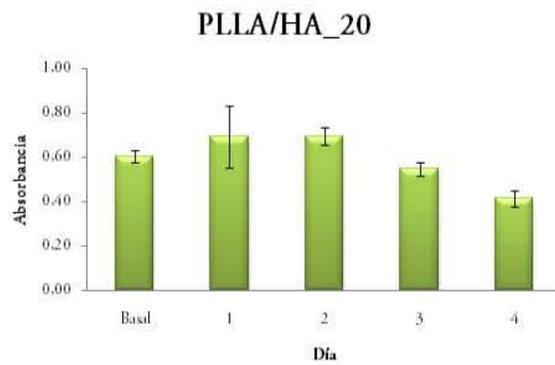
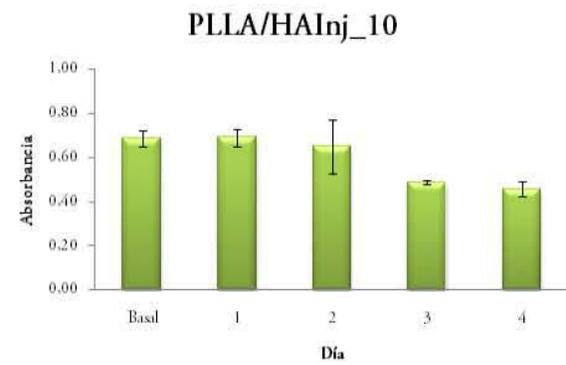
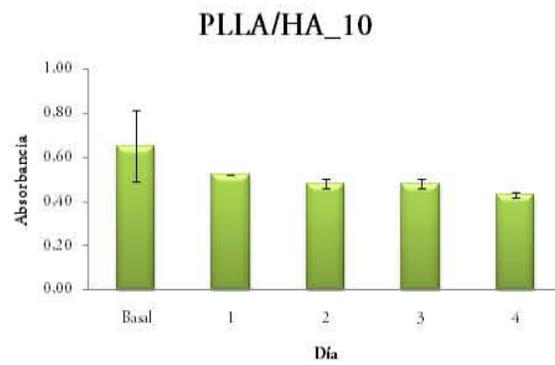
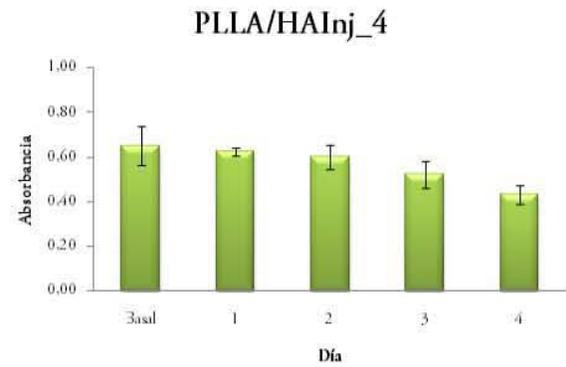
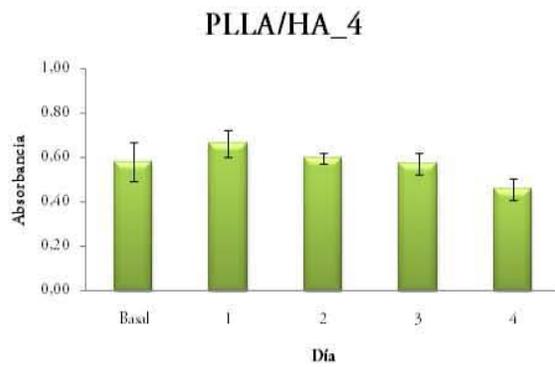
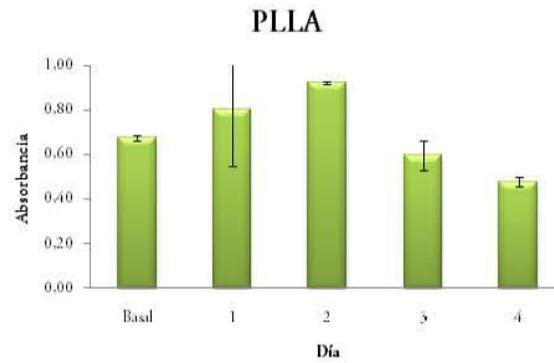


Figura 4.45. Gráfico de barras de absorbancia para la evaluación de la proliferación celular inducida con dexametasona sobre los andamios, en un periodo de 4 días

4.5.3 Evaluación de la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales cultivadas sobre los andamios

En esta parte se evaluó si la composición de los andamios tenía influencia sobre la capacidad de mineralización generada por el componente celular. Para evaluar el grado de mineralización debida a los depósitos de calcio se empleó la técnica de rojo de alizarina. La concentración de rojo de alizarina mantiene una relación directamente proporcional a la cantidad de calcio generado por las células en respuesta al microambiente.

El rojo de alizarina es un colorante que posee gran avidéz el por calcio. Sin embargo, para mejorar la sensibilidad del ensayo es necesario realizar una extracción ácida de este mineral. Este procedimiento nos obliga a incluir un control del calcio que se generaría por el componente celular en un medio que no es inductivo hacia la mineralización.

Con el propósito de obtener este control se realizó la medición de rojo de alizarina en las células que fueron mantenidas en medio DMEM (sin dexametasona). En la figura 4.46 se pueden observar los resultados derivados de este control en donde predominan valores de concentración de rojo de alizarina bajos, es decir que oscilan entre los 10 y 15 mM. Se aprecia así mismo, que entre los andamios de PLLA, PLLA/HA y PLLA/HAlnj, la respuesta generada refleja poca variación entre ellos y ninguna tendencia en relación con la cantidad incorporada de hidroxiapatita pura o injertada.

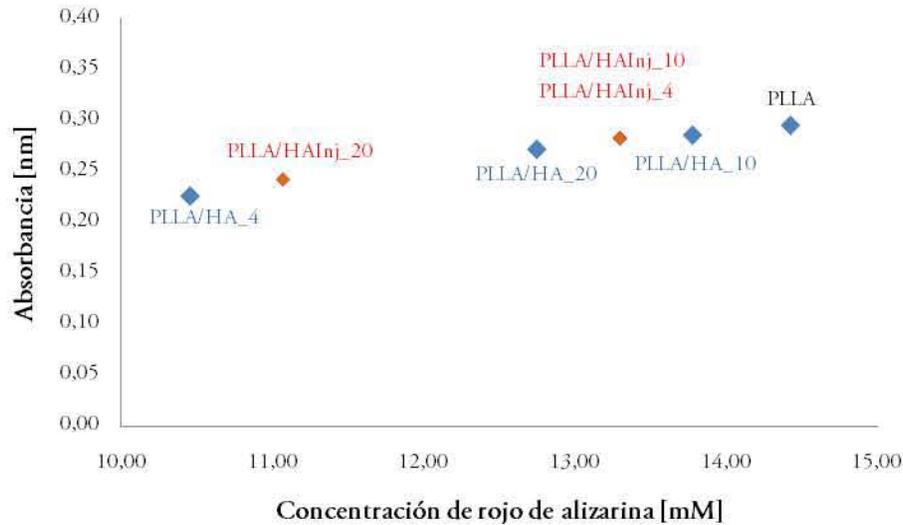


Figura 4.46. Concentración de rojo de alizarina en células cultivadas en DMEM

La parte medular de este ensayo está representada por la demostración de que la composición de los andamios favorece la mineralización de los osteoblastos, en este sentido, se midió la concentración de rojo de alizarina para cada uno de los binomios (célula-andamio). En la figura 4.47 se observa que las células cultivadas sobre los andamios con hidroxiapatita pura presentan un microambiente medianamente adecuado para la mineralización. Esto se atribuye a la presencia de un mayor depósito de calcio en comparación con la cantidad de calcio contenido en las células que no fueron inducidas a diferenciación.

Por otro lado, de manera interesante, se demuestra que las células cultivadas sobre los andamios con hidroxiapatita injertada presentaron un mayor depósito de calcio (valores que varían entre 65 a 83 mM) en comparación con los resultados obtenidos para las células cultivadas sobre los andamios con hidroxiapatita pura, las células no inducidas a la diferenciación y los andamios sin cultivo celular.

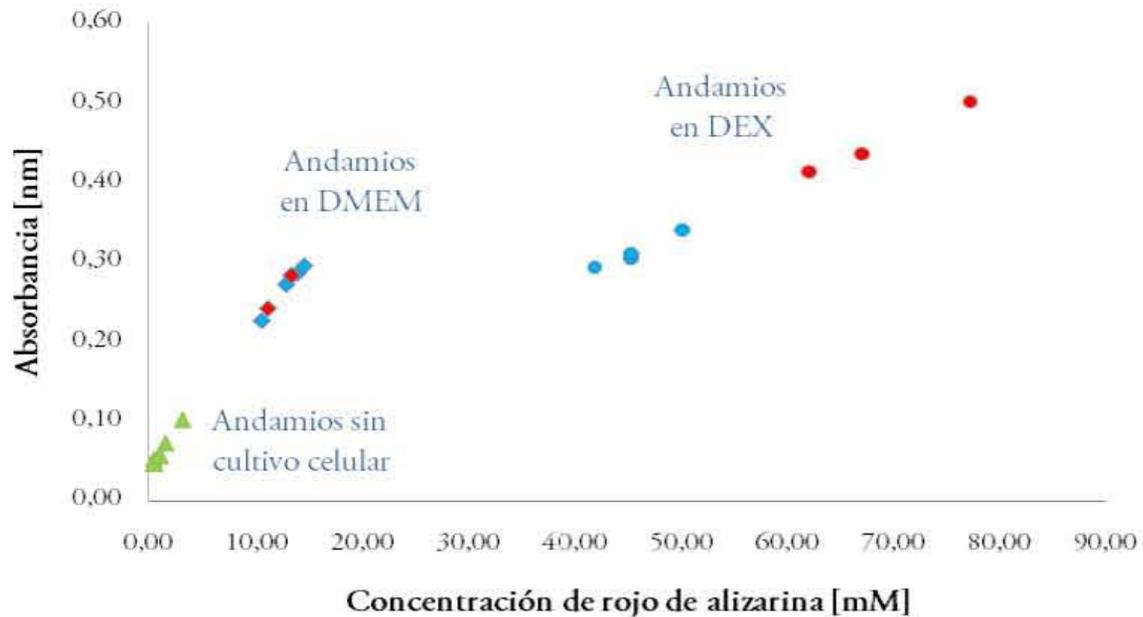


Figura 4.47. Comparación de la concentración de rojo de alizarina en células cultivadas en andamios inducidos a la diferenciación, andamios no inducidos a la diferenciación osteoblástica y andamios en ausencia de cultivo celular:

En la figura 4.48 se muestra la concentración de rojo de alizarina en células cultivadas sobre andamios de PLLA/HA y PLLA/HAInj inducidos a la diferenciación osteoblástica. La concentración medida sobre las células en los andamios de PLLA/HAInj_20 (77.25 mM) se encuentra por encima de los valores mostrados para los andamios PLLA/HAInj_10 y PLLA/HAInj_4 en un porcentaje de 13.27 y 19.74 %, respectivamente. En contraste, los andamios con hidroxiapatita pura PLLA/HA_4, PLLA/HA_10 y PLLA/HA_20, muestran valores por debajo en porcentajes del 45.95, 41.55 y 35.28 %, respectivamente. Al incrementar la diferencia porcentual se reduce la posibilidad de que las células generen un microambiente adecuado para la mineralización de la matriz extracelular.

Esto nos demuestra que la presencia de la hidroxiapatita injertada coadyuva a que el componente celular, en presencia de agentes osteogénicos, progrese exitosamente hacia la etapa de mineralización. Esta propiedad es crucial, debido a que en la medida de que el binomio célula-andamio sea capaz de generar un microambiente adecuado, éste será simultáneamente apto para la regeneración de la matriz extracelular ósea “funcional” desde el punto de vista mecánico.

Cabe resaltar que no se encontró en la literatura estudios de caracterización biológica sobre andamios porosos electrohilados de poli(L-lactida) con hidroxiapatita injertada, donde el injerto se llevó a cabo en ausencia de catalizador.

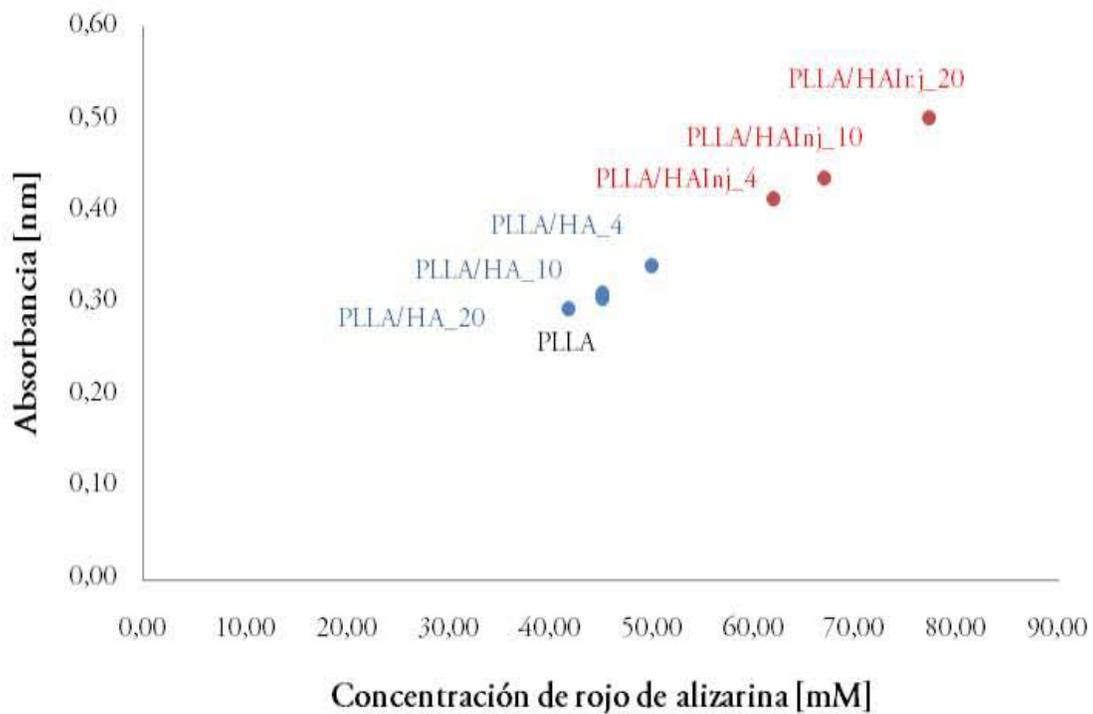


Figura 4.48. Concentración de rojo de alizarina en células cultivadas sobre andamios de PLLA/HA y PLLA/HAInj inducidos con DEX.

CONCLUSIONES

- Se lograron desarrollar andamios de poli(L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada mediante la técnica de electrohilado con las características esperadas. Las evidencias mecánicas y biológicas demostraron que los andamios son aptos para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos.
- Se injertó poli(L-lactida) en la superficie de las nanopartículas de hidroxiapatita mediante polimerización *in situ* en presencia y ausencia de octoato de estaño. Se evidenció que el octoato de estaño favorece la cantidad de injerto pero se descartó por su posible citotoxicidad.
- Se lograron estandarizar las condiciones del proceso de electrohilado para las soluciones de PLLA donde se obtuvieron andamios homogéneos. Los parámetros encontrados fueron concentración 16% p/v, flujo de inyección 0,6 mL/h, voltaje aplicado de 15kV y distancia entre el colector y el inyector de 30 cm.
- La hidroxiapatita injertada promovió la formación de andamios con fibras morfológicamente cilíndricas y poca presencia de defectos. Esto se logró con el incremento de la conductividad en las mezclas de poli(L-lactida) e hidroxiapatita injertada. La variación en la conductividad influye directamente en el proceso de electrohilado y en la obtención de andamios estructuralmente homogéneos.
- La porosidad obtenida en los andamios, 52 -73%, fue la adecuada para permitir el crecimiento celular, sin afectar significativamente las propiedades mecánicas.

- Los andamios con 4% de hidroxiapatita injertada presentaron las propiedades mecánicas más altas, tales como módulo elástico de 167.94 MPa, esfuerzo de cedencia de 2.7MPa, resistencia a la tensión de 3.93 MPa y deformación de 103.47%. Estas propiedades aumentan la probabilidad de que los andamios soporten la regeneración de tejido óseo.

- La osteoconductividad se refiere a la capacidad que un material posee para actuar como un substrato en el cual las células puedan adherirse y desarrollar sus funciones; en este sentido se demostró que los andamios con 4, 10 y 20% de refuerzo, tanto de hidroxiapatita pura e injertada, poseen una capacidad de osteoconductividad privilegiada.

- Los andamios de poli(L-lactida) con hidroxiapatita injerta al 4, 10 y 20% presentaron una estructura y distribución de hidroxiapatita que influyen positivamente sobre la proliferación celular y diferenciación osteoblástica. Las células cultivadas sobre estos andamios, inducidos a la diferenciación osteoblástica, presentaron una respuesta positiva en la maduración de osteoblastos y mineralización de la matriz extracelular.

PERSPECTIVAS

- Se recomienda modificar la polimerización por apertura de L-lactida en presencia de hidroxiapatita utilizando catalizadores no citotóxicos, tales como complejos metálicos de calcio.
- Se sugiere evaluar el comportamiento celular de los odontoblastos sobre los andamios electrohilados con hidroxiapatita injertada y sin injertar, con el propósito de determinar su uso potencial en aplicaciones dentales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Langer, R.; Vacanti, J.P. Tissue Engineering. Science 1993, 260, 920-926
- [2] Stevens, M.M. Biomaterials for bone tissue engineering. Materials Today. 2008, 11, 18-25
- [3] Suso, S. *Banco de huesos*; Masson S.A.: Barcelona, 2002.
- [4] Sastre, R.; De Aza, S.; San Román J.; Eds. *Biomateriales*; Faenza Editrice Iberica: Faenza, 2004.
- [5] Castelo-Branco, C. *Osteoporosis y menopausia*; Panamericana: Madrid, 2009.
- [6] Zanchetta. *Osteoporosis: fisiopatología, diagnóstico, prevención y tratamiento*. Panamericana: Buenos Aires, 2001.
- [7] Lanza, R.P.; Langer, R.; Vancati, J.P.; Eds. *Principles of tissue engineering*; Masson: New York, 2000.
- [8] Rouvière, H.; Delmas, A. *Anatomía humana descriptiva, topográfica y funcional*; Masson S.A.: Barcelona, 2005.
- [9] Meyer, U.; Wiesmann, H.P.; *Bone and cartilage engineering*; Springer: Heidelberg, 2006.
- [10] Chandy, T.; Das, G.S.; Wilson, R.F. Rao, G.H.R. Development of polylactide microspheres for protein encapsulation and delivery. J. Appl. Polym. Sci. 2002, 86, 1285-1295.
- [11] Avérous, L. *Polylactic acid: synthesis, properties and applications*; Belgacem, M.N.; Gandini, A.; Eds. En Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources, Elsevier Publication, New York, 2008, 433-450.
- [12] Hench, L.L.; Jones, J.R.; Eds. *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*. CRC Press: New York, 2005.
- [13] Bhat, S.V. *Biomaterials*. Narosa Publishing House: New Delhi, 2002.
- [14] Bronzino, J.D. *The biomedical engineering handbook*. CRC Press: Boca Raton, 2000.
- [15] Park, J.B; Lakes, R.S. *Biomaterials an introduction*. 1979 Plenum Press: New York, 1992.
- [16] Hollinger, J.O.; Einhorn, T.A.; Doll, B.A.; Sfeir, C.; Eds. *Bone tissue engineering*; CRC press: New York, 2005.

-
- [17] Holy, C.H. Bone tissue engineering on biodegradable polymers. Ph.D. Thesis University of Toronto.
- [18] Agarwal, S.; Wendorff, J.H.; Greine, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 2008, 49, 5603-5621.
- [19] Doshi, J.; Reneker D.H. Electrospinning process and applications of electrospun Fibers. *J. Electrostat.* 1995, 35, 151-160.
- [20] Ignjatovic, N.; Tomic, S.; Dakic, M. Miljkovic, M.; Plavsic, M.; Uskokovic, Dragan. Synthesis and properties of Hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials*, 1999, 20, 809-816.
- [21] McCullen, S.D.; Stevens, D.R.; Roberts, W.A.; Clarke, L.I.; Bernacki, S.H.; Gorga, R.E.; Lobo, E.G. Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Int. J. Nanomed.* 2007;2, 2, 253-263.
- [22] Habraken, W.J.E.M.; Wolke, J.G.C.; Jansen, J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2007, 59, 234-248.
- [23] Heise, U.; Osborn, J.F.; Duwe, F. Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. *Int. Orthop.* 1990, 14, 329-338.
- [24] Suchanek, W.; Yoshimura, M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement. *J. Mater. Res.* 1998, 13, 94-117.
- [25] Auras, R.; Lim, L-T.; Selke, S.E.M.; Tsuji, H.; Eds. *Poly(lactic acid) synthesis, structures, properties, processing and applications.*
- [26] Gupta, A.P.; Kumar, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - polylactide: a critique. *Eur. Polym. J.* 2007, 43, 4053-4074.
- [27] Zhou, Z.; Zhou, J.; Yi, Q.; Liu, L.; Zhao, Y.; Nie, H.; Liu, X.; Zou, J.; Chen, L. Biological evaluation of poly-L-lactic acid composite containing bioactive glass. *Polym. Bull.* 2010, 65:4, 411-423.
- [28] Hule, R.A.; Pochan, D.J. Polymer nanocomposites for biomedical applications. *MRS Bull.* 2007, 32, 354-358.
- [29] Jeong, S.I.; Ko, E.K.; Yum, J.; Jung, C.H.; Lee, Y.M. Shin, H. Nanofibrous poly(lactic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds for guided tissue regeneration. *Macromol. Biosci.* 2008, 8, 328-338.
-

- [30] Hong, Z.; Zhang, P.; Liu, A.; Chen, L.; Chen, X.; Jing, X. Composites of poly(lactide-co-glycolide) and the surface modified carbonated hydroxyapatite nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res., A*. 2007, 81A, 515-522.
- [31] Sui, G.; Yang, X.; Mei, F.; Hu, X.; Chen, G.; Deng, X.; Ryu, Seungkon. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2007, 82:2, 445-454.
- [32] Helwing, E.; Sandner, B.; Gopp, U.; Vogt, F.; Wartewig, S.; Henning, S. Ring opening polymerization of lactones in the presence of hydroxyapatite. *Biomaterials* 2001, 22, 2695-2702.
- [33] Sugiyama, N.; Kunibu, R.; Yoshizawa-Fujita, M.; Takeoka, Y. Ring-opening bulk polymerization of L-lactide in porous hydroxyapatite. *Chem. Lett.* 2007, 36, 1476-1477.
- [34] Hong, Z.; Zhang, P.; He, C. Qiu, X.; Liu, A.; Chen, L.; Chen, X.; Jing, X. Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: Mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*, 2005, 26, 6296-6304.
- [35] Kim, K.H.; Jeong, L.; Park H.N.; Shin, S.Y.; Park, W.H.; Lee, S.C.; Kim, T.I.; Park, Y.J.; Seol, Y.J.; Lee, Y.M.; Ku, Y.; Rhyu, I.C.; Han S.B.; Chung C.P. Biological Efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol.* 2005, 120, 327-339.
- [36] Liu HQ, Hsieh YL. Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 2002, 40, 2119-2129.
- [37] Spadavecchia, U.; González, G. Obtención de hidroxiapatita nanométrica para aplicaciones médicas. *Revista de la faculta de ingeniería de la U.C.V.* 2007, 22:4, 37-44.
- [38] Kricheldorf, H.R. Synthesis and application of polylactides. *Chemosphere*, 2001, 43, 49-54.
- [39] Hule, R.A.; Pochan, D.J. Polymer nanocomposites for biomedical applications. *MRS Bull.* 2007, 32, 354-358.
- [40] Albertsson, A-C.; Edlund, U.; Stridsberg, K. Controlled ring-opening polymerization of lactones and lactides. *Macromol. Symp.* 2000, 157, 39-46.
- [41] Hong, Z.; Qiu, X.; Sun, J.; Deng, M.; Chen, X.; Jing, X. Grafting polymerization of L-lactide on the surface of hydroxyapatite nano-crystals. *Polymer* 2004, 45, 6699-6706.
- [42] Zhong, Z.; Ankoné, M.J.K.; Dijkstra, P.J.; Birg, C.; Westerhausen, M.; Feijen, Jan. Calcium methoxide initiated ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and L-lactide. *Polym. Bull.* 2001, 46, 51-57.
- [43] Idage, B.B.; Idage, S.B.; Kasegaonkar, A.S.; Jadhav, R.V. Ring opening polymerization of dilactide using salen complex as catalyst. *Mater. Sci. Eng., B*. 2010, 168, 193-198.

- [44] Yu, F. A novel biodegradable tissue scaffold based on core-shell structured nanofibers: incorporating controlled delivery system. M.S. Thesis. National University of Singapore, 2006.
- [45] Marler, J.J.; Upton, J.; Langer, R.; Vacanti, J.P. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1998, 33, 165-182.
- [46] Poirier, J.; Ribadeau, J.L.; Catala, M.; André, J.M.; Gherardi, R.; Bernaudin, J.F. *Histología*; Masson: Barcelona, 2002.
- [47] Londoño, M.E.; Echavarría, A.; De la Calle, F. Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Revista EIA.* 2006, 5, 109-118.
- [48] Santos de Araujo, T.; Dos Santos-Filho, J. *Hidroxiapatita pura e dopada com Cr³⁺ produção, propriedades e aplicação em biosensores.* Aracaju, 2008.
- [49] Lemons, J.E; Ed. Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications. *Procedente de symposium sponsored by ASTM Committee F-4 on medical and surgical materials and devices.* West Hanover, 1987.
- [50] Kranz, H.; Bodmeier R. Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: in situ implants versus in situ microparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008, 34, 164-172.
- [51] Romero-Cano, M.S.; Vincent, B. Controlled release of 4-nitroanilose from poly(lactic acid) nanoparticles. *J. Contr. Release* 2002, 82, 127-135.
- [52] Basier, M.E.I.; Kellaway, I.W. Poly(L-lactic acid) microspheres for pulmonary drug delivery: release kinetics and aerosolization studies. *Int. J. Pharm.* 1998, 176, 85-98.
- [53] Bendix D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polym. Degrad. Stabil.* 1998, 59, 113-118.
- [54] Hartmann, H. *High molecular weight polylactic acid polymers*; Kaplan D.L.; Ed. En *Biopolymers from Renewable Resources*, Springer-Verlag, Berlin, 1998, 367-411.
- [55] Auras, R.; Harte, B.; Selke, S. An overview of polylactides as packaging materials, *Macromol. Biosci.* 2004, 4, 835-864.
- [56] Yoo, D.K.; Kim, D.; Lee, D.S. Synthesis of lactide from oligomeric PLA: effects of temperature, pressure, and catalyst. *Macromol. Res.* 2006, 14, 510-516.
- [57] Fuentes, D.A.; Díazgranados, A.; Perilla, J.E. A method to obtain high purity lactide by the polymerization of poly(lactic acid). *Rev. Colomb. Quim.* 2006, 35, 115-123.
- [58] Grüter, R.; Pohl, H. Manufacture of Lactid. U.S. Patent 1,095,205, May 5, 1914.

-
- [59] Yang, F.; Murugan, R.; Ramakrishna, S.; Wang, X.; Ma, Y-X.; Wang, S. fabrication of nano-structure porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2004, 25, 1800-1891.
- [60] Mehta, R.; Kumar, V.; Bhunia, H.; Upadhyay, N. Synthesis of poly(lactic acid): a review. *Macromol. Sci., Polym. Rev.* 2005, 45, 325-349.
- [61] Formhals, A. Process and apparatus for preparing artificial threads. U.S. Patent 1,975,504, October 2, 1934.
- [62] Hornyak, G.L.; Moore J.J.; Tibbls H.F.; Dutta J. *Fundamentals of nanotechnology*; Taylor and Francis Group: New York, 2009.
- [63] Bhardwaj, N.; Kundu S.C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotech. Adv.* 2010, 28, 325-347.
- [64] Baji, A.; Mai Y.W.; Wong S.C.; Abtahi, M.; Chen P. Electrospinning of polymer nanofibers: effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Comp. Sci. Technol.* 2010, 70, 703-718.
- [65] Li, D.; Wang, Y.; Xia Y. Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nanoletters* 2003, 3, 1167-1171.
- [66] Wang, H.B.; Mullins, M.E.; Cregg, J.M.; Hurtado, A.; Oudega, M.; Trombler M.T.; Gilbert. R.J. Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications. *J. Neural. Eng.* 2009, 6, 1-15.
- [67] Wang, C.; Chien, H.S.; Yan, K.W.; Hung C.L.; Hung K.L.; Tsai S.J.; Jhang H.J. Correlation between processing parameters and microstructure of electrospun poly(D,L-lactic acid) nanofibers. *Polymer* 2009, 50, 6100-6110.
- [68] Frenot, A.; Chronakis, I. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 2003, 8, 64-75.
- [69] Sautter B.P. Continuous polymer nanofibers using electrospinning. M.S. Thesis University of Illinois at Chicago, August 2005.
- [70] Haghi, A.K.; Akbari M. Trends in electrospinning of natural nanofibers. *Phys. Stat. Sol.* 2007, 6, 1830-1834.
- [71] Dietzel, J.M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Beck Tan, N.C. The Effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 2001, 42, 261-272.

- [72] Chung, S.; Moghe, A.K.; Montero, G.A.; Kim S.H.; King M.W. Nanofibrous scaffolds electrospun from elastomeric biodegradable poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) copolymer. *Biomed. Mater.* 2009, 4, 1-9.
- [73] McKee, M.; Elkins, C.; Long, T. Influence of self-complementary hydrogen bonding on solution rheology/electrospinning relationships. *Polymer* 2004, 45, 8705-8715.
- [74] Shenoy, S. L.; Bates, W. D.; Frisch, H. L.; Wnek G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limits. *Polymer*, 2005, 46, 3372-3384.
- [75] Fong, H.; Chun, I.; Reneker D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 1999, 40, 4585-4592.
- [76] Jing, Z.; Xuesi, C.; Xiaoyi, X.; Qizhi, L.; Xinchao, B.; Lixin, Y.; Jing, X. Ultrafine fibers electrospun from biodegradable polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 2003, 89, 1085–1092.
- [77] Huang, L.; Nagapudi, K.; Apkarian, R.P.; Chaikof, E.L. Engineered Collagen-PEO Nanofibers and Fabrics. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2001, 12, 979–993.
- [78] Zhang, C.; Yuan, X.; Wu, L.; Han, Y.; Sheng, J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) Mats. *Eur Polym J* 2005, 41, 423–432.
- [79] Gupta, P.; Elkins, C.; Long T.E.; Wilkes G.L. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*, 2005, 46, 4799-4810.
- [80] Jarusuwannapoom, T.; Hongrojjanawiwat, W.; Jitjaicham, S.; Wannatong, L.; Nithitanakul, M.; Pattamaprom, C.; Koombhongse, P.; Rangkupan, R.; Supaphol, P. Effect of solvents on electrospinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *Eur. Poly. J.* 2005, 41, 409-421.
- [81] Jun, Z.; Hou, H.; Schaper, A.; Wendorff, J.H.; Greiner, A. Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning-influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology. *e-Polym* 2003, 9, 1–9.
- [82] Liu HQ, Hsieh YL. Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 2002, 40, 2119–2129.
- [83] Sun, G.E.; Teng, H.; Zhang C.L.; Dou Y.L.; Li, Y. Preparation of ultrafine water-soluble polymers nanofibers mats via electrospinning. *Chem. Res. Chin. Univ.* 2010, 26, 318-322.
- [84] Bognitzki, M.; Czado, W.; Frese, T.; Schaper, A.; Hellsig, M.; Steinhart, M.; Greiner, A.; Wendorff, J.H. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Adv. Mater.* 2001, 13, 70-72.

-
- [85] Zeng, J.; Chen, X.; Xu, X.; Liang, Q.; Bian, X.; Yang, L.; Jing, X. Ultrafine fibers electrospun from biodegradable polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 2003, 89, 1085-1092.
- [86] Huang, C.; Chen, S.; Lai, C.; Reneker, D.; Qiu, H.; Ye, Y.; Hou, H. Electrospun polymer nanofibers with small diameters. *Nanotechnology*, 2006, 17, 1558-1563.
- [87] Franco, E.; Delvasto, S.; Zuluaga, F.; Marti, F. Caracterización del haz proyectado en el proceso de electrohilado de PVA. *Procedente de X congreso iberoamericano de metalurgia y materiales*, Cartagena de indias, Colombia, Octubre 13-17, 2008.
- [88] Gupta, P. Processing-structure-property studies of: I) submicron polymeric fibers produced by electrospinning and ii) films of linear low density polyethylenes as influenced by the short chain branch length in copolymers of ethylene/1-butene, ethylene/1-hexene & ethylene/1-octene synthesized by a single site metallocene catalyst. Ph.D. Thesis Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, December 2004.
- [89] Williams, D.F. *Definitions in Biomaterials*; Elsevier Scientific: Amsterdam, 1987.
- [90] Vallet-Regi, M. Bioceramics: Currents status and future trends. *Mater. Sci. Forum* 1999, 293, 99-106.
- [91] Hulbert, S.F.; Bokros, J.C.; Hench, L.L.; Wilson, J.; Heimke, G. *Ceramics in Clinical Applications: Past, Presente and Future*; Elsevier: Amsterdam, 1987.
- [92] Martínez-Valencia, A.B.; Esparza-Ponce, H.E. Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. *Superficies y Vacío*. 2008, 21, 18-21.
- [93] Qiu, X.; Chen, L.; Hu, J.; Sun, J.; Hong, Z.; Liu, A. Chen, X.; Jing, X. Surface –modified hydroxyapatite linked by L-lactic acid oligomer in the absence of catalyst. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2005, 43, 5177-5185.
- [94] Qiu, X.; Hong, Z.; Hu, J.; Chen L.; Chen, X.; Jing, X. Hydroxyapatite surface modified by L-lactic acid and its subsequent grafting polymerization of L-lactide. *Biomacromolecules*. 2004, 6, 1993-1199.
- [95] Xiao, Y.; Li, D.; Fan, H.; Li, X.; Gu, Z.; Zhang, X. Preparation of nano-HA/PLA composite by modified-PLA for controlling the growth of HA crystals. *Mater. Lett.* 2007, 61, 59-62.
- [96] Wang, S.H.; Zhang, Y.Z.; Yin, G.B.; Wang, H.W.; Dong, Z.H. Fabrication of a composite vascular scaffold using electrospinning technology. *Mater. Sci. Eng., C*. 2010, 30, 670-676
- [97] Hong, Z.; Zhang, P.; Liu, A.; Chen, L.; Chen, X.; Jing X. Composites of poly(lactide-co-glycolide) and the surface modified carbonated hydroxyapatite nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res., A*. 2007, 81A, 515-522.
-

-
- [98] Zhong, S.; Teo, W.E.; Zhu, X.; Beuerman, R.; Ramakrishna, S.; Yung, L.Y: Formation of collagen-glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffolds and biological properties. *Biomacromolecules*, 2005, 6, 2998-3004.
- [99] ASTM D1708. Standard test method for tensile properties of plastics by use of microtensile specimens.
- [100] Askeland, D.R.; Phulé, Pradeep, P.P. *Ciencia e ingeniería de los materiales 4ª ed.* Thomson: México, 2004.
- [101] Callister, W.D. *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales.* Reverté, S.A.: Barcelona, 2007.
- [102] Xiuling, X.; Xuesi, C.; Liu, A.; Hong, Z.; Jing, X. Electrospun poly(L-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(L-lactide) nanocomposite fibers. *Eur. Polym. J.* 2007, 43, 3187-3196.
- [103] Stuart, H.B. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications.* John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2004.
- [104] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Métodos espectroscópicos en química orgánica.* Editorial síntesis: Madrid, 2005.
- [105] Pando, E.; Martín, M.C. Problemas de determinación estructural orgánica por espectroscopía de IR. Kadmos: Salamanca, 1979.
- [106] Weerd, J.; Heeren, R.; Boon, J. Preparation methods and accessories for the infrared spectroscopic analysis of multi-layer paint films. *Stud. Conserv.* 2004, 49, 193-210.
- [107] Macomber, R.S. *A complete introduction modern NMR spectroscopy;* John Wiley & Sons, Inc: New York, 1998.
- [108] Tema 10. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. 192-208.
- [109] Tema 15. Espectroscopia de RMN y de RSE de sólidos. 1-7.
- [110] Sierra, I.; Pérez, D.; Gómez, S.; Zarcero, S.M. *Análisis instrumental;* Netbiblo, S.L.: La Coruña, 2010.
- [111] Manual de Microscopía electrónica de barrido por Jeol. Scanning electron microscope A to Z.
- [112] Manual de conductímetro CDM210. Operating Instructions.
- [113] Gere, J.M. *Mecánica de materiales 6ª ed.* Thomson:Madrid
- [114] Caplan, A. Mesenchymal stem cells; Lanza, R.; Weissman, I.; Thomson, J.; Pedersen, R.; Hogan, B.; Gearhart, J.; Blau, H.; Melton, D.; Moore, M.; Verfaillie, C.; Donnall, T.; West,
-

- M. En Handbook of stem cells, volume 2 Adult and fetal stem cells, Elseiver academic press; San Diego, 2004
- [115] Jaiswal, N.; Haynesworth, S.E.; Caplan, A.I.; Bruder, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 1997, 64(2),295-312
- [116] Connolly, J.F.; Guse, R.; Tiedeman, J.; Dehne, R. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1991, 266, 259-70.
- [117] Alcocer A. Ed. *Manual de enfermedades óseas*, Médica panamericana; Madrid, 2010.
- [118] Kishimoto TK, Rothlein R. Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Advances in Pharmacology* 1994; 25: 117-169.
- [119] Barton, A. Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters, CRC Press; Boca Raton, 1991.

ANEXO 1.
ESPECTROS FTIR Y TGA

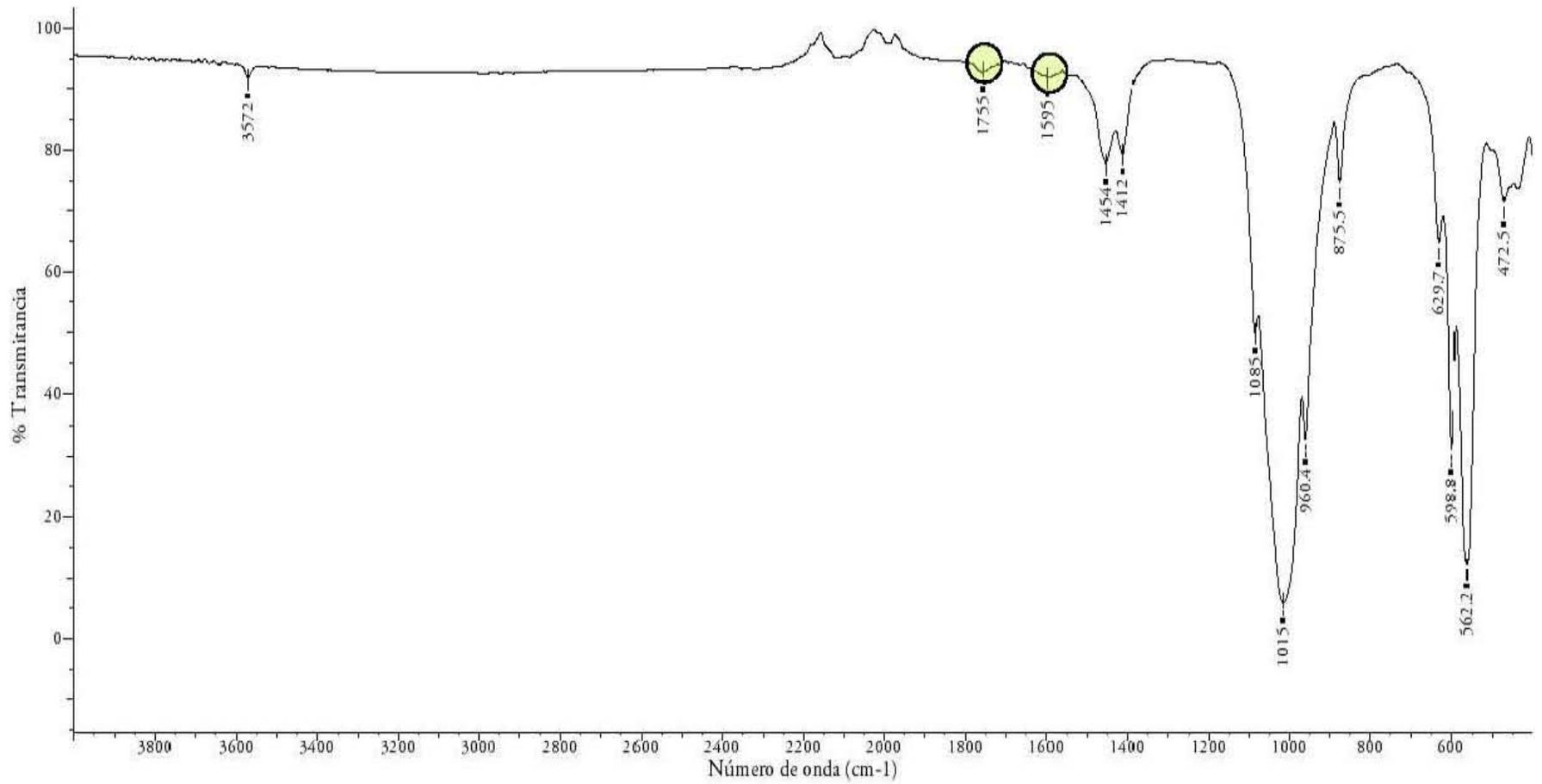


Figura A1.1. Espectro de Infrarrojo RIA-HA10-C

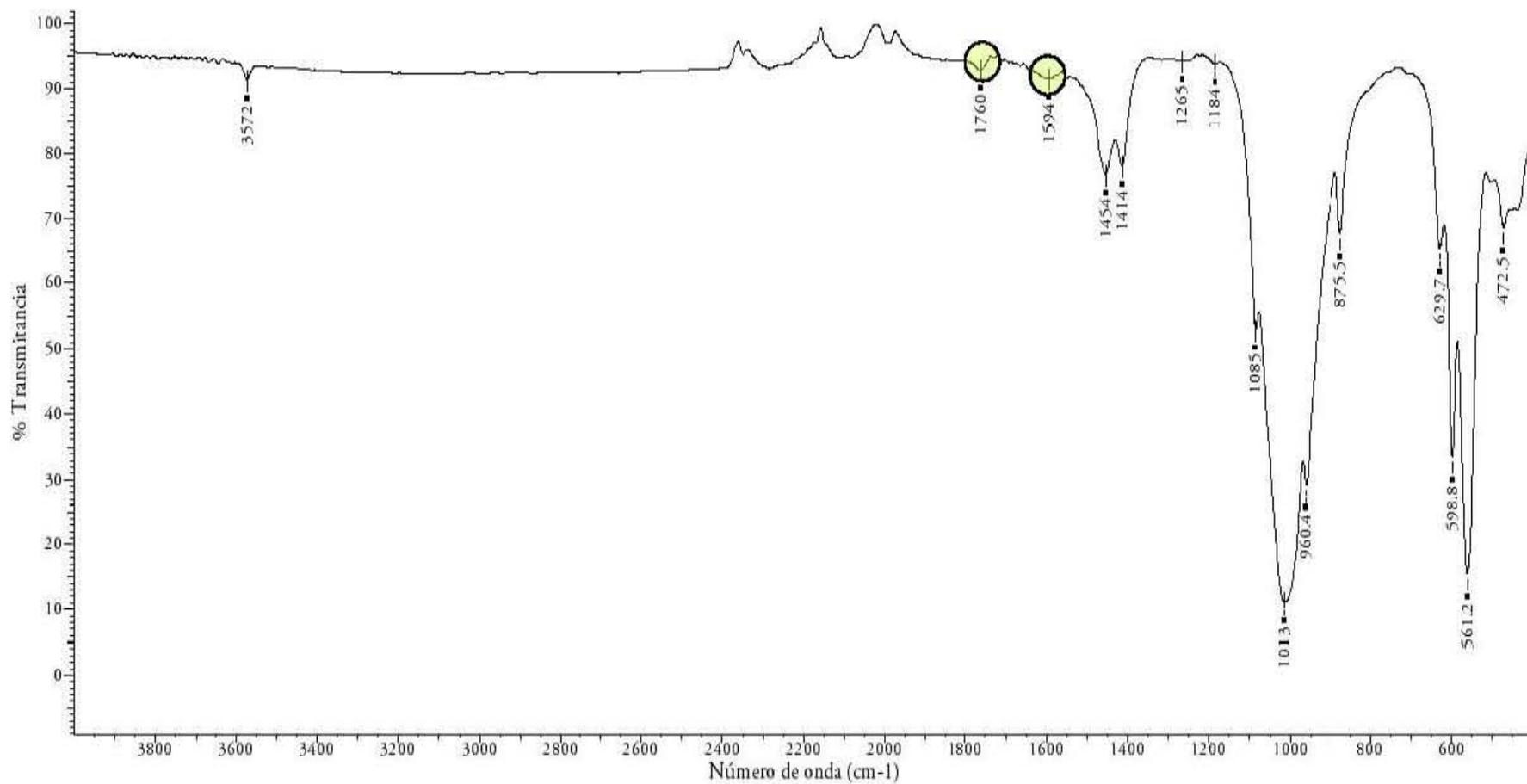


Figura A1.2. Espectro de Infrarrojo RIA-HA30-C

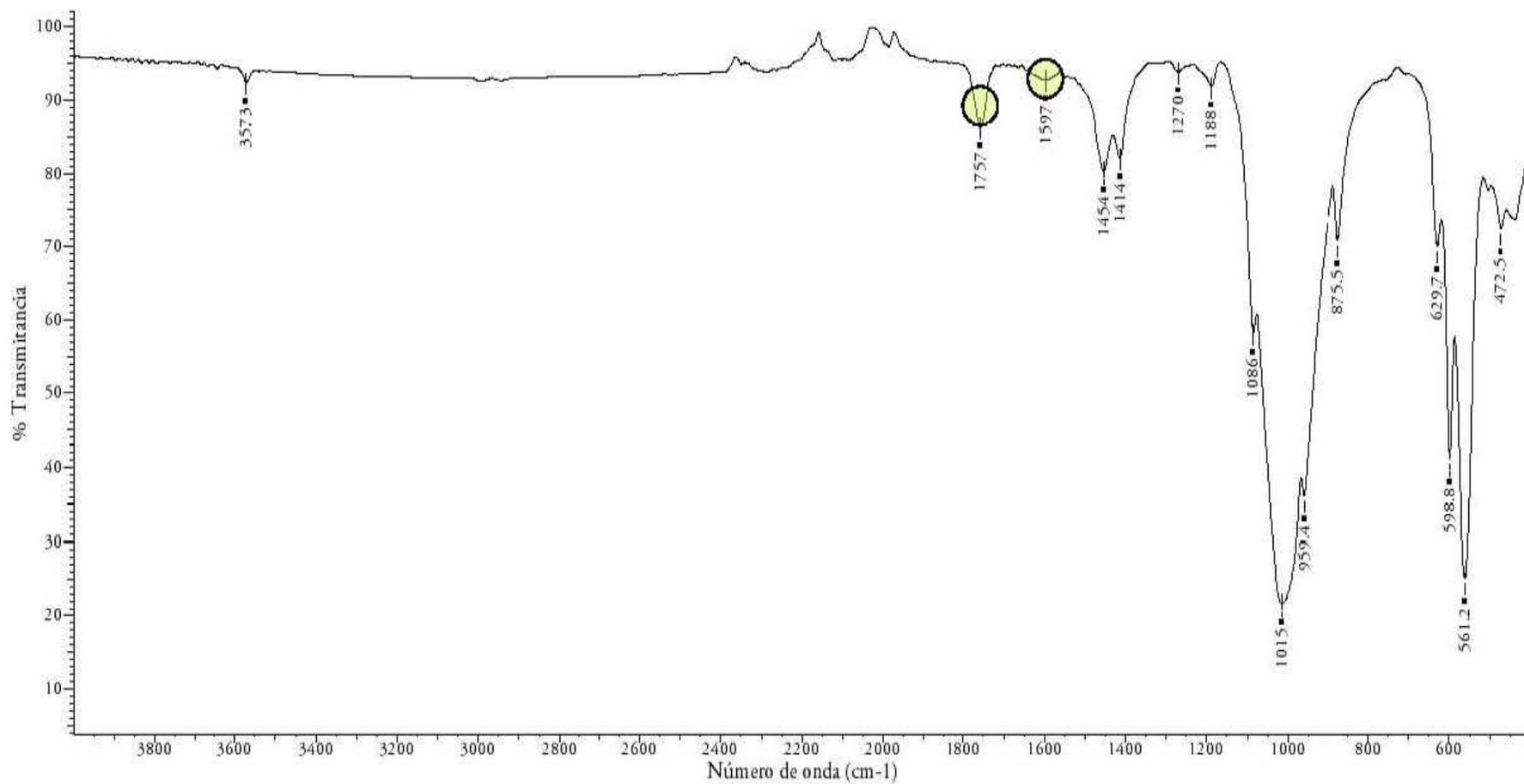


Figura A1.3. Espectro de Infrarrojo RLA-HA50-C

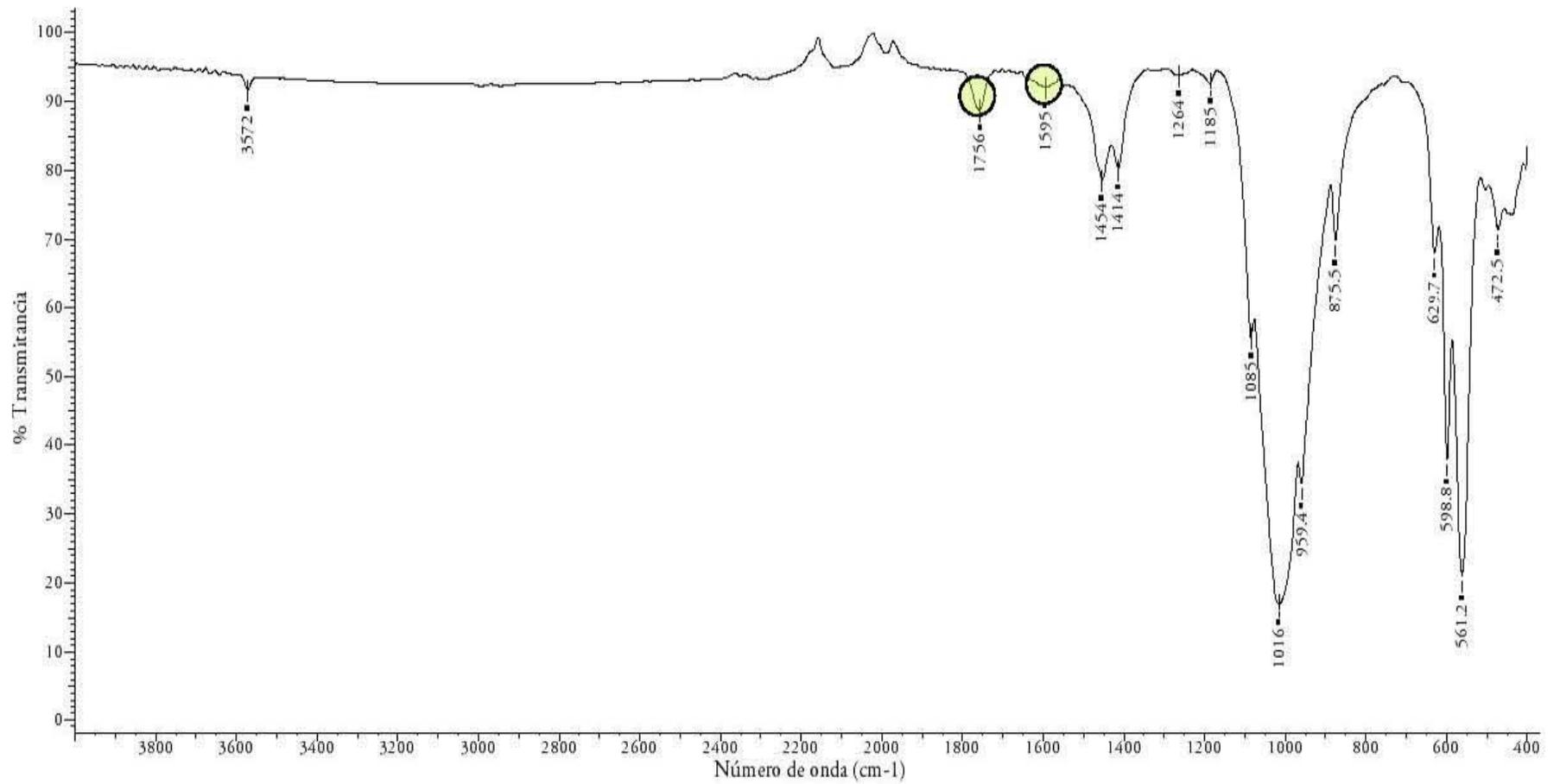


Figura A1.4. Espectro de Infrarrojo RLA-11A70-C

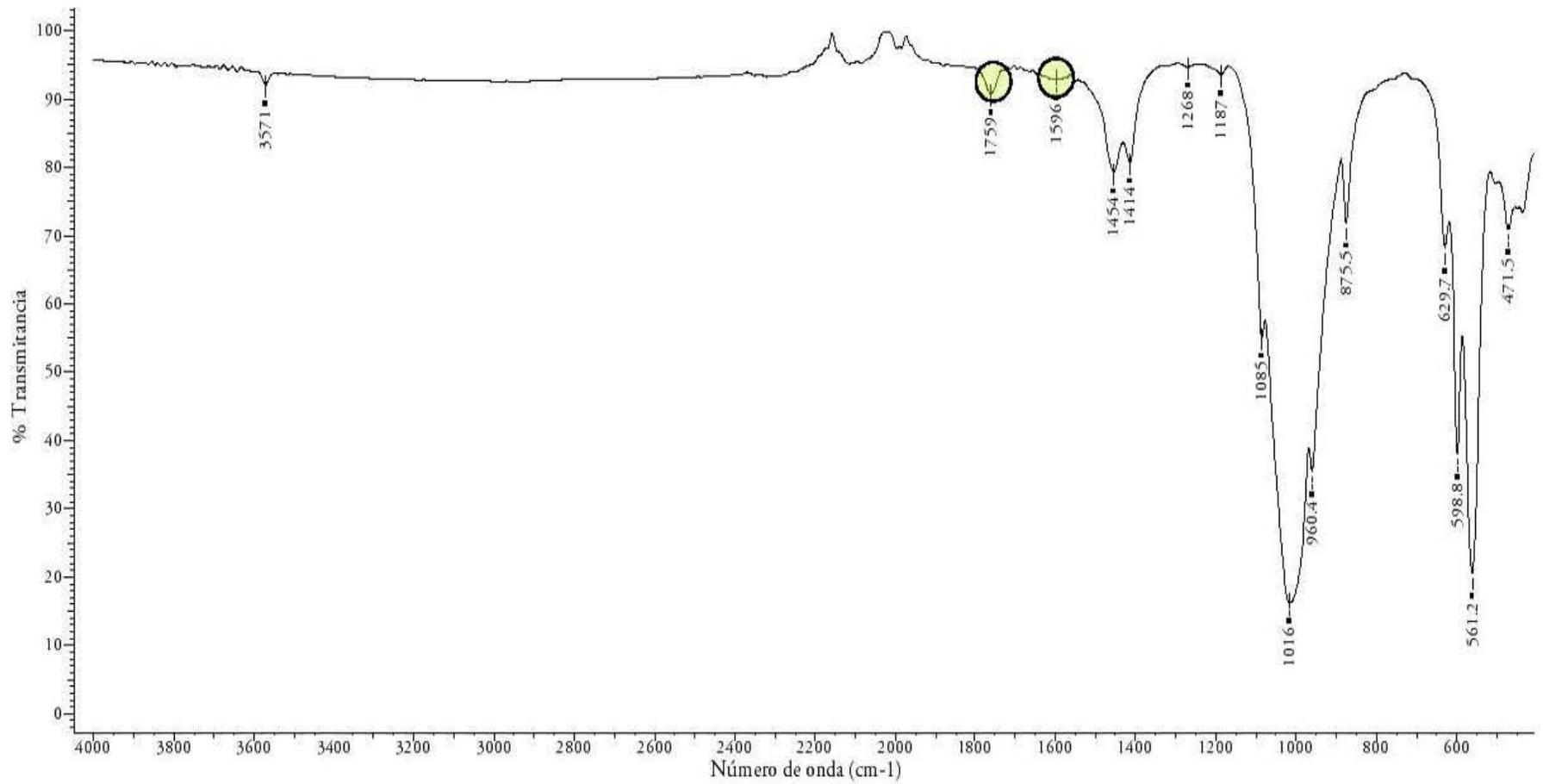


Figura A1.5. Espectro de Infrarrojo RLA-HA100-C

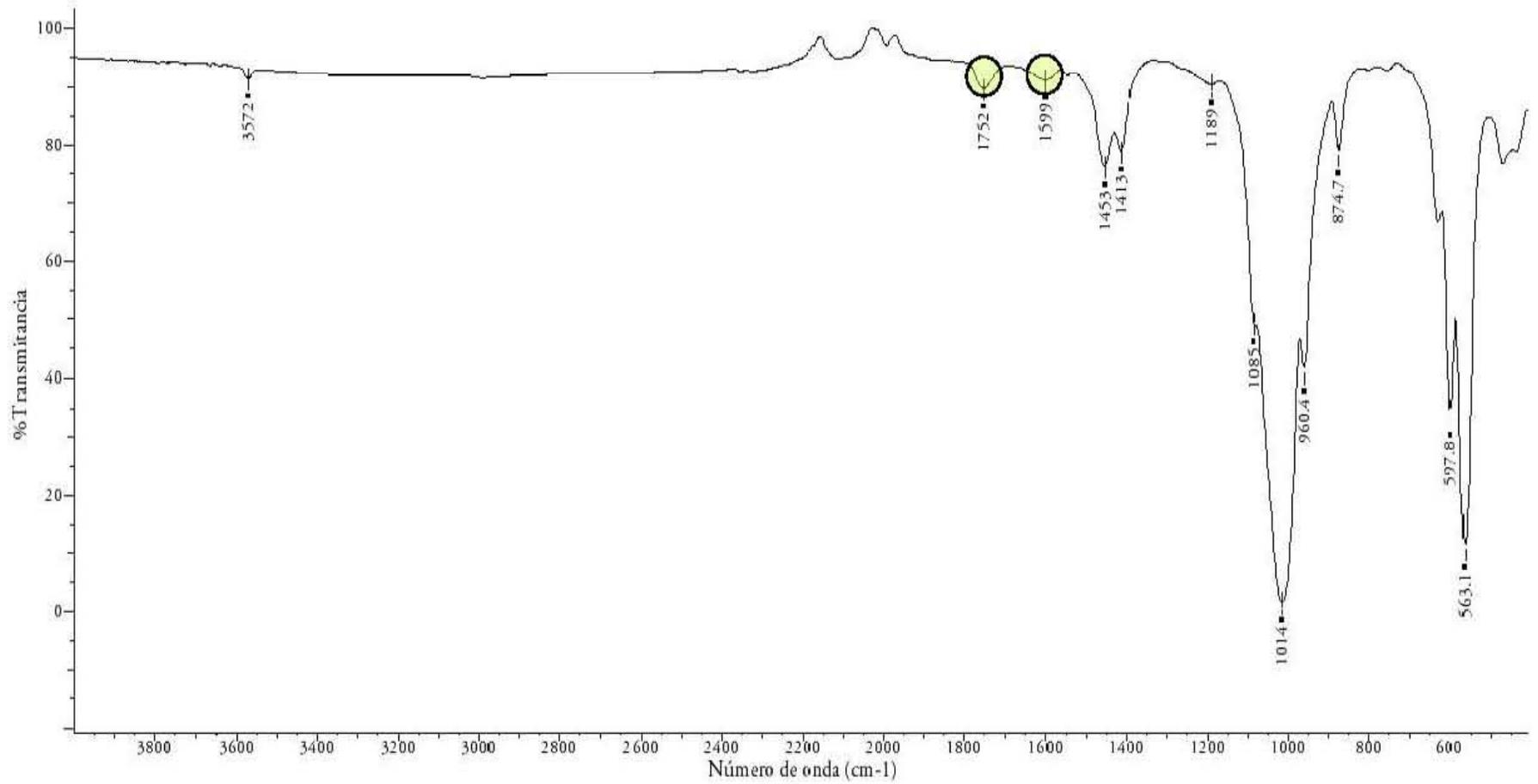


Figura A1.6. Espectro de Infrarrojo RLA-11A10

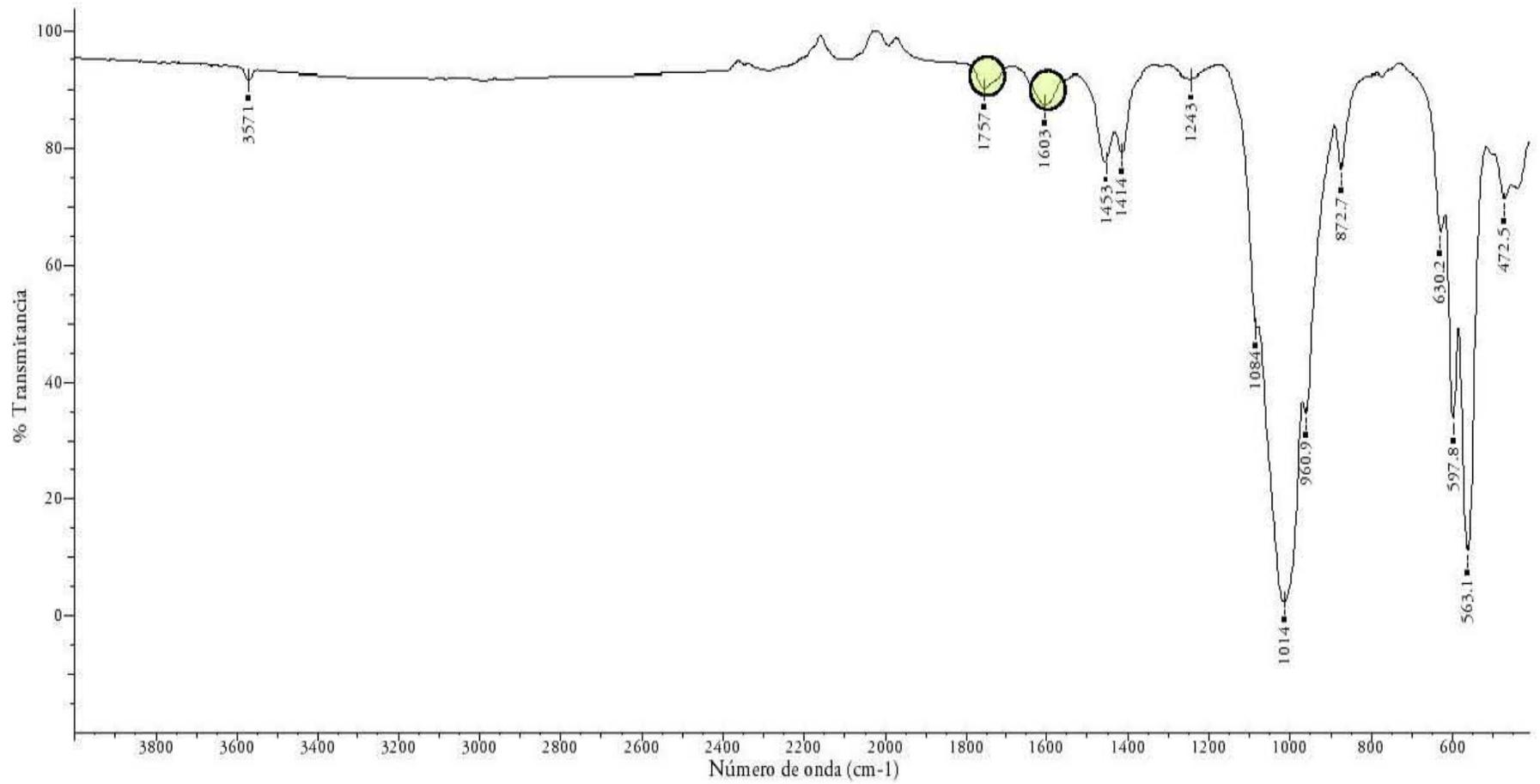


Figura A1.7. Espectro de Infrarrojo RLA-HA100

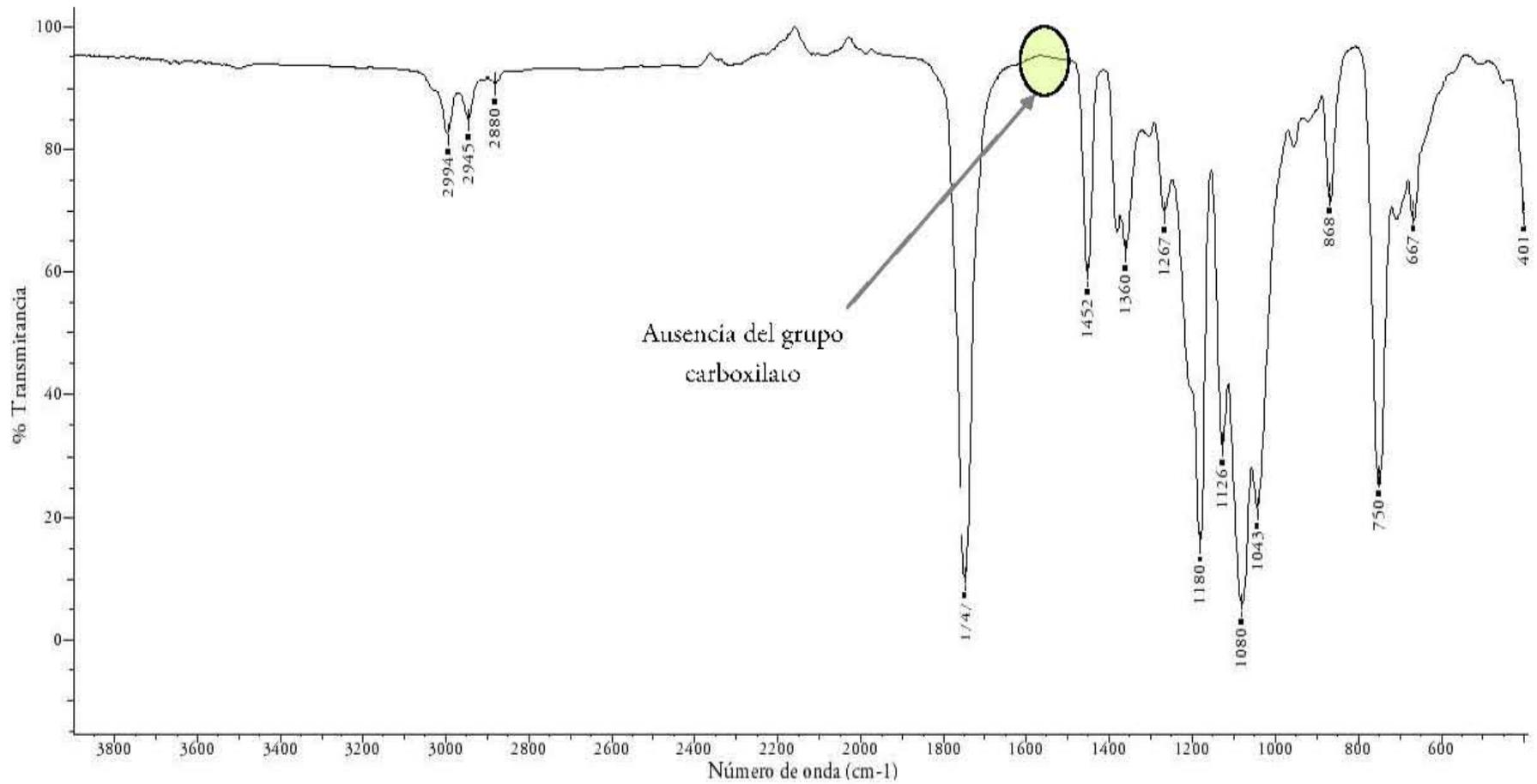


Figura A1.8. Espectro infrarrojo de la mezcla física PLLA con HA

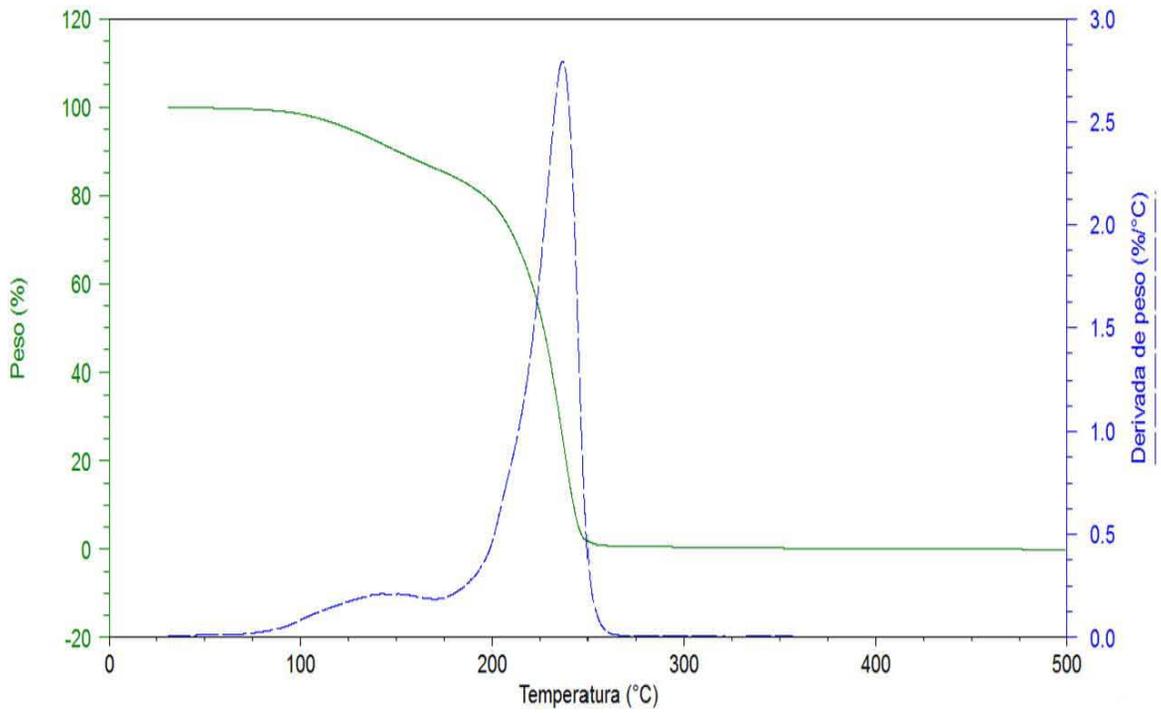


Figura A1.9. Termograma de PLLA sintetizado

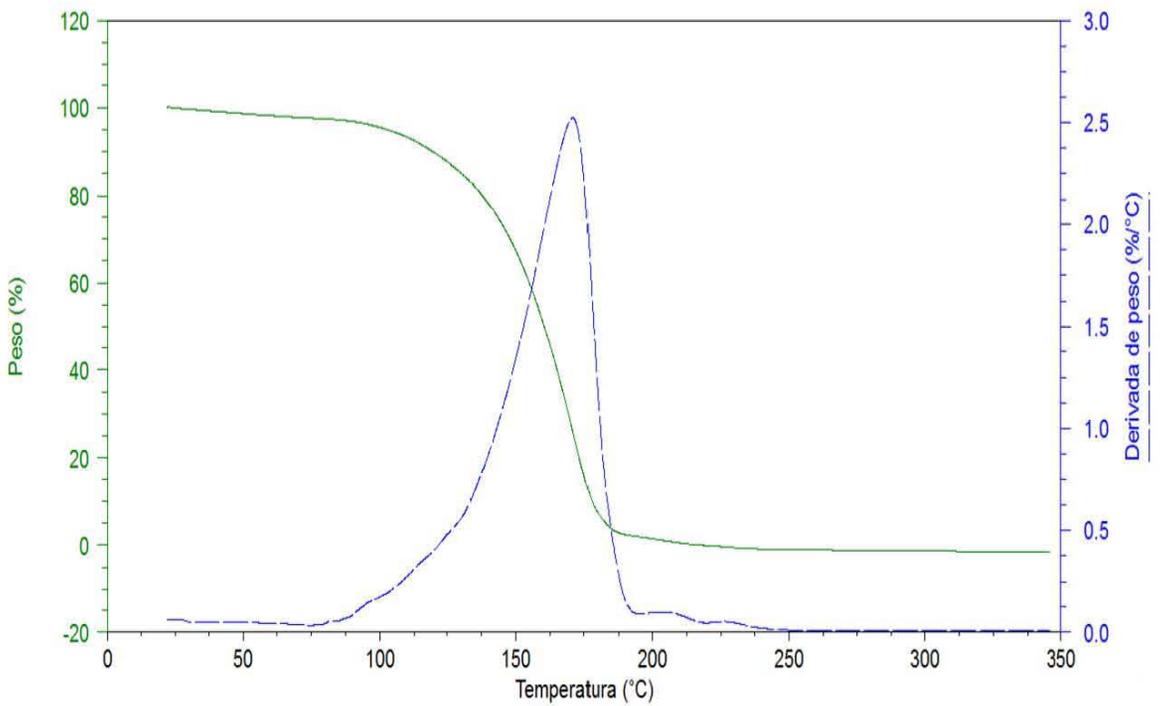


Figura A1.10. Termograma de L-lactida

ANEXO 2.

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

La espectroscopía de infrarrojo es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro de infrarrojo es comúnmente obtenido por el paso de una radiación infrarroja a través de una muestra, la cual absorbe parte de la radiación incidente solo a frecuencias correspondientes a los modos de vibración. La energía a la cual aparece un pico en un espectro de absorción corresponde a la frecuencia de vibración de una parte de la molécula [103].

Las interacciones de la radiación infrarroja con la muestra deben entenderse como cambios en el momento dipolar de la molécula asociado con vibraciones y rotaciones. Las vibraciones fundamentales son de tensión y flexión (en el plano y fuera del plano). En la primera varían las distancias de enlace entre dos átomos y en la segunda varían sus ángulos de enlace, permaneciendo prácticamente constantes las longitudes de enlace. Según la simetría se diferencian entre vibraciones simétricas (s): se producen con retención de la simetría molecular, antisimétricas (as): se producen con pérdida de uno o más elementos de simetría y degeneradas (e): vibraciones varias, que debido al mismo contenido energético, absorben a la misma frecuencia y conducen por ello a una única banda de absorción. En la interpretación de espectros, son especialmente útiles aquellas vibraciones que se limitan a enlaces aislados o grupos funcionales de una molécula, estas son conocidas como vibraciones localizadas. Para la caracterización de estas vibraciones se emplean los siguientes símbolos: ν : vibraciones de tensión, δ : vibraciones de deformación, γ : vibraciones de deformación fuera del plano y τ : vibraciones de torsión (variación del ángulo de torsión). En la figura 2A.1 se pueden observar los diferentes tipos de vibraciones [104].

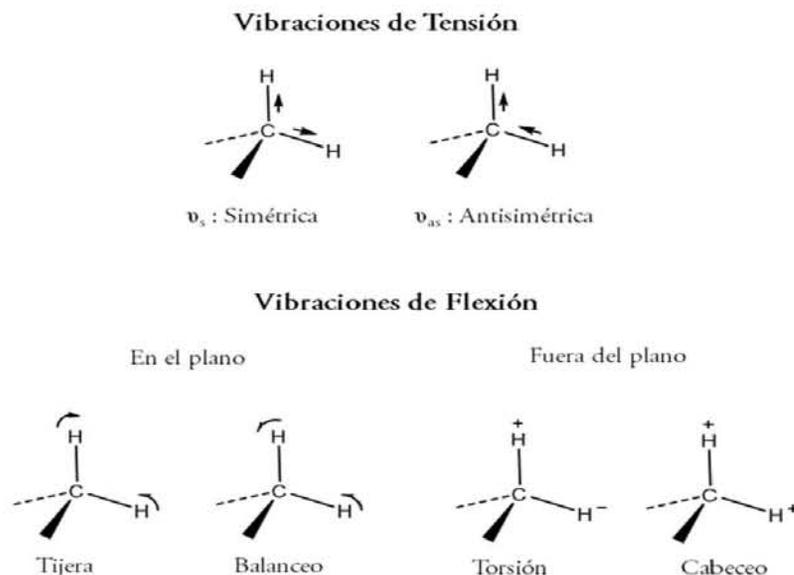


Figura A2.1. Vibraciones fundamentales de tensión y flexión [103]

Cuando la radiación IR incide sobre una molécula, produce cambios en las vibraciones moleculares. En efecto, la energía que se requiere para que las moléculas pasen de su estado fundamental de vibración al primer estado de excitación de vibración, es del orden de 1 a 10kcal/mol. Esta es la región propia de la radiación electromagnética en la zona del IR, es decir, la región comprendida entre 400 y 4000 cm^{-1} .

En espectro de IR se compone de dos regiones bandas: por encima de 1500 cm^{-1} se encuentran las bandas de absorción asignadas a grupos funcionales y por debajo de 1500 cm^{-1} se tiene la región de huella dactilar empleada para caracterizar la molécula.

Los espectrofotómetros trazan una gráfica (espectro IR) del tanto por ciento de transmisión (transmitancia) de la radiación IR absorbida por la muestra en función de la longitud de onda y/o de la frecuencia de la radiación. La intensidad de las bandas de absorción es función de la magnitud del cambio del momento dipolar, por lo tanto, será elevada (absorción fuerte) en los grupos polares y de pequeña magnitud (absorción débil) en las vibraciones de los grupos poco polares.

Los espectrofotómetros actuales, de doble haz, constan de tres partes fundamentales: 1) fuente de radiación, 2) monocromador y 3) detector-registrador [105]. La radiación IR se produce por calentamiento eléctrico de una fuente ya sea filamento de Nernst o Globar. Esta radiación que surge de la fuente se divide en dos haces mediante espejos, haz de referencia y haz de la muestra, los cuales pasan por las celdas de referencia y de la muestra del compuesto, respectivamente. Tras atravesar la referencia y la muestra, los haces de radiación inciden sobre el monocromador, el cual los descompone según sus

longitudes de onda. El detector (termopar) se encarga de medir las longitudes de onda procedentes y las convierte en una corriente eléctrica alterna. El registrador traza una gráfica de las intensidades de la corriente de la muestra en relación a la de referencia como función del número de ondas o longitud de onda, proporcionando el espectro de IR.

Este espectro se puede obtener mediante la técnica de espectroscopia de infrarrojo y se mide de diferentes maneras, tales como: transmisión, reflexión especular, reflexión difusa y reflexión total atenuada [106].

En la técnica de reflexión total atenuada (ATR por sus siglas en inglés, Attenuated Total Reflectance), mide los cambios que ocurren en un haz de infrarrojo reflejado totalmente al entrar en contacto con la muestra. Esta técnica se basa en el hecho de que cuando la radiación electromagnética que se propaga a través de un medio ópticamente denso llega a una interfase con un medio enrarecido (de menor índice de refracción), a un ángulo de incidencia mayor que el ángulo crítico, la radiación no escapa del medio denso sino que es totalmente reflejada internamente. Sin embargo, debido a la naturaleza ondulatoria de la radiación electromagnética, la reflexión no ocurre directamente en la interfase de los dos medios. La radiación realmente sale del medio más denso y se extiende una distancia corta del otro lado de la interfase en el medio enrarecido antes de retornar. La extensión con la cual la radiación penetra el medio enrarecido depende de la longitud de onda de la radiación, los índices de refracción de los dos medios y el ángulo de incidencia a la interfase.

En esta técnica la muestra se presiona contra un prisma o placa de material óptico denso que trasmite la radiación IR, tal como se muestra en la figura A2.1. La penetración controlada de la onda evanescente de la muestra hace que la radiación IR pueda ser selectivamente absorbida en la superficie de la muestra en contacto con el prisma o placa. El espectro de la radiación reflejada internamente es similar al espectro IR de absorción convencional de la muestra. La técnica de ATR es de mucha utilidad para el registro de espectros de IR de muestras difíciles de tratar mediante otros métodos de esta espectroscopia. La calidad del espectro obtenido puede ser influida por varios factores externos, tales como el efecto de la presión en el portador de la muestra, la textura de la superficie de la muestra y el índice de refracción de esta [105].

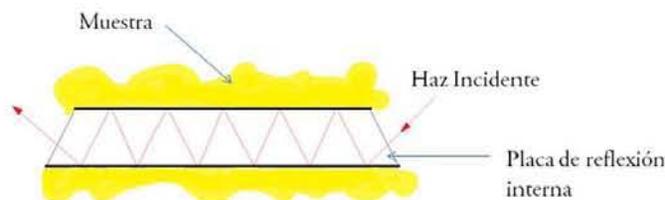


Figura A2.2. Método de reflexión múltiple [106]

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las bases teóricas de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear fueron formuladas por W. Pauli en 1924, quien sugirió que ciertos núcleos atómicos tienen las propiedades de espín y momento magnético y que, como consecuencia, al exponerlos a un campo magnético se produciría una división de sus niveles de energía. En 1946, Felix Bloch, en Stanford, y Edward Purcell, en Harvard, con trabajos independientes, demostraron que los núcleos absorben radiación electromagnética en un campo magnético intenso como resultado del desdoblamiento de los niveles de energía inducidos por el campo magnético. En los siguientes cinco años después de la investigación, algunos químicos se dieron cuenta de que el entorno molecular influía en la absorción de la radiación de radiofrecuencia (RF) por parte de un núcleo en un campo magnético, y que este efecto se podía correlacionar con la estructura molecular [107].

La resonancia magnética nuclear se puede observar únicamente en compuestos que contengan elementos con núcleos magnéticos (aquellos cuyo espín nuclear sea distinto de cero). La sensibilidad depende de varios parámetros, entre ellos la abundancia del isótopo y la magnitud de su momento magnético nuclear. Por ejemplo, el ^1H , con una abundancia natural del 99.98% y un momento magnético grande, es más fácil de observar que el ^{13}C , que tiene un momento magnético menor y una abundancia natural de 1.1% solamente. Actualmente con la técnica de RMN multinuclear es fácil de observar espectros de aproximadamente 20 núcleos diferentes, incluidos muchos elementos que son importantes en química inorgánica, como ^1H , ^7Li , ^{11}B , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{23}Na , ^{27}Al , ^{29}Si , ^{31}P , ^{195}Pt y ^{199}Hg . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se

muestra en la figura A2.3, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β [108].

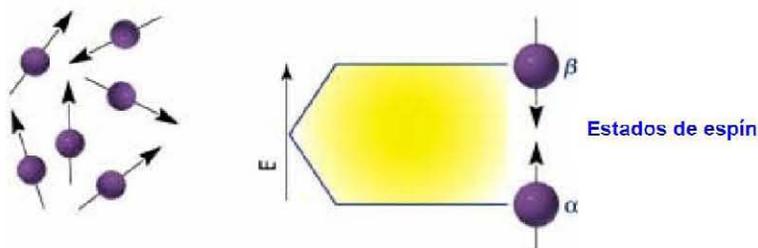


Figura A2.3. Orientación de los núcleos en presencia de un campo magnético [108].

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . Al regresar los núcleos a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, denominado espectro de RMN.

Un espectro de RMN convencional de un líquido o una disolución está formado por señales muy estrechas y bien resueltas que contienen información molecular. Sin embargo, un experimento similar con un sólido produce señales muy anchas, que puede llegar a ser de varios kHz o incluso MHz, lo que impide la obtención de información de manera fácil. Este ensanchamiento implica, además, una pérdida de sensibilidad, especialmente cuando se estudian núcleos poco abundantes como, por ejemplo el ^{13}C . La diferencia en la forma de las líneas de sólidos y líquidos proviene de la diferente movilidad de las moléculas. En estado líquido o en disolución, las moléculas se reorientan muy rápidamente promediando las interacciones anisótropas, que están en muestras sólidas. De este modo, la obtención de espectros de alta resolución de sólidos exige la aplicación de técnicas especiales.

La idea de Andrew (1958) y Lowe (1959) para suplir la insuficiencia de movimiento molecular en sólidos fue la rotación macroscópica de la muestra. Estos autores mostraron que si una muestra sólida se gira suficientemente rápido alrededor de un eje que forma un ángulo de 54.7° con la dirección principal del campo magnético externo, denominado giro al ángulo mágico (MAS, del inglés magic angle

spinning), el ensanchamiento dipolar se promedia y se pueden obtener espectros de alta resolución [109].

Análisis termogravimétrico (TGA)

La termogravimetría (TGA) es una técnica de análisis térmico en la que se determina la pérdida o ganancia de masa de una muestra en función de la temperatura. Se pueden definir, básicamente tres tipos de análisis termogravimétricos:

- 1) Análisis termogravimétrico isotérmico, en el que se mantiene la temperatura constante mientras se registran los cambios de masa.
- 2) Análisis termogravimétrico cuasi térmico, en el que la muestra a analizar se calienta mientras la masa es constante y se estabiliza la temperatura mientras se van produciendo cambios de masa
- 3) Análisis termogravimétrico dinámico, en el que la muestra se calienta en una atmósfera controlada con una rampa de temperatura previamente fijada.

En la figura A2.4 se muestra un termograma, también llamado curva termogravimétrica o curva de descomposición térmica. Como se puede observar, en este tipo de gráfica se representa la variación de la masa (generalmente en porcentaje de pérdida de masa) en función de la temperatura o el tiempo. Para una muestra dada, la variación de la masa en función de la temperatura suministra información sobre la estabilidad térmica y composición de los intermedios que puedan formarse durante el análisis y de la composición del residuo que queda al final del mismo [110].

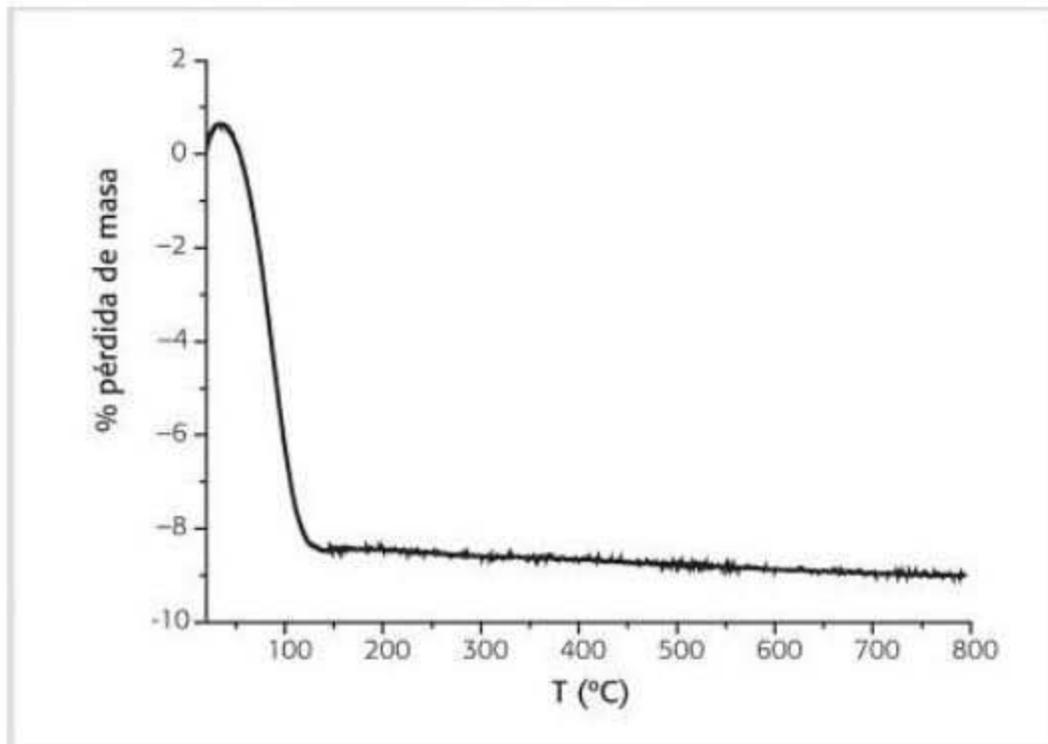


Figura A2.4. Ternograma o curva termogravimétrica [110]

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM, en inglés Scanning Electron Microscope) es usada para la observación de superficies. Cuando una muestra es irradiada con un haz de electrones, electrones secundarios son emitidos de la superficie de la misma. La topografía de la superficie puede ser observada por un escaneo bidimensional del haz de electrones y la adquisición de la imagen se obtiene a partir de los electrones secundarios.

El SEM requiere un sistema óptico de electrones para producir un haz de electrones, una zona para colocar la muestra, un detector de electrones secundarios, una unidad de visualización de la imagen, y un sistema de operación para controlar el equipo, figura A2.5. El sistema óptico de electrones consiste en un cañón de electrones, un condensador, bobinas, una lente objetivo, detector de electrones secundarios, entre otros componente [111].

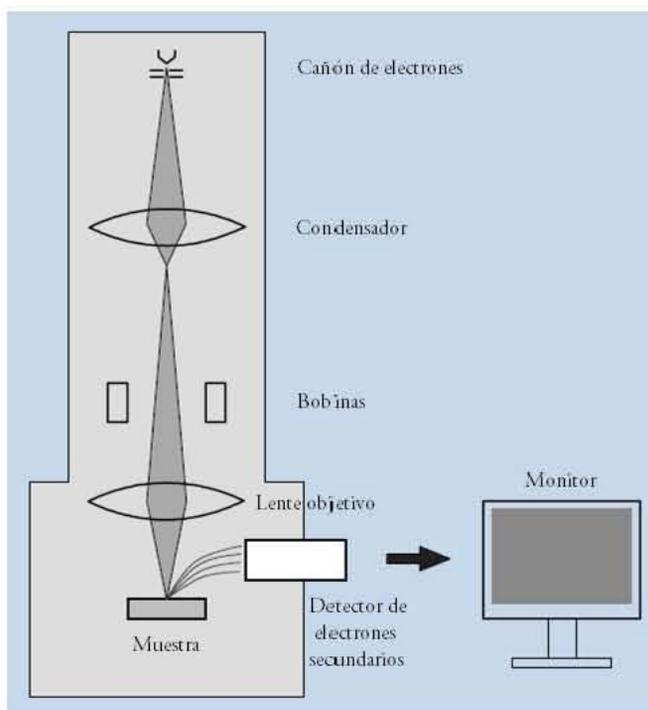


Figura A2.5. Esquema general de un microscopio electrónico de barrido [111]

Conductividad eléctrica (CE)

La conductancia G de una solución está definida como la suma de las contribuciones de cada tipo de ion presente. La resistencia entre los electrodos (K) es proporcional a la relación de la distancia entre los electrodos (l) y el área superficial de estos (s). Esta relación es conocida como constante de celda:

$$K = \frac{l}{s} \quad [cm^{-1}]$$

Generalmente, la conductividad (k) es calculada con la conductancia (G), la constante de la celda de conductividad y una constante de compensación para la resistencia del cable. La conductividad es calculada con la siguiente ecuación:

$$k = G * K \quad [S/cm]$$

La medición eléctrica se efectúa mediante un puente de Wheastone para medir resistencias, ver figura A2.6. Las R_1 y R_2 son fijas y su valor se encuentra en el rango que se desea medir. La resistencia R_x es

la que proporciona la solución. Esta última resistencia se varía en forma continua hasta alcanzarse el equilibrio en el puente, evitando así pasos de corriente al medidor.

El Conductímetro consta de un sensor, celda de conductividad, y un sistema electrónico desde donde se envía una señal eléctrica al sensor durante cada medición. Los conductímetros miden la resistencia de una solución al paso de una corriente eléctrica y se convierten estos valores en unidades inversas de la conductividad eléctrica [112].

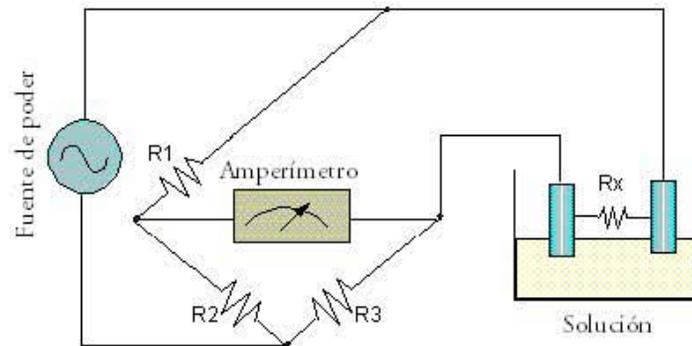


Figura A2.6. Puente Wheastone para medir la conductividad

Propiedades Mccánicas

Las propiedades mecánicas describen como se comporta un material cuando se le aplican fuerzas externas. Las fuerzas externas que se aplican sobre un material son de tensión, compresión, cortante y torsión (ver figura A2.7). Cualquier fuerza que se aplique sobre un material causa su deformación [113].

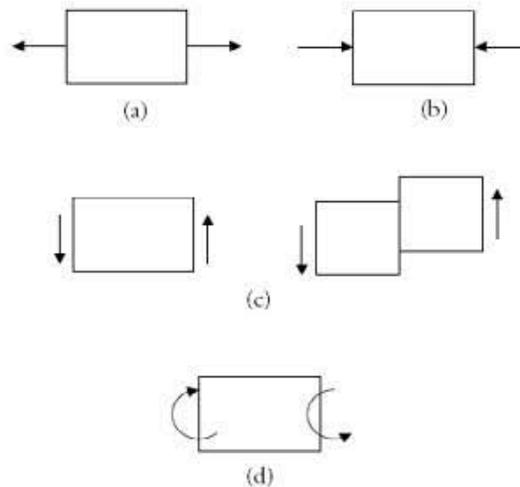


Figura A2.7. Fuerzas externas: (a) tensión, (b) compresión, (c) cortante y (d) torsión [113].

La fuerza de tensión consiste en estirar el material a lo largo de su línea de acción, es decir, el material se alarga en el sentido de aplicación de la fuerza, y se acorta en la dirección transversal a la fuerza aplicada. El alargamiento del material es el cambio de la longitud a lo largo de la línea de aplicación de la carga. Se define matemáticamente con la siguiente ecuación, donde L: Longitud final y Lo: Longitud inicial de la probeta.

$$(\Delta L) = L - L_o$$

Para estudiar el comportamiento de los materiales ante fuerzas externas, se emplea el concepto de esfuerzo. El término esfuerzo indica una carga o una fuerza por unidad de área. Existen dos tipos de esfuerzo para fuerzas de tensión, tales como: esfuerzo ingenieril (σ) y esfuerzo real (σ_t).

Esfuerzo ingenieril o nominal (σ): Es la relación entre la fuerza aplicada y el área transversal inicial del material, esta área es perpendicular a la línea de acción de la fuerza.

$$\sigma = \frac{\text{Fuerza aplicada}}{\text{Área inicial del material}} = \frac{F}{A_o}$$

Esfuerzo real (σ_t): Se define como la relación entre la fuerza aplicada y el área transversal real o instantánea del material mientras actúa la carga o fuerza.

$$\sigma_t = \frac{\text{Fuerza aplicada}}{\text{Área real del material}} = \frac{F}{A}$$

La deformación unitaria se presenta de dos maneras: deformación ingenieril y deformación real.

Deformación unitaria ingenieril o nominal (ε): Es la relación entre deformación y longitud inicial del material.

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_o}$$

Deformación unitaria real (ε_t): Se determina en cualquier valor de la carga empleando la distancia entre la longitud inicial y la longitud instantánea.

$$\varepsilon = \int \frac{dL}{L} = \ln\left(\frac{L}{L_0}\right) = \ln\left(\frac{A_0}{A}\right)$$

Después de obtener el esfuerzo y la deformación con distintas magnitudes de carga, se traza un diagrama esfuerzo en función de deformación unitaria. En la figura A2.8 se comparan las curvas de esfuerzo-deformación reales e ingenieriles. El esfuerzo real continua aumentando después de la deformación del cuello porque aunque la carga necesaria disminuye, el área disminuye aún más [100].

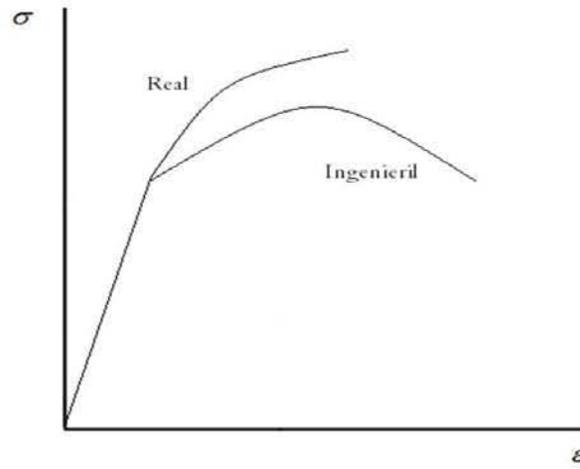


Figura A2.8. Comparación curva esfuerzo-deformación real e ingenieril [100]

Para fines técnicos son adecuados el esfuerzo nominal y la deformación unitaria nominal. Cuando se rebasa la resistencia de cedencia, el material se deforma. El componente falló porque ya no tiene la forma que se pretendía al principio. Además se desarrolla una diferencia apreciable entre las dos curvas sólo cuando comienza la formación del cuello. Cuando esto sucede, el componente ya está deformado y no sirve para el uso.

De la curva esfuerzo-deformación unitaria se obtienen varias propiedades mecánicas en tensión para el material, tales como módulo de elasticidad (E), resistencia a la tensión (σ_{TS}), ductilidad ($\% \varepsilon$), módulo de resiliencia (E_r), resistencia a la fluencia (σ_y), relación de Poisson (μ), tenacidad (área bajo la curva), ver figura 2.36. En los polímeros se especifican las tres primeras propiedades, y se explican a continuación:

1. Módulo de elasticidad (E): El módulo elástico es una medida de la rigidez del material. Es la pendiente de la línea recta que se forma en la zona elástica de la curva, donde se cumple:

$$\sigma = E * \varepsilon .$$

2. Resistencia a la tensión σ_{TS} : Es el valor máximo del esfuerzo ingenieril que se puede aplicar sobre el material. Cuando el esfuerzo aplicado iguala a la resistencia a la tensión inicia la estricción y luego la fractura del material.
3. Ductilidad: Es una medida de la cantidad de deformación plástica que puede darse en un material antes que éste se rompa. Puede medirse en dos maneras:

➤ Porcentaje de elongación: $\% \varepsilon = \frac{\Delta L}{L_o} * 100$

➤ Porcentaje de reducción de área: $\% \varepsilon = \frac{A_o - A_f}{A_o} * 100$

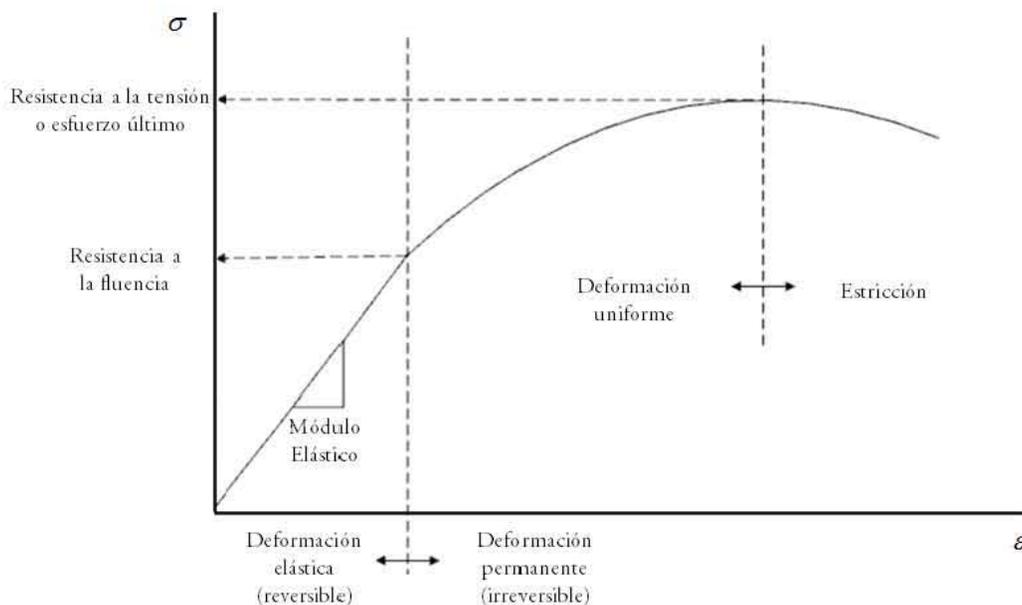


Figura A2.9. Curva esfuerzo-deformación para materiales ingenieriles.

Fractura de Polímeros

La resistencia a la rotura de los materiales poliméricos es relativamente menor que la de los metales y cerámicos. En la clasificación de los polímeros se tiene los termocostables y termoplásticos que presentan propiedades diferentes [101]:

- **Termoestables:** Son materiales duros, resistentes y frágiles. Presentan fractura frágil, formación de grietas donde se localizan los esfuerzos (estrías, fisuras y cortes). Durante la rotura se deshacen los enlaces covalentes de las estructuras entrecruzadas y reticuladas. Su procesamiento es complicado por no presentar temperatura de fusión [100]
- **Termoplásticos:** Materiales blandos y dúctiles, polímeros lineales o ramificados con cadenas flexibles. Presentan fractura dúctil y frágil, y muchos experimentan transición dúctil-frágil. La baja temperatura, alta velocidad de deformación, presencia de entallas agudas, incremento del espesor de las muestras y modificaciones de la estructura polimérica (química, molecular y/o microestructural) son factores que influyen en la fractura frágil-

Debido a los inconvenientes que algunas veces presenta los materiales poliméricos se han propuesto el desarrollo de materiales compuestos para combinar las propiedades de dichos materiales y abatir problemas de baja resistencia.

Materiales compuestos

Los materiales compuestos se han creado para mejorar la combinación de propiedades mecánicas, como rigidez, tenacidad y resistencia a la tracción a temperatura ambiente y temperatura elevada. La mayor parte de los materiales compuestos están formados por dos fases: (1) Matriz y (2) fase dispersa. Las propiedades de los compuestos están en función de las propiedades de las fases constituyentes, de sus proporciones relativas y de la geometría de las fases dispersas (forma, tamaño, distribución y orientación de las partículas).

Generalmente los compuestos son reforzados con partículas y fibras. Las partículas pueden tener gran variedad de geometrías pero suelen presentar la misma dimensión en todas las direcciones. El reforzamiento es tanto más efectivo cuanto más pequeña sean las partículas y mejor distribuidas estén en la matriz. Mientras la matriz soporta la mayor parte de la carga aplicada, las pequeñas partículas dispersas dificultan o impiden el deslizamiento de dislocaciones. De este modo se restringe la deformación plástica de tal manera que aumenta el límite elástico, la resistencia a la tracción y la dureza [101].

Ensayo de tensión

Este ensayo mide la resistencia de un material a una fuerza estática o aplicada lentamente. Las velocidades de deformación ($\dot{\epsilon}$) de un ensayo de tensión suelen ser bajas entre 10^{-4} a 10^{-2} s⁻¹. En la figura A2.10 se presenta un arreglo del ensayo, una probeta estándar se coloca en la máquina de prueba y se aplica una fuerza F , llamada carga. Los datos son colectados mediante un sistema de cómputo, donde previamente se han ingresado los datos de espesor y longitud equivalente de la probeta, y así mediante este sistema se determina el esfuerzo y junto con los datos de deformación construye la curva esfuerzo-deformación para posteriores análisis [100].

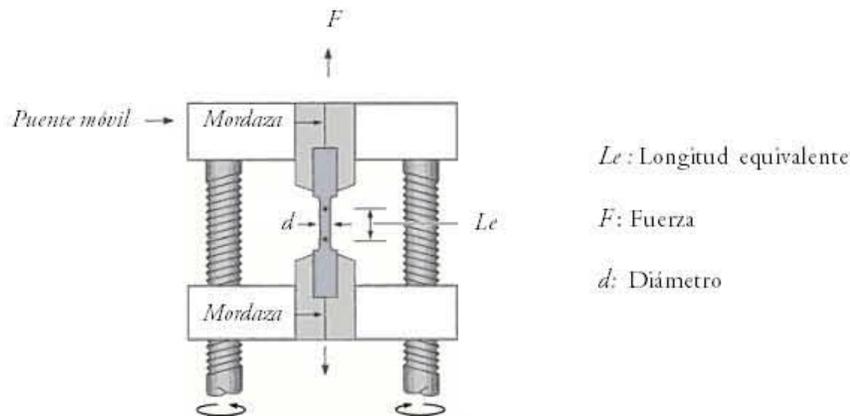


Figura A2.10. Ensayo de tensión mediante puente o cabeza móvil [100].

Propiedades Biológicas

Las células madres mesenquimales (CMM) son una alternativa viable en la regeneración de numerosos, ver figura A2.11 tejidos. Estas son células pluripotenciales, es decir, que tienen el potencial de diferenciarse hacia distintos linajes celulares, con una tasa de proliferación mayor a la de muchas células diferenciadas como los osteoblastos y condrocitos [114]. La diferenciación hacia un linaje deseado se puede lograr a través de medios condicionados con factores de crecimiento u otras moléculas específicas para tal fin. En el caso de la diferenciación osteoblástica, medio suplementado con β -glicerofosfato, dexametasona y ácido ascórbico, es suficiente para activar cambios morfológicos y funcionales; las CMM, que usualmente tienen una apariencia fibroblástica, asumen una forma cuboidal y comienzan a crear colonias que finalmente formarán nódulos mineralizados con hidroxapatita.

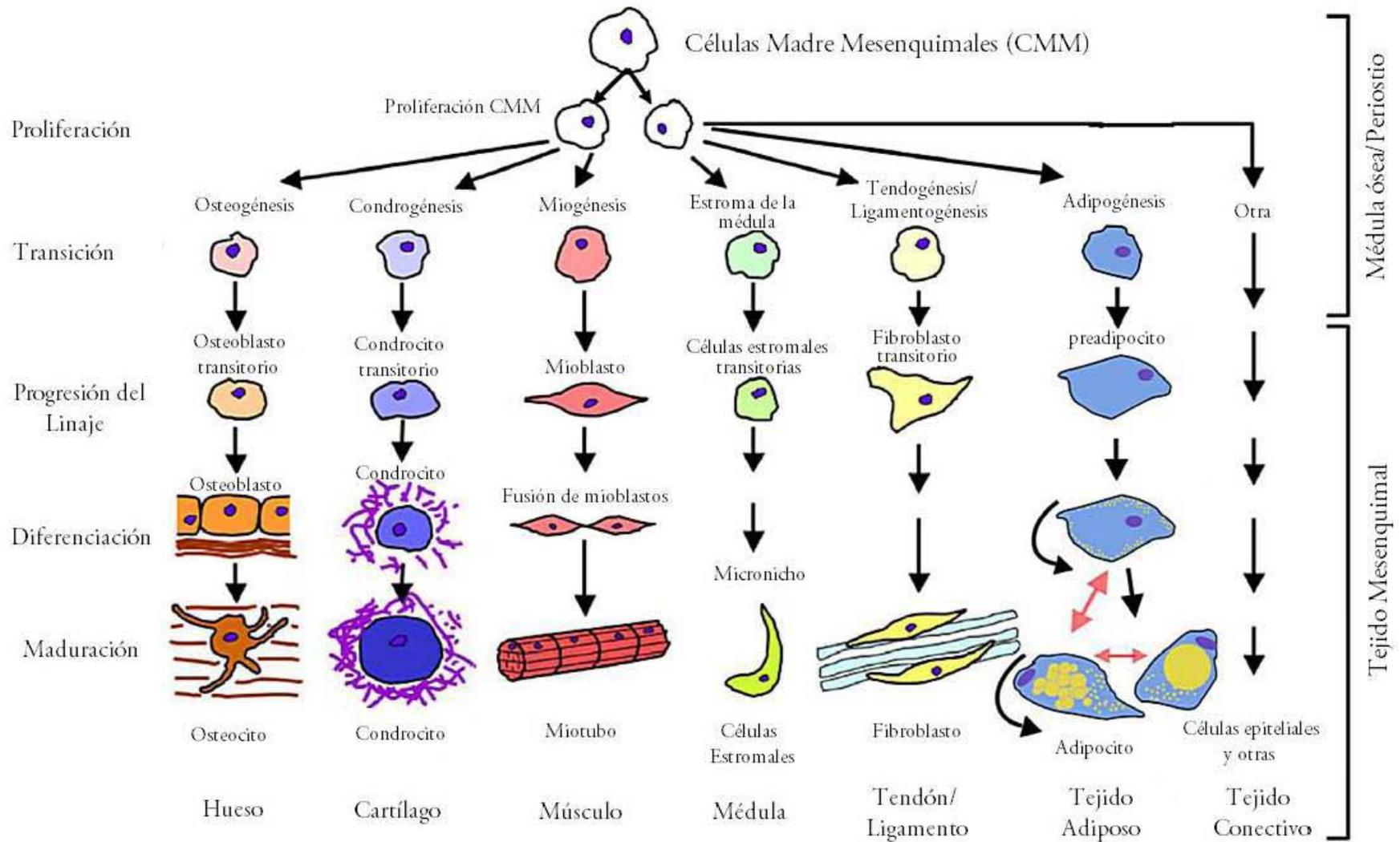


Figura A2.11. Diferenciación de células madres mesenquimales [114].

La diferenciación osteoblástica está conformada en tres períodos definidos. El primero es de proliferación, en el cual la principal función celular es la expansión mitótica y la producción de cantidades importantes de colágeno tipo I. En la segunda etapa, la proliferación y producción de colágeno I se ve disminuida por la sobreexpresión de la enzima fosfatasa alcalina y de ciertas proteínas asociadas a la matriz extra celular (MEC) ósea, como la osteopontina y osteocalcina. En la tercera etapa, la producción de fosfatasa alcalina disminuye drásticamente, presenta un pico en su curva de producción en el tiempo y se comienza a observar el depósito de cristales de calcio entre las fibras de colágeno. Durante este período de maduración, la proliferación celular disminuye aún más [115]. La matriz extracelular calcificada, que además incorpora numerosas moléculas bioactivas propias del tejido óseo, juega un papel crucial en la interacción del implante con el entorno a través del reclutamiento de células nuevas, y suministra las condiciones favorables para la formación de nuevo tejido óseo dentro del injerto. Actualmente, existen terapias regenerativas que se basan en el uso de CMMs, que han demostrado ser inductivas a la formación de nuevos tejidos [116]. No obstante, las consideraciones mecánicas y estructurales particulares de los huesos hacen necesario el uso de una matriz tridimensional que sirva de soporte al componente celular.

La respuesta de las células a sus interacciones de adhesión con otras células y la matriz extracelular ó andamio, incluyen cambios en la morfología celular, proliferación, migración-adhesión y la diferenciación, estas características se engloban en la propiedad conocida como mecanotransducción.

Mecanotransducción celular

La mecanotransducción se define como la conversión de un estímulo mecánico en una respuesta bioquímica y está mediada por la estructura del citoesqueleto, la matriz extracelular (ECM), los receptores integrales de membrana y las adhesiones focales.

Las adhesiones focales anclan al esqueleto celular de actina a la matriz extracelular. Las proteínas transmembranales de las adhesiones focales son las integrinas. Las integrinas se unen por sus dominios extracelulares a moléculas de la matriz extracelular y por sus dominios citoplasmáticos a los filamentos de actina.

La observación del interior de la célula en tres dimensiones revela interconexiones entre estructuras de proteínas filamentosas dentro del citoplasma de células. Estas estructuras forman un esqueleto celular, el citoesqueleto, que mantiene la organización de la célula, le permite moverse, posiciona sus orgánulos y

dirige el tránsito intracelular de vesículas y distintos materiales. Se han identificado tres tipos diferentes de filamentos como integrantes principales del citoesqueleto: los microtúbulos, los microfilamentos (filamentos de actina principalmente) y los filamentos intermedios.

Estructuras del citoesqueleto

El citoesqueleto consiste de tres tipos de fibras citosólicas de polímeros ordenados a partir de monómeros unidos por enlaces no covalentes: los microfilamentos con un diámetro de 7 a 9 nm, los filamentos intermedios de 10 nm de diámetro y los microtúbulos de 24 nm. Una característica del movimiento de todas las células es la polaridad, esto es, unas estructuras siempre están al frente de la célula (lamelipodio) y otras en la parte de atrás. La maquinaria que permite la migración celular está formada por el citoesqueleto de actina, que tienen un tamaño superior y variable a cualquier organelo celular. Por su capacidad de ensamblarse y desensamblarse puede cambiar fácilmente la forma de la célula.

Microfilamentos - Citoesqueleto de actina

La actina es la proteína intracelular más abundante en eucariotes. Puede llegar a representar hasta el 10% del peso total de proteína. Pesa alrededor de 43 kD y está conservada evolutivamente. Existe como un monómero globular llamado G-actina y como polímero filamentosos, F-actina. Cada molécula de actina tiene un ión de Mg^{+2} que forma complejo bien con ATP o con ADP, existiendo por lo tanto cuatro formas diferentes de actina. El plegamiento de la proteína permite la formación de dos lóbulos con una hendidura en la mitad que permite la unión del ATP y el Mg^{+2} , y un cambio de conformación.

La actina presenta principalmente dos arreglos dentro de la célula: uno en forma de ramillete y otro en red de filamentos entrecruzados. El primero se presenta principalmente hacia la periferia de la célula y forma unas proyecciones por el alineamiento de fibras paralelas y son la base de la formación de microvellocidades y filopodios. Las redes entrecruzadas pueden ser de dos tipos, las cercanas a la membrana que le sirven de soporte y es bidimensional, y las que ocupan todo el citosol que tienen un carácter tridimensional y que le dan características de gel. Las fibras se mantienen juntas por proteínas que permiten el entrecruzamiento y en la zona cortical por anclaje a proteínas de membrana.

Matriz extracelular ósea (ECM)

La matriz extracelular (ECM, en inglés extracellular matrix) ósea es mucho más abundante que el componente celular. Está constituida por dos componentes químicos principales: matriz orgánica y sales minerales. Las propiedades biomecánicas del hueso derivan de la composición y la estructura de la matriz ósea. Así, las fibras colágenas proporcionan flexibilidad y resistencia a la tracción, en tanto el componente mineral aporta dureza, rigidez y resistencia a la compresión.

La matriz orgánica del hueso está constituida por una red de fibras colágenas incluida en un material amorfo mucoproteico. El principal componente de la matriz orgánica es el colágeno tipo I, que representa alrededor del 95% del contenido total de colágeno y cerca del 90% del total de proteínas presentes en el hueso. El porcentaje restante corresponde a proteínas no colágenas.

La molécula de colágeno tipo I consiste en una triple hélice que contiene dos cadenas α_1 idénticas y una cadena α_2 . Estas cadenas se caracterizan por la recepción del triplete glicina X-Y, en donde X suele ser prolina e Y hidroxiprolina. Otros colágenos, como los tipos III y V, están presentes en el hueso en baja proporción y se cree que su papel es el de modular el diámetro de las fibras colágenas. Las características del tejido óseo depende, en gran medida, del grado de organización de las fibras colágenas. En el hueso fibroso, adoptan una disposición aleatoria, en tanto que en el hueso laminar presentan una disposición ordenada.

El componente inorgánico de la matriz constituye el 50-70% del hueso, en tanto que el agua representa sólo el 5-10%. La elevada presencia de sales minerales aporta dureza, rigidez y resistencia a la compresión. El componente mineral de la matriz ósea está constituido, en su mayor parte, por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita. Estos cristales, de aspecto fusiforme o en forma de lámina, se disponen sobre las fibras de colágeno y entre ellas, y tienden a estar orientados en la misma dirección de las fibras de colágeno [117]

Receptores integrales de membrana y adhesiones focales

Los receptores integrales o las integrinas básicamente median la adhesión célula-célula o bien la adhesión célula-matriz. Una integrina individual consiste en 2 sub-unidades α y β unidas no covalentemente, estos se encuentran dentro de la categoría de los receptores heterodímeros. Cada subunidad es una glicoproteína transmembranal tipo I, que tiene un dominio extracelular relativamente grande y una cola

citoplásmica corta. En mamíferos existen cerca de 18 subunidades α y 8 subunidades β , que se combinan para producir al menos 24 diferentes heterodímeros, cada uno de los cuales puede unirse a un repertorio específico de proteínas de la matriz extracelular o ligando proteicos solubles

Las integrinas son receptores altamente versátiles, transmiten señales desde el exterior al interior de la célula, viceversa. Muchos procesos como la motilidad, la morfología celular, proliferación, diferenciación y muerte son regulados a través de esta señalización bidireccional. Dicho proceso requiere por un lado las integrinas unidas a ligandos y por otro lado componentes subcelulares. Las integrinas no solo se encargan de unir las proteínas de la célula a la matriz extracelular sino que se encuentra mediando las interacciones célula-matriz extracelular [118]. Entre los ligandos de las integrinas presentes en la matriz extracelular están: la fibronectina, laminina, varias colágenas, tenascina, vitronectina, osteopontina, sialoproteína ósea, dentina entre otros.

En la cara interna de la membrana celular se observa una gran variedad de proteínas, muchas de las cuales interaccionan con las integrinas transmembranales formando complejos de adhesión, los cuales comunican a la matriz extracelular con la actina del citoesqueleto y con componentes de señalización, de esta forma estas estructuras se convierten en una pieza esencial para establecer la polaridad celular, dirigir la migración celular y mantener el crecimiento y su supervivencia.

Las adhesiones focales cumplen con un rol mecánico y de señalización, las proteínas transmembranales de las adhesiones focales son las integrinas y estas se unen por sus dominios extracelulares a las moléculas de la matriz extracelular mientras que por sus dominios citoplasmáticos a los filamentos de la actina. Las adhesiones focales son altamente complejas en su composición molecular, estudios han revelado la presencia de proteínas del citoesqueleto (tenasina, vinculina, paxilina, α -actinina, parvina/actopaxina y talina), tirosincinasas (Src, FAK, PYK", Csk, Abl) serin/treonin cinasas (ILK, PKC y PAK), moduladores de GTPasas péquelas (ASAP, Graf y PSGAP), tirosin fosfatasas (SHP-2 y LAR PTP) y otras enzimas (PI 3-cinasa y la proteasa calpalina II). Algunas de estas proteínas pueden unirse directamente a los filamentos de la actina (vinculina, tensina, actinina, VASP, parvina/actopaxina y las proteínas ERM) mientras que otras se unen directamente en la región citoplasmática de las integrinas (talina, tensasina, FAK, ILK y α -actinina).