



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C

Posgrado en Materiales Poliméricos

OBTENCIÓN DE UN ANDAMIO TUBULAR DE ÁCIDO
POLI (LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) Y
POLICAPROLACTONA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE
ELECTROHILADO PARA LA INGENIERÍA EN TEJIDOS
DE LA URETRA

Tesis que presenta

JULIO CÉSAR SÁNCHEZ PECH

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

MATERIALES POLIMÉRICOS



Mérida, Yucatán a 11 de noviembre de 2014

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida Yucatán a 11 de noviembre de 2014



Julio César Sánchez Pech



*CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS EN MATERIALES POLIMÉRICOS*

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado

OBTENCIÓN DE UN ANDAMIO TUBULAR DE ÁCIDO POLI (LÁCTICO-COGLICÓLICO) Y POLICAPROLACTONA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO PARA LA INGENIERÍA EN TEJIDOS DE LA URETRA

Perteneciente al Programa de Maestría en Ciencias (Materiales Poliméricos) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Materiales bajo la dirección del Dr. Fernando Hernández Sánchez.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Esta tesis se elaboró en los laboratorios de la Unidad de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Director de tesis: Dr. Fernando Hernández Sánchez

Comité tutorial: Dr. Manuel Cervantes Uc

M.C Benjamín León Mancilla

Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez

Dr. Juan Morales Corona

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor, el Dr. Fernando Hernández Sánchez por sus consejos, por confiar en mí y por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría bajo su responsabilidad.

Agradezco al M.C Hugo Joel Carrillo Escalante por su inigualable ayuda para la realización de este trabajo, por brindarme su amistad y por sus valiosos consejos que tanto me han guiado.

A mi tutor interno, el Dr. Manuel Cervantes Uc por todas las observaciones hechas para mejorar la calidad de este trabajo.

A mi tutor externo, el M.C Benjamín León Mancilla por su paciencia para guiarme en el ámbito médico que requirió esta tesis.

A la Ingeniera Silvia Andrade, por todo su apoyo y paciencia para las micrografías con el Microscopio Electrónico de Barrido.

A mis compañeros de trabajo, América y Gaspar, quienes siempre estuvieron dispuestos a debatir acerca de los resultados obtenidos y por supuesto, por brindarme su valiosa amistad.

Agradezco al CONACYT por la beca de manutención que me fue otorgada y al CICY por facilitarme sus instalaciones para la realización de experimentos.

De igual forma, agradezco al CONCIYTEY por el financiamiento otorgado con clave Yuc 2011-C09-170132 del FOMIX.

A todos, les estaré eternamente agradecido.

Dedico este trabajo con todo mi amor a mi pareja, por apoyarme en esas largas horas de trabajo, por entender mis frustraciones y por estar siempre a mi lado

Alma

A mi Padre y a mi Madre, por brindarme todo su cariño, por procurar siempre lo mejor para mí

Manuel y Socorro

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO 1.....	8
ANTECEDENTES.....	8
1.1 La ingeniería de tejidos	8
1.2 Uretra masculina y femenina	11
1.3 Ingeniería de tejidos de la uretra	15
1.4 Biomateriales para tejidos uretrales	17
1.4.1 Materiales sintéticos usados para el reemplazo de tejidos uretrales.....	18
No absorbibles	18
Silicón	18
Polietileno (PE)	19
Politetrafluoretileno (PTFE).....	19
Absorbibles	20
Ácido poliglicólico (APG).....	21
Ácido poliláctico (PLA)	21
1.5 Electrohilado de una mezcla de PLGA/PLC para la ingeniería de tejidos	25
1.6 Andamios y su Fabricación	26
1.7 Técnicas utilizadas para la fabricación de andamios	27
1.7.1 Métodos De Fabricación	28
Liofilización	28

Impresión 3D	30
Estereolitografía.....	31
1.8 Electrohilado.....	32
1.9 Parámetros que influyen en la morfología y diámetro de la fibra	36
Concentración del polímero	36
Variables controlables.....	37
Variables ambientales.....	38
1.10 importancia de los andamios electrohilados en la ingeniería de tejidos	39
1.11 Propiedades mecánicas del andamio.....	40
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
JUSTIFICACIÓN.....	43
HIPÓTESIS.....	43
OBJETIVOS.....	44
Objetivo general	44
Objetivos específicos	44
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
2.1 Disoluciones	46
Disolución PCL	46
Disolución PLGA.....	48
Disolución PLGA/PCL.....	49
2.2 Construcción del andamio tubular	51
2.3 Caracterización del andamio tubular	54
Morfología.....	54

Análisis FT-IR	54
Determinación del grado hidrofiliidad del andamio mediante ángulo de contacto	55
Propiedades mecánicas del andamio tubular	56
Degradación "in vitro"	57
Análisis DSC	58
CAPÍTULO III. Resultados y Discusión.....	61
3.1 Andamios tubulares de PCL.....	61
3.2 Análisis de las micrografías del MEB	62
Andamio tubular de PCL.....	62
Andamios tubulares PLGA.....	65
Andamios tubulares PLGA/PCL.....	66
3.3 Medición de los diámetros de las nanofibras	71
3.4 Medición del ángulo de contacto	72
3.5 Propiedades mecánicas del andamio.....	73
3.6.-Estudios de degradación.....	75
3.7 Análisis DSC	85
CONCLUSIONES.....	90
BIBLIOGRAFÍA.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Variaciones de masa de PCL, disueltos en DCM:DMF(20:80).....	46
Tabla 2.- Variaciones de masa de PCL, disueltos en DCM:DMF (30:70).....	47
Tabla 3.- PCL disuelto en diferentes porcentajes de cloroformo y etanol	47
Tabla 4.- relación de disolventes usados para el electrohilado del PLGA.....	48
Tabla 5.- Relación de valores de porcentajes de PLGA agregadas a la disolución de PCL	50
Tabla 6.- Relación de parámetros aplicados a la máquina de electrohilado para la obtención de andamios tubulares.....	53
Tabla 7.- Parámetros utilizados para el análisis DSC	59
Tabla 9.-Valores estadísticos que fueron determinados para los andamios	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.- Anatomía de la uretra femenina.....	11
Figura 1.2.-Anatomía de la uretra masculina.....	13
Figura 1.3.-Regeneración de la uretra mediante el uso de células propias del paciente.....	16
Figura 1.4.-Estructura del PLGA	23
Figura 1.5.-Estructura de la PCL.....	24
Figura 1.6.- Andamio de PLA obtenido por medio de la técnica de liofilización, fuente: Sánchez, Julio C. <i>Aplicación de la liofilización para la obtención de andamios de PLLA. Mérida, México. 2012.</i>	29
Figura 1.7.-Andamio elaborado con policaprolactona; en la microfotografía a, b se observa la parte superficial y en la a', b' muestra un corte transversal.	30
Figura 1.8.- (a) Fotografía (b) visualización μ CT (c y d) imágenes MEB.....	31
Figura 1.9.-Técnica convencional de electrohilado [43].	33
Figura 1.10.-Efecto del campo eléctrico cuando es aplicado a una disolución polimérica que se encuentra en un tubo capilar.	35
Figura 1.11.- a) fibras electrohiladas con una concentración de 8% en relación peso/volumen b) fibras electrohiladas con una concentración de 12.8% en relación peso/volumen.	36
Figura 2.1.-Mezclado de PCL con 20% y 30% de PLGA	49
Figura 2.2 .-Diagrama esquemático del proceso de electrohilado.....	51
Figura 2.3.-fotografía del dispositivo para electrohilado	52
Figura 2.4.- Medidor de ángulo de contacto Tantec Cam Plus Micro.....	55
Figura 2.5.-Dimensiones utilizadas para las probetas.....	56

Figura 2.6.- Procedimiento realizado para los estudios de degradación del andamio	57
Figura 2.7.- Dispositivo utilizado para los estudios DSC	60
Figura 3.1.- Fotografía de un andamio tubular hecho con la técnica de electrohilado.....	61
Figura 3.2.-Micrografías de los andamios hechos de las disoluciones A, B y C. A y B son imágenes MEB y C es una imagen captada con el microscopio óptico (X40).	62
Figura 3.3.- Micrografías de las disoluciones D, E, F. La disolución F fue vista mediante un microscopio óptico, utilizando una ampliación de 40X.....	63
Figura 3.4.- Micrografías MEB de las muestras D y E.....	64
Figura 3.5.- Andamios de PLGA vistos con el microscopio óptico	65
Figura 3.6.- Micrografías del andamio elaborado de la mezcla K.....	66
Figura 3.7.- Fotografías del andamio PLGA:PCL (20:80) con diámetro interno de 3 mm	68
Figura 3.8.- Micrografías observadas mediante el MEB del andamio tubular de PLGA:PCL (20:80) con un diámetro interno de 3 mm.	69
Figura 3.9.- Micrografía SEM del andamio de PLGA:PCL(30:70)	70
Figura 3.10.- La imagen fue dividida en 4 cuadrantes, para un mejor análisis estadístico	71
Figura 3.11.- Fotografías del ángulo de contacto, pertenecientes a los andamios electrohilados de las mezclas K y L	73
Figura 3.12.- Diagrama esfuerzo-deformación del andamio (rojo) y la PCL (azul).	74
Figura 3.13.-Degradación hidrolítica del PLGA	76
Figura 3.14.-Hidrólisis de la PCL.....	77

Figura 3.15.-Masa remanente de los andamios durante cada semana.....	78
Figura 3.16.-Micrografías SEM de los andamios sometidos a procesos de degradación.....	80
Figura 3.17.-Enlace C-COO para las unidades lácticas del PLGA y enlace CH ₂ para la PCL.	82
Figura 3.18.-Espectros al andamio PLGA:PCL (20:80), sometido a degradación durante cero, tres y once semanas.	84
Figura 3.19.-Termogramas de PCL y PLGA.....	85
Figura 3.20.-Termogramas de PCL y PLGA:PCL (20:80)	86
Figura 3.21.-Segunda corrida DSC para mezcla PLGA:PCL(20:80)	87
Figura 3.22.- Ampliación en el intervalo de 20°C a 40°C para la mezcla PLGA:PCL	88

RESUMEN

La ingeniería de tejidos es una disciplina que combina los principios de biología, ingeniería y materiales para producir o reemplazar tejidos afectados por alguna enfermedad. La idea básica de la ingeniería de tejidos es relativamente simple, en un andamio poroso biodegradable se realiza un cultivo con células primarias o células madre apropiadas mediante un bioreactor por un período de tiempo. Las células son estimuladas para proliferar (y diferenciarse en el caso de las células madre) para producir matriz extracelular (MEC). Una vez que se ha realizado el implante in vivo, el andamio original se degrada sin afecciones importantes al cuerpo.

En este trabajo, se describe la metodología para la obtención de andamios mediante la técnica de electrohilado para su uso en la ingeniería de tejidos de la uretra. Para lograr obtener fibras, fueron evaluados diferentes sistemas de disoluciones que contenían dos polímeros: ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y policaprolactona (PCL). También, fueron modificados diferentes parámetros en la máquina de electrohilado, tales como: voltaje, temperatura, rapidez de inyección, distancia entre el capilar y el cilindro colector, entre varios otros.

Los andamios fabricados fueron sometidos a diversos ensayos para conocer sus propiedades físico-químicas. Por lo tanto, las muestras fueron observadas mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB) para determinar la existencia de fibras y formación de poros.

Los andamios fueron sometidos a ensayos de degradación in vitro durante cinco semanas, sumergiendo las muestras en Phosphate Buffered Saline (PBS) con un pH de 7.4. Al término de las cinco semanas, las muestras del andamio fueron observadas también por MEB para poder establecer si hubo un colapso en las fibras o se mantuvo la morfología inicial.

Para determinar si la degradación que se llevaba a cabo era por vía hidrólisis, se realizaron ensayos FT-IR con el fin de corroborar que, efectivamente, eran los enlaces éster que eran susceptibles a un rompimiento cuando entraban en contacto con la disolución PBS.

Ya que la hidrofiliidad de un andamio es un factor clave para realizar un cultivo celular, se realizaron pruebas de ángulo de contacto al andamio para determinar si era hidrofílico o hidrofóbico.

Para conocer las propiedades mecánicas del soporte tridimensional (3D), se realizaron ensayos a tensión, y mediante la curva de esfuerzo-deformación obtenida, fue calculado el módulo elástico del andamio.

También, se realizaron corridas DSC con la finalidad de evaluar las propiedades térmicas del andamio, y así poder determinar si la mezcla utilizada fue miscible o compatible.

ABSTRACT

Tissue engineering is a discipline that combines the principles of biology, engineering and materials to produce or replace tissues affected by disease. The basic idea of tissue engineering is relatively simple. Primary cells or stem cells are cultivated in a biodegradable scaffold, by a bioreactor for a period of time. Cells are stimulated to proliferate (and differentiate in the case of stem cells) to produce extracellular matrix (ECM). Once the implant has been carried out in vivo, the original scaffold is degraded without damage for the human body.

In this work, is described the methodology for obtaining scaffolds with the technique of electrospinning for use in tissue engineering of the urethra. In order to obtain fibers were evaluated different systems solutions containing two polymers: poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), and polycaprolactone (PCL). Also, various parameters were changed in the electrospinning machine, such as voltage, temperature, injection speed, distance between the capillary and the collector cylinder and several others.

The fabricated scaffolds were subjected to various tests to determine their physicochemical properties. Therefore, the samples were observed by scanning electron microscope (SEM) to determine the existence of fibers and pore formation.

The scaffold was subjected to in vitro degradation assays for five weeks, immersing the samples in Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4). At the end of the five weeks, the scaffold samples were also observed by SEM to determine whether there was a collapse in the fibers or the initial morphology was maintained.

To determine if degradation was carried out via hydrolysis, tests of FT-IR were performed to determine that the ester bonds were susceptible to breaking, when they came in contact with the PBS solution.

The hydrophilicity of a scaffold is a key factor to perform a cell culture, contact angle tests were performed to determine if the scaffold was hydrophilic or hydrophobic.

For the mechanical properties of the three-dimensional (3D) support, tension tests were performed, and with the stress-strain curve obtained, was calculated the elastic modulus of the scaffold.

DSC runs were also made in order to evaluate the thermal properties of scaffold, and thus determine if the mixture used was miscible or compatible.

INTRODUCCIÓN

La pérdida o fallo de un órgano o tejido es uno de los problemas más frecuentes y costosos en el cuidado de la salud. Con la llegada de nuevos materiales sintéticos, tales como el tetrafluoretileno (teflón) y la silicón, se abrió un nuevo campo que incluye una gran variedad de dispositivos que pueden ser empleados en el cuerpo humano. Sin embargo, estos dispositivos aunque pudieron reemplazar componentes estructurales del cuerpo, no regeneraban el tejido original.

Con el paso del tiempo, aparecieron nuevos materiales que se caracterizaban por ser biocompatibles, ser o no biodegradables y bioabsorbibles. Mientras tanto, se generaban nuevas técnicas relacionadas con el cultivo y expansión celular. Los estudios relacionados con la matriz extracelular y su interacción con las células permitieron una mejor comprensión del crecimiento de tejido. Todas estas investigaciones culminaron con el primer trasplante de médula ósea, realizado en la década de 1970. Para esta época los científicos habían comenzado a combinar dispositivos médicos y biomateriales con los conceptos de biología, creando de esta manera un nuevo campo llamado Ingeniería de tejidos [1].

En 1998 se tuvo conocimiento de las células madre humanas, esto significó un gran progreso para la ciencia de los tejidos, ya que este tipo de células estaban presentes en los procesos de regeneración. De igual forma, este descubrimiento ha sido objeto de numerosos debates éticos en el campo de la medicina. Las investigaciones avanzaron, y en 1999 el mundo conoció al primer mamífero clonado de la historia, la oveja Dolly [2].

Unificando las áreas de ingeniería de tejidos, trasplante celular y células madre se tiene un concepto que hoy en día es objeto de estudio de numerosos investigadores alrededor del mundo: la regeneración de tejido vivo y órganos.

En la ingeniería de tejidos, los científicos, ingenieros y físicos aplican herramientas provenientes de una variedad de disciplinas para construir sustitutos

biológicos cuyo propósito es poder reemplazar o regenerar tejido lesionado por múltiples causas. Algunas de las aplicaciones de la ingeniería de tejidos se ven reflejadas en terapias actuales, especialmente en el área relacionada con el reemplazo de piel y en menor grado, con la reparación de cartílagos. Por otra parte, existen múltiples estudios enfocados a prototipos de otros substitutos de tejido, tales como tejido nervioso, vascular (arteria y vena) y uretral. Uno de los investigadores más reconocidos en el área de la ingeniería de tejidos es el Dr. Anthony Atala, quien incluso ha logrado diseñar y construir un riñón artificial elaborado con una impresora 3D que inyecta células vivas [3].

En los últimos años, la uretra ha sido objeto de investigación por parte de la ingeniería de tejidos, sin embargo, son pocos los estudios que han resultado exitosos y que incluso han concluido con el implante de una uretra en el cuerpo humano, tal como reporta Raya y colaboradores [4]. En este trabajo se describe la metodología que se llevó a cabo para reemplazar una uretra dañada por una nueva, que fue elaborada con la ayuda de un andamio a base de un biopolímero, el cual actuó como un soporte para que las células generaran su propia Matriz Extracelular (MEC).

Las estructuras porosas constituyen el principal objetivo en la fabricación de andamios, debido a que promueven la viabilidad, proliferación y diferenciación celular. Además, determina la forma que tendrá el tejido u órgano resultante; existen numerosas técnicas modernas para su elaboración, por ejemplo, sinterización selectiva por láser (SSL), estereolitografía, lixiviado, electrohilado, etc [5].

Los polímeros presentan características físicas y químicas únicas, las cuales son aprovechadas en distintas aplicaciones dependiendo de las necesidades a cubrir. Ya sea hidrofobicidad, módulo de elasticidad alto, temperatura de transición vítrea (T_g) baja, etc. Pero también, en muchos casos estas propiedades pueden ser limitantes, por ejemplo, la policaprolactona es un polímero hidrofóbico; Goddard y

colaboradores [6], demostraron que en una superficie hidrofílica existe una mayor adherencia celular. Otra gran ventaja es el grado de biodegradación, es decir, una cinética de degradación controlada. En años recientes, numerosas mezclas de polímeros han sido electrohilados para vencer las limitaciones asociadas a un solo polímero [7].

El propósito de esta tesis, es presentar el estado actual del arte en la ingeniería de tejidos de la uretra, así como la metodología empleada para la obtención de un andamio de PLGA:PCL por medio de la técnica de electrohilado, propuesto para ser empleado para la obtención de tejido uretral; así mismo se presentan resultados y discusión correspondientes.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 La ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo relativamente nuevo que requiere el uso de andamios, células y factores de crecimiento [8]. El último objetivo es el implante del tejido construido dentro del cuerpo para reparar una herida o reemplazar un órgano que no cumple con sus funciones correctamente. Este tejido también puede ser usado para realizar pruebas relacionadas con nuevos fármacos [9].

El primer sustituto de piel elaborado con materiales sintéticos fue desarrollado en 1962 [10], sin embargo, fue hasta finales de 1970 y principios de 1980 que fue comercializado. La mayor parte de la comunidad científica está de acuerdo en que fue en el transcurso de estos años donde comenzó la era actual de la ingeniería de tejidos [3].

Entre los primeros productos útiles para la construcción de piel sintética, se encuentran los desarrollados por Howard Green y colaboradores [11], en la Escuela de Medicina de Harvard, quien también describe técnicas para crecer epidermis.

Otro de los productos relacionados con el crecimiento de piel fue desarrollado por el Ingeniero Mecánico Ioannis Yannas[12] del Instituto Tecnológico de Massachusetts (ITM). Consistió en un material poroso a base de colágeno bovino tipo I y fue elaborado mediante la técnica de liofilización.

Durante la década de los años 90 fueron desarrollados y comercializados numerosos productos cuya función principal era crecer piel y subsecuentemente cartilago. A principios del año 2000 disminuyó la cantidad de inversiones destinadas al área de la ingeniería de tejidos, y fue hasta el 2004 que la disminución se vio compensada con la llegada de empresas dedicadas al cultivo de células madre. En el 2008, aunque existieron avances significativos en la ingeniería de tejidos de la vejiga, cornea, vasos sanguíneos, corazón e hígado, aún no se ofrecía una solución clínicamente aceptable. Actualmente, las investigaciones de diversos laboratorios, empresas científicas y centros de investigación se encuentran dirigidas hacia el área de ingeniería de tejidos, ya que se visualiza un futuro prometedor [13].

Los productos terapéuticos desarrollados por la ingeniería de tejidos, están dirigidos principalmente a aquellos órganos que son más propensos a sufrir heridas y enfermedades, tales como el páncreas, el hígado, el sistema cardiovascular, nervioso, urinario y piel. Con la llegada de nuevas tecnologías como el electrohilado se obtienen estructuras porosas que permiten a las células cumplir mejor sus funciones, de esta forma se tiene mayor avance en las investigaciones relacionadas con la medicina regenerativa [9].

Las células son los bloques de construcción del tejido, y las células presentes en un tejido injertado juegan un papel importante en el estímulo de tejido saludable y regeneración. Por lo tanto, la mayoría de las investigaciones incluyen aislamiento y expansión de células *in vitro*. Uno de los mayores obstáculos para el uso clínico, es la escasa disponibilidad de células humanas disponibles. [5]

Para que exista una correcta regeneración de tejido es necesario que las células se encuentren en un ambiente que permita su funcionamiento tal como si estuvieran en el tejido natural. El uso de andamios celulares sirve al menos para alguno de los siguientes propósitos:

1. Favorecer la proliferación, adhesión y diferenciación de las células
2. Permitir la migración celular y la formación de nuevos vasos sanguíneos, que favorezca un intercambio de nutrientes adecuados para la sobrevivencia celular.
3. Poseer propiedades mecánicas adecuadas que eviten el colapso del andamio en el sitio donde será colocado; además soportar puntos de sutura quirúrgica para su fijación en el tejido dañado que se pretende regenerar.
4. Por último, ser clínicamente manejable (elasticidad Vs plasticidad) para que el médico pueda ajustar en dimensiones el andamio cuando sea colocado en el paciente.

Algunos de los biomateriales sintéticos que han sido usados en la ingeniería de tejidos son el poli(ácido láctico), ácido poliglicólico y la policaprolactona. Estos materiales resultan atractivos debido a que ya han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA).

Otra consideración relacionada con la ingeniería de tejidos es la presencia de estímulos mecánicos y químicos, tales como cargas cíclicas y factores de crecimiento celular. Existen diferentes factores de crecimiento empleados, por ejemplo, para el crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés de Fibroblastic Growth Factor) o el VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) que promueve el crecimiento de tejido de vascular. Estos factores pueden ser incorporados durante la elaboración de los andamios [14].

1.2 Uretra masculina y femenina

El sistema urinario está compuesto por dos riñones, dos uréteres, una vejiga y una uretra. El tracto urinario es esencialmente igual en el hombre que en la mujer, excepto por lo que se refiere a la longitud de la uretra, la femenina mide aproximadamente 3.5 cm, mientras que la masculina mide entre 18 y 20 cm.

La uretra femenina es una estructura tubular corta rodeada por las glándulas periuretrales; en la figura 1.1 se muestra que la mayor se empareja con las glándulas de Skene que se encuentran adyacentes a la uretra distal y de drenaje en el meato [15].



Figura 1.1.- Anatomía de la uretra femenina

Fuente: Elsevier[16]

La uretra del hombre mostrada en la figura 1.2 se divide en anterior y posterior. La uretra posterior consiste de la prostática y membranosa. La uretra prostática mide aproximadamente 3.5 cm de longitud y pasa a través de la glándula de la próstata.

La uretra membranosa mide aproximadamente de 1 a 1.5 cm de largo y pasa a través del diafragma urogenital. El diafragma urogenital contiene el esfínter externo de la uretra y las glándulas de *Cowper*, una en cada lado.

La uretra anterior consiste en la uretra bulbar y peneal. La uretra bulbosa va desde el margen inferior del diafragma urogenital a la unión penoescrotal, y la uretra del pene se extiende a partir de la unión penoescrotal y pasa a través del cuerpo esponjoso, terminando en el meato externo [15].

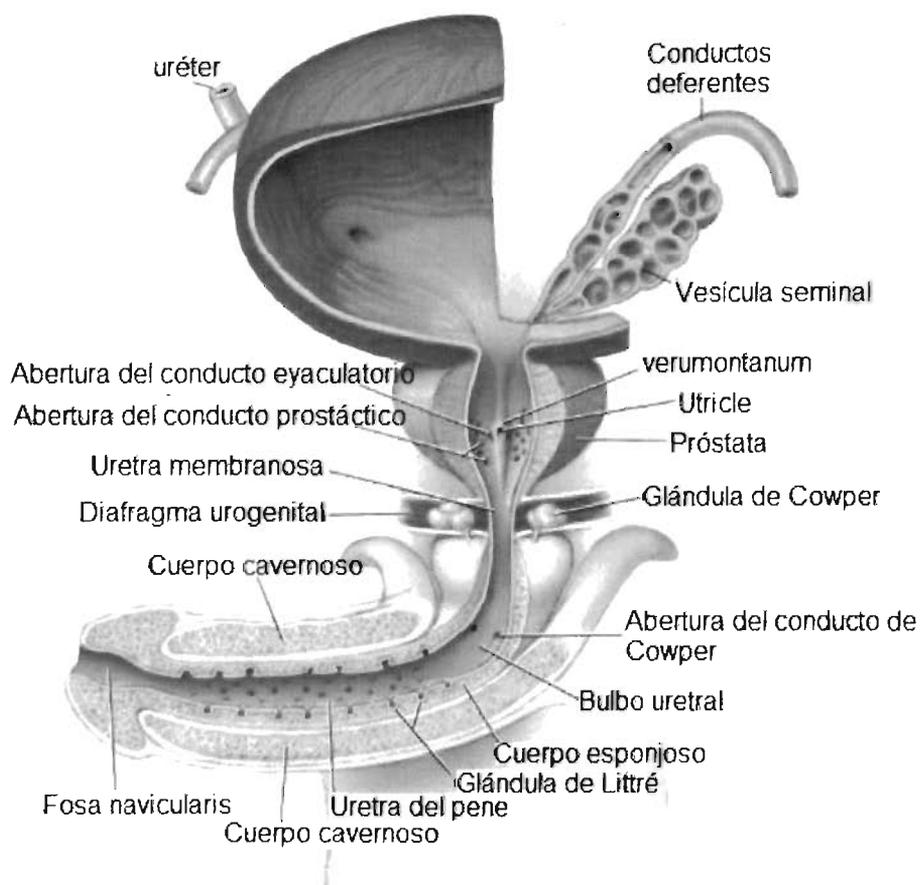


Figura 1.2.-Anatomía de la uretra masculina.

Fuente: Advanced Male Urethral and Genital Reconstructive Surgery[1]

Histológicamente la uretra se compone de tejido formado por células de músculo suave, que actúan como soporte mecánico; se encuentra revestido por células epiteliales (uretra prostática), epitelio escamoso (uretra del pene distal) y epitelio columnar estratificado (uretra membranosa, bulbosa y peneana) [1].

La función del aparato urinario es la de mantener el balance de fluidos, mediante la excreción de agua y varios productos de desecho. Cuando el sistema urinario

no funciona, no puede eliminar el líquido sobrante en el cuerpo, ni filtrar la sangre, lo que conduce a una intoxicación del organismo

Los problemas más complejos relacionados con la uretra pueden ser causados por lesiones, las cuales impiden excretar la orina de forma correcta, para retirar la orina de la vejiga es necesario, en muchos casos, introducir una aguja y extraer todo el líquido existente, lo cual resulta incómodo y doloroso. Cuando la herida en la uretra es pequeña, existe la posibilidad de realizar una intervención quirúrgica para reparar el daño. Sin embargo, en el 50% de los casos existen infecciones posteriores a la cirugía que provocan que el paciente orine sangre (hematuria).

1.3 Ingeniería de tejidos de la uretra

Después de que un tejido sufre una lesión, el cuerpo puede iniciar el crecimiento interno celular en los bordes de la herida con el fin de cubrir el defecto. Las células de los bordes del tejido nativo son capaces de recorrer distancias cortas sin efectos perjudiciales, es por esta razón que las heridas pequeñas pueden sanar correctamente. Sin embargo, si la herida es grande (milímetros de distancia o profundidad) la respuesta regenerativa del cuerpo no es la misma y pueden existir problemas inflamatorios graves. Cuando esto ocurre, aumenta el depósito de colágena y aparición de fibrosis. En la uretra estos procesos se manifiestan como una estenosis (constricción o estrechamiento del conducto uretral).

Una de las alternativas para los pacientes cuya uretra está dañada, es sustituir ésta por una artificial. Desde hace décadas, la ingeniería de tejidos comenzó a investigar y tratar de desarrollar dispositivos que permitan cumplir la función del sistema urinario, obteniendo resultados satisfactorios, sin embargo, el desarrollo de una uretra artificial ha sido difícil debido a que debe cumplir ciertos criterios cuando es implantada, tales como: flexibilidad, resistencia al pH de la orina, absorbible, entre algunas otras. Además, el material utilizado no siempre es compatible con el paciente.

Actualmente se realizan investigaciones para desarrollar una uretra con la ayuda de andamios y células madre, con el objetivo de implantarla en el cuerpo humano, siguiendo el procedimiento que se muestra en la figura 1.3. La búsqueda de un material sintético adecuado que pueda sustituir la uretra no ha sido exitosa. Las tasas de complicación son todavía altas para permitir su aplicación en la clínica diaria. Los resultados más alentadores se han obtenido mediante nuevos materiales absorbibles, entre ellos el ácido poliglicólico, que causan mínima reacción inflamatoria del tipo cuerpo extraño y permiten una sustitución final de la uretra por tejidos regenerados a partir de andamios.

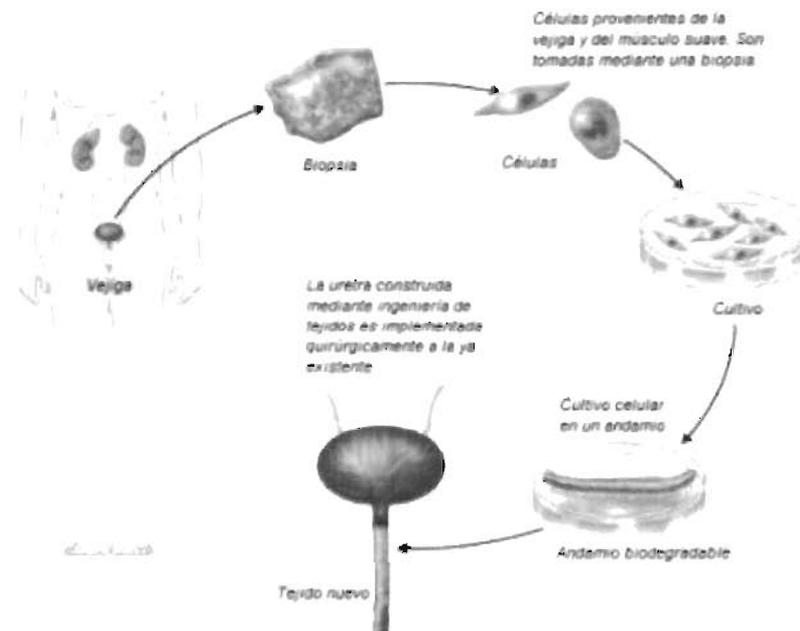


Figura 1.3.-Regeneración de la uretra mediante el uso de células propias del paciente.

Fuente: Advanced Male Urethral and Genital Reconstructive Surgery[1]

La selección de un biomaterial es importante en el desarrollo de la ingeniería de tejidos uretral. Debe ser capaz de controlar la estructura y función del andamio fabricado, además de permitir diversos procesos que realizan las células huésped. Generalmente, el material debe ser biocompatible, promover la interacción celular y desarrollo de tejido, además de poseer propiedades mecánicas y físicas apropiadas [1].

El biomaterial seleccionado debe ser biodegradable y bioabsorbible para soportar la reconstrucción de la uretra sin inflamación. Los productos resultantes de la degradación no deben provocar inflamación o toxicidad.

1.4 Biomateriales para tejidos uretrales

Generalmente, se han utilizado dos tipos de biomateriales para tejidos uretrales. Unos a base de matrices de tejido acelulares provenientes de vejigas, submucosa del intestino delgado (SIS), cuerpo esponjoso, aorta y dermis. La segunda clase de biomateriales usados son polímeros sintéticos, tales como poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) [17]. Esta clase de biomateriales han sido evaluados en cuanto a su biocompatibilidad con células primarias uroteliales y células del músculo de la vejiga humanas. Los polímeros sintéticos pueden ser manufacturados a gran escala controlando propiedades mecánicas, grado de degradación y microestructura.

1.4.1 Materiales sintéticos usados para el reemplazo de tejidos uretrales

No absorbibles

Estos materiales sintéticos son utilizados para sustituir de manera permanente los tejidos dañados. A continuación se presenta un análisis de estos materiales que han sido utilizados para la fabricación de uretras.

Silicón

El éxito de prótesis de siliconas en otras especialidades médicas estimuló su empleo en urología como sustituto en el tracto urinario.

Robert De Nicola[18], describió el implante de un tubo de silicona de 9.5 cm, tras resección de una uretra enferma en un paciente con una extensa estenosis uretral gonocócica, complicada por varias fístulas. El tubo de silicona que usó fue originalmente diseñado para la reconstrucción del colédoco. La función genitourinaria del paciente fue favorable a los 14 meses.

En 1971 Court y colaboradores [19], reportaron el uso de una prótesis tubular de silicona, especialmente diseñada para sustitución uretral en tres pacientes. Los resultados preliminares no fueron tan buenos como se esperaban. En uno de los pacientes, la prótesis tuvo que ser reemplazada quirúrgicamente por otra con forma curva.

Varios fueron los estudios posteriores que fracasaron en el intento de usar silicona para el reemplazo de la uretra, por lo que se concluyó que el material es inadecuado para dicha función.

Polietileno (PE)

Pocos meses después de la publicación del trabajo pionero de De Nicola en enero de 1950, Foret[18] realizó en Liége (Bélgica) un reemplazo de la uretra con un tubo de polietileno de aproximadamente 10 cm. A los 6 meses de seguimiento, el paciente de 75 años de edad estaba asintomático y era capaz de orinar a 75 cm de distancia. Los autores, concluyeron que sus buenos resultados, fueron debidos al largo tiempo de permanencia de la prótesis que facilitó la cicatrización uretral.

Palleschi y Tanagho[20] obtuvieron buenos resultados con el uso de Dacron siliconado en la cirugía de la uretra. La regeneración epitelial fue completa y no hubo alteraciones en el tracto urinario superior. Los autores animados por sus buenos resultados especularon sobre el uso clínico.

Poltetrafluoretileno (PTFE)

Gil-Vernet usó tubos de teflón para el reemplazo de la uretra sin éxito. El autor logró buenos resultados en apenas 2 de las 10 uretroplastias tubulares con Teflón. Dreikorn y colaboradores reemplazaron de 3 a 8 cm de uretra de doce perros con politetrafluoretileno expandido, obteniendo resultados significativos a un seguimiento de 12 meses. Sin embargo, no se describieron estudios histológicos. Los autores reconocieron que hacían falta más estudios experimentales antes de la aplicación en la clínica [21].

Poliuretano (PU)

Nissenkorn[22], describió el uso de una prótesis endouretral temporal hecha de poliuretano en más de veinte pacientes con estenosis recidivante de uretra, que no fueron candidatos al tratamiento quirúrgico convencional. En el seguimiento de hasta dos años, el autor no encontró incrustación ni obstrucción de la prótesis.

Absorbibles

Los poliésteres de origen natural (ácidos α -hidroxi), incluyendo (poli (ácido glicólico) PGA, poli (ácido L-láctico) PLA y poli (ácido láctico-co-glicólico) PLGA, son ampliamente utilizado en la ingeniería de tejidos. Éstos polímeros han sido aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para usarse en personas en una variedad de aplicaciones, incluyendo suturas. Los productos de degradación de estos compuestos no son tóxicos, los metabolitos resultantes son eliminados del cuerpo en forma de dióxido de carbono y agua [23]. Ya que estos polímeros son termoplásticos, pueden ser fácilmente transformados en andamios tridimensionales con la microestructura deseada, forma y dimensiones específicas con una variedad de técnicas. Para lograr que los andamios posean una alta porosidad, estos materiales se procesan en forma de fibras o esponjas.

Los estudios realizados con varios biomateriales, tanto naturales (submucosa de la vejiga, submucosa del intestino delgado, colágeno, y alginato) y sintéticos (PGA, PLA, PGA y de silicona), concluyeron en que la mayoría no indujo efectos citotóxicos significativos y las células cultivadas en estos materiales mostraron funciones de metabolismo normales [17].

Ácido poliglicólico (APG)

Este polímero derivado del ácido hidroxiacético es ampliamente usado en cirugía en la forma de hilos de sutura.

Un grupo de científicos de la Universidad de California liderado por Tanagho [24], describió en 1983 el uso de una malla de APG para el reemplazo parcial de la uretra de siete perros. La región urotelial fue completamente regenerada, pero el tejido suburotelial fue reemplazado por un tejido conectivo denso de colágeno. El cuerpo esponjoso no se regeneró. Los autores concluyeron que la malla de APG es un injerto ideal para la uretra.

Olsen y colaboradores [25], desarrollaron una prótesis tubular utilizando para la reconstrucción uretral. La cara interna estaba compuesta por APG y la externa por ácido polihidroxibutírico (PHB). El PHB sólo se utilizaba para soportar los esfuerzos a tensión que existen en la uretra.

Después de haber realizado experimentos con perros y conejos, los autores llegaron a la conclusión de que el APG es una alternativa atractiva para estenosis extensas de uretra, ya que si se observaba regeneración tisular.

Ácido poliláctico (PLA)

Este polímero fue probado experimentalmente en su configuración PLLA por Kemppainen y colaboradores [26], como una prótesis espiral endouretral y reforzada. Después de haberse llevado a cabo experimentos con conejos los resultados fueron buenos, con permanencia de la luz uretral al año de

seguimiento, además, la reacción del tipo a cuerpo extraño fue mínima. Los autores afirmaron que los efectos de la orina sobre el APL-L son desconocidos.

Hyaff-11

Italiano, G. y colaboradores [27], describieron en 1997 el uso de un material semisintético y derivado del ácido hialurónico, Hyaf-11, para la reconstrucción de la uretra totalmente reseca en once conejos. La regeneración epitelial fue completa a las cuatro semanas. La luz uretral se mantuvo permeable y no hubo regeneración de tejido esponjoso.

Ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)

Wang X.Q y colaboradores [28], diseñaron un andamio obtenido mediante la técnica de electrohilado a partir de PLGA. El diámetro interior del andamio fue de 3 mm y el diámetro exterior de 4 mm, el diámetro de las fibras fabricadas fue de 234 nm aproximadamente, los autores señalan que este andamio posee estructuras macroscópicas ideales para ser usado en la ingeniería de tejidos de la uretra.

El PLGA o ácido poli(láctico-co-glicólico) es un copolímero que tiene amplio uso en dispositivos médicos, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad está aprobado por la Food and Drug Administration(FDA). Su estructura química está representada en la figura 1.4.

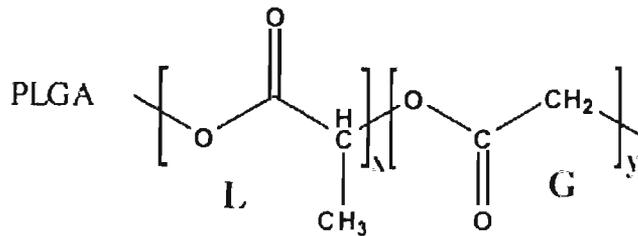


Figura 1.4.-Estructura del PLGA

Se sintetiza por medio de una copolimerización por apertura de anillo de dos monómeros diferentes, los dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5 – diona) de ácido glicólico y ácido láctico. Para la síntesis de este polímero, los catalizadores que son usados son estaño(II) 2-etilhexanoato, estaño(II) alcóxido, o aluminio isopropoxido, entre otros. Las unidades de monómero (del ácido glicólico o ácido láctico) son unidas entre sí mediante enlaces éster durante la polimerización, resultando así, un copolímero alifático lineal como un producto [29].

El PLGA ha sido usado exitosamente como un polímero biodegradable, cuando se degrada mediante hidrólisis en el cuerpo, son producidos los monómeros originales: ácido láctico y ácido glicólico. Bajo condiciones fisiológicas normales, estos dos monómeros son producto de varios procesos metabólicos en el cuerpo. Naturalmente, el cuerpo humano se encuentra en contacto con ambos monómeros, por lo tanto, existe una mínima toxicidad relacionada con el uso de PLGA como biomaterial. Además, es posible controlar la rapidez de degradación modificando los porcentajes de ambos monómeros presentes en el copolímero, esto hace que el PLGA sea una elección común en la producción de una variedad de dispositivos biomédicos, tales como implantes, dispositivos protésicos, injertos y suturas [29].

Policaprolactona (PCL)

La policaprolactona es un poliéster alifático semicristalino, se obtiene mediante polimerización por apertura de anillo del monómero ϵ -caprolactona. Su estructura se observa en la figura 1.5, su Tg es de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

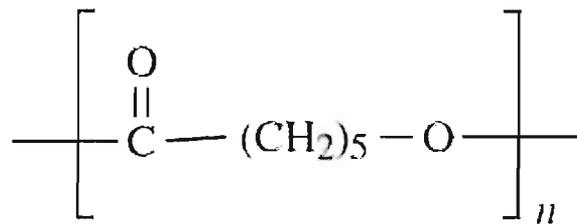


Figura 1.5.-Estructura de la PCL

La PCL posee buenas propiedades elastoméricas y alta elongación. Su uso biomédico ha sido aprobado por la FDA desde 1970; sus productos de degradación son de baja toxicidad para el cuerpo humano.

Las propiedades elásticas que posee, proveen a este polímero de cualidades para aplicaciones biomédicas que interactúan con diversos tipos de esfuerzos mecánicos. La PCL ha sido mezclada con otros polímeros, incluyendo al polietilenglicol (PEO), ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA).

1.5 Electrohilado de una mezcla de PLGA/PLC para la ingeniería de tejidos

Electrohilar mezclas no solo vence las limitaciones asociadas a un simple polímero, sino también, crea un nuevo componente sin la necesidad de sintetizar un copolímero, lo cual, es difícil y complejo. Duan y colaboradores [30], realizaron investigaciones para electrohilar una mezcla de PLGA, poli(alcohol vinílico) (PVA) y quitosano para aplicaciones relacionadas con la piel; para el proceso, electrohiló una mezcla de PVA y quitosano, para después agregar PLGA mediante un segundo electrohilado, obteniendo así, un andamio con propiedades mecánicas adecuadas, propiedades absorbentes y actividad antibacterial, provenientes del PLGA, PVA y quitosano respectivamente.

El PLGA es mejor que la PCL con respecto a la adhesión y proliferación celular, debido a que es más hidrofílico. La PCL es un material hidrofóbico, por lo que no presenta sitios fisiológicamente activos, esto genera un ambiente desfavorable para el crecimiento celular. La ventaja de usar PCL en la mezcla a electrohilar, se relaciona con su elevada resistencia mecánica, una propiedad valiosa para las aplicaciones de ingeniería de tejidos. El PLGA fue incluido ya que se ha demostrado ser un material ideal para el crecimiento, adhesión y proliferación celular [31]. Combinando ambos polímeros, se crea un andamio que presenta las características necesarias para el óptimo desarrollo de las células [7].

1.6 Andamios y su Fabricación

Para la regeneración de tejido son empleadas tres estrategias: infusión de células aisladas, tratamiento mediante sustancias inducidas al tejido (parches) e implantación de células en un andamio [32]. De las tres estrategias empleadas, el uso de andamios proporciona mejores resultados. En una matriz con estructura tridimensional (3D) las células son capaces de proliferar y migrar en su interior, de esta manera, son capaces de producir MEC nueva y generar tejido con la forma deseada. El andamio también permite la incorporación de señales mecánicas (tensión, compresión) o biológicas que mejoran la regeneración mediante bioreactores. Las propiedades mecánicas y biológicas de los andamios pueden variar dependiendo de su aplicación, y pueden ser diseñadas para proveer un ambiente con las señales apropiadas que estimulen a las células a proliferar y llevar al cabo el proceso de diferenciación [33].

El tamaño de poro óptimo para los andamios depende del tipo de célula que vaya a ser cultivada en él, ya que si éstos son demasiado pequeños ocurren oclusiones. En promedio pueden estar entre 50 μm y 200 μm . En la mayoría de los casos el andamio debe ser construido con un material degradable que no sea tóxico.

1.7 Técnicas utilizadas para la fabricación de andamios

La formación de una estructura porosa constituye el objetivo principal para la fabricación de andamios para lo cual se han desarrollado numerosas técnicas tales como: separación de fases, espumado mediante gases, suspensión de partículas, liofilización, etc. Algunos de los inconvenientes de estas técnicas es la limitada morfología del andamio que se puede obtener tales como el tamaño de poro, forma, distribución e interconectividad. Numerosos estudios resaltan la importancia que posee el tamaño de poro en la habilidad de las células de adherirse y proliferar sobre el andamio, sin embargo, con la ayuda de nuevos sistemas que permiten controlar de forma exacta el tamaño de poro, se sugiere que la adhesión y proliferación celular puede llevarse a cabo aun no teniendo controlada esta condición [34]. De cualquier forma la porosidad del andamio, que se define como la proporción de espacio vacío en un sólido, sigue siendo un factor crítico [35]. En el siguiente apartado se describirán brevemente algunas técnicas para la fabricación de andamios y se pondrá especial atención en el electrohilado.

1.7.1 Métodos De Fabricación

Liofilización

La liofilización trae grandes promesas a la medicina regenerativa. El propósito de preservar material biológico valioso tales como la sangre, tejidos, y en última instancia órganos enteros, conduce a las investigaciones a desarrollar metodologías de congelamiento para el tratamiento de estos materiales delicados. Uno de los principales problemas es que los cristales que son formados durante el congelamiento pueden dañar o destruir células sensibles [36].

En el caso de los andamios, los agujeros de los cristales de hielo son justamente lo que se necesita para la creación de una estructura porosa.

En la primera etapa de la liofilización la muestra es congelada. La manera en que se congela determina su estructura cristalina. Lo más importante de esta etapa es poder controlar las condiciones de congelación, lo suficiente para obtener los resultados deseados.

En la figura 1.6 se puede observar andamios obtenidos mediante la técnica de liofilización [37].

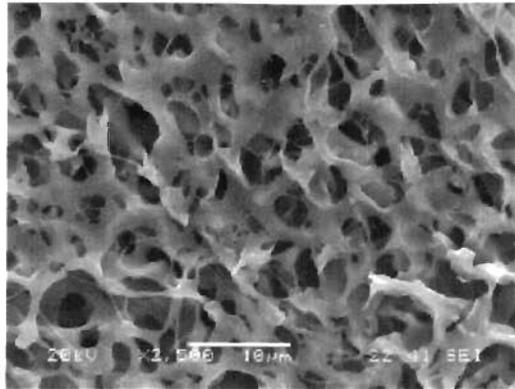


Figura 1.6.- Andamio de PLA obtenido por medio de la técnica de liofilización, fuente: Sánchez, Julio C. *Aplicación de la liofilización para la obtención de andamios de PLLA*. Mérida, México. 2012.

Impresión 3D

Esta técnica consiste en la creación de estructuras mediante un cabezal de impresión, el cual inyecta material sobre una superficie a partir del diseño elaborado con un software [38]. De esta manera, es posible obtener andamios con poros homogéneos y dimensiones deseadas, como se muestra en la figura 1.7.

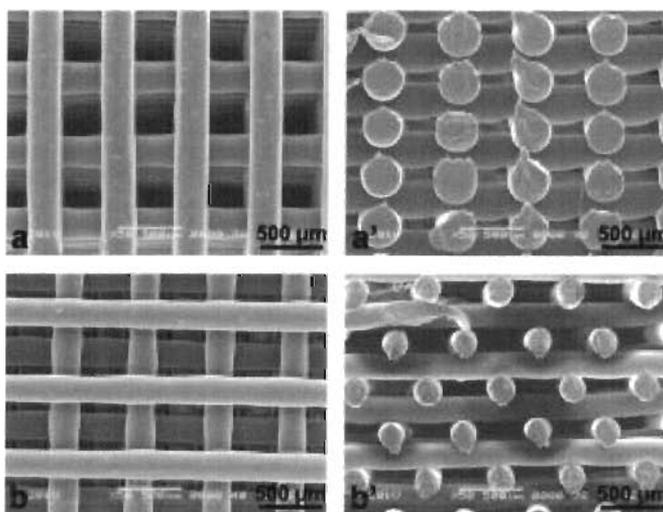


Figura 1.7.-Andamio elaborado con policaprolactona; en la microfotografía a, b se observa la parte superficial y en la a', b' muestra un corte transversal.

Fuente: Heidi A. Declercq, Acta biomaterialia, 2014 [39].

Estereolitografía

La estereolitografía se basa en reacciones químicas llevadas a cabo por medio de luz para crear objetos 3D a partir de un polímero líquido. El proceso consiste en colocar una superficie plana dentro de un recipiente cuyo contenido es polímero fotoreactivo, posteriormente, se emplea un software de Diseño Asistido por Computadora (DAC) para controlar un transmisor de luz ultravioleta dirigida a la superficie sumergida, de esta manera se van creando capas sólidas. La superficie puede subir o bajar según sea necesario para crear el objeto 3D. Los biomateriales que han sido utilizados en esta aplicación incluyen al poli (propileno fumarato) [40].

Así, se pueden obtener estructuras porosas que pueden ser usadas para aplicaciones de regeneración tisular. En la Figura 1.8 se presenta un andamio de PCL hecho con la técnica de estereolitografía.

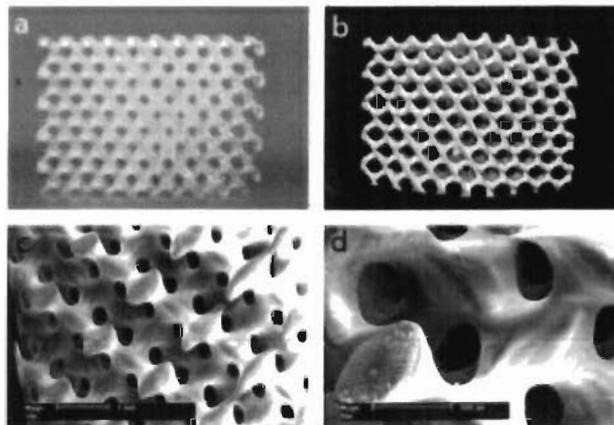


Figura 1.8.- (a) Fotografía (b) visualización μ CT (c y d) imágenes MEB.

Fuente: 3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application[41]

1.8 Electrohilado

Entre 1934 y 1944, Formhals[42] publicó una serie de patentes, describiendo la configuración de un sistema para la producción de filamentos de polímero usando una fuerza electrostática. La primera patente que registró la técnica de electrohilado describía la fabricación de fibras textiles de celulosa, para el proceso se utilizó un voltaje de 57 kV y éter monoetilico de etilenglicol como disolvente.

La disposición del sistema de electrohilado se muestra en la figura 1.9. Consta de tres componentes principales: una fuente de poder de alto voltaje, un tubo capilar y una unidad colectora de las fibras (usualmente una placa de metal o un cilindro rotatorio).

La técnica consiste en la fabricación de fibras mediante disoluciones poliméricas a través de campos eléctricos, consiste en aplicar fuerzas eléctricas que superen las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado, de esta forma a un voltaje determinado, son expulsados chorros finos de disolución desde el capilar hasta el plato colector, elongándose de acuerdo a las fuerzas externas y experimentando inestabilidad en algunas ocasiones.

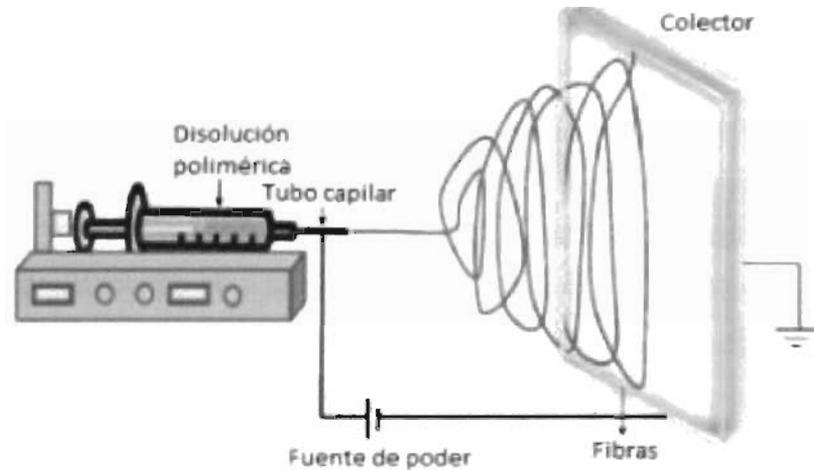


Figura 1.9.-Técnica convencional de electrohilado [43].

Para que el polímero sea atraído hacia el colector, es necesario que la intensidad del campo eléctrico supere a la tensión superficial existente en la gota de polímero que se encuentra en la punta de la aguja, para esto, se requiere un voltaje crítico, descrito por Taylor mediante la ecuación 1 [44].

$$V_c^2 = 4 \frac{H^2}{L^2} \left(l \frac{2L}{R} - \frac{3}{2} \right) (1.30\pi \gamma) \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde V_c^2 es el voltaje crítico, H , la separación entre el capilar y el colector, L , la longitud de la aguja, R , el radio de la aguja y γ representa la tensión superficial del líquido. Por medio de experimentos con distintas disoluciones, Taylor[44] determinó que a un ángulo de 49.3° , la tensión superficial se encuentra en equilibrio con las fuerzas electrostáticas.

Hendricks [45], desarrolló la ecuación 2, con la cual es posible conocer la potencia requerida para que un flujo electrostático emerja de una gota de radio r , situada en el extremo de un capilar.

$$V = 300 \sqrt{20\pi} r$$

Ecuación 2

Cuando existe un incremento de voltaje, los iones que se encuentran en la gota (situada en el extremo del capilar) de disolución son obligados a situarse en la superficie. Como resultado, la gota comienza a alargarse en forma de cono, al que se le denomina *cono de Taylor*, como se muestra en la figura 1.10. Este fenómeno es importante para el electrohilado, ya que define los gradientes de rapidez en el proceso de formación de fibras. Cuando $V > V_c$, un chorro delgado de disolución polimérica emerge de la superficie del cono y viaja hacia el dispositivo colector.

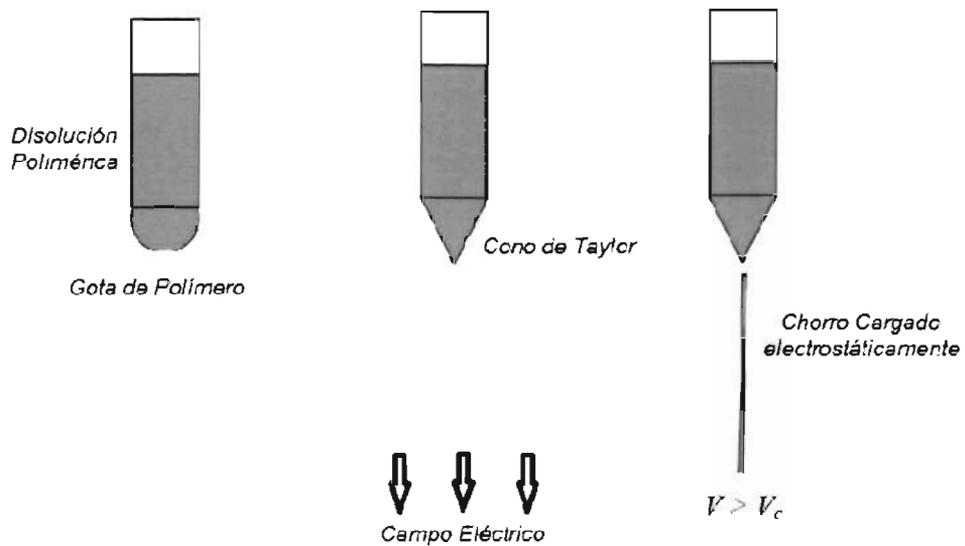


Figura 1.10.-Efecto del campo eléctrico cuando es aplicado a una disolución polimérica que se encuentra en un tubo capilar.

1.9 Parámetros que influyen en la morfología y diámetro de la fibra

Concentración del polímero

Uno de los parámetros más importante en el electrohilado es la concentración del polímero. Las concentraciones altas son más viscosas y pueden ser fácilmente electrohiladas, en contraste con una concentración baja. Las disoluciones con baja concentración son más propensas a producir glóbulos en las fibras, una concentración óptima produce fibras libres de éstos, como se observa en la figura 1.11a y 1.11b, respectivamente.

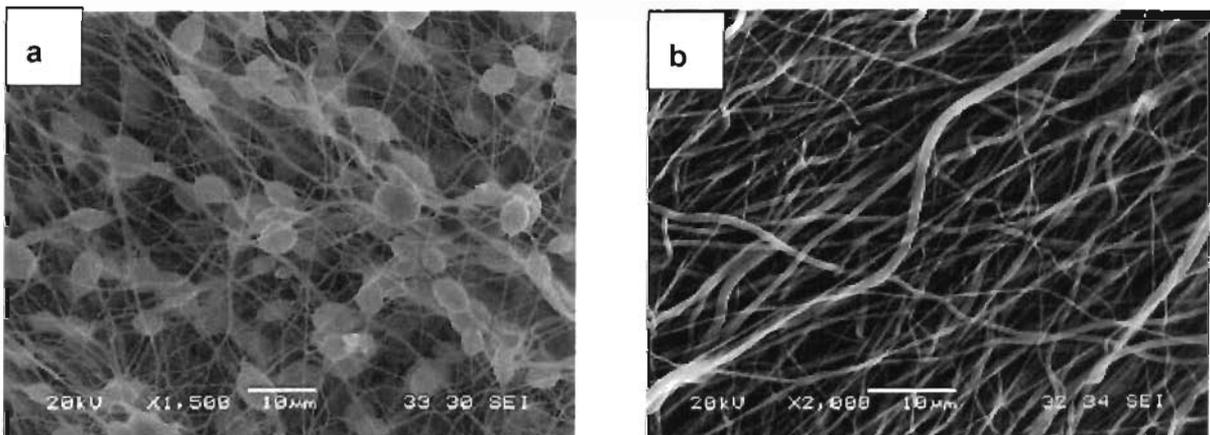


Figura 1.11.- a) fibras electrohiladas con una concentración de 8% en relación peso/volumen b) fibras electrohiladas con una concentración de 12.8% en relación peso/volumen.

La densidad de carga de la disolución polimérica es otra variable que afecta al tamaño y morfología de la fibra. La composición y presencia de fracciones conductivas (sal, partículas metálicas, nanotubos de carbono) en el disolvente afectan la densidad de carga de la disolución polimérica. Al incrementar la conductividad se crea una gran densidad de carga en la superficie de la disolución misma que es necesaria para la formación del cono de Taylor. Además, se genera mayor fuerza para estirar al polímero, convertirlo en fibras y atraerlas al colector.

Variables controlables

Las variables que se controlan con facilidad son: voltaje aplicado, diámetro del tubo capilar y la rapidez de flujo. Se requiere de cierto voltaje crítico para electrohilar, cuando se excede es posible que las nanofibras resulten con una superficie rugosa. El diámetro del tubo capilar también tiene efectos en la morfología de las fibras formadas. Los diámetros grandes tienden a producir glóbulos. Deitzel y colaboradores [46], demostraron que el electrohilado de polifosfaceno metilfenoxi sustituido (PNmPh) al 3%, usando una aguja calibre 25G se producen fibras con defectos, mientras que un calibre de 18 produce fibras lisas. La distancia entre la punta de la aguja y el colector tiene un efecto significativo sobre las fibras electrohiladas. Distancias cortas tienden a generar glóbulos.

Variables ambientales

Existen diferentes parámetros relacionados con el ambiente que influyen en el proceso de electrohilado, tales como: temperatura, humedad y flujo del aire. La mayoría de los estudios demuestran que existe una reducción en el diámetro de las fibras cuando el electrohilado se lleva a cabo a altas temperaturas. Esto se debe a que se reduce la viscosidad de la disolución polimérica.

Cuando existe un ambiente con alta humedad, se generan poros en las fibras, esto se debe a que existen fenómenos de evaporación durante el proceso de formación de las fibras.

En relación con la rapidez de flujo de la disolución, un flujo de salida menor podría ser benéfico, ya que el disolvente tendría más tiempo para evaporarse evitando la formación de defectos en las fibras.

1.10 importancia de los andamios electrohilados en la ingeniería de tejidos

En términos generales, el electrohilado es una técnica que sirve para generar fibras a escala nanométrica y micrométrica, éstas pueden ser usadas en aplicaciones biomédicas tales como: cicatrización de heridas, ingeniería de tejidos y liberación de fármacos. El área superficial de un andamio electrohilado proporciona un alto volumen de mallas fibrosas que aseguran la adhesión celular, esto permite una mayor proliferación de las células cultivadas; en comparación con una superficie plana, de dos dimensiones [47].

Los andamios promueven la actividad celular y se degradan cuando la formación de tejido está completa. En ciertas aplicaciones, es deseable que un andamio imite al tejido en cuanto a su estructura, incluyendo propiedades mecánicas y una porosidad apropiada para la migración y crecimiento celular.

Con el electrohilado se pueden obtener andamios con nanofibras que imitan la matriz extracelular (MEC) nativa. Además, posee la versatilidad para fabricar andamios con una variedad de propiedades mecánicas y porosidad óptima para su aplicación en la ingeniería de tejidos. También se han electrohilado compuestos que contienen mezclas de polímeros sintéticos y naturales para ser utilizados en andamios que requieren bioactividad, así como propiedades mecánicas adecuadas para la regeneración de tejido vascular, dérmico, neural y cartilaginoso. También se han electrohilado disoluciones poliméricas a base de polímero y cerámico, para aplicaciones relacionadas con la regeneración ósea [48].

En los tejidos y en los órganos, las células están rodeadas por una matriz extracelular (MEC), y es en esta matriz en donde las células realizan sus funciones, en conjunto con señales moleculares [49]. La MEC contiene fibras de entre 10-100 nm que están compuestas principalmente de colágeno, elastina y fibronectina. Debido a la alta proximidad de las fibras y la morfología de estas, son

capaces de proveer a las células la interacción con señales moleculares, y por lo tanto, controlar sus funciones, así como las propiedades del tejido.

La ingeniería de tejidos requiere andamios que imiten lo más posible la estructura y funciones de la MEC [50]. La técnica de electrohilado es un método versátil para crear andamios biodegradables con tamaño de fibras próximas a la MEC. De esta manera, las nanofibras fabricadas de PLLA, PCL PLGA, entre otros, proveen características topográficas necesarias para el desarrollo de la célula. Las nanofibras promueven la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

1.11 Propiedades mecánicas del andamio

Las propiedades mecánicas de un andamio son un aspecto importante durante su diseño. El propósito de un andamio es proporcionar una superficie para la adherencia celular, así como para mantener la estabilidad mecánica en el sitio del defecto en donde es implantado [33]

Un andamio debe cumplir con dos requisitos mecánicos: debe conservar integridad estructural y estabilidad cuando un médico lo manipula e implanta en el sitio del tejido lesionado del paciente. Después de la cirugía, la estructura en la zona del implante debe proporcionar soporte biomecánico suficiente durante el proceso de regeneración [51]. La bioestabilidad de algunos implantes depende de factores tales como la elasticidad [52].

Algunos biopolímeros, tales como agarosa y alginato, han sido utilizados para promover el crecimiento y la diferenciación celular, pero sus propiedades mecánicas pobres limitan su uso clínico. Por otro lado, los andamios elaborados con polímeros sintéticos, tales como el PLGA y la PCL, poseen propiedades mecánicas más efectivas.

Las propiedades mecánicas de un andamio están determinadas por factores intrínsecos (química del material), y por factores extrínsecos (tamaño de poro, porcentaje de porosidad). Las propiedades mecánicas de un andamio obtenido mediante electrohilado, quedan establecidas por las cadenas moleculares del polímero y por la morfología de las fibras.

La uretra está conformada por dos tipos de células principalmente: células de músculo suave y células epiteliales. El músculo posee una elasticidad pasiva y una contractilidad activa, proporcionada por la proteína estructural titina, y las proteínas miosina y actina, respectivamente. La titina puede alcanzar una deformación elástica de hasta ~ 150%, ésta característica mecánica permite soportar cargas variables aplicadas al tejido [53].

Muller y colaboradores [54], realizaron diferentes ensayos a tensión para determinar el Módulo Elástico de la uretra, obteniendo valores entre 15 kPa y 20kPa. Estos valores usualmente corresponden al tejido blando del cuerpo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La uretra es una estructura anatómica cilíndrica, que permite la excreción de orina (ambos géneros) y permite el paso del semen. En el hombre, la uretra es un tubo largo que corre dentro del pene, debido a esto, es más propensa a sufrir obstrucciones y constricciones, en contraste a la de la mujer, cuya uretra es más corta[15]. Las causas de los problemas uretrales pueden ser envejecimiento, enfermedad o lesión. Ellos incluyen:

- Estenosis uretral: estrechamiento de la uretra
- Uretritis: inflamación de la uretra, a veces causada por una infección.

Los síntomas de los trastornos de la uretra pueden ser dolor, dificultad para orinar, sangrado o secreción [1].

Además de las anomalías congénitas, otras enfermedades como, cáncer, trauma e infecciones, pueden producir daño a veces irreversible de diversos órganos del sistema genitourinario y eventualmente requerir reconstrucción quirúrgica.

Ante la falta de tejido urológico nativo muchas veces se utilizan diferentes tejidos para reparar distintos segmentos. La utilización de tejidos autólogos no urológicos para las reconstrucciones relacionadas con la uretra, aparecen como una mejor alternativa, sin embargo, éstos presentan un alto índice de posibles efectos adversos tales como: alteraciones metabólicas, infecciones, perforaciones y posibilidad de malignización en algunos pacientes [1].

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la utilización de tejido genital vecino es la primera elección de tratamiento que ofrece mejores resultados. Sin embargo, en defectos uretrales extensos, este tejido no es suficiente y se requiere la utilización de tejido extragenital [55]. La ingeniería de tejidos puede ayudar a resolver los problemas que se presentan con el uso de injertos de tejido no urológico, mediante la utilización de soportes tridimensionales: andamios.

HIPÓTESIS

Mediante la mezcla de los polímeros PLGA y PCL se obtendrá un andamio con características necesarias para la ingeniería de tejidos de la uretra.

OBJETIVOS

Objetivo general

Elaboración de un andamio tubular de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y policaprolactona (PCL) mediante la técnica de electrohilado, para su uso en la ingeniería de tejidos de la uretra.

Objetivos específicos

- Evaluar diferentes parámetros en la técnica de electrohilado para la obtención de un andamio tubular de PLGA y PCL
- Evaluar las diferentes concentraciones PLGA y PCL, obteniendo así, una óptima para el electrohilado
- Variar los parámetros del electrohilado para obtener diferentes características de los andamios.
- Obtener andamios que posean una alta superficie de contacto.
- Lograr la reproducibilidad de obtención de andamios tubulares de PLGA y PCL.
- Caracterización fisicoquímica del andamio.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se expone la metodología seguida para la obtención de un andamio tubular fabricado de PLGA/PCL. Se realizaron variaciones de concentración del polímero en la solución hasta llegar a la óptima relación. De igual forma, se dan a conocer los parámetros utilizados en la máquina de electrohilado, tales como: variaciones de voltaje, flujo de salida, rapidez de giro del cilindro, distancia aguja-colector y calibre de la aguja.

El disolvente es una variable clave para lograr el electrohilado de la mezcla de polímeros, por esta razón, primero se realizaron pruebas para cada polímero por separado, de esta manera, se eligió el mejor disolvente para el PLGA y para la PCL. Se utilizó una variedad de mezclas, para tener un mejor control e identificación de ellas, se les ha asignado una letra.

Habiendo optimizado las variables de la máquina y la concentración de polímero se procedió a mezclar ambos a diferentes porcentajes, así, fue posible obtener microfibras con una morfología ideal para la ingeniería de tejidos [4].

2.1 Disoluciones

Disolución PCL

Para esta disolución se utilizó policaprolactona en forma de *pellets* (Perstorp, Estados Unidos); posee una masa molecular de 80000, Tm de 58°C-60°C y Tg - 60°C. Los disolventes utilizados fueron diclorometano anhidro $\geq 99.8\%$, N-N dimetilformamida anhidra 99.8% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y Cloroformo grado reactivo (JALMEK, México).

Se utilizaron dos sistemas para disolver a la PCL, el primero está conformado por los disolventes dimeclorometano (DCM) y dimetilformamida (DMF) [56-58]; para el segundo sistema de disolventes se utilizó el cloroformo, DMF y etanol [59, 60].

Varias fracciones en peso de PCL (8%,10%,12%,) en relación masa/volumen) fueron disueltos en DCM:DMF (20:80, 30:70) por 30 min a temperatura ambiente (30°C) [61], tal como se muestra en la tabla 1 y 2.

Tabla 1.- Variaciones de masa de PCL, disueltos en DCM:DMF(20:80).

DCM (ml)	DMF (ml)	PCL (g)	Letra asignada a la disolución polimérica
2	8	0.8	A
2	8	1	B
2	8	1.2	C

Tabla 2.- Variaciones de masa de PCL, disueltos en DCM:DMF (30:70)

DCM (ml)	DMF (ml)	PCL (g)	Letra asignada a la disolución polimérica
3	7	0.8	D
3	7	1	E
3	7	1.2	F

Para el sistema conformado por la PCL, cloroformo, dimetilformamida y etanol se realizaron las siguientes mezclas.

Mezcla G: 2g de PCL fueron disueltos en 13.5 ml de cloroformo durante 40 min, después, fueron agregados 2.1 ml de DMF a la disolución de PCL y cloroformo.

Mezcla H: 2g de PCL se disolvieron en 13.5 ml de cloroformo durante 40 min, posteriormente fueron agregados 2.1 ml de etanol grado reactivo a la disolución de PCL y cloroformo.

El resumen de ambas disoluciones se observa en la tabla 3

Tabla 3.- PCL disuelto en diferentes porcentajes de cloroformo y etanol

PCL	cloroformo	etanol	DMF	Letra asignada a la disolución polimérica
2g	13.5 ml	-	2.1 ml	G
2g	13.5 ml	2.1 ml	-	H

Disolución PLGA

Para esta disolución se utilizó Poli(D, L-láctico-co-glicólico), con una relación de 75:25 láctico:glicólico, masa molecular de 76000-115000 y Tg de 49°C-55°C (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Los disolventes utilizados fueron diclorometano anhidro $\geq 99.8\%$, y N-N dimetilformamida anhidra 99.8% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

La concentración de las soluciones se basaron en trabajos de Baker y colaboradores [62], estas mezclas fueron preparadas a temperatura ambiente (30°C) durante 1 h.

La relación entre disolventes y PLGA se muestra en la tabla 4

Tabla 4.- relación de disolventes usados para el electrohilado del PLGA

DCM (ml)	DMF (ml)	PLGA (g)	Letra asignada a la disolución polimérica
4.5	-	0.77	I
1.5	1.5	1	J

Disolución PLGA/PCL

PLGA al 33.3% fue disuelto en DMF:DCM (50:50) durante 1 h a temperatura ambiente (30°C) y PCL al 12.82% fue disuelto en cloroformo:etanol (86.5:13.5) durante 40 min a temperatura ambiente (30°C).

La disolución de PLGA que se muestra en la figura 2.1 fue mezclada con la del PCL a dos porcentajes diferentes a temperatura ambiente (30°C), como se muestra en la tabla 5.



Figura 12.-Mezclado de PCL con 20% y 30% de PLGA

Tabla 5.- Relación de valores de porcentajes de PLGA agregadas a la disolución de PCL

	Porcentaje en la disolución	Tiempo de mezclado	Letra asignada a la disolución polimérica
PLGA	20%,	24 horas	K
	30%	24 horas	L

2.2 Construcción del andamio tubular

En el diagrama esquemático de la figura 2.2 se expone el procedimiento para la preparación del andamio tubular.

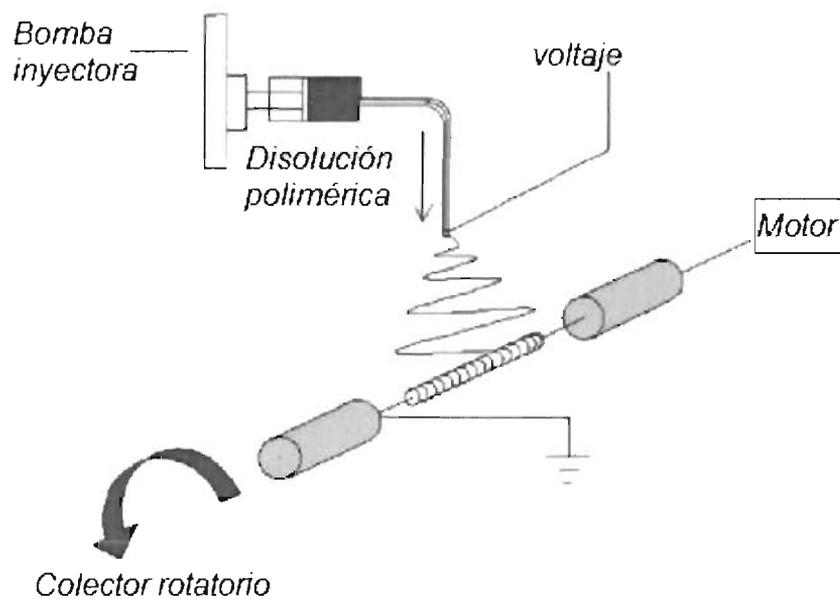


Figura 13 .-Diagrama esquemático del proceso de electrohilado

En la figura 2.3, se muestra una fotografía del equipo utilizado para el electrohilado de las disoluciones poliméricas.



Figura 14.-fotografía del dispositivo para electrohilado

Un cilindro de diámetro pequeño (5 mm de diámetro) se recubre con teflón, esto servirá para que al final del proceso el andamio se pueda retirar con mayor facilidad.

5 ml de la mezcla de PLGA/PCL fueron colocados en una jeringa con aguja de 0.5 mm de diámetro, que posteriormente fue montada a la bomba inyectora (fue purgada antes de funcionar).

Ya que los parámetros a variar en la máquina de electrohilado son numerosos, todos éstos se mantuvieron constantes para electrohilar cada polímero, asignando valores reportados en la literatura [7, 59]. Se puso especial atención en la concentración de la disolución, como señala Sánchez y Rodríguez [60]. El conjugado de variables se observa en la tabla 6.

Tabla 6.- Relación de parámetros aplicados a la máquina de electrohilado para la obtención de andamios tubulares.

	Disolución polimérica	Voltaje (kv)	Distancia al colector	Rapidez de inyección	Diámetro interior de la aguja
PCL	A	18	15	0.4	0.5
	B	18	15	0.4	0.5
	C	18	15	0.4	0.5
	D	18	15	0.4	0.5
	E	18	15	0.4	0.5
	F	18	15	0.4	0.5
	G	18	15	0.4	0.5
	H	18	15	0.4	0.5
PLGA	I	20	15	3	0.5
	J	20	15	3	0.5
PLGA/PCL	K	22	15	0.5	0.5
	L	22	15	0.5	0.5

2.3 Caracterización del andamio tubular

Morfología

La estructura, el diámetro y detalles morfológicos de las fibras, fueron observados con un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca JEOL JSM-6360 LV.

Las muestras tuvieron dimensiones de 0.50 cm², algunas muestras solo fueron analizadas con el microscopio óptico, debido a que a baja resolución ya se observaban defectos notorios en las fibras, lo cual, hacia innecesario analizarlas por el MEB. El diámetro promedio de las fibras electrohiladas, se determinó con las imágenes del MEB por medio del software Image-j.

Análisis FT-IR

Para determinar si el tipo de degradación que se llevaba a cabo era hidrólisis (cuando el andamio era sumergido en PBS), las fibras electrohiladas de PCL, PLGA y PCL/PLGA fueron caracterizadas por medio de la técnica de reflexión total atenuada (RTA) con un cristal de Zirconio-Selenio en un intervalo de 500 a 4000 cm⁻¹, analizando un total de 60 escaneos.

Determinación del grado hidrofiliidad del andamio mediante ángulo de contacto

En un medidor de ángulo de contacto Tantec's *Cam Plus Micro* se colocó una muestra de 7 cm², para después aplicarle una gota de 10 µL. Se realizaron 8 mediciones para cada andamio, las fotografías fueron tomadas a los 5 s después de haber depositado la gota. El equipo utilizado se muestra en la figura 2.4.

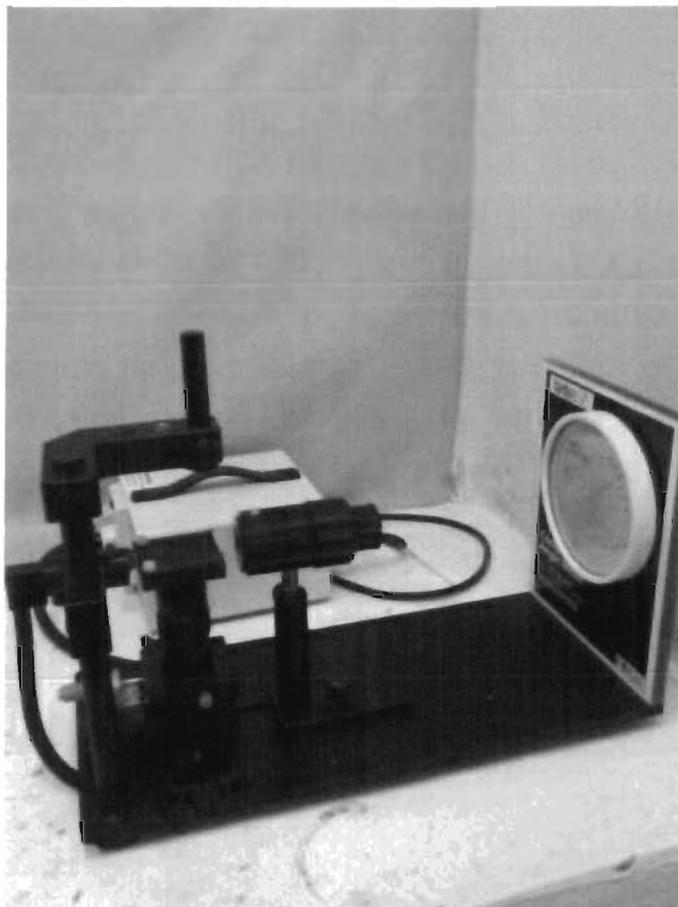


Figura 15.- Medidor de ángulo de contacto Tantec Cam Plus Micro

Propiedades mecánicas del andamio tubular

Un prerequisite importante para el uso de andamios hechos mediante electrohilado para aplicaciones biomédicas son propiedades mecánicas adecuadas. Se ha demostrado que un estímulo mediante el esfuerzo y la deformación de las microfibras y nanofibras influyen en la migración, proliferación y diferenciación celular [63].

Las propiedades mecánicas fueron determinadas siguiendo el procedimiento utilizado por Loung [64], para ensayos a tensión de membranas electrohiladas. La rapidez de deformación fue de 5mm/min. Esta prueba se efectuó mediante la máquina de ensayos Mini Shimadzu.

La probeta con dimensiones de 40 mm x 10 mm x 0.3 mm fue colocada en un marco hecho de cartón; esta sujeción permitía una mejor manipulación de la probeta en la máquina de ensayos. El ensayo realizado, así como las dimensiones de la probeta se muestran en la figura 2.5.

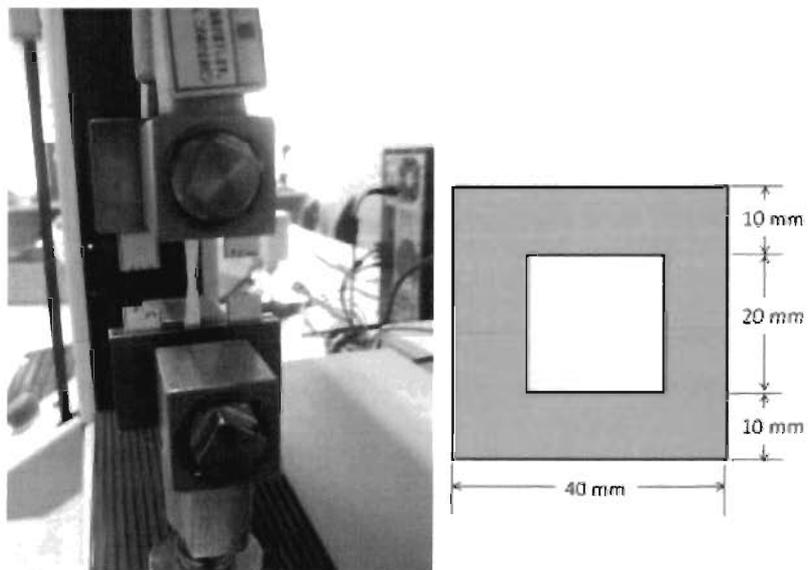


Figura 16.-Dimensiones utilizadas para las probetas.

Degradación “in vitro”

Para los estudios de degradación *in vitro*, el andamio PLGA:PCL (20:80) fue seccionado (5mm x 5 mm) (n=5) . Cada muestra fue sumergida en viales de laboratorio con 10 ml de solución PBS (*Phosphate Buffer Solution, pH 7.4, sin bactericida*). Los pocillos fueron colocados a 37 °C en una incubadora y la solución PBS fue reemplazada cada 7 días, durante 5 semanas. El procedimiento se muestra en la figura 2.6.

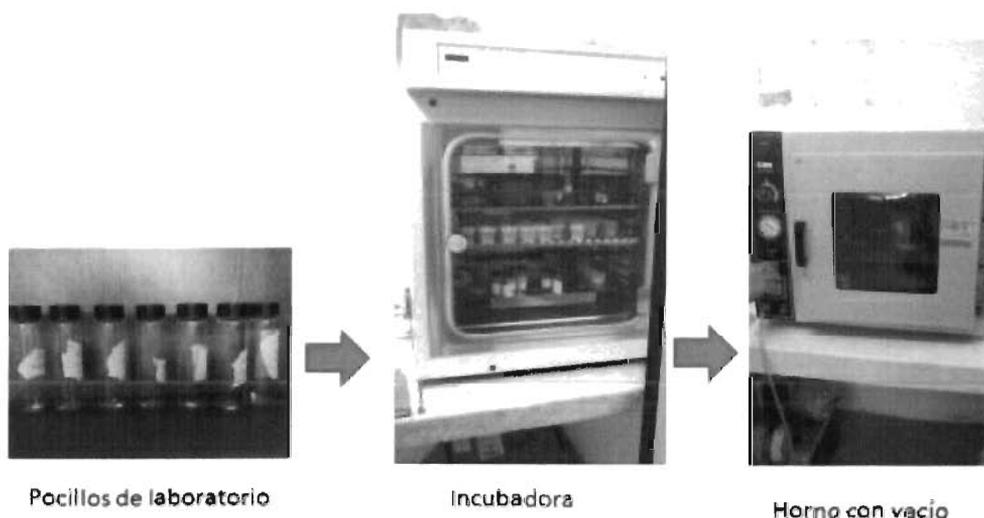


Figura 17.- Procedimiento realizado para los estudios de degradación del andamio

Cada muestra retirada de la solución PBS fue secada en un horno al vacío a temperatura ambiente por 12 horas, posteriormente analizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido.

La pérdida de masa de cada muestra de andamio fue determinada mediante la ecuación 3.

$$\text{Porcentaje de pérdida de masa} = \frac{M - M'}{M} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde M representa a la masa final y M a la masa inicial, medidas mediante una balanza electrónica.

Análisis DSC

Mediante un análisis DSC es posible determinar las temperaturas características de transformación o de transición, tales como: transición vítrea, cristalización, transformaciones poliamórficas, fusión, ebullición, sublimación, entre otras [65].

Una forma de conocer el grado de compatibilidad entre dos o más disoluciones es mediante una prueba DSC. Si la mezcla analizada muestra cambios de capacidad calorífica durante la transición vítrea significa que el sistema pudiera presentar compatibilidades [66]. Otro de los métodos para determinar el comportamiento de una mezcla de polímeros es comparando el grado de cristalinidad entre el polímero semicristalino y el grado cristalinidad cuando es mezclado con otro. Si existe una disminución del porcentaje de cristalinidad significa que existen fenómenos de compatibilidad entre las zonas amorfas del sistema [67].

Para determinar el porcentaje de cristalinidad del polímero, se utilizó la ecuación 4.

$$X = \frac{\Delta H}{\Delta H'} \quad \text{Ecuación 4}$$

En donde ΔH representa la entalpía de fusión del andamio de PCL y $\Delta H'$ la entalpía del polímero considerado 100% cristalino.

Para determinar el porcentaje de cristalización en la mezcla de PLGA:PCL (20:80) se utilizó la ecuación 5.

$$X = \frac{\Delta H}{\Delta H'W}$$

Ecuación 5

En donde ΔH representa la entalpía de fusión del andamio y $\Delta H'$ representa la entalpía de fusión de la PCL con 100% de cristalinidad, W es la fracción de PCL en la mezcla.

En el CICY existe un calorímetro diferencial de barrido modelo Perkin Elmer, que fue utilizado para las pruebas. Los parámetros utilizados para el análisis térmico se encuentran en la tabla 7. En la figura 2.7 se muestra el equipo DSC utilizado.

Tabla 7.- Parámetros utilizados para el análisis DSC

Andamios	Intervalo de temperaturas	Masa (mg)	Flujo de calor °C/min
PCL	0 °C-65 °C	2.5	10
PLGA:PCL	0 °C-80 °C	2.6	10



Figura 18.- Dispositivo utilizado para los estudios DSC

CAPÍTULO III. Resultados y Discusión

3.1 Andamios tubulares de PCL

Las dimensiones de los andamios tubulares electrohilados fueron establecidas mediante un instrumento de medición Vernier y presentaron los siguientes valores: espesor de 1 mm, 7 cm de longitud y un diámetro de 5 mm; presentaban una superficie rugosa, eran flexibles y de consistencia blanda. En la figura 3.1 se muestra un andamio tubular obtenido mediante electrohilado.

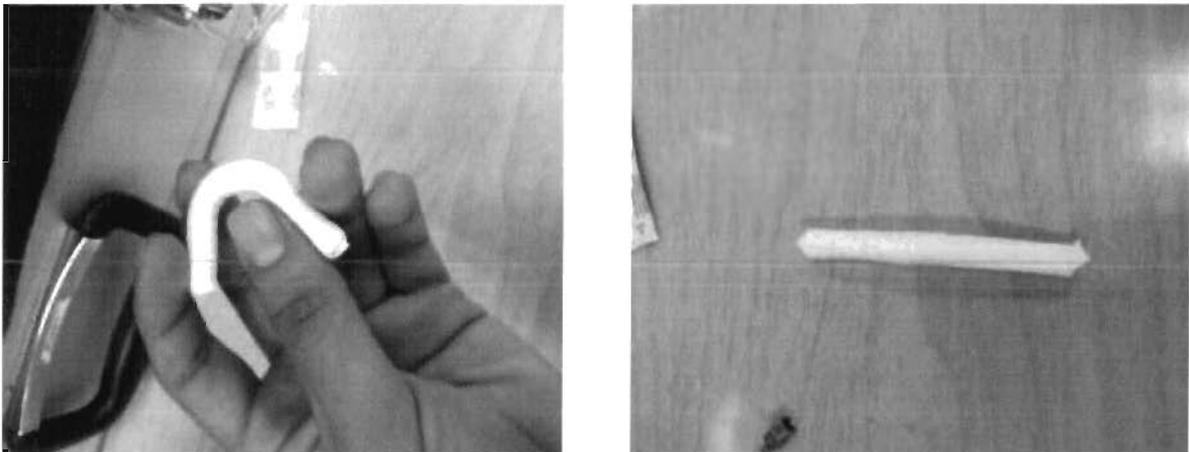


Figura 19.- Fotografía de un andamio tubular hecho con la técnica de electrohilado

3.2 Análisis de las micrografías del MEB

Andamio tubular de PCL

En la figura 3.2 se muestran las micrografías de las disoluciones A, B y C electrohiladas; en ellas se aprecia gran cantidad de glóbulos, cuya formación aún no ha sido establecido claramente, estos defectos se relacionan con la tensión superficial existente en la disolución polimérica, ya que ésta intenta reducir el área superficial por unidad de masa, cambiando los chorros por esferas, [60].

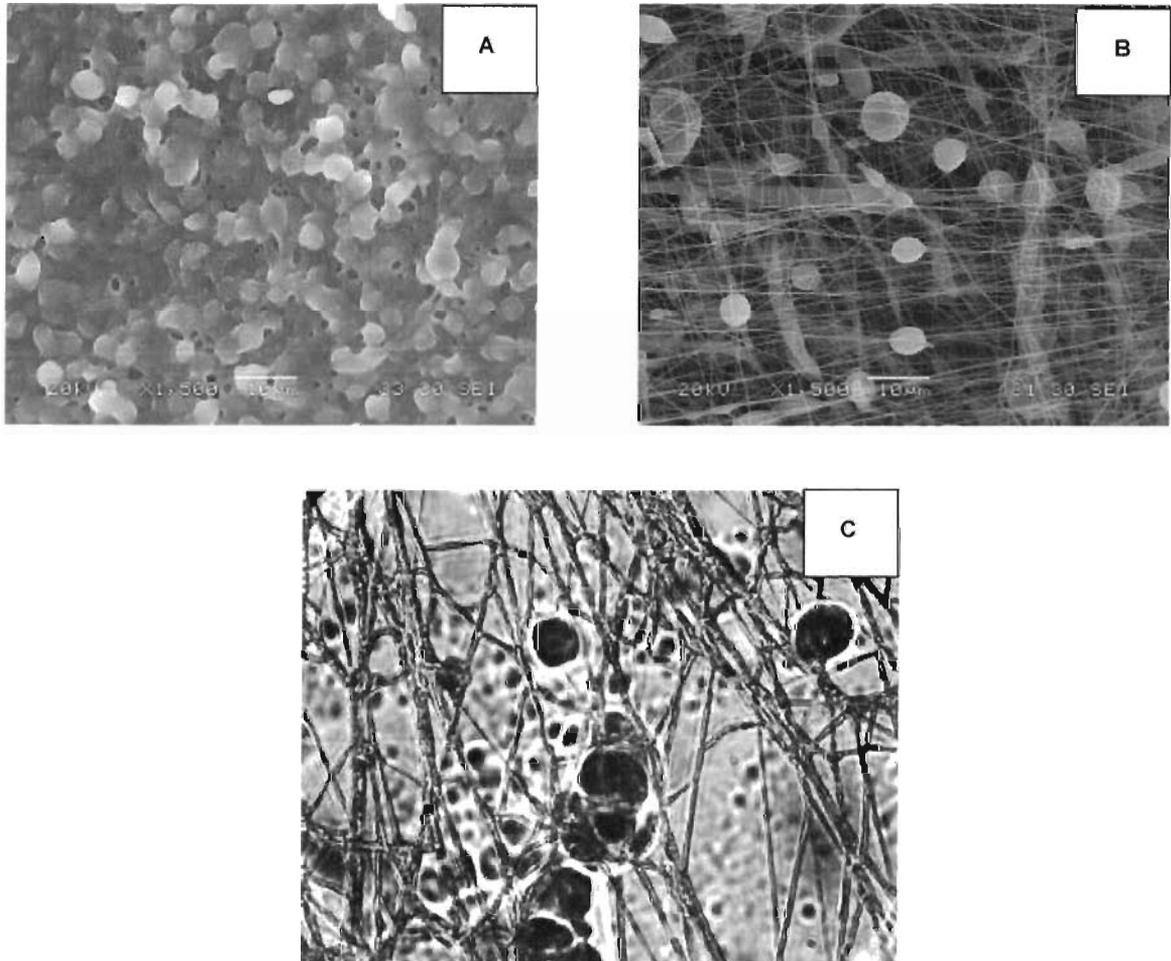


Figura 20.-Micrografías de los andamios hechos de las disoluciones A, B y C. A y B son imágenes MEB y C es una imagen captada con el microscopio óptico (X40).

La disolución A no presenta fibras, debido a una baja concentración del polímero en los disolventes [68], B presenta fibras pero con gran cantidad de glóbulos que median aproximadamente de $7\mu\text{m}$ a $10\mu\text{m}$, de igual manera, puede observarse que la disolución C también presenta glóbulos, por lo que estos dos últimos sistemas de disoluciones fueron descartados para la construcción del andamio tubular.

Al aumentar la concentración del polímero, utilizando los mismos disolventes se obtuvieron las fibras mostradas en las micrografías de la figura 3.3.

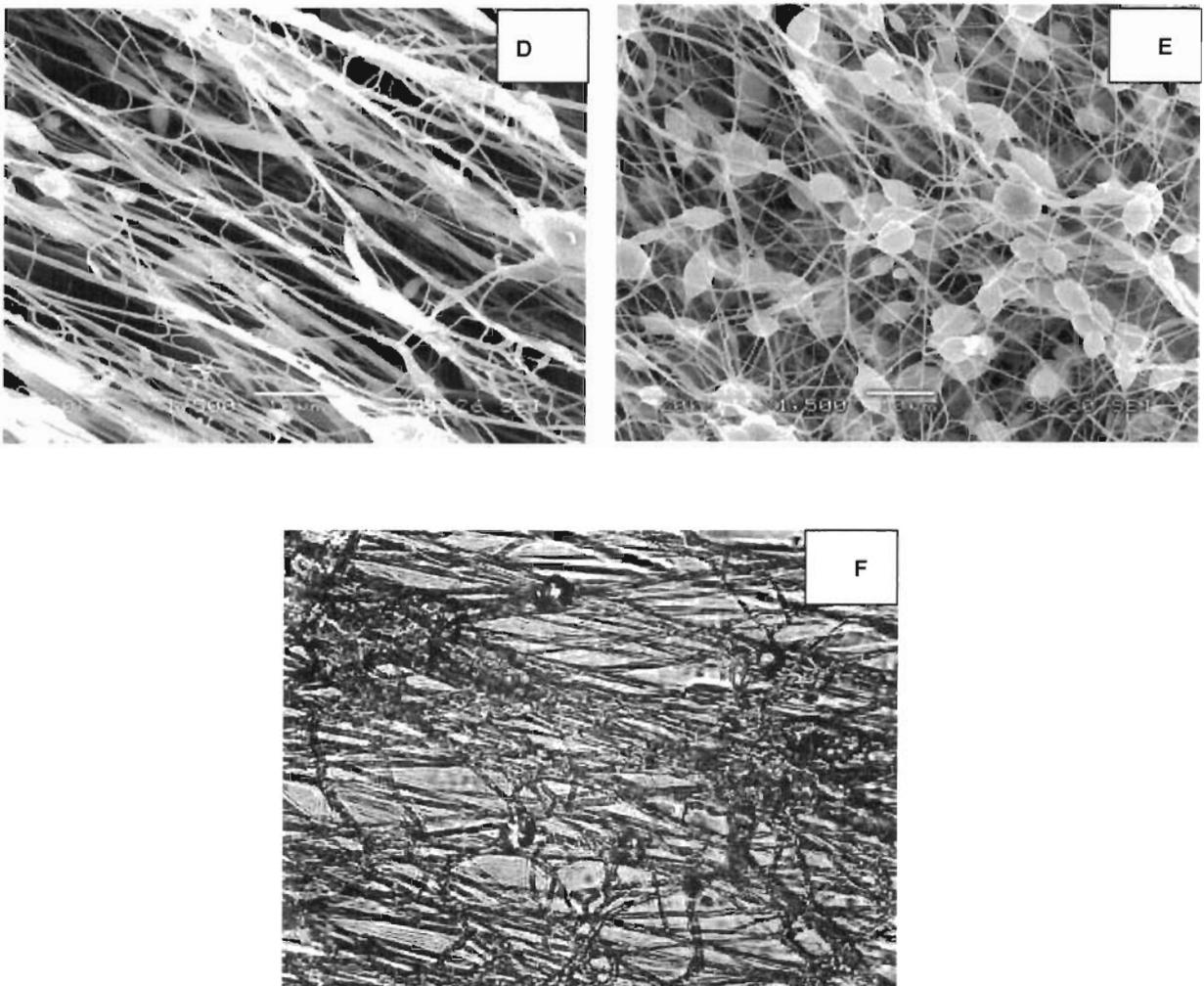


Figura 21.- Micrografías de las disoluciones D, E, F. La disolución F fue vista mediante un microscopio óptico, utilizando una ampliación de 40X.

Las disoluciones hechas con DCM:DMF(30:70) también presentaron glóbulos, por lo que ambos disolventes también fueron descartados.

Modificando los disolventes y la concentración de polímero, se obtuvieron fibras de PCL, como se observan en la figura 3.4.

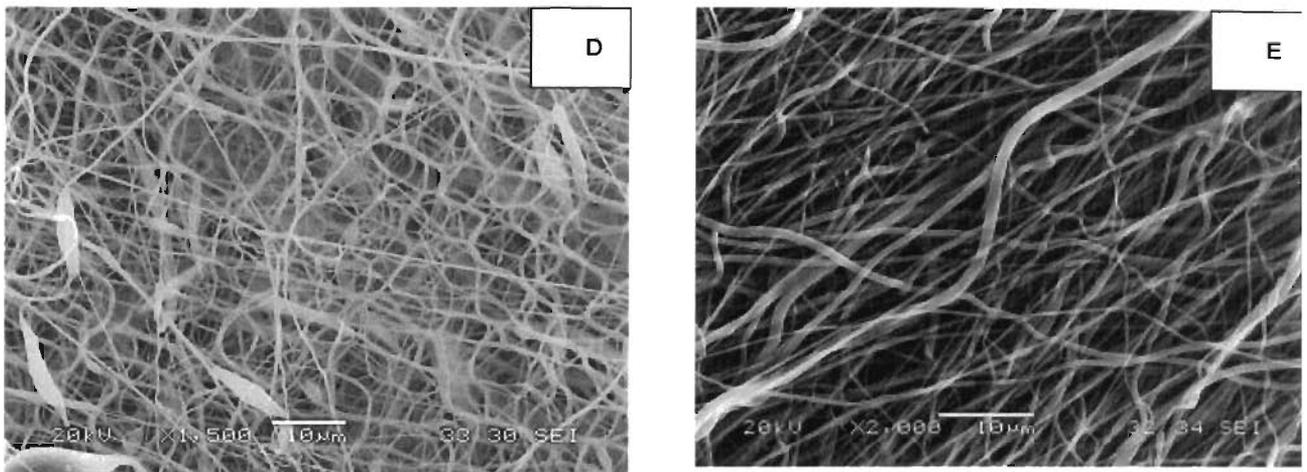


Figura 22.- Micrografías MEB de las muestras D y E

La mezcla D electrohilada presenta fibras con pocos glóbulos, la mezcla E no presenta glóbulos y se observa cierta alineación debido a la rapidez de giro del cilindro. Habiendo obteniendo estos resultados, las demás disoluciones se descartaron y se eligió la mezcla E.

Andamios tubulares PLGA

Existieron complicaciones para retirar el andamio del cilindro rotatorio, ya que por su naturaleza, es un polímero frágil. El andamio resultante elaborado a partir de PLGA, medía 5 cm de longitud, un espesor de 0.2 mm aproximadamente y con superficie lisa, dichas mediciones fueron realizadas con un instrumento Vernier. Las muestras fueron analizadas con el microscopio óptico, las fotografías se muestran en la figura 3.5.

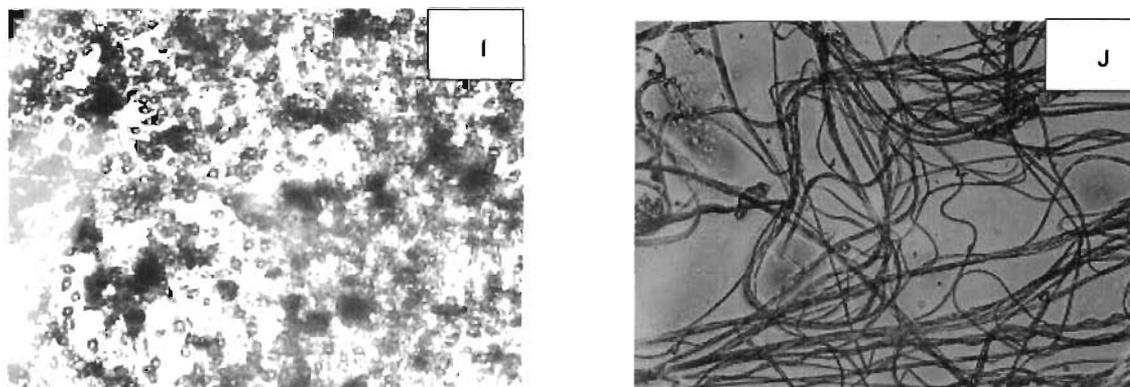


Figura 23.- Andamios de PLGA vistos con el microscopio óptico

La mezcla I, no mostró fibras pero si gran cantidad de glóbulos, la mezcla J presentó fibras con algunos glóbulos, por esta razón la disolución polimérica J fue la elegida para mezclar con la disolución de policaprolactona.

Andamios tubulares PLGA/PCL

Mezcla K

En la figura 3.6 se muestran las micrografías de los andamios obtenidos con la mezcla K, PLGA:PCL (20:80).

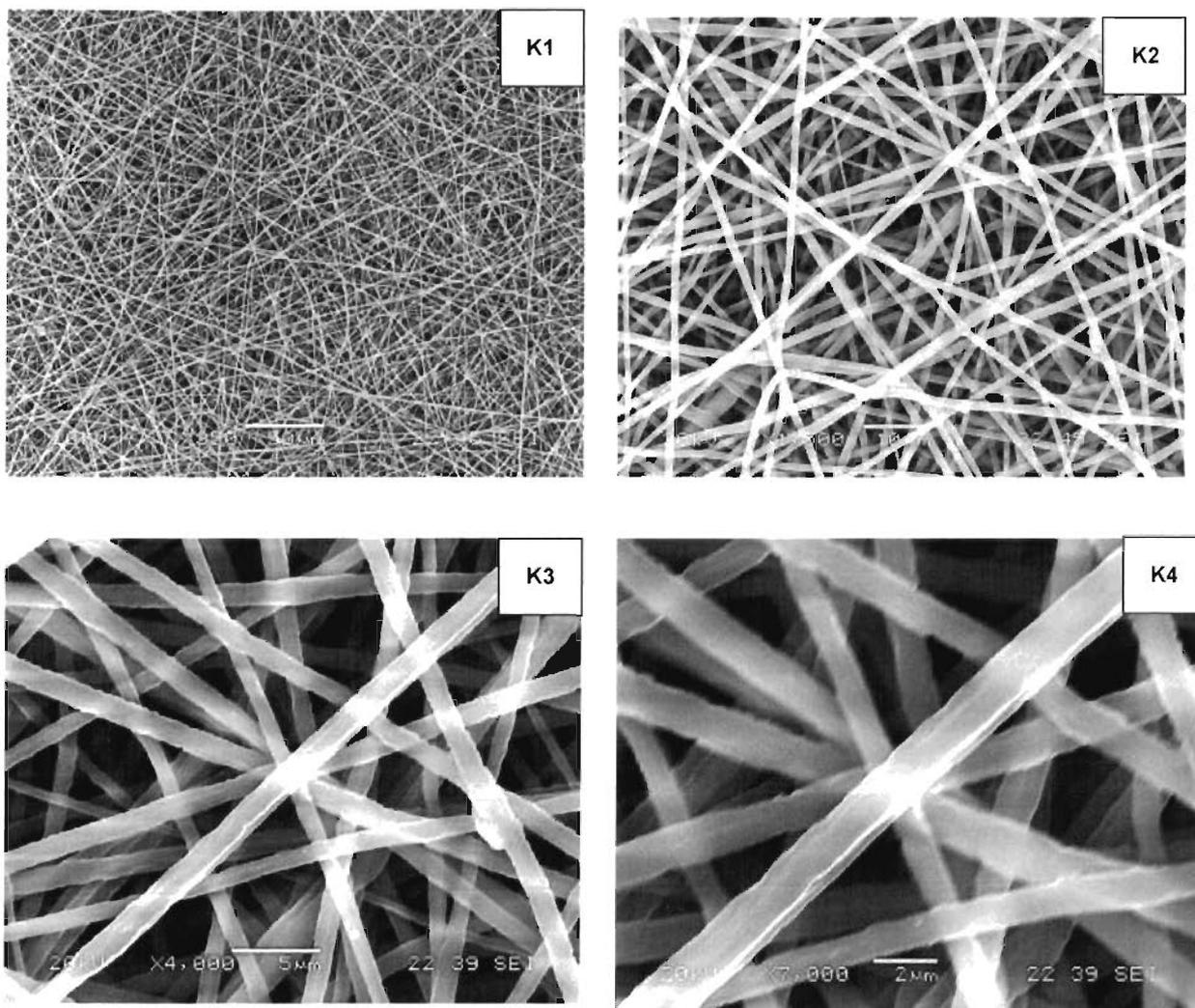


Figura 24.- Micrografías del andamio elaborado de la mezcla K

En el andamio de la muestra K, se pueden apreciar fibras con diámetros aproximadamente de 1 μm , además de presentar una alta porosidad.

En la micrografía K3, pueden observarse los poros formados por las fibras, mismos que sirven para alojar a la célula y ésta se pueda desarrollar para la formación de tejido, tal como señala Stevens [69]. Las fibras obtenidas tienen una morfología más definida en comparación con las reportadas por Hieb y colaboradores [7].

En la figura 3.7 se observa un andamio de PLGA:PCL (20:80) cuyo diámetro interno es de 3 mm, para lograr disminuir el diámetro del andamio tubular fue necesaria la fabricación de un cilindro de acero inoxidable con un diámetro también de 3 mm.

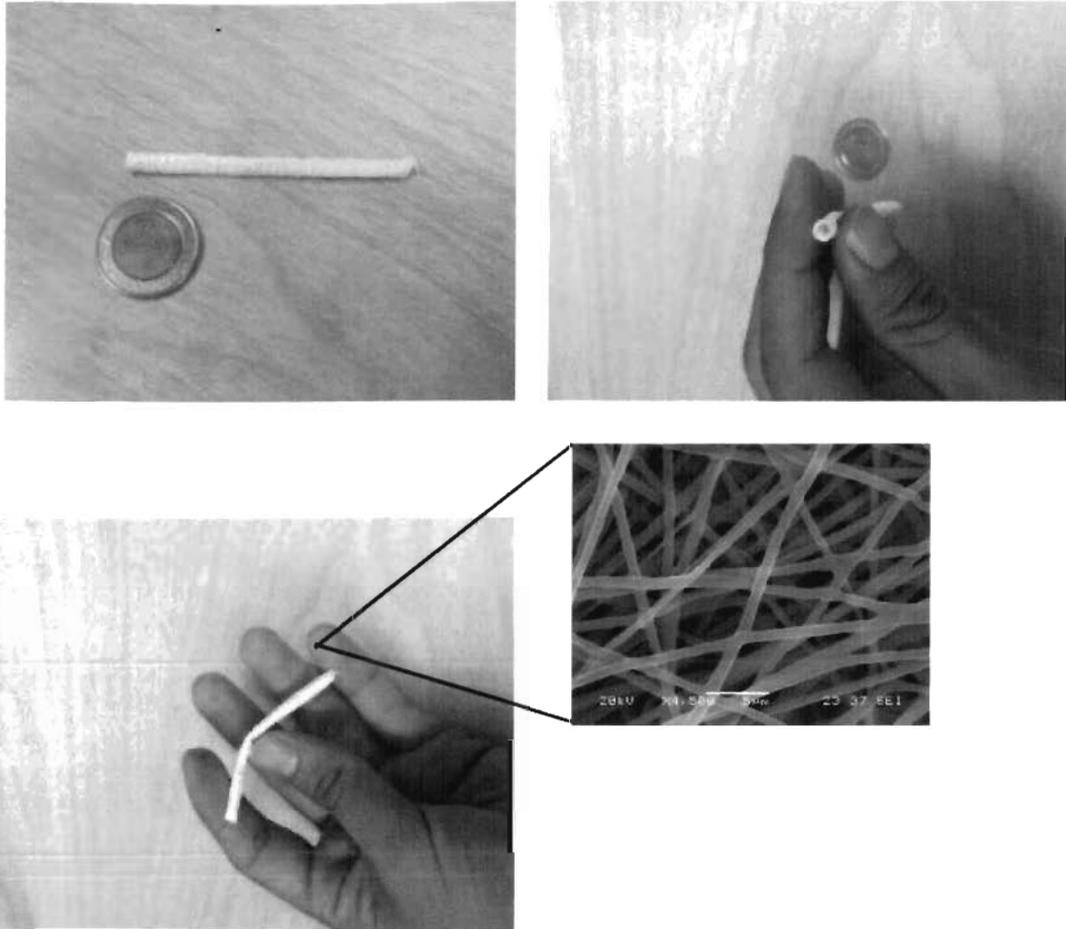


Figura 25.- Fotografías del andamio PLGA:PCL (20:80) con diámetro interno de 3 mm

Como se puede observar en la figura 3.8, la disminución del diámetro del cilindro no afecta a las fibras, de esta manera, es posible variar esta medida sin morfologías diferentes.

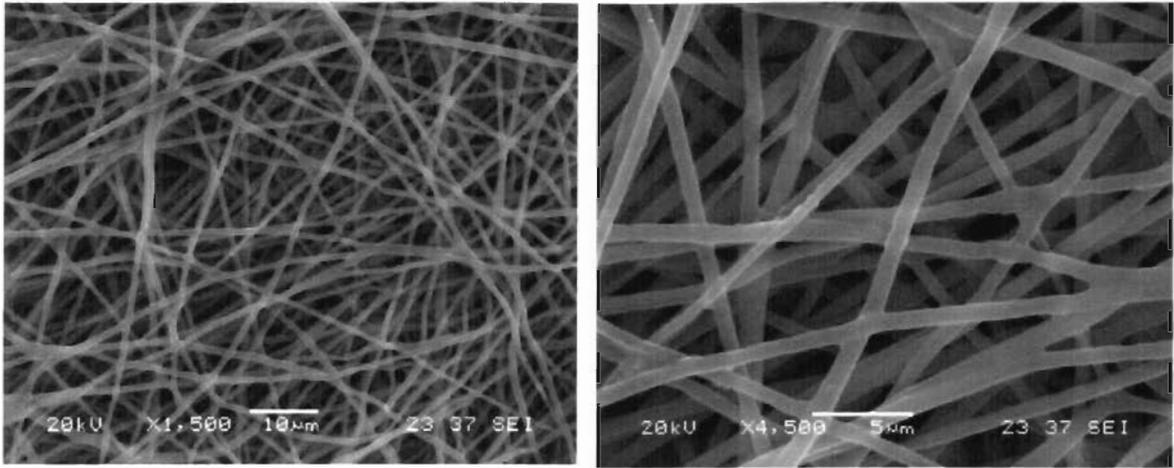


Figura 26.- Micrografías observadas mediante el MEB del andamio tubular de PLGA:PCL (20:80) con un diámetro interno de 3 mm.

Mezcla L

Las fibras obtenidas de PLGA:PCL (30:70) se observan en la micrografía de la figura 3.9.

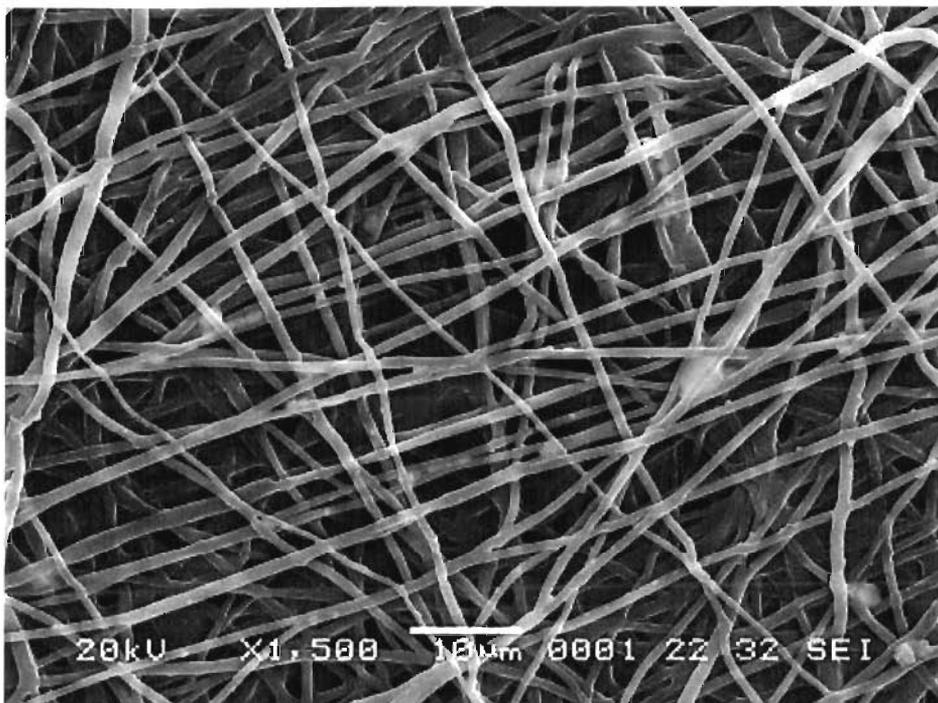


Figura 27.- Micrografía SEM del andamio de PLGA:PCL(30:70)

Tal como señala Hieb [7], un exceso de PLGA puede resultar perjudicial para las fibras, probablemente, debido a que cuando las fibras son depositadas en el cilindro colector, aún contienen residuos de disolvente.

3.3 Medición de los diámetros de las nanofibras

Para la medición de los diámetros, una micrografía de MEB fue dividida en 4 cuadrantes, midiendo 25 fibras en cada uno como se muestra en la figura 3.10. Para determinar el diámetro de los poros promedio, se trazaron círculos entre 3 fibras, siendo 5 en cada cuadrante. En la tabla 9 se muestran los valores estadísticos que fueron determinados.

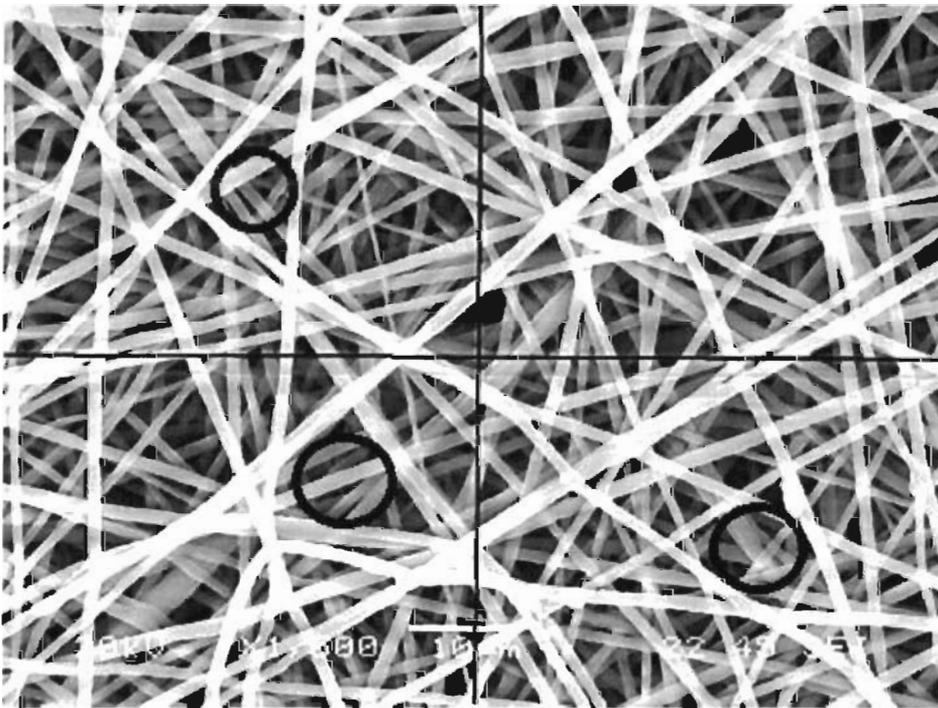


Figura 28.- La imagen fue dividida en 4 cuadrantes, para un mejor análisis estadístico

Tabla 8.-Valores estadísticos que fueron determinados para los andamios

Muestra	Número de fibras	Media (μm)	Promedio (μm)	Desv. Estándar (μm)	Tamaño de poro promedio (μm)	Tamaño de fibra Mín. (μm)	Tamaño de fibra Máx. (μm)
K	100	1.192	1.200	0.31	7.5	0.55	1.8

3.4 Medición del ángulo de contacto

Binulal [70] señala que el ángulo de contacto de la policaprolactona tiene un valor de 143° , los ángulos de contacto de los andamios electrohilados de la mezcla K y L presentaron un ángulo de contacto de 84° y 82° respectivamente. Tama e Ikada [71] realizaron pruebas de adhesión con fibroblastos en superficies con diferentes grados de hidrofiliidad, llegando a la conclusión de que éstos mostraban una mayor adhesión en materiales que presentaban ángulos de contacto de entre 60° y 80° . En la figura 3.11 se observan los resultados obtenidos con los andamios analizados.

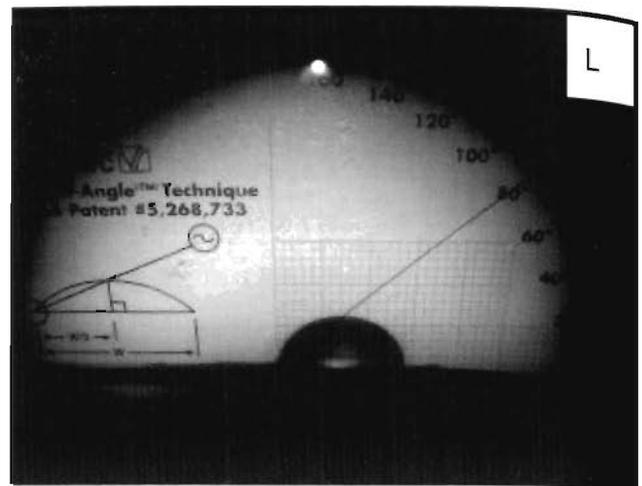
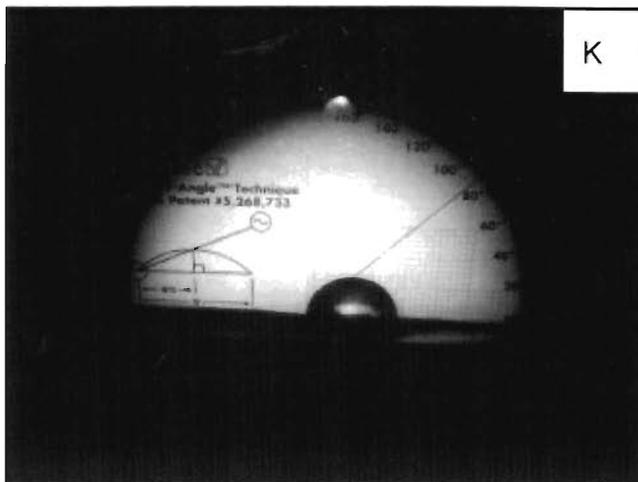


Figura 29.- Fotografías del ángulo de contacto, pertenecientes a los andamios electrohilados de las mezclas K y L

El grado de hidrofiliadad de un andamio es un factor importante para la adhesión celular. Añadiendo un mayor porcentaje de PLGA en el andamio se consigue un menor ángulo de contacto. El copolímero utilizado (PLGA) tiene una relación de 75:25 (ácido láctico:ácido glicólico), dado que el ácido glicólico es el monómero que aporta las propiedades hidrofílicas, una mayor presencia de éste en el copolímero mejoraría estas propiedades en el andamio.

3.5 Propiedades mecánicas del andamio

El PLGA es un material rígido, cuyo módulo elástico cuando es electrohilado es de 323.15 MPa [51]; en la gráfica de la figura 3.12 se observa el diagrama esfuerzo-deformación. A partir de estas curvas se realizó el cálculo para determinar el módulo elástico del andamio. La PCL electrohilada posee un Módulo Elástico de 1.8 MPa y el andamio electrohilado de PCL y PLGA mostró un Módulo Elástico de 11.31 MPa.

Los valores correspondientes al módulo elástico del tejido uretral se encuentran entre 10 kPa y 20kPa [54]. El módulo elástico del andamio permite satisfacer las propiedades mecánicas demandadas por el tejido uretral [28].

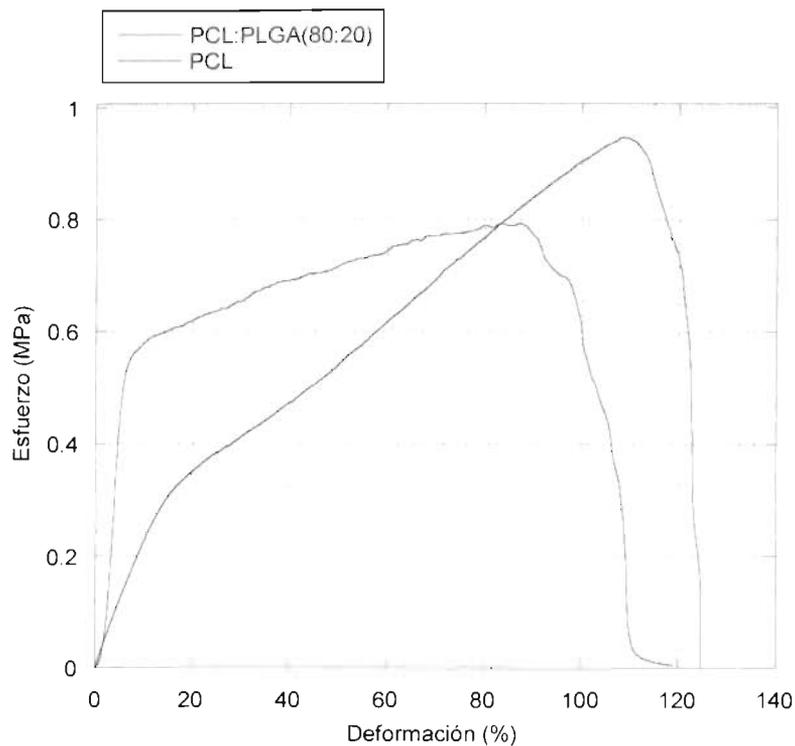


Figura 30.- Diagrama esfuerzo-deformación del andamio (rojo) y la PCL (azul).

3.6.-Estudios de degradación.

Existen dos formas principales por las cuales, las cadenas de los polímeros pueden romperse: pasivamente por hidrólisis o activamente por reacción enzimática [72]. Para la mayoría de los materiales biodegradables, especialmente los polímeros artificiales, la hidrólisis es el mecanismo más importante de degradación, ya que el agua penetra en el polímero y ocasiona la formación de oligómeros y monómeros.

Mediante la introducción de un segundo monómero en la cadena polimérica, muchas de las propiedades del polímero original pueden ser influenciadas, tales como cristalinidad, la temperatura de transición vítrea o el tiempo de degradación. Para el copolímero PLGA la rapidez de degradación puede ser controlada con el aumento o disminución en el contenido de ácido glicólico [73].

La hidrólisis es una reacción bimolecular en la que el agua y el grupo funcional que posee el enlace lábil están involucrados[74]. Los polímeros hidrófilos ocupan grandes cantidades de agua, esto provoca un aumento en sus tasas de degradación correspondientes. Se ha reportado que para suturas quirúrgicas fabricadas a base de PLGA la resistencia a la rotura va a depender marcadamente del pH del medio en donde fue realizado el proceso de degradación. En la figura 3.13 se observa el mecanismo químico de degradación hidrolítica del PLGA.

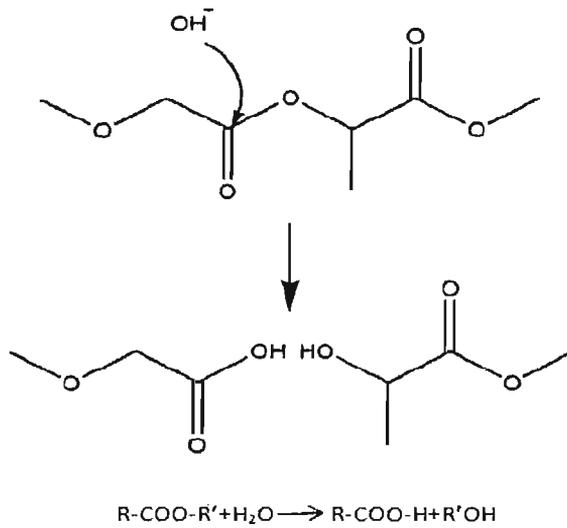


Figura 31.-Degradación hidrolítica del PLGA

El proceso de degradación consiste en dos etapas: primero, comienza una rotura aleatoria de enlaces éster, lo que conduce a una disminución en las propiedades mecánicas y reducción de la masa molecular del polímero. En la segunda etapa, existe un mayor desarrollo de rotura en los enlaces éster, lo que propicia una disminución de tamaño en las cadenas moleculares; provocando pérdidas de masa [75].

La hidrólisis de PCL se muestra en la ecuación de la figura 3.14.

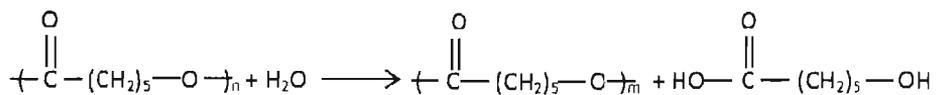


Figura 32.-Hidrólisis de la PCL

Cuando las cadenas largas de polímeros se escinden a cadenas más cortas, son lo suficientemente pequeñas para migrar fuera de la fibra, la masa de la fibra original, se reduce [76].

La PCL degrada lentamente debido a la presencia de cinco enlaces hidrofóbicos CH₂ repetitivos [77].

Los registros de pérdida de masa de los andamios durante cada semana se muestran la gráfica de la figura 3.15.

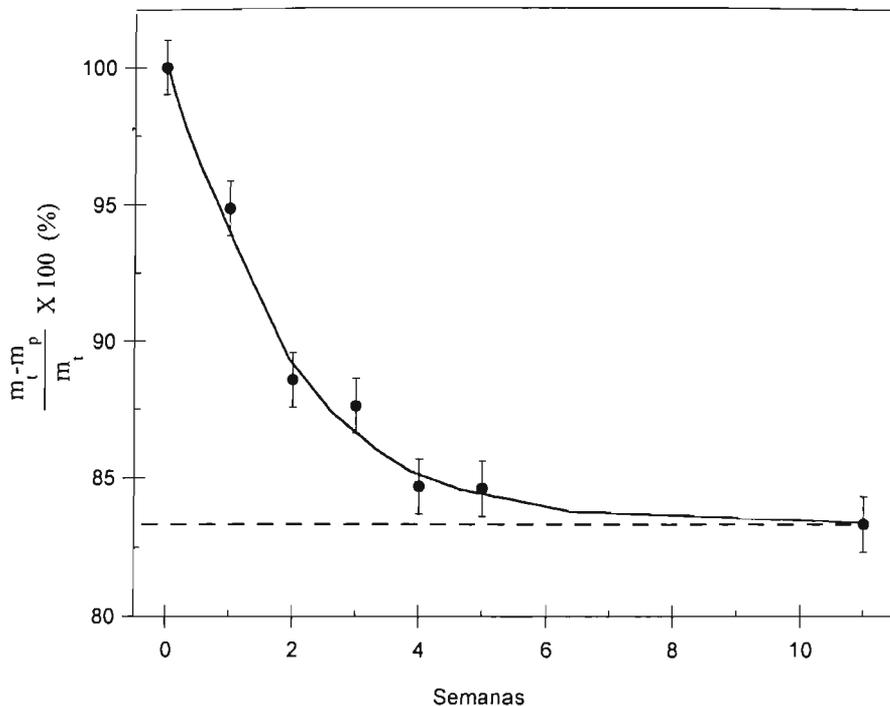


Figura 33.-Masa remanente de los andamios durante cada semana

Como se observa, la degradación refleja una caída de tipo exponencial, con asíntota un poco mayor a 83, tipo parabólico para la semana 5, corresponde al mínimo de la parábola, siendo un poco menos de 83%. Debido a la lenta degradación que muestra la PCL, significa que aproximadamente poco menos de 17% de pérdida de masa pertenece al PLGA.

En la figura 3.16, se presentan las microfotografías del microscopio electrónico, al comparar la imagen de la semana 0, con la imagen de la semana 1, se observa que la superficie de las microfibras ya no son homogéneas, pues se ve una especie de sombra que corresponde a la pérdida del PLGA. Esta sombra va en

aumento con el transcurso de las semanas. A partir de la primera semana comienzan a hacerse visibles los cambios en la morfología de las fibras, pero es hasta la tercera semana cuando comienza a disminuir el diámetro (estos diámetros fueron medidos con el software ImageJ). A finales de la quinta semana se aprecia que las fibras comienzan a romperse y disminuyendo aún más su diámetro.

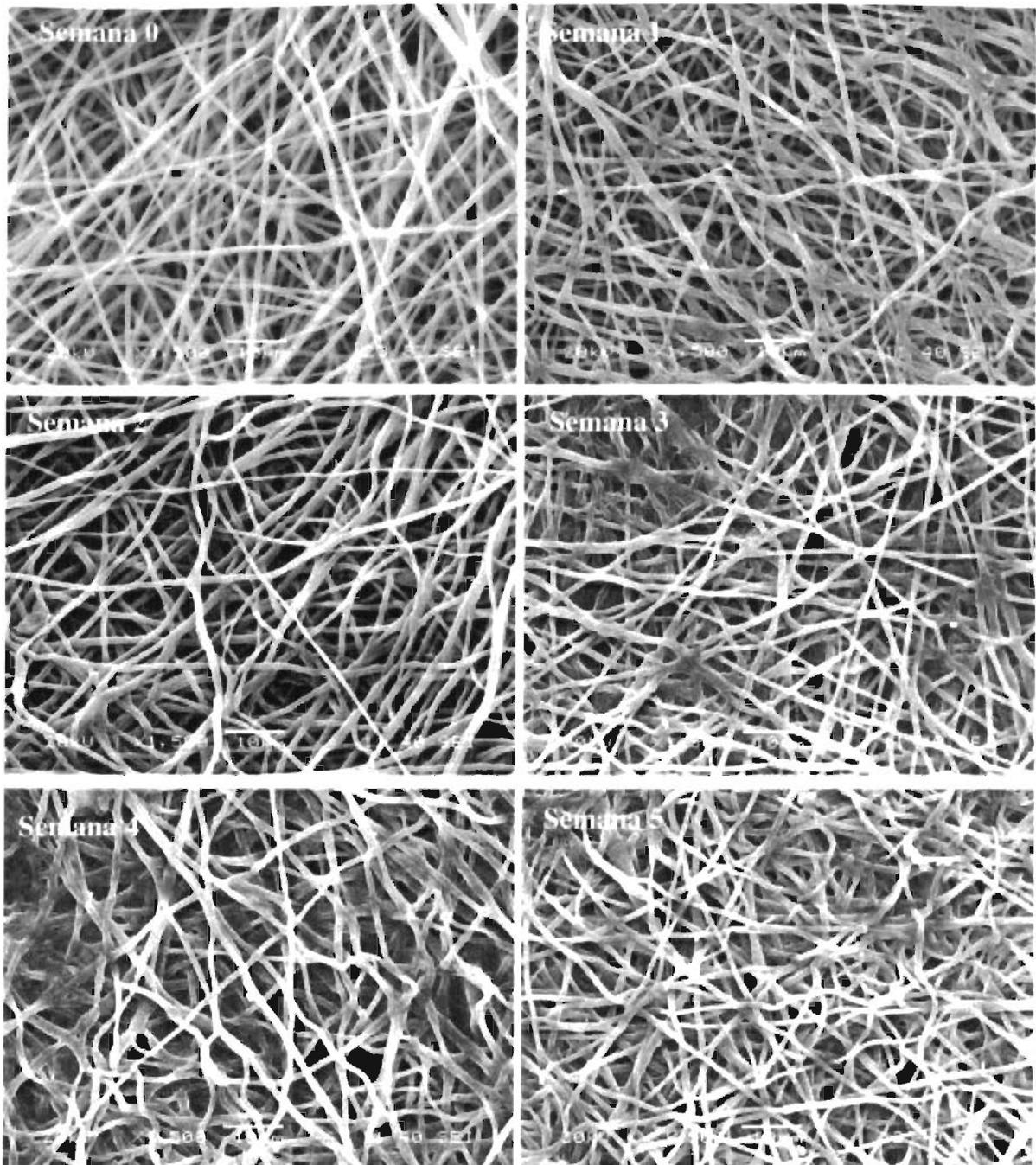


Figura 34.-Micrografías SEM de los andamios sometidos a procesos de degradación

Durante el análisis SEM se verificó que existían áreas en donde aún era posible observar fibras, sin embargo, también estaban presentes superficies en las cuales eran poco visibles. Esto puede ser ocasionado (entre otros factores) por una erosión superficial de las fibras poliméricas. Principalmente, existen dos tipos de erosión: superficial y en masa. En la erosión superficial el material solo experimenta pérdida de masa en su superficie, mientras que en la erosión en masa la degradación y la erosión no se limitan a ésta, por lo que la pérdida de masa ocurre en todo el volumen del material, por lo tanto, el tamaño del material permanecerá constante durante un tiempo considerable [72].

El mecanismo de degradación química que se llevó a cabo es la hidrólisis de los enlaces éster.

En la gráfica de la figura 3.17, se muestran los espectros FTIR del PLGA puro y la PCL pura en el intervalo de número de onda entre 820 cm^{-1} y 900 cm^{-1} . El pico que se observa a 865 cm^{-1} corresponde al enlace C-COO en tensión del PLGA; el pico que se observa en 840 cm^{-1} corresponde al enlace CH₂ en balanceo de la PCL [78]. El pico de la PCL está asociado a CH₂ en balanceo. El pico de la PCL fue elegido para compararlo con los espectros de los andamios degradados, de esta manera se verificará el comportamiento del enlace en el transcurso de las semanas.

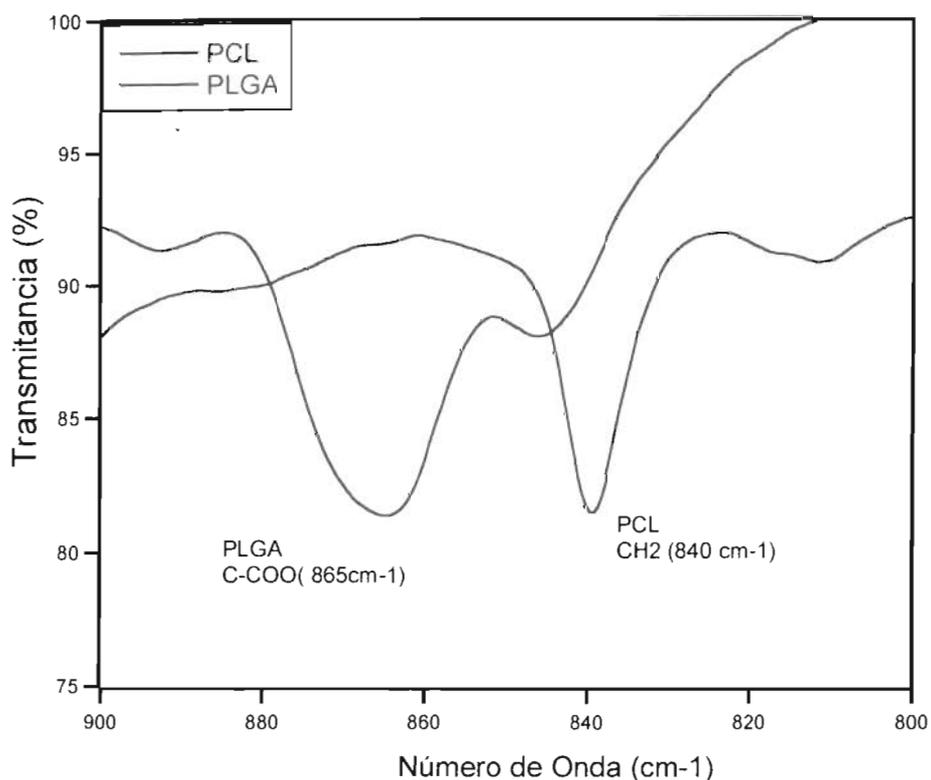


Figura 35.-Enlace C-COO para las unidades lácticas del PLGA y enlace CH₂ para la PCL.

Se parte del hecho que la degradación de la PCL es despreciable a las once semanas. Por lo tanto, el pico de la PCL en 840 cm^{-1} , no varía durante ese tiempo. Esto quiere decir que se puede tomar este pico como referencia para monitorear la degradación del PLGA, observando el cambio del pico del PLGA (865 cm^{-1}) dentro de la mezcla. El mecanismo para hacer esto es el siguiente: se toma lo picos correspondientes a este número de onda de las mezclas a tres y once semanas de degradación, y se normalizan al correspondiente pico a cero semanas de

degradación. Con esta operación, las variaciones que se observen de los grupos lácticos del PLGA dentro de la mezcla, serán reales.

Como se ha comentado, la degradación de la PCL es mucho más lenta que la del PLGA, ya que su tiempo de degradación es de aproximadamente dos años [79].

En la gráfica de la figura 3.18 se presentan los espectros pertenecientes al andamio de PLGA:PCL (20:80), sometido a degradación durante cero, tres y once semanas. Como se observa, el pico correspondiente a los C-COO del ácido láctico disminuye al paso de las semanas, desapareciendo prácticamente a las once semanas. Esto confirma que la degradación hidrolítica para esta mezcla, a corto plazo, solo afecta al PLGA.

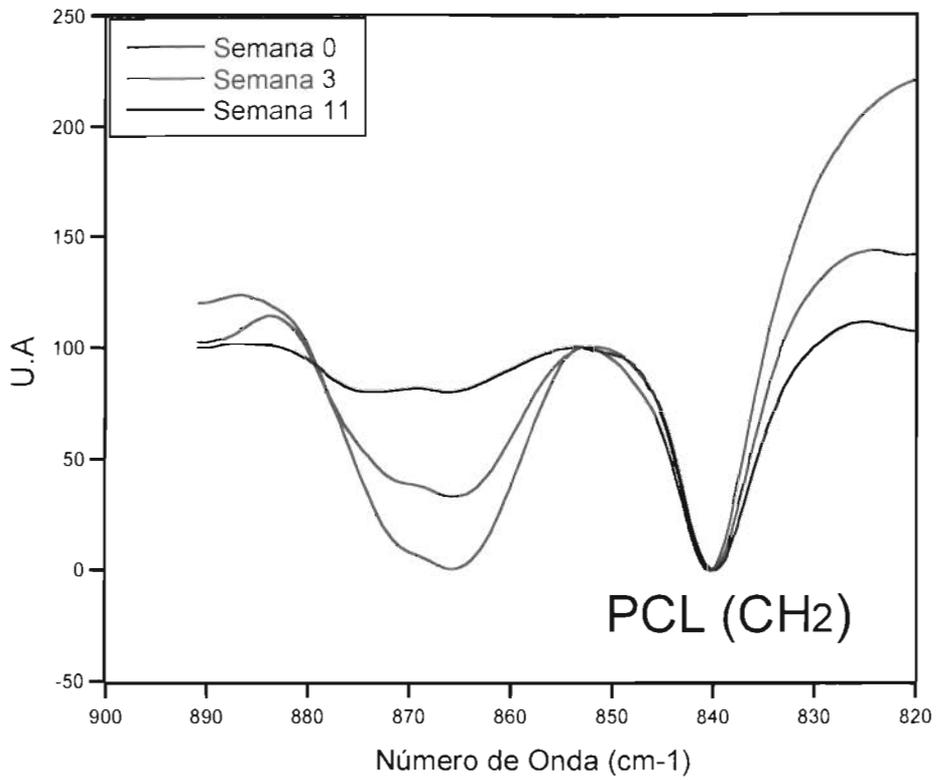


Figura 36.-Espectros al andamio PLGA:PCL (20:80), sometido a degradación durante cero, tres y once semanas.

3.7 Análisis DSC

Para analizar el comportamiento térmico de la PCL y PLGA cuando son mezclados, se realizaron ensayos DSC de cada uno por separado. En las gráficas de la figura 3.19 se observan los termogramas correspondientes a los polímeros que componen la mezcla. La PCL (61°C) presenta un calor endotérmico (pico) que se asocia con la fusión de su fase cristalina (PCL Corrida 1). El PLGA presenta su transición vítrea alrededor de los 50°C. La energía endotérmica que se observa al terminar la transición vítrea en su termograma, corresponde a una relajación estructural (adquirida por el proceso a que fue sometido, incluyendo su síntesis), esto se comprobó al desaparecer esta energía endotérmica en las subsecuentes corridas, como se observa en la figura (PLGA Corrida 2). Es posible adquirir nuevamente esta relajación estructural, al dejar el PLGA tres horas a una temperatura de 12°C por debajo de su Tg [80].

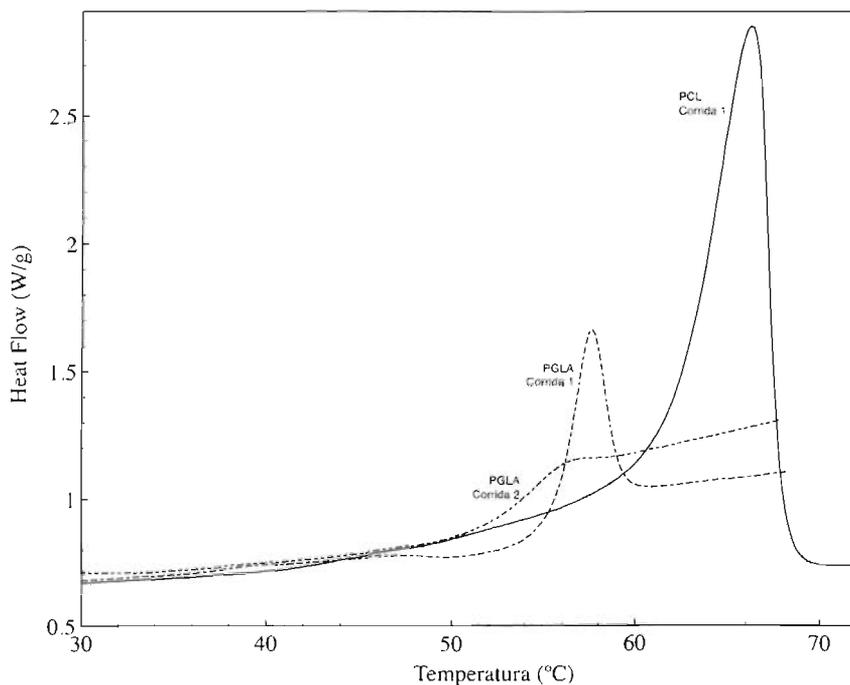


Figura 37.-Termogramas de PCL y PLGA

En la figura 3.20 se muestra el termograma de la policaprolactona y de la mezcla de PLGA:PCL (20:80), comparando ambos termogramas se aprecia un cambio en la pendiente en el intervalo de 15°C a 30°C en el termograma de la disolución PLGA:PCL(20:80).

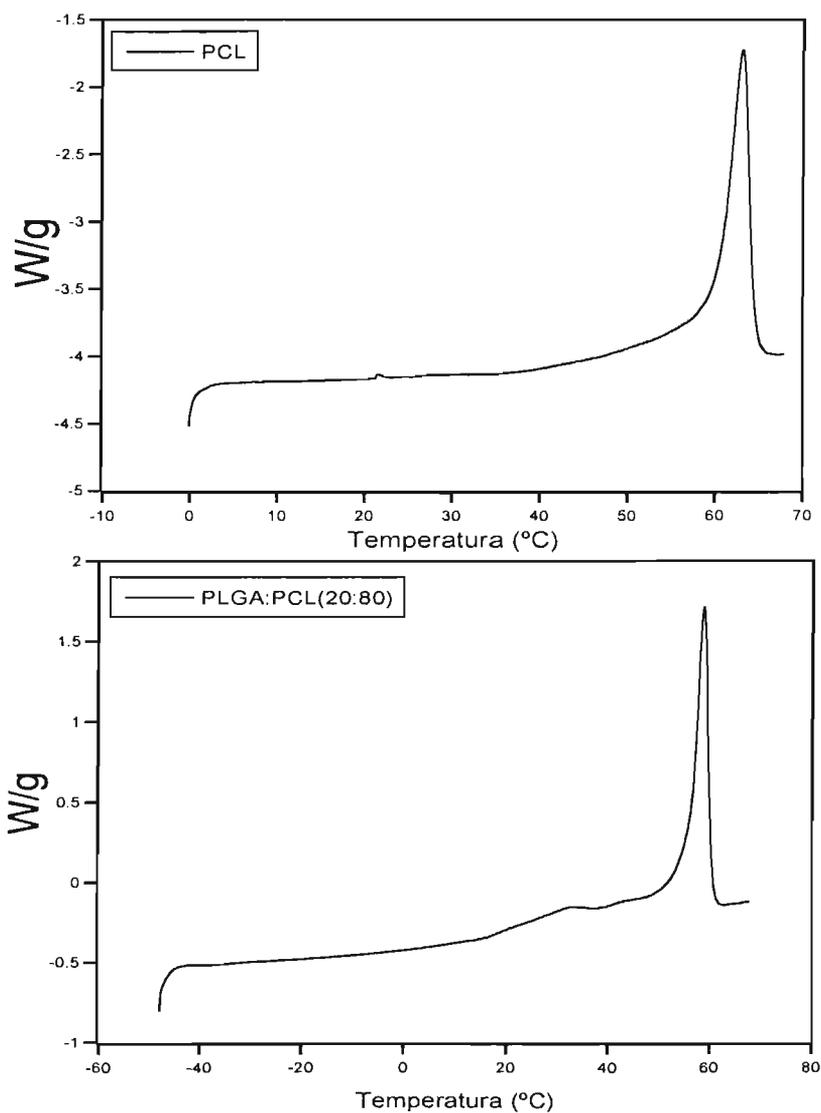


Figura 38.-Termogramas de PCL y PLGA:PCL (20:80)

Este cambio en la pendiente está asociado con la Tg del PLGA (50°C). Diversos autores señalan que un cambio, incluso mínimo, en la línea base de la mezcla, sugiere que existen interacciones entre las zonas amorfas entre ambos polímeros[67, 81-83].

Para corroborar esta interacción se realizó una segunda corrida, el termograma correspondiente se muestra en la figura 3.21. Como se observa, aparentemente el cambio de pendiente apreciado en la primera corrida ya no es visible.

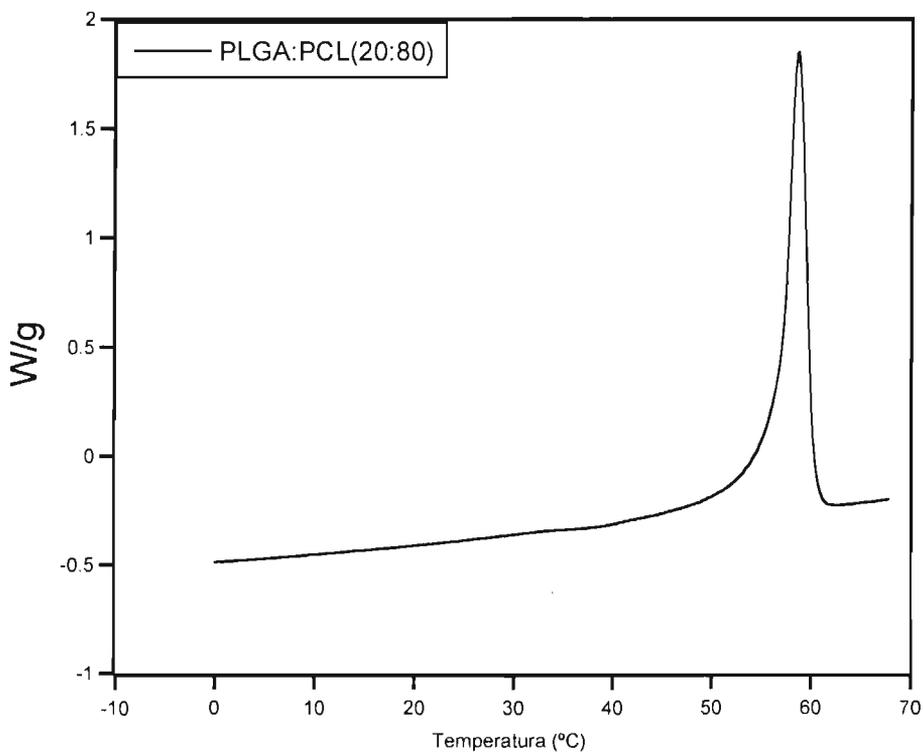


Figura 39.-Segunda corrida DSC para mezcla PLGA:PCL(20:80)

Sin embargo, realizando una ampliación mostrada en la figura 3.22 en el intervalo de 20 °C y 40 °C se observa una ligera desviación de la línea base. Esto es debido a que la T_g del PLGA traslapó con el pico endotérmico de la PCL durante la segunda corrida, lo cual, está asociado con la relajación entálpica del PLGA[81].

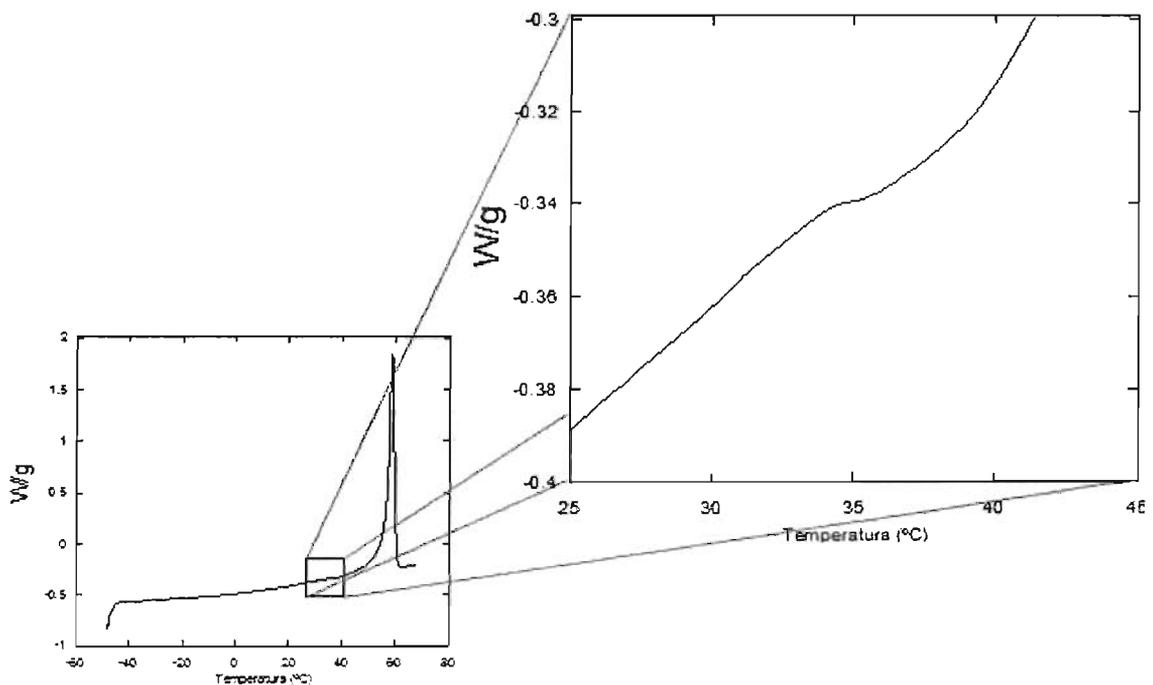


Figura 40.- Ampliación en el intervalo de 20°C a 40°C para la mezcla PLGA:PCL

La endoterma de cristalinidad de la PCL dentro de la mezcla, prácticamente no se ve afectada por la presencia de los dominios de la PLGA. Los pequeños cambios que se observaron, corresponden realmente a las condiciones de enfriado a los que fue sometida la mezcla, o bien, al poco contenido de PLGA que presenta el andamio.

Perspectivas

Los objetivos planteados al inicio de este trabajo de investigación fueron cumplidos, ya que se logró obtener un andamio tubular fabricado mediante la técnica de electrohilado. La caracterización del andamio es de suma importancia, pues existen diversas propiedades que no pueden ser observadas a simple vista. Tener conocimiento de dichas propiedades, será de gran importancia para las aplicaciones posteriores de la estructura tridimensional fabricada.

La técnica del electrohilado ofrece una gran flexibilidad para la elección del material del andamio, así como un control más preciso sobre su geometría. Además, permite la fabricación de fibras con diámetros que van desde nanómetros hasta micrómetros; mediante la modulación de los parámetros de hilatura tales como: rapidez de flujo, distancia y variaciones en las propiedades de la solución del polímero.

Los andamios basados en polímeros sintéticos ofrecen ventajas en sus propiedades mecánicas, ya que pueden ser ajustables, de igual forma, son susceptibles a la funcionalización de su superficie a través de recubrimientos de proteínas o proveer moléculas de señalización para activar receptores específicos en la membrana celular.

Con la obtención de este soporte tridimensional para las células será posible desarrollar tecnologías novedosas para la ingeniería de tejidos. Entre otras aplicaciones, se ha planteado la construcción de un bioreactor que mediante impulsos mecánicos estimule la proliferación celular en el andamio. Coadyuvando de esta manera al objetivo principal de la ingeniería de tejidos, la obtención de tejido que pueda ser utilizado en pacientes que lo requieran, mejorando así su calidad de vida.

CONCLUSIONES

Uno de los principales factores para el uso de andamios electrohilados como soportes para cultivo de células, es que las fibras imitan la escala y la disposición tridimensional de las fibrillas de colágeno en la Matriz Extracelular. El área superficial de un andamio electrohilado proporciona un alto volumen de mallas fibrosas que aseguran la fijación celular, esto permite una mayor proliferación de las células cultivadas; en comparación con una superficie plana, de dos dimensiones.

Se logró la fabricación de un andamio tubular de PLGA/PCL (20:80) a partir de la mezcla K, los diámetros internos obtenidos fueron de 5 mm y 3 mm. Esta medida es considerada ideal, ya que la uretra humana posee un diámetro de entre 3 mm y 4 mm.

Para comprobar la existencia de fibras en el andamio, se analizaron muestras mediante microscopía electrónica de barrido. En las micrografías obtenidas se observaron fibras libres de glóbulos e imperfecciones, así como una porosidad homogénea. Para llevar a cabo la medición del tamaño de las fibras y de los poros se utilizó el software Image-J, con el cual, se determinó que el diámetro de fibra promedio fue de 1.200 μm . Para tener conocimiento del tamaño de poro promedio, se trazaron círculos entre las fibras sobrepuestas en forma de triángulo y sus diámetros fueron medidos, dichos diámetros mostraron un valor promedio de 7.5 μm . En la literatura se hallaron artículos que señalan que este tamaño de fibras y poros es ideal para la ingeniería de tejidos de la uretra.

Los andamios tubulares de PLGA:PCL (20:80) mostraron valores de ángulo de contacto de 84°, lo cual representa un aumento en la hidrofiliidad, si es comparado con andamios elaborados únicamente de PCL reportados en la literatura. El andamio obtenido con una relación de PLGA:PCL (30:70) mostró un

valor de ángulo de contacto de 82° . Esta disminución corrobora que un aumento en la cantidad de PLGA en la disolución polimérica representa un mayor grado de hidrofiliidad del andamio, sin embargo, las fibras observadas con esta relación eran menos homogéneas y la mezcla presentaba cierta dificultad para ser electrohilada. Por lo tanto, la mezcla de PLGA:PCL en una relación de 20:80 es la adecuada para obtener andamios a partir de estos dos polímeros. .

Para determinar las propiedades mecánicas del andamio se realizaron ensayos a tensión, el resultado que se obtuvo fue un módulo elástico de 11.31 MPa, esta característica mecánica permite soportar la demanda del tejido uretral cuando sea implantado.

En relación a la degradación in vitro del andamio, se determinó mediante micrografías MEB que aún después de la semana 5 era posible observar fibras. Sin embargo, la morfología de los poros es diferente si se comparan con los existentes en la semana 0, ya que en el andamio sometido a degradación no era posible observar fibras sobrepuestas en forma de un triángulo totalmente definido. Debido a que al término de la quinta semana era posible observar fibras, significa que el andamio no sufrirá colapso y podrá cumplir de manera satisfactoria su función como soporte para un cultivo celular.

Para monitorear la degradación del PLGA se realizó un análisis FT-IR. Los picos correspondiente a los C-COO (865 cm^{-1}) del ácido láctico del PLGA contenido en los andamios degradados, fueron comparados con un pico de la PCL (CH_2 en 840 cm^{-1}) ya que la degradación de la PCL es despreciable a las once semanas. Al normalizar la gráfica se observó que existía una menor intensidad en el pico del enlace C-COO. Esto confirma que la degradación hidrolítica para esta mezcla, a corto plazo, solo afecta al PLGA. A partir de estos resultados se puede inferir que al término de la quinta semana, la pérdida de más del 15% de la masa del andamio sometido a degradación, se debe principalmente a su contenido de PLGA.

Para el análisis térmico del andamio se realizó una corrida DSC, y en el termograma obtenido se observó un cambio de pendiente en el intervalo de 20°C a 40°C. Este cambio en la pendiente está asociado con la Tg del PLGA (50°C), esto sugiere que existen interacciones entre las zonas amorfas de ambos polímeros. En la segunda corrida DSC, el cambio de pendiente apreciado en la primera corrida correspondiente al andamio PLGA:PCL (20:80) ya no era visible, sin embargo, realizando una ampliación en el intervalo de 20 °C y 40 °C se observa una ligera desviación de la línea base. Esto es debido a que la Tg del PLGA traslapó con el pico endotérmico de la PCL durante la segunda corrida. Se establece entonces que si bien no existe una miscibilidad, ambos polímeros son compatibles, pues comparten grupos funcionales que permiten interacciones entre ellos.

En esta tesis, se presentó un estudio para la obtención de un andamio cuyas características son adecuadas para la ingeniería de tejidos de la uretra. Sin embargo, es importante señalar que día con día existen nuevos descubrimientos en esta disciplina, por lo que se hace imprescindible continuar con la búsqueda de nuevas tecnologías que contribuyan a este importante e incipiente campo de la ciencia.

Con la obtención de este soporte tridimensional para las células, será posible desarrollar tecnologías novedosas para la ingeniería de tejidos. Entre otras aplicaciones, se ha planteado la construcción de un bioreactor que mediante impulsos mecánicos estimule la proliferación celular en el andamio. Coadyuvando de esta manera al objetivo principal de la ingeniería de tejidos, la obtención de tejido que pueda ser utilizado en personas, mejorando así su calidad de vida.

BIBLIOGRAFÍA

Brandes, S.B. and A.F. Morey, *Advanced Male Urethral and Genital Reconstructive Surgery*, cap. 36. 2014: Springer.

Wilmut, I., et al., *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Cloning and stem cells, 2007. **9**(1): p. 3-7.

Atala, A., *Engineering organs*. Current opinion in biotechnology, 2009. **20**(5): p. 575-592.

Raya-Rivera, A., et al., *Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study*. The Lancet, 2011. **377**(9772): p. 1175-1182.

Cato T. Laurencin, L.S.N., *Nanotechnology and Tissue Engineering The Scaffold*. 2008, USA Taylor & Francis Group, LLC.

Goddard, J.M. and J. Hotchkiss, *Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds*. Progress in polymer science, 2007. **32**(7): p. 698-725.

Hiep, N.T. and B.-T. Lee, *Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2010. **21**(6): p. 1969-1978.

Vacanti, J., *Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art*. Journal of pediatric surgery, 2010. **45**(2): p. 291-294.

Sill, T.J. and H.A. von Recum, *Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(13): p. 1989-2006.

Berthiaume, F., T.J. Maguire, and M.L. Yarmush, *Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges*. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2011. **2**: p. 403-430.

Rheinwald, J.G. and H. Green, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation keratinizing colonies from single cell is*. Cell, 1975. **6**(3): p. 331-343.

Yannas, J.B.I., et al., *Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury*. Annals of surgery, 1981. **194**(4): p. 413.

Lavik, E. and R. Langer, *Tissue engineering: current state and perspectives*. Applied microbiology and biotechnology, 2004. **65**(1): p. 1-8.

Chen, R.R. and D.J. Mooney, *Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering*. Pharmaceutical research, 2003. **20**(8): p. 1103-1112.

Yoder, I.C. and N. Papanicolaou, *Imaging the urethra in men and women*. Urologic radiology, 1992. **14**(1): p. 24-28.

<http://www.netterimages.com/images/vpv/000/000/002/2947-0550x0475.jpg>.

Pariente, J.L., B.S. Kim, and A. Atala, *In vitro biocompatibility assessment of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human urothelial cells*. Journal of biomedical materials research, 2001. **55**(1): p. 33-39.

18. De Nicola, R.R., *Permanent artificial, silicone, urethra*. The Journal of urology, 1950. **63**(1): p. 168-72, illust.
19. Da Silva, E.A. and E.Z. Telo, *Sustitucion de la uretra con material sintetico*. Actas Urologicas Espanolas, 2000. **24**(3): p. 235-242.
20. Palleschi, J. and E. Tanagho, *Urethral tube graft in dogs: prosthesis of dacron lined silicone*. Investigative urology, 1978. **15**(5): p. 408-411.
21. Dreikorn, K., et al., *Alloplastic replacement of the partially resected canine urethra by expanded polytetrafluoroethylene grafts*. Urological research, 1979. **7**(1): p. 19-21.
22. Nissenkorn, I., *A simple nonmetal stent for treatment of urethral strictures: a preliminary report*. The Journal of urology, 1995. **154**(3): p. 1117-1118.
23. Reed, A. and D. Gilding, *Biodegradable polymers for use in surgery—poly (glycolic)/poly (lactic acid) homo and copolymers: 2. < i> In vitro</i> degradation*. Polymer, 1981. **22**(4): p. 494-498.
24. Bazeed, M.A., et al., *New treatment for urethral strictures*. Urology, 1983. **21**(1): p. 53-57.
25. Olsen, L., et al., *Urethral reconstruction with a new synthetic absorbable device: an experimental study*. Scandinavian journal of urology and nephrology, 1992. **26**(4): p. 323-326.
26. Kempainen, E., et al., *A bioresorbable urethral stent*. Urological research, 1993. **21**(3): p. 235-238.
27. Italiano, G., *Reconstructive surgery of the urethra: a pilot study in the rabbit on the use of hyaluronan benzyl ester (Hyaff-11) biodegradable grafts*. Urological research, 1997. **25**(2): p. 137-142.
28. Wang X.Q., C.Q.H., Hu J.H., Hou Y.C., Wang C.X., *A novel three-dimensional tubular biodegradable scaffolds for tissue engineering of the urethra*. Eur Urol Suppl 2013;12:e247, 2013.
29. Haripal, G.S., *Preparation and characterization of PLA and PLGA scaffold and film*. 2012.
30. Duan, B., et al., *A nanofibrous composite membrane of PLGA–chitosan/PVA prepared by electrospinning*. European Polymer Journal, 2006. **42**(9): p. 2013-2022.
31. Curran, J., Z. Tang, and J. Hunt, *PLGA doping of PCL affects the plastic potential of human mesenchymal stem cells, both in the presence and absence of biological stimuli*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. **89**(1): p. 1-12.
32. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
33. Hutmacher, D.W., et al., *Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling*. Journal of biomedical materials research, 2001. **55**(2): p. 203-216.
34. Itälä, A.I., et al., *Pore diameter of more than 100 µm is not requisite for bone ingrowth in rabbits*. Journal of biomedical materials research, 2001. **58**(6): p. 679-683.

- Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-5491.
- PECH, J.C.S., *APLICACIÓN DE LA LIOFILIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE ANDAMIOS DE PLLA*.
- J.C, S., *Obtención de Andamios de PLLA con la Técnica de Liofilización*. 2013, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Sachs, E.M., et al., *Three-dimensional printing techniques*. 1993, Google Patents.
- Declercq, H.A., et al., *Synergistic effect of surface modification and scaffold design of bioprinted 3-D poly-ε-caprolactone scaffolds in osteogenic tissue engineering*. Acta Biomaterialia, 2013. **9**(8): p. 7699-7708.
- Lee, K.-W., et al., *Poly (propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: effects of resin formulations and laser parameters*. Biomacromolecules, 2007. **8**(4): p. 1077-1084.
- Li, X., et al., *3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application*. International Journal of Polymer Science, 2014. **2014**.
- Huang, C.-F. and F.-C. Chang, *Comparison of hydrogen bonding interaction between blends and copolymers*. Polymer, 2003. **44**(10): p. 2965-2974.
- <http://3.bp.blogspot.com/-RHXt-rHpgO4/UZ1s77N8cdl/AAAAAAAAAHE/es19Gij0fpl/s1600/1.JPG>.
- Taylor, G., *Electrically driven jets*. Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences, 1969. **313**(1515): p. 453-475.
- CARSON, R., et al., *Factors influencing electrically sprayed liquids*. AIAA Journal, 1964. **2**(8): p. 1460-1461.
- Deitzel, J., et al., *The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles*. Polymer, 2001. **42**(1): p. 261-272.
- Lim, S.H. and H.-Q. Mao, *Electrospun scaffolds for stem cell engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009. **61**(12): p. 1084-1096.
- Yang, F., J. Wolke, and J. Jansen, *Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly (ε-caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering*. Chemical Engineering Journal, 2008. **137**(1): p. 154-161.
- Álvaro Naranjo, T., R. Noguera Salva, and F. Fariñas Guerrero, *La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I)*. 2009.
- Reneker, D., et al., *Electrospinning of nanofibers from polymer solutions and melts*. Advances in applied mechanics, 2007. **41**: p. 43-346.
- Li, W.J., et al., *Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering*. Journal of biomedical materials research, 2002. **60**(4): p. 613-621.
- Yang, S., et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors*. Tissue engineering, 2001. **7**(6): p. 679-689.

53. Chen, Q., S. Liang, and G.A. Thouas, *Elastomeric biomaterials for tissue engineering*. Progress in Polymer Science, 2013. **38**(3): p. 584-671.
54. Müller, B., et al., *Mechanical properties of urethral tissue*. Journal of Biomechanics, 2008. **41**: p. S61.
55. Hospitalaria, I., *Reconstrucción de agenesia e hipoplasia total de uretra mediante ingeniería de tejidos. Primer reporte mundial*.
56. Kulpreechanan, N., T. Bunaprasert, and R. Rangkupan, *Electrospinning of Polycaprolactone in Dichloromethane/Dimethylformamide Solvent System*. Advanced Materials Research, 2014. **849**: p. 337-342.
57. Haroosh, H., et al., *Electrospun PLA: PCL/halloysite nanotube nanocomposites fibers for drug delivery*. 2011.
58. Zoppe, J.O., et al., *Reinforcing poly (ϵ -caprolactone) nanofibers with cellulose nanocrystals*. ACS applied materials & interfaces, 2009. **1**(9): p. 1996-2004.
59. Wu, H., et al., *Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2010. **21**(12): p. 3207-3215.
60. Sánchez, L.M.D., L. Rodriguez, and M. López, *Electrospinning: la era de las nanofibras*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 2013. **14**(1): p. 10-27.
61. Kim, M.S., et al., *Highly porous 3D nanofibrous scaffolds processed with an electrospinning/laser process*. Current Applied Physics, 2014. **14**(1): p. 1-7.
62. Baker, S.C., et al., *The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering*. Biomaterials, 2009. **30**(7): p. 1321-1328.
63. Tan, E., S. Ng, and C. Lim, *Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber*. Biomaterials, 2005. **26**(13): p. 1453-1456.
64. Luong, N.T.H., *Engineered Poly(L-Lactic acid) - Based Nanofibers for Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells*. 2012, National University of Singapore: Singapore.
65. Ruiz, M.E., *MÉTODOS DE ANÁLISIS TÉRMICO*. Análisis farmacéutico, 2013: p. 159.
66. Cirerol, N.D.R.A., *Calorimetría Diferencial De Barrido. DSC.*, in *Ingeniería Química Industrial*. Universidad Autónoma de Yucatán: Mérida Yucatán.
67. Huang, J.-M. and S.-J. Yang, *Studying the miscibility and thermal behavior of polybenzoxazine/poly (ϵ -caprolactone) blends using DSC, DMA, and solid state^{< sup>13} C NMR spectroscopy</sup>*. Polymer, 2005. **46**(19): p. 8068-8078.
68. Liu, Y., et al., *Controlling numbers and sizes of beads in electrospun nanofibers*. Polymer International, 2008. **57**(4): p. 632-636.
69. Stevens, M.M. and J.H. George, *Exploring and engineering the cell surface interface*. Science, 2005. **310**(5751): p. 1135-1138.

70. Binulal, N., et al., *Gelatin nanoparticles loaded poly (ϵ -caprolactone) nanofibrous semi-synthetic scaffolds for bone tissue engineering*. Biomedical Materials, 2012. **7**(6): p. 065001.
71. Tamada, Y. and Y. Ikada, *Effect of preadsorbed proteins on cell adhesion to polymer surfaces*. Journal of colloid and interface science, 1993. **155**(2): p. 334-339.
72. Göpferich, A., *Mechanisms of polymer degradation and erosion*. Biomaterials, 1996. **17**(2): p. 103-114.
73. Miller, R.A., J.M. Brady, and D.E. Cutright, *Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios*. Journal of biomedical materials research, 1977. **11**(5): p. 711-719.
74. Woodward, S.C., et al., *The intracellular degradation of poly (ϵ -caprolactone)*. Journal of biomedical materials research, 1985. **19**(4): p. 437-444.
75. Liu, H. and K.K. Leonas, *Weight loss and morphology changes of electrospun poly (ϵ -caprolactone) yarns during in vitro degradation*. Fibers and Polymers, 2010. **11**(7): p. 1024-1031.
76. Haghghat, F. and S. Ravandi, *Mechanical properties and in vitro degradation of PLGA suture manufactured via electrospinning*. Fibers and Polymers, 2014. **15**(1): p. 71-77.
77. Abedalwafa, M., et al., *BIODEGRADABLE POLY-EPSILON-CAPROLACTONE (PCL) FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS: A REVIEW*. Rev. Adv. Mater. Sci, 2013. **34**: p. 123-140.
78. Vey, E., et al., *Degradation kinetics of poly (lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies*. Polymer Degradation and Stability, 2011. **96**(10): p. 1882-1889.
79. Sun, H., et al., *The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 1735-1740.
80. Mijović, J., et al., *Principal features of structural relaxation in glassy polymers. A review*. Polymer Engineering & Science, 1994. **34**(5): p. 381-389.
81. Aghdam, R.M., et al., *Investigating the effect of PGA on physical and mechanical properties of electrospun PCL/PGA blend nanofibers*. Journal of Applied Polymer Science, 2012. **124**(1): p. 123-131.
82. Khatri, Z., et al., *Preparation and characterization of electrospun poly (ϵ -caprolactone)-poly (L-lactic acid) nanofiber tubes*. Journal of Materials Science, 2013. **48**(10): p. 3659-3664.
83. Ide, F. and A. Hasegawa, *Studies on polymer blend of nylon 6 and polypropylene or nylon 6 and polystyrene using the reaction of polymer*. Journal of applied polymer science, 1974. **18**(4): p. 963-974.