



**INSTITUTO POTOSINO EN INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

**Compositos poliméricos entrecruzados de CMC-PLA y su
posible uso como andamio para soporte y diferenciación
hacia células cartilaginosas.**

Tesis que presenta

I.B. Giovanni Alfredo Sánchez Vega

Para obtener el grado de

Maestro en Nanociencias y Materiales

Director de tesis:

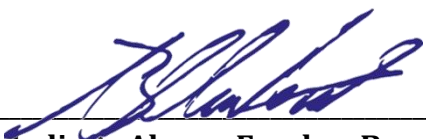
Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios

San Luis Potosí, S.LP., 19 de enero del 2024




Constancia de aprobación de la tesis


La tesis “**Compositos poliméricos entrecruzados de CMC-PLA y su posible uso como andamio para soporte y diferenciación hacia células cartilaginosas**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Giovanni Alfredo Sánchez Vega** y aprobada el *14 de diciembre del 2023* por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios
Director de la tesis



Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana
Miembro del Comité Tutorial



Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Miembro del Comité Tutorial



Dra. Alethia Muñoz Ramírez
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales



Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Polímeros de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), A.C., bajo la dirección del Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios.



Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (No. 1153105) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C



Agradecimientos a los técnicos M.C. Ana Iris Peña, M.C. Beatriz Rivera, Dr. Ignacio Guadalupe Becerril y Dr. Héctor Gabriel Silva Pereyra del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) por el apoyo con las técnicas en difracción en rayos-X (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).



Agradecimientos a la M. C. María Mercedes Zavala Arriaga, técnico titula nivel “B” del laboratorio de petroquímica y petrofísica (LabGeo-APP) de la división de Geociencias en el IPICYT, por el apoyo en la técnica de microscopía óptica.



Agradecimientos a la Lic. Lucy Rose McKenna, maestra de idiomas del área de posgrado en el IPICYT, por su invaluable apoyo en el aprendizaje de los fundamentos del idioma italiano.



Agradecimientos a la Dra. Luz Eugenia Alcántara de la Coordinación para la innovación y aplicación de la ciencia y la tecnología (CIACyT) por su apoyo y tutela en los ensayos biológicos.



Agradecimientos al grupo “Before” del Departamento de química, materiales e ingeniería química “Giulio Natta” perteneciente al Politécnico de Milán, por la estancia de investigación bajo la tutela de la Dra. Silvia Farè y el M.C, Mateo Pitón durante el periodo marzo-mayo del 2023.

*La ciencia es difícil, es un gusto adquirido;
pero es, sin lugar a duda, la aventura
humana más maravillosa posible.*

Luis A. Orozco

*Yo he preferido hablar de cosas imposibles,
porque de lo posible se sabe demasiado.*

Silvio Rodríguez.

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

Dedicatoria

Con alegría y gratitud en mi corazón, dedico este logro a mis familiares, amigos y seres queridos, quienes me han brindado un apoyo incondicional a lo largo de mi trayectoria académica, profesional y personal.

Esta tesis es el resultado de poco más de dos años de arduo trabajo y pasión, que con todo mi corazón dedico a las personas que ya no se encuentran presentes con nosotros. A mi abuelita Ignacia, mi tío José, mi tío Raymundo y mi primo Roberto, quienes con su amor, aliento y comprensión me han guiado hasta donde me encuentro hoy.

A mis padres Rosa María y Alfredo, quienes me han inculcado la perseverancia de luchar siempre por mis sueños y me han brindado su amor incondicional. Les agradezco por siempre creer en mí y estar a mi lado.

A mi hermano Johan y a mi hermana Joselin, su aliento constante ha sido un pilar fundamental en mi carrera académica. Me siento sumamente orgulloso de ver cómo ellos también poco a poco van formando su vida personal y académica.

A mi novia Daniela, quien hace que todo sea más fácil, me anima a ser mejor cada día y ha estado presente para celebrar los éxitos y levantarme en los momentos difíciles. Te agradezco infinitamente por acompañarme en este proceso y recordarme que puedo alcanzar cualquier meta que me proponga.

Por último, pero no menos importante, les dedico este trabajo a todos aquellos que de alguna manera han dejado una huella en mi camino. Cada palabra de aliento, gesto de apoyo y cada muestra de cariño ha sido fundamental para llegar hasta este momento.

Esta tesis está dedicada a cada uno de ustedes, porque sin su amor, confianza y respaldo, este logro no sería posible.

Que esta dedicación sea una pequeña muestra de mi gratitud eterna.

Giovanni Alfredo Sánchez Vega

Agradecimientos

En este momento significativo de mi trayectoria académica, deseo expresar mi profunda gratitud y reconocimiento a todas las personas que han contribuido de manera invaluable a la culminación de esta tesis. Su apoyo, orientación y estímulo han sido fundamentales en mi camino hacia este importante logro en mi vida académica. A través de estas líneas, me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a aquellos que han dejado una huella perdurable en este viaje académico y han hecho posible la realización de esta tesis.

En primer lugar, quiero agradecer de manera especial al Dr. Vladimir Escobar Barrios, mi asesor, maestro y amigo; por aceptarme en su laboratorio y guiarme en el desarrollo de mi tesis de maestría. Sus consejos, apoyo y confianza en mis ideas descabelladas sobre el trabajo propuesto, así como sus recomendaciones de series, libros, películas y canciones, han sido invaluableles en mi formación académica y personal. Agradezco su constante motivación para ser un mejor estudiante y persona, así como la oportunidad que me brindó de realizar una estancia en el extranjero. Sin su ayuda, tanto yo como este trabajo no seríamos lo que somos ahora. Usted es la viva imagen de cómo debería ser la ciencia en México, espero contar con su amistad por mucho tiempo.

Expreso también un sincero agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial por su importante aporte en el desarrollo de este trabajo de tesis, destacando su disposición para que nuestras reuniones semestrales resultaran beneficiosas a nivel académico y personal. Agradezco especialmente a la Dra. Luz Alcántara, por su participación, disposición y generosidad al compartir su experiencia y conocimiento en las pruebas biológicas. Su participación enriqueció enormemente el trabajo realizado, y espero podamos seguir colaborando en el futuro.

De manera especial agradezco a la Prof. Silvia Farè y al M.C. Matteo Pitton, del Departamento de química, materiales e ingeniería química “Giulio Natta” del Politécnico de Milán, por aceptarme en su grupo de trabajo durante 3 meses. Agradezco la amabilidad y disposición durante la estancia, donde recibí todo el apoyo profesional

y logístico para alcanzar los objetivos propuestos. Les agradezco por brindarme una de las mejores experiencias de mi vida académica y personal.

Quiero agradecer a mis compañeros y amigos de la maestría, Antonio, Yeraldi, Rosario y América. Han sido dos largos años en los cuales nos hemos tenido que enfrentar a un sin número de obstáculos, lo cuales recuerdo con mucho cariño gracias a ustedes. Agradezco su generosidad al compartir lo que yo considero la cosa más valiosa del mundo, su tiempo, en este camino sinuoso llamado maestría. Siempre los consideraré excelentes personas, estudiantes y amigos.

Al grupo de polímeros, mis amigos y compañeros de desventuras, Yeraldi, Hugo, Nora, Juan Carlos, deni y Jaz, tengo solo palabras de agradecimiento por hacer más amena mi estancia en el laboratorio. Su ayuda, consejos y amistad siempre las atesoraré, al igual que las pláticas, historias y las vivencias compartidas. Agradecimientos especiales al Dr. Hugo Ramos, por enseñarme tanto sobre el mundo de la investigación y la vida misma. Sin darme cuenta, se ha convertido en un gran amigo y espero que, en un futuro cercano, me convierta en su colega.

A mi familia, mis padres, Rosa María y Alfredo, les agradezco por ser un pilar fundamental en mi educación, por su apoyo incondicional a través de este viaje. A pesar de no estar físicamente presentes, sé perfectamente que siempre han procuraron mi bienestar. A mis hermanos Johan y Joselin, por estar siempre a mi lado, esperando siempre darles un ejemplo de que con perseverancia se alcanzan los sueños. Por último, agradezco a mis tíos, primos, sobrinos y, en general, a toda mi familia, ya que el apoyo de cada uno de ustedes me brinda la fortaleza necesaria para seguir adelante.

Por supuesto, agradezco a la persona que ha sido mi cómplice y compañera de vida durante estos últimos 4 años: Daniela, mi girasol bello. Sin tu apoyo, colaboración e inspiración, no hubiera podido superar este proceso, que en ocasiones se tornaba inalcanzable. Gracias por ayudarme a sobrellevar la presión y los momentos difíciles. Te amo con todo mi corazón.

Finalmente, agradezco al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por darme la oportunidad de pertenecer a esta gran comunidad.

Índice de contenido

Constancia de aprobación de la tesis	II
Créditos Institucionales	III
Acta de examen de grado	VI
Dedicatoria	VII
Agradecimientos	VIII
Índice de contenido	X
Índice de tablas	XIV
Índice de figuras	XV
Abreviaturas	XXI
Glosario	XXII
Resumen	XXV
Abstract	XXVII
Introducción	1
Principal problema por solucionar (Justificación)	4
Hipótesis	5
Objetivos	6
<i>Objetivo general</i>	6
<i>Objetivos específicos</i>	6
Compendio del trabajo de investigación	8
CAPÍTULO 1. Avances en el desarrollo de andamios poliméricos multicapa para aplicaciones en Ingeniería de Cartílago: Estado actual.	11
1.1 <i>Análisis bibliométrico</i>	11
1.2 <i>Generalidades del tejido cartilaginoso</i>	16
1.2.1 Cartílago articular: función y organización	17
1.2.2 Deterioro del cartílago articular	18
1.3 <i>Tratamientos disponibles actuales para enfermedades del cartílago articular</i>	20
1.3.1 Técnicas de reparación de tejido	20
1.3.2 Técnicas de sustitución de cartílago	21
1.3.3 Técnicas de regeneración celular	23

1.3.4 Limitaciones y desafíos	25
1.4 Desarrollo de andamios poliméricos multicapa: Un avance en la IT para la regeneración de cartílago.	29
1.4.1 Técnicas de fabricación de andamios poliméricos multicapa	29
1.4.2 Biomateriales para andamios multicapa biomiméticos	40
1.5 Dirección de la investigación	44
CAPÍTULO 2. Técnicas Experimentales	46
2.1 Reactivos químicos utilizados	46
2.1.1 Procesamiento del andamio por FDLF	46
2.1.2 Procesamientos de andamios por Impresión 3D y EH	46
2.1.3 Construcción de andamios multicapa	46
2.2 Técnicas de caracterización	47
CAPÍTULO 3. Fabricación y evaluación de un andamio de PLA-CMC entrecruzado con ácido cítrico, mediante la técnica de fundición de disolvente para aplicaciones de ingeniería de tejidos.	53
3.1 Metodología experimental	54
3.1.1 Procesamiento mediante la técnica FDLF.	54
3.1.2 Caracterización macroscópica cualitativa.	55
3.1.3 Caracterización de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).	55
3.1.4 Caracterización morfológica.	55
3.1.5 Humectabilidad y retención de agua.	56
3.1.6 Caracterización mecánica por tensión	57
3.1.6 Caracterización térmica	57
3.1.7 Caracterización biológica	57
3.2 Resultados y discusión	58
3.2.1 Efecto del entrecruzamiento	58
3.2.2 Caracterización espectroscópica	59
3.2.3 Caracterización morfológica	65
3.2.4 Caracterización mecánica	72
3.2.5 Caracterización de la humectabilidad	75
3.2.6 Caracterización térmica	79
3.2.7 Caracterización biológica	82
3.3 Notas finales del capítulo	84
CAPÍTULO 4. Análisis de la variación estructural en andamios de PLA procesados por diversas técnicas.	85
4.1 Metodología experimental	85
4.1.1 Procesamiento por impresión 3D	85
4.1.2 Procesamiento por electrohilado (EH)	86
4.1.3 Caracterización macroscópica cualitativa	87
4.1.4 Caracterización de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	87

4.1.5 Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM).	87
4.1.6 Caracterización de la humectabilidad por ángulo de contacto	87
4.1.7 Caracterización térmica	87
4.2 Resultados y discusión	88
4.2.1 Evaluación preliminar de la estructura interna de los andamios	88
4.2.2 Caracterización mediante espectroscopía FTIR-ATR	89
4.2.3 Caracterización morfológica mediante SEM.	92
4.2.4 Ángulo de contacto	96
4.2.5 Caracterización térmica	98
4.3 Notas finales del capítulo	103
CAPITULO 5. Diseño, construcción y evaluación biológica de un andamio polimérico multicapa para su aplicación en ingeniería de tejidos.	104
5.1 Metodología experimental	105
5.1.1 Construcción del andamio multicapa	105
5.1.2 Eliminación del agente entrecruzante químico (AEQ) residual	106
5.1.3 Caracterización macroscópica cualitativa	107
5.1.4 Caracterización espectroscópica	107
5.1.5 Caracterización morfológica por microscopía óptica	107
5.1.6 Caracterización de la capacidad de retención de agua	107
5.1.7 Ángulo de contacto	108
5.1.8 Caracterización mecánica por compresión	108
5.1.9 Caracterización biológica	108
5.2 Resultados y discusión	110
5.2.1 Caracterización macroscópica de los andamios	110
5.2.2 Reflectancia Total Atenuada mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	111
5.2.3 Carácter hidrofílico de los andamios multicapa	115
5.2.4 Efecto de la incorporación del CS sobre las propiedades mecánicas de los andamios multicapa.	118
5.2.5 Respuesta citotóxica previo a la eliminación de excedente de AEQ	121
5.2.6 Respuesta citotóxica y actividad metabólica posterior a la eliminación de excedente de AEQ sobre fibroblastos L929.	127
5.3 Notas finales del capítulo	130
CAPITULO 6. Andamios poliméricos 3D multicapa, con base en PLA-CMC y agregados bioactivos para ingeniería de cartílago articular.	131
6.1 Metodología experimental	131
6.1.1 Construcción del andamio multicapa	131
6.1.2 Eliminación del agente de entrecruzante residual	133
6.1.3 Caracterización macroscópica cualitativa	134
6.1.4 Caracterización espectroscópica	134
6.1.5 Caracterización morfológica	134
6.1.6 Caracterización de la humectabilidad por ángulo de contacto y capacidad de retención de agua.	135

6.1.7 Caracterización mecánica por compresión	135
6.1.8 Caracterización térmica	136
6.1.9 Caracterización biológica	136
6.2 Resultados y discusión	140
6.2.1 Efecto del tratamiento térmico y la introducción del CS sobre las propiedades fisicoquímicas y térmicas de los andamios multicapa.	140
6.2.2 Efecto de la introducción del CS en el carácter hidrofílico y la estabilidad mecánica de los andamios multicapa.	166
6.2.3 Actividad metabólica y expresión génica de Células Madre Mesenquimales (CMM) posterior a la incorporación de CS en los andamios multicapa.	184
6.3 Notas finales del capítulo	198
CAPÍTULO 7. Conclusiones generales	199
7.1 Conclusiones generales	199
7.2 Contribuciones de esta tesis	200
7.3 Productos científicos	201
7.3.1 Asistencia a congresos	201
7.3.2 Acuerdos generados	201
CAPÍTULO 8: Referencias Bibliográficas	203

Índice de tablas

Tabla 1.1. Tendencias de investigación relevantes.	13
Tabla 1.2. Enfoques comúnmente usados para la regeneración de tejido articular humano.	27
Tabla 1.3. Técnicas de procesamiento generalmente utilizadas para la creación de andamios multicapa.	38
Tabla 2.1. Especificaciones generales de las técnicas analíticas utilizadas.	49
Tabla 3.1. Valores destacados en el espectro FTIR.	59
Tabla 3.2. Parámetros mecánicos de cada andamio.	74
Tabla 4.1. Asignación de bandas características para los andamios de PLA procesados por distintas técnicas	91
Tabla 4.2. Parámetros térmicos obtenidos de las diferentes procesamientos.	100
Tabla 5.1. Asignación de bandas características para los andamios multicapa.	112
Tabla 5.2. Ángulo de contacto de los materiales PLA-HA, PCH10CX, PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS.	117
Tabla 5.3. Parámetros mecánicos de cada andamio multicapa ante el esfuerzo de compresión axial.	119
Tabla 6.1. Cebadores utilizados para el análisis qRT-PCR.	139
Tabla 6.2. Asignación de las bandas identificadas en los andamios multicapa con una mayor concentración de AEC y un tratamiento térmico.	143
Tabla 6.3. Asignación de las bandas identificadas en los andamios multicapa PCH20CXT al incorporar CS.	146
Tabla 6.4. Características térmicas más relevantes de cada andamio.	151
Tabla 6.5. Resumen de las propiedades mecánicas del andamio PCH20CXT a lo largo de 7 días de inmersión.	176
Tabla 6.6. Resumen de las propiedades mecánicas del andamio PCH20CXT-0.25%CS a lo largo de 7 días de inmersión.	178
Tabla 6.7. Resumen de las propiedades mecánicas del andamio PCH20CXT-0.5%CS a lo largo de 7 días de inmersión.	180

Índice de figuras

Figura 1.1. Representación de las palabras clave en forma de red interconectada.	12
Figura 1.2. Evolución en la dirección de investigación mediante la palabras clave.	14
Figura 1.3. Contribución mundial a la investigación sobre la regeneración del tejido cartilaginoso. A) Producción científica mundial; B) Los 10 países con mayor productividad; C) Campos de estudio en los principales centros de investigación del mundo.	15
Figura 1.4. Diagrama de los tipos de cartílago y sus diferencias más importantes. Tomada y modificada de Gartner (2021) [55].	16
Figura 1.5. Estructura del Cartílago Articular Adulto: En la imagen de la izquierda, se presenta un esquema que ilustra la organización celular en las distintas zonas del tejido. En la imagen de la derecha, se muestra la arquitectura de las fibras de colágeno. Tomada y modificada de D. Correa (2017) [6].	17
Figura 1.6. Imágenes macroscópicas de cartílago articular humano: (a) fotografía de una articulación femoral de la rodilla normal; (b) articulación femoral de la rodilla con osteoartritis, presenta varias erosiones en la superficie (*). Tomada y modificada de Grogan (2015) [76].	19
Figura 1.7. Modalidades de reparación del cartílago más comunes. A) Lesión de cartílago de espesor total. B) Microfractura, C) Aloinjertos, D) Implantación de condrocitos autólogos (ICA), E) Implantación de CMPP y F) Combinación de CMM y FC. Tomada y modificada de Le (2020) [108].	26
Figura 1.8. Diagrama esquemático del proceso de extrusión y deposición por MDF. Tomado y modificado de Pati (2015) [116]	30
Figura 1.9. Diagrama esquemático de la configuración horizontal de un equipo de electrohilado. Tomado y modificado de AZoNano (2023)	31
Figura 1.10. Ilustración de la formación de película mediante la técnica de fundición con disolvente. Tomada y modificada de Kanaan (2021) [126].	32
Figura 1.11. Características esenciales de un hidrogel para su uso en IT. A) entrecruzamiento, B) estructura 3D, C) capacidad de hinchamiento, D) hidrofílico, E) capacidad de controlar la solubilidad.	34
Figura 1.12. Representación gráfica del entrecruzamiento químico que ilustra el tipo de enlace dentro del material. Tomado y modificado de Ramachandran (2019) [138]	34

Figura 1.13. Estructura y disposición espacial del ácido cítrico.	35
Figura 1.14. Diagrama esquemático del entrecruzamiento de cadenas de polisacáridos inducida por enlaces de hidrógeno. Tomada y modificada de Qureshi (2020) [137]	36
Figura 2.1. Esquema de las técnicas descritas en la Tabla 2 para cada una de las secciones que componen los andamios multicapa y las variaciones de los andamios multicapa en sí.	47
Figura 3.1. Metodología para la fabricación de andamios por la técnica FDLP a partir de PLA-CMC con diferente contenido de entrecruzante. (a) Preparación de la soluciones base; (b) entrecruzamiento; (c) evaporación del solvente; (d) eliminación de residuos del solvente y del AEQ; (e) obtención de los andamios.	54
Figura 3.2. Fotografías de compositos poliméricos entrecruzados A) secos y B) húmedos. Se destaca en la circunferencia roja un recubrimiento transparente.	58
Figura 3.3. Espectro FTIT de las muestras AFD5CX, AFD7CX y AFD10CX, así como del CMC y PLA HA.	60
Figura 3.4. Esquema propuesto de A) la reacción de entrecruzamiento ente CMC-AC, B) con la capacidad de formar una red tridimensional e C) interactuar con el PLA.	62
Figura 3.5. Seguimiento, a lo largo del tiempo, de la reacción de entrecruzamiento en el andamio AFD10CX.	64
Figura 3.6. Imágenes ópticas de los andamios secos y húmedos obtenidos por FDPL. A) PLA HA; B) AFD5CX seco; C) AFD7CX seco; D) AFD10CX seco; E) AFD5CX húmedo; F) AFD7CX húmedo y G) AFD10CX húmedo.	66
Figura 3.7. Imágenes SEM de los andamios obtenidos a una magnificación de 70x. A) PLA HA; B) AFD5CX; C) AFD7CX; D) AFD10CX.	68
Figura 3.8. Imágenes SEM de los andamios obtenidos a una magnificación de 500x. A) PLA-HA; B) AFD5CX; C) AFD7CX; D) AFD10CX.	69
Figura 3.9. Imágenes SEM de los andamios obtenidos a una magnificación de 5,000x. A) PLA HA; B) AFD5CX; C) AFD7CX; D) AFD10CX.	70
Figura 3.10. Imágenes SEM de los andamios obtenidos a una magnificación de 15,000x. A) AFD5CX; B) AFD7CX; C) AFD10CX.	71
Figura 3.11. Análisis EDX de los andamios A) AFD5CX, B) AFD7CX y C) AFD10CX.	72
Figura 3.12. Comportamiento esfuerzo-deformación de las diferentes muestras bajo cada uno de los tratamientos.	73

Figura 3.13. A) Efecto del tiempo de entrecruzamiento en la capacidad de absorción de agua en los andamios PLA-CMC durante las primeras 5 horas; B) Representación macroscópica del hinchamiento durante la primera hora.	76
Figura 3.14. Efecto del tiempo de entrecruzamiento en la capacidad de hinchamiento en los andamios PLA-CMC durante 3 semanas.	77
Figura 3.15. A) Tendencia que presenta el ángulo de contacto contra la concentración de AC agregado en los andamios. B) Tamaño de poro observado en los andamios bajo tres diferentes concentraciones de AC.	78
Figura 3.16. Termogramas DSC de A) PLA-HA, B) CMC y C) ADF10CX.	80
Figura 3.17. A) Esquema de la viabilidad celular basado en el ensayo MTT. B) Absorbancia de los andamios después de 24 horas de incubación con CMM 500-010. ****($p>0.0001$).	83
Figura 4.1. Esquema de la metodología para el procesamiento de andamios por medio de las técnicas A) Impresión 3D y B) electrohilado (EH).	86
Figura 4.2. Andamios de PLA procesado mediante A) EH e B) impresión 3D. Estructura interna de los andamios C) PLA-EH y D) PLA-3D, bajo microscopía óptica de campo claro a una magnificación de 500x.	89
Figura 4.3. Espectros FTIR-ATR de los andamios obtenidos mediante diferentes técnicas de procesamiento.	90
Figura 4.4. Micrografías de los andamios procesados mediante electrohilado (PLA EH), a A) 5000x, C) 10,000x y E) 20,000x, e impresión 3D (PLA 3D), a B) 5000x, D) 10,000x y F) 20,000x.	93
Figura 4.5. A) Distribución del tamaño de las fibras (DTF) y B) Distribución del tamaño de los poros (DTP) observados en el andamio de PLA EH. C) Distribución del tamaño de los poros (DTP) observados en el andamio de PLA 3D.	94
Figura 4.6. Ángulo de contacto de los andamios A) PLA 3D y B) PLA EH.	97
Figura 4.7. A) Curvas DSC del procesamiento del PLA por impresión 3D y EH. B) Intervalo de temperatura de la transición vítrea en el PLA 3D y PLA EH.	99
Figura 5.1. Esquema de la metodología propuesta para construir andamios poliméricos multicapa. (a)determinación de la cantidad de CMC; (b)formulación de la solución de anclaje; (c)montaje del andamio y (d)entrecruzamiento de los polímeros.	105
Figura 5.2. Metodología para la remoción de AC remanente: A) ajuste de pH con agua estéril hasta alcanzar pH de 6.5 y B) ajuste de pH con medio de cultivo hasta alcanzar un pH de 8.5.	106

Figura 5.3. Fotografías macroscópicas del compuesto multicapa PCH10CX-1%CS A)seco y B)húmedo.	110
Figura 5.4. Identificación y comparativa de los grupos funcionales presentes en los espectros FTIR-ATR de los andamios multicapa con respecto a los materiales base.	111
Figura 5.5. Efecto del CS sobre la capacidad de retención de agua en los andamios multicapa de PLA-CMC.	115
Figura 5.6. Comportamiento a la compresión de los andamios con 0%, 0.5% y 1% (p/p) de CS.	118
Figura 5.7. Viabilidad celular de lo Fibroblastos L929 después de 7 días de incubación sobre los andamios multicapa.	122
Figura 5.8. Morfología de las células expuesta al A)Medio de cultivo a 1 día y B) 7 días; Andamio PLA 3D a C)1 día y a D) 7 días; Andamio PLA EH a E) 1 días y a F) 7 días.	123
Figura 5.9. Morfología de las células expuesta a A)PCH10CX a 1 día y B) 7 días; PCH10CX -0.5%CS a c)1 día y D) 7 días; PCH10CX -1%CS a E) 1 días y F) 7 días.	124
Figura 5.10. Posibles causas del efecto citotóxico. A)baja estabilidad estructural del andamio y b) pH ácido de los andamios observado a los 15 min de que la muestra entra en contacto con el agua (b2*), comparado con el pH del agua (b1*).	125
Figura 5.11. Respuesta citotóxica de la línea celular de los fibroblastos L929 posterior a la eliminación del exceso de AC.	128
Figura 5.12. Respuesta de citocompatibilidad de la línea celular de los fibroblastos L929 posterior a la eliminación del exceso de AEQ.	129
Figura 6.1. Esquema de la metodología propuesta para construir andamios poliméricos multicapa. (a)determinación de la cantidad de CMC; (b)formulación de la solución de anclaje; (c)montaje del andamio, (d) entrecruzamiento de los polímeros y (e)unión de las capas por temperatura.	132
Figura 6.2. Metodología para la remoción de AC remanente: A) ajuste de pH con agua estéril hasta alcanzar pH de 6.5 y B) ajuste de pH con medio de cultivo hasta alcanzar un pH de 8.5.	133
Figura 6.3. Diferenciación macroscópica de los andamios en función de la concentración de AC: A) 10% y B) 20%AC. Así como la variación en concentración de CS en cada una: a1) y b1)0%; a2) 0.5% y b2)0.25%CS; a3)1% b3)0.5%CS.	141

Figura 6.4. Espectros FTIR-ATR obtenido de los andamios multicapa al modificar la concentración de AEQ y exponerlos a un tratamiento térmico posterior.	142
Figura 6.5. Espectros FTIR-ATR obtenido de los andamios multicapa con tratamiento térmico al modificar la concentración de CS.	145
Figura 6.6. Termogramas generados a partir de la técnica DSC de los andamios multicapa.	150
Figura 6.7. Sección transversal del andamio multicapa PCH20CXT a 125x, obtenida mediante fractura criogénica.	154
Figura 6.8. Magnificación a 2000x a cada estructura que compone el andamio PCH20CXT. A) PLA 3D, B) PLA EH, C) ADF10CX.	155
Figura 6.9. Análisis de la composición química mediante EDS en el Contexto del andamio multicapa PCH20CXT.	157
Figura 6.10. Morfología panorámica de una sección transversal del andamio PCH20CXT-0.25%CS a 125x.	158
Figura 6.11. Magnificación a 10,000x a las estructuras A) PLA EH y B) PLA 3D, que componen el andamio PCH20CXT-0.25%CS.	159
Figura 6.12. Seguimiento de la difusión de la HAp en el andamio y su efecto al interactuar con CS sobre andamio multicapa PCH20CXT-0.25%CS, mediante la identificación química por EDS.	161
Figura 6.13. Sección transversal del andamio multicapa PCH20CXT-0.5%CS a 125x, obtenida mediante fractura criogénica.	162
Figura 6.14. Magnificación a 5,000x a cada estructura que compone el andamio PCH20CXT-0.25%CS. A) PLA 3D, B) PLA EH y C) ADF10CX.	164
Figura 6.15. Seguimiento de la difusión de la HAp en el andamio y su efecto al interactuar con una concentración de 0.5% (p/p) de CS, mediante la identificación química por EDS.	165
Figura 6.16. Medición del ángulo de contacto de los andamios A) PCH20CXT, B) PCH20CXT-0.25%CS y C) PCH20CXT-0.5%CS.	167
Figura 6.17. Capacidad de absorción de agua de los andamios multicapa después de un período de 4 horas de exposición a la solución SBF.	170
Figura 6.18. Representación gráfica de la evolución del hinchamiento en los andamios multicapa a lo largo de una semana de interacción con la solución SBF.	172

Figura 6.19. Curvas de esfuerzo deformación del andamio multicapa PCH20CXT a lo largo de una semana de inmersión en SBF.	175
Figura 6.20. Curvas de esfuerzo deformación del andamio multicapa PCH20CXT-0.25%CS, a lo largo de una semana de inmersión en SBF.	177
Figura 6.21. Curvas de esfuerzo deformación del andamio multicapa PCH20CXT-0.5%CS, a lo largo de una semana de inmersión en SBF.	179
Figura 6.22. Difractogramas de los andamios multicapa tras 7 días de inmersión en SBF en contraste con PLA cargado con HAp.	182
Figura 6.23. Comparativa del efecto citotóxico de los andamios multicapa mediante el análisis colorimétrico AlamarBlue™.	184
Figura 6.24. Fluorescencia azul de las células teñidas en su núcleo. A)ADF10CX, B)PLA 3D, C)PLA EH, D)PCH20CXT, E)PCH20CXT-0.25%CS, F)PCH20CXT-0.5%CS.	186
Figura 6.25. Comparación de la actividad metabólica de las CMM entre los grupos de control y los andamios multicapa.	188
Figura 6.26. Representación gráfica de la curva de amplificación del gen Sox9, expresado al final del proceso de evaluación en los diferentes andamios.	190
Figura 6.27. Representación gráfica de la curva de amplificación del gen Col2a1, expresado al final del proceso de evaluación en los diferentes andamios	191
Figura 6.28. Representación gráfica de la curva de amplificación del gen Acan, expresado al final del proceso de evaluación en los diferentes andamios	194
Figura 6.29. Representación gráfica de la curva de amplificación del gen Runx2, expresado al final del proceso de evaluación en los diferentes andamios.	196

Abreviaturas

3D	Tercera dimensión.
AC	Ácido cítrico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
AEQ	Agentes de entrecruzamiento químico.
AH	Ácido hialurónico.
CM	Células madre.
CMC	Carboximetilcelulosa.
CMM	Células madre mesenquimales.
CMPP	Células madre pluripotenciales.
Cq	Ciclo de umbral crítico.
CS	Condroitín sulfato.
DFT	Distribución del tamaño de fibra.
GAG	Glicosoaminoglicanos.
HAp	Hidroxiapatita.
IT	Ingeniería de tejidos.
MEC	Matriz Extracelular.
PBS	Tampón de fosfato salino.
PLA	Poli(ácido láctico).
SBF	Fluido corporal simulado.

Glosario

Anabolismo: Conjunto de procesos metabólicos en el cuerpo que se encargan de construir y sintetizar moléculas más complejas (proteínas, lípidos y carbohidratos,) a partir de componentes más simples.

Anhidroglucosa: Una forma de glucosa sin agua.

Anómeros: Isómeros que difieren en la configuración espacial alrededor de un átomo de carbono anomérico en los azúcares.

Articulación sinovial: Tipo de articulación móvil en el cuerpo humano, con cavidad sinovial que permite el movimiento entre los huesos.

Biocompatible: Material que es compatible con sistemas biológicos, como tejidos y órganos, sin causar respuestas adversas.

Biodegradable: Capacidad de un material para descomponerse de forma natural mediante procesos biológicos.

Colgajo: Un segmento de tejido vascularizado que se traslada de un lugar a otro en el cuerpo para la reconstrucción.

Corticoesteroides: Medicamentos que contienen esteroides y tienen propiedades antiinflamatorias.

Desbridamiento: Proceso de limpieza y eliminación de tejido muerto o dañado, comúnmente utilizado en heridas.

Diartrosis: Tipo de articulación sinovial que permite el movimiento libre entre los huesos.

Ectodermo: Capa externa del embrión que se desarrolla en tejidos como la piel y el sistema nervioso.

Eluatos: Sustancias arrastradas por un disolvente desde una matriz, como en la cromatografía.

Endógenos: Procesos o sustancias que se originan internamente dentro del cuerpo.

Epiglotis: Una estructura en la garganta que evita que los alimentos entren en la tráquea durante la deglución.

Fenotipo: Conjunto de características observables de un organismo determinadas por su genotipo (información genética única que determina las características y rasgos de un individuo) y el entorno.

Hueso subcondral: Hueso situado debajo del cartílago en una articulación.

Líquido sinovial: Fluido que lubrica las articulaciones y facilita el movimiento.

Matriz extracelular: Red de moléculas que proporciona soporte estructural y señales a las células en tejido.

Mesodermo: Capa del embrión que se desarrolla en tejidos como músculos, huesos y sistema circulatorio.

Migración celular: Movimiento de células de un lugar a otro en el cuerpo.

Morfogénesis: Proceso de formación de la estructura y forma del cuerpo durante el desarrollo embrionario.

Osteofitos: Crecimientos óseos anormales en los bordes de los huesos, comúnmente asociados con la osteoartritis.

Pericondrio: Tejido que rodea el cartílago y contribuye a su crecimiento y mantenimiento.

Polipéptidos: Cadenas cortas de aminoácidos, los componentes básicos de las proteínas.

Prolifertiva: Relativo al aumento rápido del número de células.

Proteoglicanos: Moléculas compuestas de proteínas y carbohidratos que forman parte de la matriz extracelular.

Tejido conectivo: Tipo de tejido que proporciona soporte estructural y conexiones entre diferentes tipos de tejidos en el cuerpo.

Tumorigénica: Capacidad de causar la formación de tumores.

Viscosuplementos: Sustancias inyectables para aumentar la viscosidad del líquido sinovial en articulaciones con osteoartritis.

Resumen

Compositos poliméricos entrecruzados de CMC-PLA y su posible uso como andamio para soporte y diferenciación de células para regeneración de cartílago

Aspectos destacados:

- Uso de materiales base, considerados como “materias primas”.
- Incorporación de concentraciones de CS por debajo del 1% (p/p).
- Uso y manejo de técnicas de bajo costo y fácil acceso para el procesamiento de cada una de las capas del andamio.
- Implementación de metodología novedosa para conformar un andamio multicapa.
- Identificación de la expresión de genes característicos de la condrogénesis, sin el uso conjunto de factores de crecimiento.

El cartílago articular hialino, esencial para el óptimo funcionamiento de las articulaciones, tiene una capacidad limitada de regeneración debido a su anatomía e histología. A pesar de los avances en este campo en los últimos años, la mayoría de los tratamientos disponibles no han ofrecido los mejores resultados y a menudo tienen un carácter profiláctico. La ingeniería de tejidos (IT) se presenta como una rama de la ingeniería biomédica que ofrece soluciones prometedoras para la reparación y regeneración de tejidos dañados. En este contexto, los andamios poliméricos multicapa surgen como una estrategia innovadora para recrear eficazmente la compleja estructura basada en células y macromoléculas del cartílago.

Por primera vez, hasta donde es del conocimiento del autor, se presenta la conformación de un andamio multicapa bioinspirado mediante la sinergia del Polí(ácido láctico) (PLA) y la carboximetilcelulosa (CMC), entrecruzada con ácido cítrico (AC), junto con la Hidroxiapatita (HAp) y el Condroitín Sulfato (CS). A través de

las técnicas de impresión en tercera dimensión (3D), electrohilado (EH) y fundición por disolvente (FDLP), se creó un microambiente que imita al tejido nativo, proporcionando una estructura tridimensional estratificada con porosidades macroscópicas, alta capacidad de retención de agua (hasta $\approx 490\%$), superhidrofilicidad ($\theta = 13.8^\circ \pm 1.3^\circ$), estabilidad mecánica y una excelente respuesta biológica hacia células madre mesenquimales (CMM), logrando una alta tasa de viabilidad celular ($>90\%$) y actividad metabólica, así como la expresión de los principales genes de diferenciación condrogénica (Sox9, Col2A1 y Acan).

Este estudio demuestra la viabilidad de los andamios poliméricos multicapa para aplicaciones en ingeniería de cartílago. La combinación de materiales biodegradables, la regulación de propiedades intrínsecas y extrínsecas, y el diseño de andamios con características similares a la matriz extracelular (MEC) ofrece una estrategia prometedora para la regeneración efectiva del tejido cartilaginoso. Sin embargo, las limitaciones en la calidad de las materias primas y la falta de estímulos externos de compresión mecánica deben considerarse en futuras investigaciones en este ámbito. No obstante, el enfoque de la presente tesis es innovador y podría tener un impacto significativo en el campo de la medicina regenerativa y la terapia de tejidos.

Palabras Clave: Andamios multicapa, ingeniería de cartílago, Poli(ácido láctico), carboximetilcelulosa, condroitín sulfato.

Abstract

Crosslinked CMC-PLA Polymeric Composites and Their Potential Use as Scaffolds for Cell Support and Cartilage Regeneration

Highlights:

- Use of base materials considered as "raw materials."
- Incorporation of CS concentrations below 1% (w/w).
- Use and implementation of low-cost and readily accessible techniques for processing each layer of the scaffold.
- Novel methodology used for constructing a multilayered scaffold.
- Identification of characteristic gene expression in chondrogenesis without the simultaneous use of growth factors.

Hyaline articular cartilage, crucial for optimal joint function, has limited regenerative capacity due to its anatomy and histology. Despite recent advances in this field, most available treatments have not yielded optimal results and often have a prophylactic nature. Tissue engineering (TE) emerges as a branch of biomedical engineering that offers promising solutions for the repair and regeneration of damaged tissues. In this context, multilayered polymeric scaffolds arise as an innovative strategy to effectively recreate the complex cell and macromolecule-based structure of cartilage.

For the first time, as far as it is known to the author, the formation of a bioinspired multilayered scaffold is presented, leveraging the synergy of Poly(lactic acid) (PLA) and carboxymethylcellulose (CMC), crosslinked with citric acid (CA), along with Hydroxyapatite (HAp) and Chondroitin Sulfate (CS). Through third-dimensional printing (3D), electrospinning (ES), and solvent casting (SC), a microenvironment mimicking native tissue was created, providing a stratified three-dimensional structure with macroscopic porosities, high water retention capacity (up to $\approx 490\%$),

superhydrophilicity ($\theta = 13.8^\circ \pm 1.3^\circ$), mechanical stability, and an excellent biological response to pluripotent stem cells (PSCs), achieving a high cell viability rate (>90%) and metabolic activity, as well as the expression of key chondrogenic differentiation genes (Sox9, Col2A1, and Acan).

This study demonstrates the feasibility of multilayered polymeric scaffolds for applications in cartilage engineering. The combination of biodegradable materials, regulation of intrinsic and extrinsic properties, and scaffold design with features resembling the extracellular matrix (ECM) offers a promising strategy for the effective regeneration of cartilaginous tissue. However, limitations in raw material quality and the absence of external mechanical compression stimuli must be considered in future research in this field. Nonetheless, this approach is innovative and could have a significant impact in the field of regenerative medicine and tissue therapy.

Keywords: *Multilayered scaffolds, cartilage engineering, Poly(lactic acid), carboxymethylcellulose, chondroitin sulfate.*

Introducción

El cartílago articular humano en su estado sano es un tejido vivo que permite un movimiento prácticamente exento de fricción en las articulaciones sinoviales, al mismo tiempo que protege al hueso subcondral del estrés mecánico, gracias a su amplia red de matriz extracelular (MEC) y las macromoléculas que lo conforman (colágeno, elastina, fibronectina, proteoglicanos y lamininas) [1]. Desde una perspectiva histológica, el tejido cartilaginoso, situado en la diartrosis, exhibe una estructura excepcionalmente organizada en zonas de células, denominadas condrocitos, y MEC [2]. Cada una de estas zonas presentan variaciones tanto en su estructura como en su composición, abarcando aspectos como el diámetro y la orientación de las fibras de colágeno, concentración de proteoglicanos, como el condroitín sulfato (CS), y el volumen de agua anclada a estos proteoglicanos [3]. Tales variaciones ejercen una influencia significativa en la morfología y las funciones de los condrocitos, dependiendo de la región del cartílago en la que se encuentren [4].

En el ámbito de la ciencia médica, no es un secreto que a medida que envejecemos, la actividad anabólica y proliferativa de muchos de nuestros tejidos disminuye de manera notable. Aunque el cartílago es un tejido resistente y duradero no es una excepción a este fenómeno, ya que en su etapa de maduración, la actividad mitótica se reduce casi en su totalidad, manteniendo solamente una baja actividad metabólica destinada a la síntesis y degradación de los componentes de la MEC [5]. A pesar de la marcada respuesta del hueso subcondral, estas condiciones, sumadas a la escasa presencia de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas [6], dificultan la migración de células cartilaginosas en caso de producirse una lesión [7], dando lugar a un tejido fibroso o fibrocartilaginoso que es mecánicamente inadecuado para una unión estructural duradera [8]. Esta es la razón por la cual la mayoría de las afecciones cartilaginosas experimentan una evolución negativa, afectando la estructura y función de los tejidos u órganos, lo que conlleva dolor y restricciones en el movimiento [9].

De acuerdo con el Colegio Americano de Reumatología y Artritis, en el año 2020, aproximadamente 302 millones de personas en todo el mundo sufrían de algún problema relacionado con la degeneración o atrofia en alguna articulación [10]. Hasta el año 2017, en México, de acuerdo con cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), se tenía registro de un alto porcentaje de casos, afectando poco más de un millón de personas, de las cuales el 40% sufría de dolor crónico [11]. Esto se traduce en una pérdida aproximada de 2.3 años de vida saludable, lo que contribuye a que sea una de las diez principales causas de invalidez total en México, aumentando así la carga económica y social del país [12]. Se espera que estas cifras sigan en aumento debido a la obesidad y los malos hábitos alimenticios, que son especialmente comunes entre los jóvenes [13]. La carga adicional que lleva estas articulaciones, debido al exceso de peso corporal, contribuye al desgaste prematuro del cartílago articular [14].

Idealmente, los tratamientos médicos deberían de reconstituir o imitar la compleja composición macromolecular del cartílago articular, así como su organización específica por zonas [15]. Sin embargo, las opciones terapéuticas disponibles actualmente, como la implantación de condrocitos autólogos [16], aloinjertos [17] y la microfractura [18], en muchas ocasiones se limitan a mitigar los efectos secundarios, a pesar de mostrar una gran eficiencia [19]. Esto se debe a la falta de una integración celular sólida con el tejido nativo, lo que promueve la formación de fibrocartílago [6].

A lo largo de la historia, la ingeniería de tejidos (IT) ha implementado estrategias para desarrollar materiales capaces de replicar las funciones mecánicas y biológicas del tejido óseo y cartilaginoso [20]. En este contexto, la técnica de andamios multicapas ha emergido como un enfoque prometedor para abordar los desafíos en la regeneración del cartílago. La capacidad de recrear una estructura multicapa similar al tejido cartilaginoso nativo ofrece nuevas posibilidades para mejorar la función y viabilidad de los implantes utilizados en la terapia regenerativa del cartílago [21]. Para lograrlo, se han utilizado diversas aproximaciones conjuntas que aseguran el control de las propiedades intrínsecas y extrínsecas. Entre estos enfoques se incluye la impresión en tercera dimensión (3D), que permite regular el tamaño y distribución de poros [22]; el método de electrohilado (EH), que contribuye a mantener la estabilidad mecánica y el

control en la dirección de las fibras [23]; y la fundición con disolvente (FDLP), que garantiza el control en el diseño del andamio [24].

Los hidrogeles, estructuras poliméricas tridimensionales capaces de retener grandes cantidades de agua sin comprometer su estabilidad mecánica [25], son ampliamente utilizados en IT para migración celular, la curación de heridas y la morfogénesis, debido a su capacidad de degradación controlada y su similitud con la matriz extracelular (MEC) [26,27]. Los hidrogeles con base en materiales sintéticos biodegradables, como el poli(ácido láctico) (PLA), proporcionan resistencia mecánica para mantener una tensión en las células alojadas en el hidrogel, permitiendo emular la carga que soporta el tejido nativo [28,29]. A diferencia de la mayoría de los polímeros sintéticos, los compuestos naturales son biodegradables y biocompatibles, aunque carecen de resistencia mecánica [30]. Ciertos polímeros naturales, como la carboximetilcelulosa (CMC), con grupos funcionales carboxílico (-COOH) e hidroxilo (-OH) [31], atraen agua proporcionando un entorno similar a la MEC [32], al igual que ciertos aditivos cerámicos como la hidroxiapatita (HAp), que no solamente ayudan a mantener un entorno hidrofílico [33,34], sino que, además, fomentan un microentorno propicio para la diferenciación y la fijación estable de células cartilaginosas calcificadas [35,36].

A pesar de que en los últimos años ha habido un gran progreso en el tratamiento de las enfermedades articulares, la mayoría de los tratamientos disponibles actuales carecen de integración con el tejido nativo. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone el procesamiento, a partir de tres diferentes técnicas, de un andamio polimérico multicapa compuesto a partir de CMC y PLA en conjunto con HAp y condroitín sulfato (CS) para generar una estructura que proporcione la capacidad de estimular la diferenciación de células madre (CM) hacia un linaje condrogénico.

Principal problema por solucionar (Justificación)

De acuerdo con la más reciente información proporcionada por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el año 2018, 6 de cada 10 pacientes que solicitaron una consulta programada o de emergencia, presentaron alguna lesión ósea/cartilaginosa [37,38]; llegando a ser hasta 8 de cada 10 pacientes al sobrepasar los 60 años [39].

Actualmente, los tratamientos con un índice más alto de éxito en la recuperación y restauración de la función del tejido cartilaginoso son inaccesibles para la mayor parte de la población y en general, la gran mayoría presentan un carácter profiláctico al no ofrecer los resultados esperados. Por estas razones, el andamio polímero multicapa compuesto a partir de PLA y CMC comerciales, se propone como un material económico, accesible y fácil de procesar, que pueda generar una diferenciación celular hacia un linaje condrogénico, mediante la promoción de un microambiente con las mismas características que el cartílago nativo.

Hipótesis

- I. La concentración del agente entrecruzante, y los tratamientos térmicos modifican las interacciones ente el PLA y el CMC.
- II. El hidrogel de CMC entrecruzado es capaz de promover un ambiente húmedo que incentive la interacción interfacial entre las diferentes secciones del andamio multicapa.
- III. La presencia de CS en el andamio multicapa incentiva el proceso de condrogénesis sobre células madre mesenquimales (CMM), al mismo tiempo que mantiene estable el fenotipo, a pesar de la ausencia de factores de crecimiento.
- IV. La estructura multicapa y distribución estratificada de un andamio polimérico, potenciará la capacidad de proliferación y diferenciación de CMM para la formación de cartílago articular, sin la presencia de estímulos mecánicos externos.

Objetivos

Objetivo general

Generar una estructura de capas diferenciables, con un porcentaje de aditivos bioactivos en cada una de ellas, mediante el uso de diferentes técnicas de procesamiento y con condiciones idóneas de un microambiente (retención de agua, porosidad, estabilidad mecánica, y degradación controlada); que sea similar al que presenta el tejido articular nativo.

Objetivos específicos

1. Generar la metodología que permita obtener una estructura con respuesta bioactiva sobre células madre mesenquimales, mediante la técnica de fundición con disolvente (FDLP).
2. Evaluar el efecto de la concentración del ácido cítrico (AC) como agente de entrecruzamiento químico (AEQ), así como de la temperatura y tiempo de curado, sobre las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y biológicas de cada uno de los andamios resultantes.
3. Examinar el efecto de la matriz polimérica tridimensional de la CMC entrecruzada sobre las moléculas de PLA, bajo el procesamiento conjunto por FDLP.
4. Determinar los parámetros adecuados para el procesamiento de PLA mediante las técnicas de electrohilado (EH) e impresión en tercera dimensión (3D).
5. Establecer el efecto que generan las técnicas de procesamiento por EH e impresión 3D, sobre la estructura y las propiedades intrínsecas de los andamios resultantes.
6. Desarrollar e implementar la metodología para conformar una estructura multicapa mediante la integración de los andamios resultantes procesados mediante impresión 3D, EH y FDLP.
7. Determinar el efecto de la incorporación del CS, así como el AC sobre la propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas de los andamios multicapa.

-
8. Establecer el efecto de la concentración de AEQ y el tratamiento térmico, sobre la estructura de los andamios multicapa.
 9. Evaluar el efecto conjunto entre la modificación en la concentración de CS y las propiedades mecánicas/morfológicas de los andamios multicapa, durante el proceso de condrogénesis de las células madre mesenquimales (CMM).

Compendio del trabajo de investigación

El presente proyecto de tesis está compuesto por un total de 6 capítulos. A continuación, se presenta la descripción concisa del contenido de cada uno de estos:

CAPÍTULO 1. En este capítulo, inicialmente, se muestra el análisis detallado sobre la evolución en las tendencias de investigación sobre la regeneración del cartílago articular a lo largo de los últimos 10 años (2013-2023), al mismo tiempo se exponen las contribuciones que se han realizado en este ámbito en México durante el mismo periodo de tiempo. Posteriormente, se presentan generalidades anatómicas y fisiológicas del tejido cartilaginoso hialino, así como el origen y las limitaciones físicas que generan su deterioro. Enseguida, se revisa el estado del arte acerca de los tratamientos actualmente disponibles para enfermedades del cartílago articulares, donde se ahondará en las limitaciones y desafíos que presentan cada uno. Asimismo, se aborda el estado del arte de las principales técnicas utilizadas para el procesamiento de andamios multicapa, así como las categorías y tipos de biomateriales más comúnmente utilizados en este campo. Finalmente, se presenta la dirección en el trabajo de investigación que tiene este proyecto de tesis.

CAPÍTULO 2. El capítulo está dividido en dos secciones principales: la primera sección enumera los reactivos utilizados para el procesamiento de los andamios mediante las técnicas de fundición con disolventes/lixiviación de partículas (FDLP), impresión en tercera dimensión (3D) y electrohilado (EH), así como para la conformación de los andamios multicapa. La segunda sección describe las técnicas analíticas de caracterización utilizadas para estudiar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y biológicas de los andamios obtenidos.

CAPÍTULO 3. El procesamiento por FDLP, de la primera de tres secciones que conforman el andamio multicapa, se describen en este capítulo. Esencialmente, esta sección se centra en discutir con detalle el proceso de entrecruzamiento entre la CMC y el AC bajo las condiciones experimentales establecidas en la metodología, haciendo

énfasis en la temperatura y el tiempo de curado. Además, se estudia el efecto de la estructura 3D formada por la reticulación del CMC sobre las cadenas poliméricas del PLA, específicamente las modificaciones y restricciones que impone sobre su estructura. Por último, se analiza el efecto de la concentración de ácido cítrico (AC), como agente de entrecruzamiento químico (AEQ) sobre las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y biológicas finales de los andamios conformados por reactivos considerados comercialmente como “materias primas”.

CAPÍTULO 4. A lo largo de este capítulo se presentan, además de las condiciones fijadas para el procesamiento de las dos secciones restantes del andamio multicapa, el efecto puntual que ejercen las condiciones individuales de cada una de las técnicas de procesamiento seleccionadas (EH e impresión 3D) sobre el andamio de PLA resultante. Esencialmente, el capítulo se centra en el análisis y discusión sobre las modificaciones observadas en la disposición espacial, tipo de morfología y topología exhibida, así como el comportamiento de la química superficial y, por ende, de las propiedades de mojabilidad de los andamios denominados PLA 3D y PLA EH. Finalmente, mediante un análisis de calorimetría diferencia de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), se analizan las repercusiones de la elección de “materias primas” como reactivos precursores, al establecer su efecto sobre la estabilidad térmica, la rugosidad, la hidrofiliidad y el tamaño de los poros en la superficie de los andamios.

CAPÍTULO 5. Esta sección se aborda el efecto y las posibles repercusiones que genera la elección del AC, como AEQ, durante la exposición de los andamios multicapa a condiciones biológicamente similares a las del cuerpo humano. Además, en conjunto, se estudia el impacto que genera la incorporación de una concentración de condroitín sulfato (CS), agregado de forma diferente a lo usualmente reportado en la literatura, sobre la respuesta citotóxica y la actividad metabólica de fibroblastos de la línea celular L929, que interactúan de forma directa con los andamios multicapa a lo largo de siete días continuos.

CAPÍTULO 6. Tomando en consideración todas las observaciones realizadas sobre las condiciones experimentales, el capítulo seis explora de manera específica el efecto de

la temperatura y la concentración de AEQ sobre los componentes individuales que integran los andamios multicapa. Del mismo modo, se establece la influencia que genera el uso conjunto de una estructura multicapa con una concentración reducida de CS sobre la diferenciación y el mantenimiento del fenotipo, en células con la capacidad de diferenciación hacia un linaje cartilaginoso.

CONCLUSIÓN GENERAL. Finalmente, se presenta una conclusión general de los principales resultados junto con las contribuciones realizadas a este campo y los productos científicos generados a partir de esta investigación.

CAPÍTULO 1. Avances en el desarrollo de andamios poliméricos multicapa para aplicaciones en Ingeniería de Cartílago: Estado actual.

1.1 Análisis bibliométrico

El gran auge que ha tenido la ingeniería de tejidos (IT) en las últimas dos décadas se debe a la prometedora estrategia de sanar tejidos y órganos dañados mediante constructos o andamios biológicos funcionales [40]. La premisa fundamental es que, mediante la manipulación de células, andamios y estímulos, es posible generar constructos capaces de integrarse con los tejidos nativos tras la implantación, restableciendo así las funciones perdidas [41]. En los últimos años, ha surgido un creciente interés en el desarrollo de andamios para uso en regeneración de tejido cartilaginoso, en específico para cartílago articular, debido a la amplia gama de materiales y aditivos bioactivos disponibles como precursores, que se combinan con las más recientes metodologías de procesamiento [42].

El análisis bibliométrico tiene como objetivo analizar la investigación y el desarrollo en la regeneración de tejido cartilaginoso, y con ello articular e identificar a través del uso de mapas bibliométricos y del software de código abierto VOS Viewer [43], en conjunto con la base de datos *Scopus*®, las tendencias de investigación en este campo. Mediante estas herramientas, se identificó un total de 210 artículos científicos publicados en el periodo 2013-2023 al introducir las palabras clave “*Condroitin sulfato*”, “*Ingeniería de tejidos*” y “*Cartílago*”.

El software VOS Viewer proporciona cinco tipos de análisis bibliométricos: coautoría, coocurrencia, citas, acoplamiento bibliográfico y cocitación. En este estudio, se utilizó el análisis de coocurrencia para examinar las palabras clave de los 210 artículos, incluyendo palabras clave del índice como las propuestas por los autores, con el fin de identificar las palabras clave destacadas que reflejen las tendencias en la investigación.

Se utilizó el método de recuento completo y se estableció un umbral de coocurrencia de 40, con el propósito de minimizar la redundancia en la medida de lo posible.

Así, el análisis resultó en la identificación de tres grupos distintos (representados en verde, azul y rojo), como se muestran en la Figura 1.1. La visualización de la densidad revela la profundidad de las palabras clave analizadas en cada grupo y la relación entre los distintos temas, destacando los principales en cada conjunto. Las palabras clave en cada grupo fueron etiquetadas con diferentes círculos de colores, donde el tamaño de los círculos se correlaciona directamente con la frecuencia de aparición de palabras clave en los artículos de la muestra.

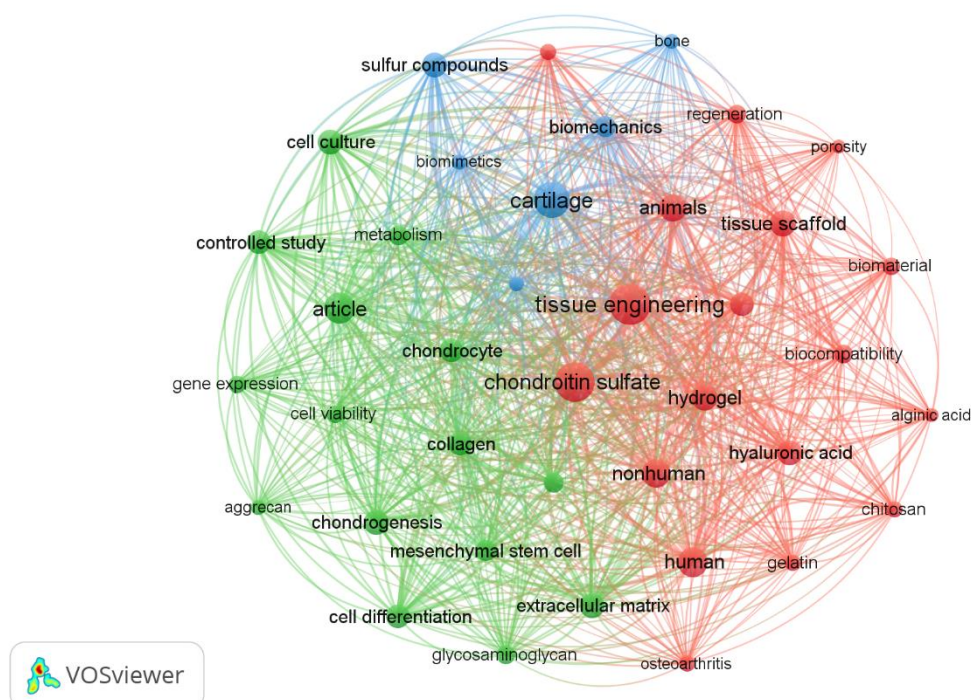


Figura 1.1. Representación de las palabras clave en forma de red interconectada.

A partir de la revisión de los artículos, se observó que la mayoría de los autores plantean diversas tendencias para futuras investigaciones. Estas incluyen el uso de biopolímeros en ingeniería de tejidos cartilaginoso, la exploración de los mecanismos de interacción bioquímica de los glicosaminoglicanos (GAGs) y el desarrollo de andamios con capacidad biomimética. Estas tendencias se muestran en la Tabla 1.1.

Desde hace un par de décadas, el evidente incremento en el uso de polímeros de fuentes naturales, como el CS, se debe a la alta disponibilidad de los mismos [44–49], junto con la aparente capacidad ilimitada de reaccionar (química o físicamente) con otros tipos de materiales, como los polímeros sintéticos [24], para dotarlos de propiedades biológicas a cambio de corregir sus carencias mecánicas y así crear condiciones que simulen un microambiente lo más parecido al tejido nativo [25]. De esta manera, se pretende avanzar más en el entendimiento de las complejas interacciones bioquímicas con las células, que estimulan y potencian la actividad de regeneración en el tejido cartilaginoso [50].

Tabla 1.1. *Tendencias de investigación relevantes.*

Tendencias de búsqueda	Palabras clave
Biopolímeros en ingeniería de tejidos cartilaginoso	Ácido algínico, animales, biocompatibilidad, biomaterial, regeneración de cartílago, quitosano, condroitín sulfato, gelatina, humano, ácido hialurónico, hidrogel, no humano, osteoartritis, porosidad, regeneración, ingeniería tisular, regeneración tisular, andamio tisular.
Mecanismo de interacción de los GAGs	Agrecano, articulación, cultivo celular, diferenciación celular, proliferación celular, viabilidad celular, condrocito, condrogénesis, colágeno, estudio controlado, matriz extracelular, expresión génica, glicosoaminoglicanos, célula madre mesenquimal, metabolismo.
Andamios con capacidad biomimética	Biomecánica, biomimética, hueso, cartílago, enlaces cruzados, compuestos de azufre.

Para apoyar la dirección de las investigaciones propuesta anteriormente, se realizó un gráfico de visualización superpuesta de las palabras clave [51]. Como se puede observar en la Figura 1.2, los principales temas de investigación han experimentado cambios a

lo largo del tiempo. A partir de finales del año 2017 y principios de 2018, se percibe un cambio en el enfoque de la investigación, pasando del uso de polímero naturales, como el quitosano o el colágeno, para construir estructuras monocapa, hacia la utilización de biopolímeros con componentes de azufre para ensamblar estructuras 3D, con el objetivo de mejorar la biocompatibilidad de los andamios en contacto con condrocitos, y células madre (CM). Este cambio de enfoque abre las puertas para una amplia gama de oportunidades de investigación, para académicos interesados en explorar nuevos e innovadores materiales de acuerdo con estas tendencias.

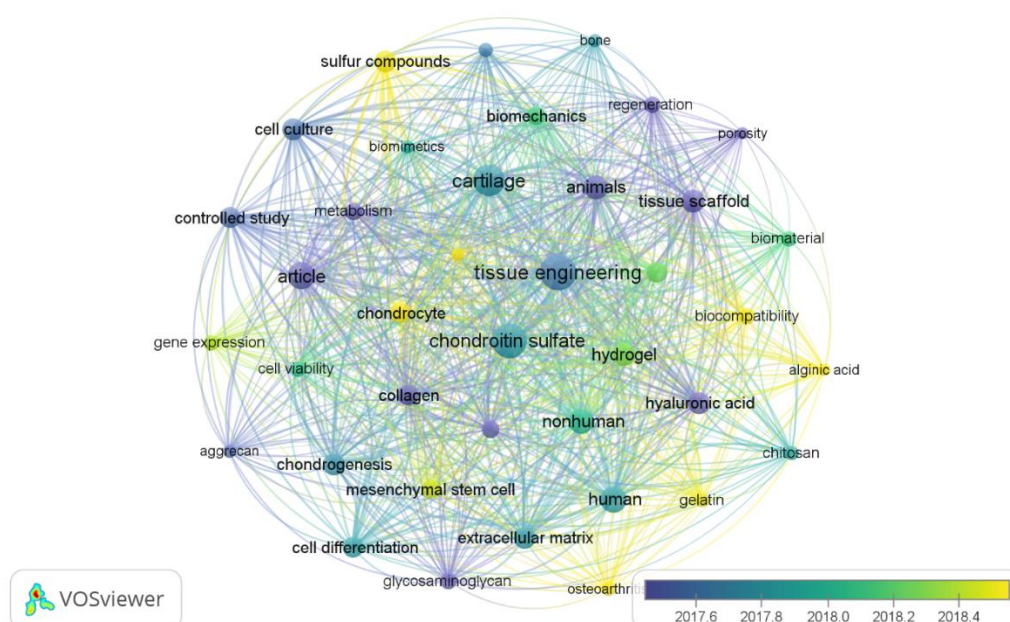


Figura 1.2. Evolución en la dirección de investigación mediante la palabras clave.

Mediante la plataforma LENS®, utilizando las mismas palabras clave que en el análisis previo, se recuperaron artículos en coautoría de 710 instituciones distribuidas en 49 países/regiones, con el propósito de visualizar el progreso científico en este campo a nivel global [52]. La Figura 1.3A muestra la distribución global de la producción científica en el campo de la ingeniería de tejidos cartilaginosos donde México, a lo largo de estos 10 años (2013-2023), sólo ha contribuido con 2 artículos de investigación. Por ende, no resulta sorprendente que México no figure entre los 10 países con mayor número de publicaciones en este campo, destacándose Estados Unidos, Reino Unido, China, Países Bajos, Australia, Portugal, Italia, Alemania, España y Suiza (Figura 1.3B).

Además, en la Figura 1.3C, se puede observar que, en los principales centros de investigación, ubicados en los países anteriormente mencionados, se encuentran enfocados principalmente en los temas de condroitín sulfato, química, ingeniería de tejidos, cartílago e ingeniería biomédica.

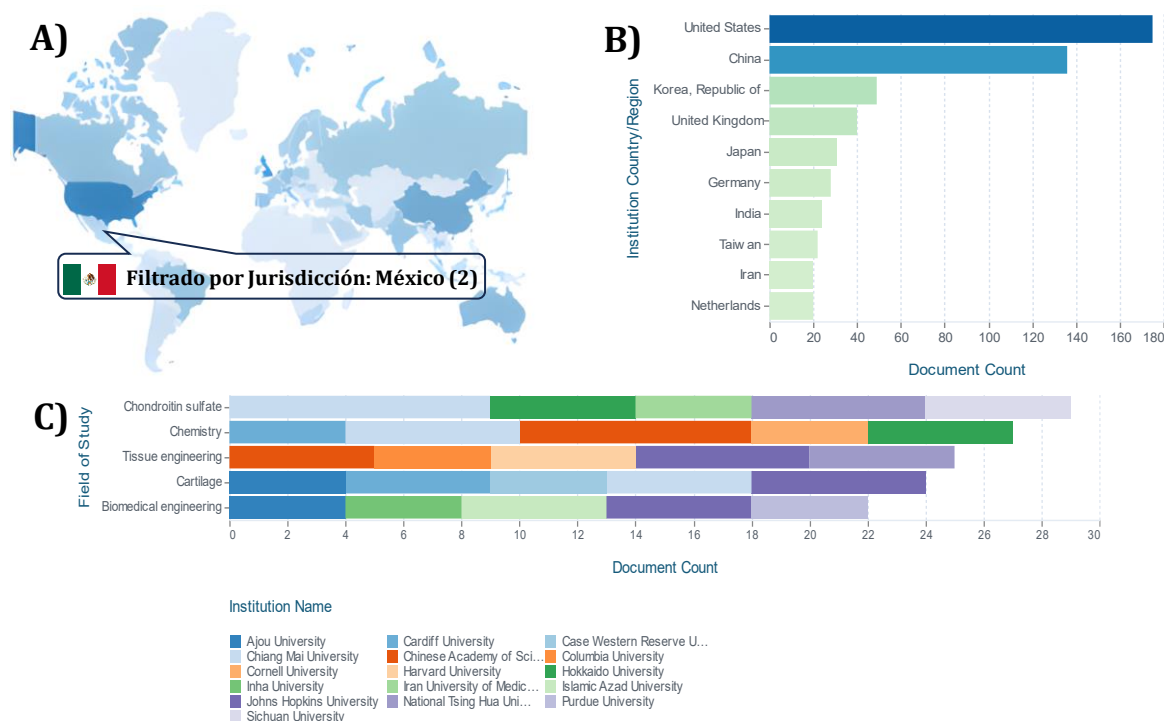


Figura 1.3. Contribución mundial a la investigación sobre la regeneración del tejido cartilaginoso. **A)** Producción científica mundial; **B)** Los 10 países con mayor productividad; **C)** Campos de estudio en los principales centros de investigación del mundo.

La información previa ilustra cómo ha evolucionado y se encuentra actualmente la investigación en esta área. Sobre todo, proporciona una visión hacia dónde se está dirigiendo la investigación y destaca la excelente oportunidad que la ciencia mexicana posee para desarrollar proyectos en este ámbito. Estas tendencias de investigación se han considerado en la realización de este trabajo de tesis.

1.2 Generalidades del tejido cartilaginoso

El tejido cartilaginoso, un tipo de tejido conectivo altamente especializado, se distingue de otro tipo de tejidos debido a su composición única, ya que contiene un solo tipo de célula, conocida como condrocito [53]. Este tejido se encuentra distribuido en varias partes del cuerpo, como las articulaciones, el sistema respiratorio y el sistema musculoesquelético, entre otros ejemplos [54]. Existen tres tipos principales de cartílago: hialino, elástico y fibroso (Figura 1.4), cada uno con una estructura única que le confiere elasticidad, resistencia a la compresión y a los esfuerzos de corte [55].

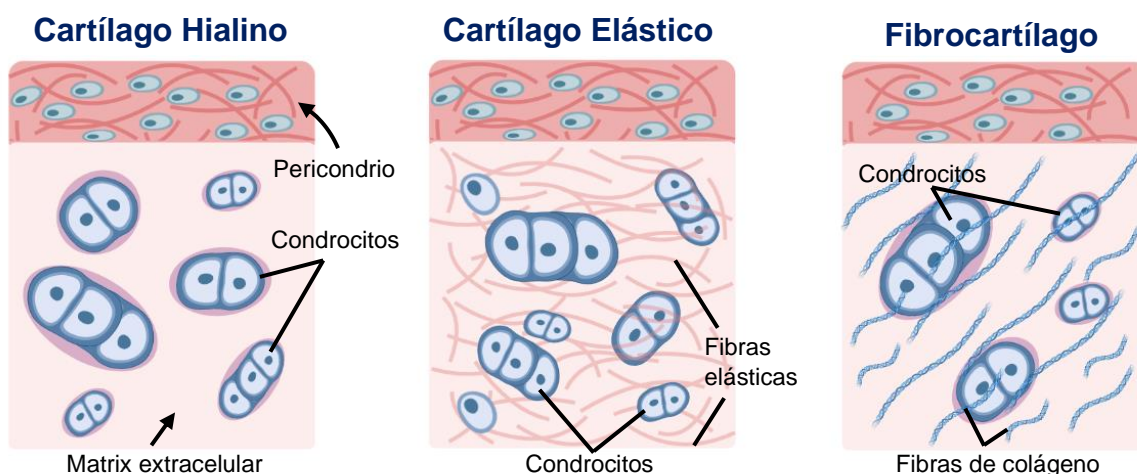


Figura 1.4. Diagrama de los tipos de cartílago y sus diferencias más importantes.

Tomada y modificada de Gartner (2021) [55].

El cartílago hialino, también conocido como articular, es el tipo más común y se encuentra en las articulaciones, las costillas y las vías respiratorias. Por su parte, el cartílago elástico se encuentra en estructuras que requieren mayor flexibilidad, como el pabellón auricular y la epiglotis [56]. El cartílago fibroso, también conocido como fibrocartílago, contiene mayor cantidad de fibras de colágeno y se encuentra en áreas que necesitan soportar cargas intensas, como los discos intervertebrales y los meniscos de las rodillas [57].

1.2.1 Cartílago articular: función y organización

El cartílago articular es un tejido elástico de varios milímetros de espesor (2-4 mm) [3,58], caracterizado por ofrecer una superficie lubricada que permite reducir la fricción. Al mismo tiempo, es capaz de transferir y distribuir las fuerzas de compresión en los huesos, permitiendo su deslizamiento y rotación sin desgaste [59]. Esto es posible gracias a su abundante, y altamente especializada red de matriz extracelular (MEC), que se organiza en cuatro zonas distintas: la zona superficial, la zona media, la zona profunda y la zona de cartílago calcificado (Figura 1.5) [60].

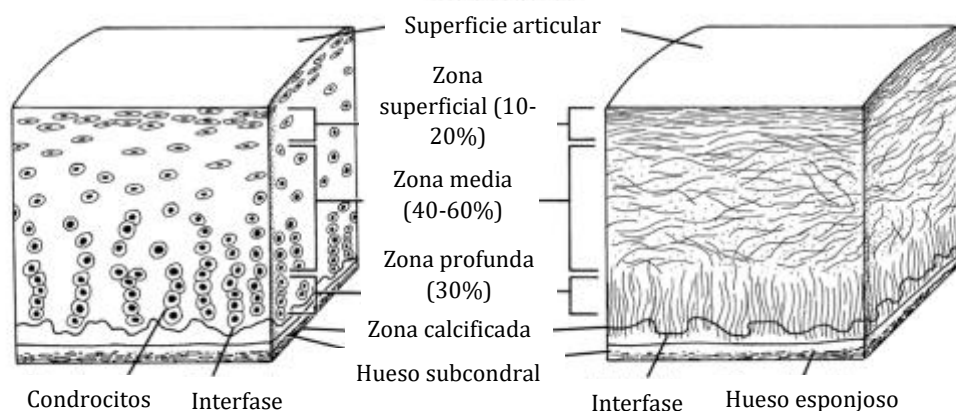


Figura 1.5. Estructura del Cartílago Articular Adulto: En la imagen de la izquierda, se presenta un esquema que ilustra la organización celular en las distintas zonas del tejido.

En la imagen de la derecha, se muestra la arquitectura de las fibras de colágeno.

Tomada y modificada de D. Correa (2017) [6].

La zona superficial, que abarca aproximadamente entre el 10% y el 20% del grosor total del cartílago, desempeña un papel fundamental al conferir características de un deslizamiento suave y una resistencia a esfuerzos de corte [61]. Los condrocitos y la abundante cantidad de fibras de colágeno son los responsables de dotar a esta zona de sus propiedades distintivas. Mientras los condrocitos expresan proteoglicanos, es decir, proteínas específicas unidas a glucosaminoglicanos (GAG) (heteropolisacáridos aniónicos [62]) para proporcionar funciones de lubricación y protección, la organización meticulosa de las fibras de colágeno presentes en esta zona le confiere la resistencia a la tracción. Por esta razón, los condrocitos presentan una morfología

elongada y las fibras de colágeno se encuentran altamente compactadas y dispuestas en paralelo a la superficie articular [63,64].

La zona media representa aproximadamente del 40% al 60% del espesor total del cartílago. En esta zona, la organización de las fibras de colágeno es menos regular debido al bajo empaquetamiento y a su alineamiento al azar con relación a la superficie de las fibras. Además, los condrocitos en esta capa adoptan una morfología redonda [65]. En la zona profunda, 30% del espesor total del cartílago, el colágeno se compone de largas fibras orientadas perpendicularmente a la superficie articular. Esta capa se caracteriza por presentar la mayor concentración de proteoglicanos, pero con una menor concentración de agua. Finalmente, el cartílago calcificado, una fina capa que separa el hueso subcondral del cartílago articular, contiene pequeñas células atrapadas en una matriz calcificada con sales de apatita [66].

1.2.2 Deterioro del cartílago articular

A pesar de la notable resistencia del cartílago, al igual que otros tejidos, no está exento de la disminución en su actividad anabólica y proliferativa a medida que pasa el tiempo. Aunque durante su proceso de desarrollo los condrocitos se multiplican rápidamente, una vez que se alcanza la fase de maduración, las células presentes carecen de contacto entre sí y no mantienen conexión con el exterior [67]. Como resultado, la diferenciación disminuye al mínimo, ya que la nutrición por medio del líquido sinovial, se ve dificultada al tener que atravesar una densa estructura cartilaginosa compuesta por una doble barrera: la membrana sinovial y la MEC [68,69].

En el estado de maduración, los condrocitos generalmente sintetizan macromoléculas que mantienen la MEC y pueden aumentar su tasa de síntesis ante una lesión, sin embargo, son incapaces de reparar defectos tisulares importantes [70], los cuales suelen ser mayormente provocadas por traumatismos, enfermedades o lesiones deportivas [71,72]. Además, el cartílago también puede experimentar desgaste y degeneración debido a factores como el sexo, la genética y ciertas enfermedades como la obesidad o enfermedades metabólicas [73,74].

1.2.2.1 Osteoartritis (OA)

Considerada como la principal enfermedad crónico-degenerativa de las articulaciones, la OA afecta principalmente al cartílago articular y es la forma más común de artritis. Esta enfermedad puede presentarse en cualquier articulación del cuerpo, pero se observa con mayor frecuencia en las articulaciones de carga, como las rodillas, la cadera, las manos y la columna vertebral (Figura 1.6A)[75].

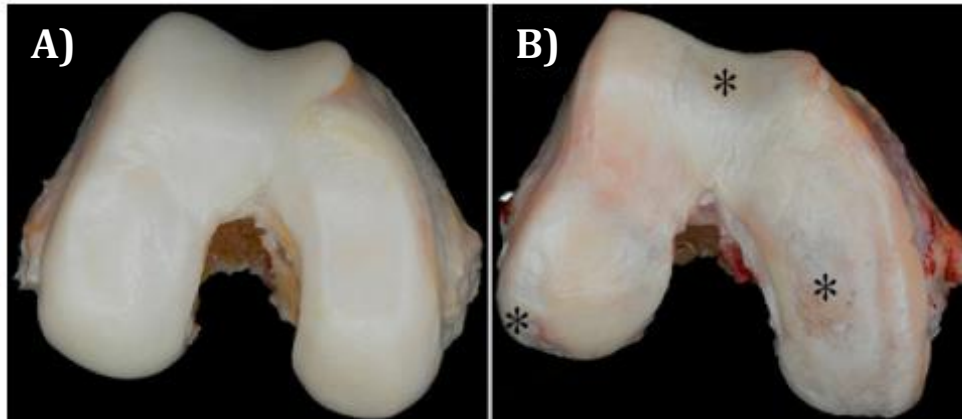


Figura 1.6. Imágenes macroscópicas de cartílago articular humano: (a) fotografía de una articulación femoral de la rodilla normal; (b) articulación femoral de la rodilla con osteoartritis, presenta varias erosiones en la superficie (*). Tomada y modificada de Grogan (2015) [76].

En la osteoartritis el desgaste gradual del cartílago articular (Figura 1.6B), sumando a la poca presencia de vasos sanguíneos en estos tejidos, con el tiempo resulta en una disminución de la amortiguación y el deslizamiento suave de la articulación [76]. Esto puede llevar a síntomas como: dolor, rigidez, inflamación, así como pérdida total o parcial de la función. A medida que la enfermedad continúa avanzando, se pueden presentar cambios en los huesos adyacentes, como la formación de osteofitos a lo largo de los bordes de los huesos y la deformidad de las articulaciones [77].

1.3 Tratamientos disponibles actuales para enfermedades del cartílago articular

La regeneración del cartílago articular es un desafío debido a la limitada capacidad de autoreparación de este tejido. Por lo tanto, el enfoque del tratamiento para su regeneración puede variar según la gravedad de la lesión, la edad y las necesidades individuales del paciente (Tabla 1.2) [78]. Aunque el objetivo principal de los tratamientos es aliviar los síntomas y mejorar la función articular y ralentizar la progresión de la enfermedad [79], resulta esencial considerar todas las opciones de manejo no quirúrgico antes de recurrir a cualquier procedimiento quirúrgico definitivo para un paciente con OA. Estas opciones pueden incluir modificaciones en el estilo de vida, uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, fisioterapia e inyección de corticoesteroides o viscosuplementos [80].

El propósito principal de esta sección consiste en llevar a cabo un análisis introductorio de los diversos tratamientos utilizados en lesiones del cartílago articular, considerando tanto sus ventajas como desventajas individuales. Es crucial resaltar que la selección del tratamiento definitivo estará siempre sujeta a una evaluación médica previa, asegurando que el paciente esté consciente de las consideraciones específicas que cada enfoque conlleva.

1.3.1 Técnicas de reparación de tejido

Las técnicas para reparación de tejido cartilaginoso se centran en corregir los daños en el cartílago existente y mejorar sus propiedades mecánicas para restaurar las funciones de movilidad perdidas. Sin embargo, es importante destacar que la aplicación de estas técnicas no siempre conduce a la regeneración total del tejido, resultando muchas veces en la formación de cartílago mecánicamente inferior [81].

1.3.1.1 Microfractura

La microfractura es una técnica introducida en la década de 1980 para tratar los defectos del cartílago articular en la rodilla, mediante el acceso a las células de la medula ósea en la profundidad de la superficie subcondral, facilitando la curación de dichos

defectos [82]. Este procedimiento artroscópico implica la creación de perforaciones separas de 3 a 4 mm en el hueso subcondral, liberando elementos de la médula ósea, como células madre y factores de crecimiento, formando un coágulo que induce la reparación del cartílago [83].

En el caso de pequeñas lesiones y pacientes con baja demanda postoperatoria, el uso de la microfractura ha mostrado buenos resultados clínicos en el corto plazo (hasta 24 meses). Sin embargo, después de 5 años tras la operación, no se ha llegado a conclusiones claras sobre el éxito o fracaso del tratamiento, independientemente del tamaño de la lesión [84]. Se ha observado que los pacientes menores a 35 años presentan mejores resultados clínicos, sin importar el tamaño de la lesión [85]. No obstante, el cartílago regenerado suele ser de calidad inferior al nativo y podría requerir terapias adicionales [42].

1.3.1.2 Condroplastia o desbridamiento artroscópico

El desbridamiento artroscópico es una técnica utilizada para eliminar colgajos de cartílago que generan inflamación y dolor al momento de realizar cualquier movimiento, además de prevenir la progresión de las lesiones en el cartílago debido al estrés mecánico o a colgajos inestables [86].

La ventaja clave de esta técnica radica en su corto período de recuperación, debido a su naturaleza mínimamente invasiva. Se trata de un procedimiento económico que no requiere de una planificación preoperatoria o un procedimiento por etapas, similar a otros métodos de reparación de cartílago. No obstante, su limitación radica en que no puede restaurar la congruencia normal del cartílago articular, ya que se enfoca únicamente en abordar los problemas mecánicos originados por colgajos de cartílago desprendidos [87].

1.3.2 Técnicas de sustitución de cartílago

La aplicación de estas terapias implica la eliminación del cartílago dañado y su reemplazo con un material sintético o biológico para aliviar el dolor, reducir la inflamación, restaurar la función y evitar lo más posible un estado de discapacidad. En

casos más severos de daño al cartílago, se opta por el uso de prótesis de cartílago artificial. Si no es el caso, se recomienda la aplicación de células recolectadas del propio cartílago del paciente o de un donante para estimular la regeneración [88].

1.3.2.1 Implantación de condrocitos autólogos (ICA)

La ICA fue descrita por primera vez por Brittberg *et. al.* [16]. En esta técnica, durante un procedimiento quirúrgico separado, los condrocitos y un colgajo de periostio se recogen de una sección de articulación que no soporta peso. Posteriormente, estos condrocitos se cultivan *ex vivo* y se inyectan en una suspensión de colágeno junto con el colgajo, previamente suturado, en la región del defecto osteocondral. Finalmente, se sella todo con un pegamento de fibrina [89]. Este tratamiento, probado en 200 pacientes, proporcionó resultados duraderos con una tasa de éxito del 71% a los 10 años y una función mejorada en el 75% de los pacientes [90].

Aunque este procedimiento reduce el dolor y la hinchazón de las lesiones de tamaño entre 1.5 a 2 cm², existe una morbilidad asociada en el sitio donante debido a la extracción del periostio y los condrocitos [91]. La técnica de segunda generación, conocida como ICA recubierta con colágeno (ICAC), supone una mejora al utilizar una membrana de colágeno porcino, en lugar de colgajo de periostio, para cubrir la lesión. Esta técnica ha mostrado ser más rentable y con una menor presencia de hipertrofia en el tejido [92,93]. En la tercera generación, denominada ICA asistida con matriz (ICAM), los condrocitos se colocan en andamios procesados a partir de biomateriales [94]. A pesar de la rápida evolución de esta terapia, el hecho que los condrocitos recolectados se cultiven *in vitro* puede dar lugar a desdiferenciación o pérdida del fenotipo, lo que modifica la viabilidad en el uso de cualquier tipo de condorcitos, limitándolo solo el uso de las variantes neonatales o juveniles que presentan disponibilidad limitada. Además, es importante señalar que esta técnica implica un procedimiento de dos etapas de cirugía, lo que conlleva un alto costo [95].

1.3.2.2 Aloinjertos

Las estrategias de reparación de cartílago basados en células siguen siendo una opción viable para defectos mayores a 2 cm² en articulaciones de pacientes menores a 30 años

[17]. El trasplante de aloinjerto osteocondral fresco implica la transferencia de cartílago y hueso subcondral obtenido de diferentes fuentes, como articulaciones de rodilla, cadera u hombro de un donante de la misma especie, pero genéticamente diferente, como un cadáver humano o, en ocasiones, un animal [96].

Al tratarse de una tratamiento de una sola etapa, muchas veces es preferibles a otras técnicas, especialmente cuando se sufre de una pérdida ósea extensa donde es necesario la restauración de la articulación. Esta técnica ayuda a aliviar los síntomas y mejorar la funcionalidad, además de ofrecer la posibilidad de retrasar o incluso eliminar la necesidad de una futura artroplastia [97–99].

Sin embargo, este enfoque aún presenta complicaciones en términos de asegurar un trasplante seguro y oportuno de tejido descelularizado aséptico con una respuesta inmunitaria mínima, con el fin de evitar el riesgo de rechazo o infección [100]. Por lo tanto, aun se requiere de investigación científica y clínica adicional para optimizar la viabilidad y disponibilidad del injerto, así como para lograr una coincidencia precisa del tamaño y el perfeccionar las indicaciones y técnicas quirúrgicas actuales [96].

1.3.2.3 Artroscopia articular total

La artroscopia articular total se postula como la solución ideal para el tratamiento, alivio del dolor crónico y mejora de la capacidad funcional de las articulaciones en estados graves de degeneración que no ha respondido a otras modalidades terapéuticas [101]. En el mejor de los casos, brinda alivio del dolor, preserva la función con resultados comprobados a largo plazo. En el peor de los escenarios, puede proporcionar alivio del dolor, pero con tasas elevadas de complicaciones, revisiones y limitaciones funcionales. Por lo tanto, se torna fundamental recordar que, aunque estos procedimientos mayores resultan efectivos, no deben considerarse como opciones de tratamiento primario, sino como opciones de último recurso [80].

1.3.3 Técnicas de regeneración celular

Dadas las limitaciones que presentan los condrocitos, las células madre (CM) han surgido como una alternativa prometedora, ya que tienen el potencial de diferenciarse

en condrocitos y promover la regeneración del cartílago [19]. En este enfoque, se pueden usar tanto células madre pluripotenciales (CMPP) como células madre mesenquimales (CMM).

1.3.3.1 Células madre pluripotenciales (CMPP)

El uso de CMPP se presenta como una nueva y prometedora generación en las terapias de regeneración de cartílago, debido a su capacidad de autorrenovación indefinida, baja inmunogenicidad y su capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de tejidos. Sin embargo, ciertos fenotipos, como aquellos provenientes de la destrucción de embriones humanos, suscitan debates éticos por su origen [102]. Una alternativa a esto, son las células madre pluripotenciales (CMPP), las cuales se generan a partir de células de la piel o la sangre del propio paciente mediante la transducción de genes con factores de transcripción específicos [103].

Aunque las células pluripotenciales pueden ser opciones viables para el tratamiento de enfermedades cartilaginosas, es necesario resolver varios problemas antes de trasladar estos hallazgos experimentales al ámbito clínico. Entre estos desafíos se encuentran el alto costo de producción, naturaleza indiferenciada y su tendencia a crecer sin restricciones, lo que podría dar lugar al desarrollo de tumores [104,105].

1.3.3.2 Células madre mesenquimales (CMM)

Otra alternativa celular para la regeneración de cartílago, con una capacidad tumorigénica mínima, son las células madre mesenquimales (CMM), que exhiben una alta capacidad proliferativa y son multipotentes en términos de su capacidad de diferenciación en diversos linajes celulares, como condrocitos, adipocitos, osteoblastos y miocitos [106].

Las CMM se perfilan como una opción viable para la regeneración del cartílago debido a su alta disponibilidad, ya que pueden ser obtenidas de varios tipos de tejidos. Adicionalmente, minimizan la morbilidad del donante y demuestran una innata capacidad intrínseca de expansión y diferenciación *in vitro*. Además, cuando se utilizan en conjunto con factores de crecimiento (FC), como el factor de crecimiento

transformante beta (TGF- β) y la proteína morfogénica ósea (BMP), se estimula el crecimiento celular y se potencia eficazmente la condrogénesis [107].

No obstante, este método solamente aplaza el deterioro del cartílago, ya que en la mayoría de las ocasiones no logra la regeneración del tejido lesionado y, en caso de lograrlo, el tejido nuevo muestra inestabilidad mecánica en comparación con el tejido cartilaginoso nativo [108]. La aplicación combinada de factores condrogenicos podría regular la diferenciación, proliferación y actividad metabólica, lo que conduciría a un mejor desempeño del neo-cartílago. No obstante, el uso de estos FC, ya sea autólogos o sintéticos, aumenta significativamente el costo de una terapia de esta naturaleza [109,110].

1.3.4 Limitaciones y desafíos

Indudablemente, el ámbito de la regeneración del tejido cartilaginoso ha experimentado un rápido avance en las últimas décadas, dando lugar al desarrollo de varios enfoques innovadores, como los mencionados anteriormente, que han demostrado resultados satisfactorios tanto a corto como a largo plazo (Figura 1.7). No obstante, las limitaciones y desventajas de los tratamientos actuales continúan siendo importantes obstáculos que se deben abordar en el futuro de la ingeniería de cartílago (Tabla 1.2). Al solucionar estos desafíos, podríamos diseñar tejido cartilaginoso con propiedades similares a las nativas, asegurado así el mantenimiento de un fenotipo celular y la producción optima y estable de una matriz extracelular optima y estable, a fin de evitar su degradación [87,89]

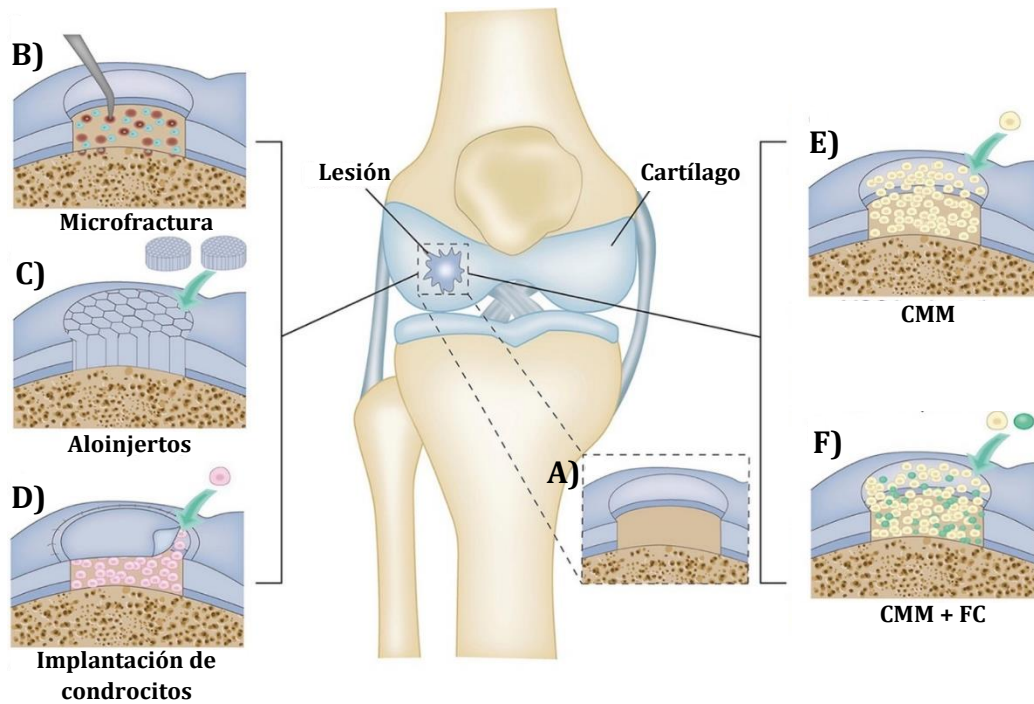


Figura 1.7. Modalidades de reparación del cartílago más comunes. **A)** Lesión de cartílago de espesor total. **B)** Microfractura, **C)** Aloinjertos, **D)** Implantación de condrocitos autólogos (ICA), **E)** Implantación de CMPP y **F)** Combinación de CMM y FC. Tomada y modificada de Le (2020) [108].

Tabla 1.2. Enfoques comúnmente usados para la regeneración de tejido articular humano.

Tratamientos	Ventajas	Desventajas	Referencias
<i>Técnicas de reparación de Cartílago</i>			
<i>Microfractura</i>	<ul style="list-style-type: none"> Buenos resultados a corto plazo. Mejores resultados clínicos en pacientes jóvenes sin importar el tamaño de la lesión 	<ul style="list-style-type: none"> Eficaz en lesiones <2 cm². Recomendada para pacientes <35 años. Calidad inferior del cartílago regenerado 	<i>D.Goyal (2013) [84], J.R. Steadman (2001) [85], T. Li (2019) [42].</i>
<i>Condroplastia</i>	<ul style="list-style-type: none"> Corto periodo de recuperación. Económico. Sin planificación preoperatoria. 	<ul style="list-style-type: none"> No restaura el cartílago. Efecto paliativo. 	<i>T. Matsushita (2023) [87].</i>
<i>Técnicas de sustitución de Cartílago</i>			
<i>ICA</i>	<ul style="list-style-type: none"> Abarca lesiones de 1.5 a 2 cm². Reduce dolor e hinchazón. Alta tasa de éxito a 10 años. 	<ul style="list-style-type: none"> Alto riesgo de morbilidad. Desdiferenciación o pérdida del fenotipo. Alto costo. 	<i>T. Minas (2014) [90], L. Peterson (2000) [91], M. Brittberg (2018) [95].</i>
<i>Aloinjertos</i>	<ul style="list-style-type: none"> Repara lesiones >2cm². Tratamiento de una sola etapa. Retrasa o elimina la artroscopia. 	<ul style="list-style-type: none"> Recomendable en pacientes <30 años. Riesgo de rechazo o infección. Baja disponibilidad. 	<i>A. Riff (2020) [17], S. Sherman (2014) [96]. Y. Levy (2013) [100].</i>
<i>Artroscopia articular total</i>	<ul style="list-style-type: none"> Único para etapas finales de artritis. Alivio del dolor y preservación de la función a largo plazo. 	<ul style="list-style-type: none"> Tasa elevada de complicaciones y número de revisiones. Limitación funcional. 	<i>C.W. Grayson (2012) [80], V. wylde (2012) [101].</i>
<i>Técnicas de regeneración celular</i>			

<i>CMPP</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Autorrenovación intrínseca. • Baja inmunogenicidad. • Capacidad de diferenciación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Debates éticos. • Altos costos de producción. • Posible desarrollo tumoral. 	<i>A. Yamashita (2008-13)</i> [102] [105], <i>M. Turner (2013)</i> [104].
<i>CMM + FC</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alta capacidad proliferativa. • Diferenciación en varios linajes. • Estimula la condrogénesis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Solo en estados tempranos de la lesión. • Tejido nuevo mecánicamente inestable. • Alto costo de producción. 	<i>P. Kanga(2013)</i> [107], <i>H.Le (2020)</i> [108], <i>H. Rogan (2020)</i> [110].

1.4 Desarrollo de andamios poliméricos multicapa: Un avance en la IT para la regeneración de cartílago.

En las últimas décadas, ha surgido una gran variedad de nuevas modalidades de tratamiento que han demostrado diferentes niveles de éxito en la reparación del cartílago. Sin embargo, los resultados clínicos no logran ser consistentes [84], ya que ninguno garantiza a largo plazo la restauración completa del cartílago debido a la incapacidad de imitar la estructura estratificada inherente del cartílago, así como la dificultad en lograr una integración efectiva con el tejido del huésped [111].

En este contexto, la técnica de andamios multicapas es una estrategia innovadora en la ingeniería de tejidos (IT), que busca mejorar la regeneración del cartílago mediante la creación de estructuras multicapa, donde cada capa puede tener propiedades y funciones específicas, optimizando así la formación de tejido cartilaginoso funcional [112]. Los andamios multicapas ofrecen la ventaja de replicar la estructura compleja del cartílago nativo y controlar sus propiedades mecánicas y biológicas [113]. No obstante, su fabricación precisa es compleja y la unión entre capas puede ser un punto débil, por lo que se requiere una cuidadosa elección del tipo de células, biomateriales y condiciones de cultivo [15,21]. Superar estos desafíos podría resultar en andamios altamente efectivos para la regeneración del cartílago.

1.4.1 Técnicas de fabricación de andamios poliméricos multicapa

La IT busca crear estructuras tridimensionales 3D llamadas andamios que puedan proporcionar soporte estructural y guiar la regeneración de tejidos específicos. Estos andamios son diseñados para imitar la matriz extracelular natural y proporcionar un entorno propicio para el crecimiento y la diferenciación celular [89]. Entre las técnicas comunes para la fabricación de andamios en tercera dimensión (3D) se encuentran los sistemas de impresión por extrusión, la deposición capa por capa y el uso de hidrogeles [114].

En la siguiente sección, se abordarán las metodologías que posibilitan el diseño de entornos histológicamente más precisos. Cada una de estas metodologías presenta

ventajas notables con respecto a las demás, al permitir un ajuste meticuloso de las propiedades mecánicas y biológicas del andamio dependiendo de su aplicación.

1.4.1.1 Sistemas de impresión basados en extrusión

Las técnicas de impresión en 3D para la fabricación de andamios en aplicaciones biomédicas han ganado prominencia debido a su facilidad de uso y control preciso en la estructura y distribución de factores biológicos [115]. Estos sistemas pueden clasificarse según su método de impresión, siendo el enfoque de extrusión uno de los más empleados, como el modelado por deposición de fundido (MDF) o el de electrohilado (EH).

1.4.1.1.1. Modelado por deposición de fundido

En MDF, un cabezal calienta y extruye el polímero a través de una boquilla para construir capas sobre una plataforma en un patrón preestablecido (Figura 1.8). Esto permite fabricar andamios con geometría altamente controlada y porosidad interconectada [116].

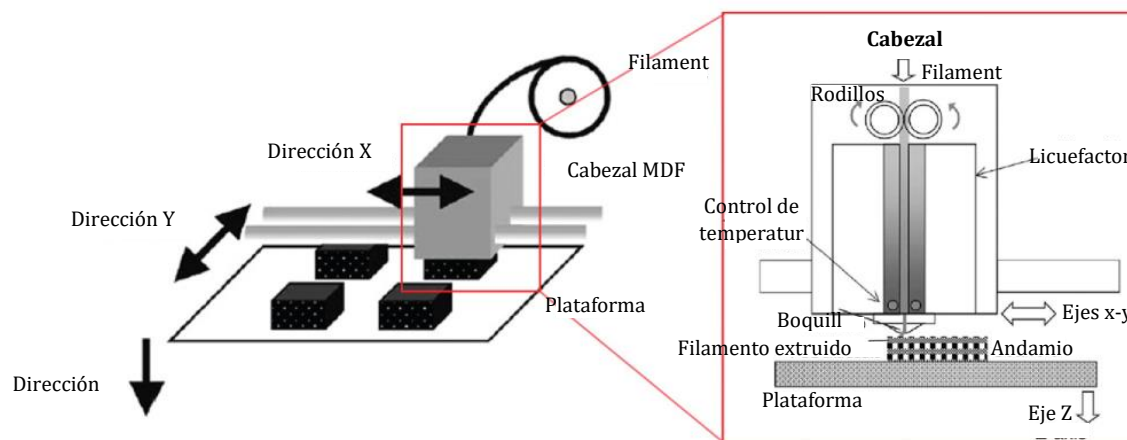


Figura 1.8. Diagrama esquemático del proceso de extrusión y deposición por MDF.

Tomado y modificado de Pati (2015) [116].

Comparado con otras técnicas de impresión 3D, el MDF destaca por su simplicidad y amplia disposición de materiales, eliminando la necesidad de solventes y permitiendo una producción continua. Sin embargo, enfrenta retos en la uniformidad de las fibras y está limitado a materiales biodegradables como el poli(ácido láctico) (PLA) [117].

Aunque las técnicas en impresión 3D han avanzado rápidamente, los resultados clínicos aún no son consistentes y se busca superar limitaciones, como la integración de nuevas clases de polímeros, la falta de regeneración estructural del cartílago sobre estos materiales y la integración de las estructuras extruidas con el tejido huésped [118,119].

1.4.1.1.2 Electrohilado

El EH constituye una técnica que usa un campo eléctrico para estirar y depositar fibras en un sustrato. En este proceso, un polímero en solución se extruye mediante una aguja micrométrica cargada eléctricamente [120]. Las fibras generadas se depositan en un colector y se fusionan, resultando en un andamio tridimensional (Figura 1.9) [121]. Este enfoque permite un control preciso del tamaño de poro y la orientación de las fibras en los andamios resultantes [23].

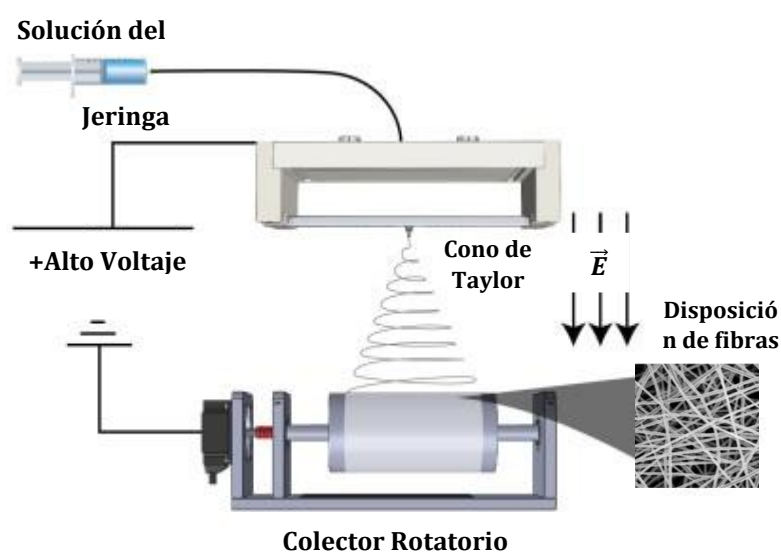


Figura 1.9. Diagrama esquemático de la configuración horizontal de un equipo de electrohilado. Tomado y modificado de AZoNano (2023) [122].

Al emplear el EH en la creación de andamios porosos o redes fibrinosas, se incrementa la estabilidad mecánica debido a la capacidad de direccionar las fibras. Además, esta técnica se distingue por su sencillez en el procesamiento y su alta área superficial, lo que asegura una reproducibilidad efectiva [123]. Sin embargo, factores como las condiciones de la solución (pH, peso molecular, tipo de solvente, concentración, entre

otros) y del dispositivo, así como los métodos de recolección, influyen en el diámetro de las fibras y la densidad de éstas en la membrana que se genera, que pueden variar desde la micro hasta la nanoescala [116].

A pesar de que el EH destaca como una técnica prometedora en la ingeniería de tejidos, al permitir la manufactura de andamios tridimensionales con una orientación precisa de las fibras, la naturaleza aleatoria de estas fibras plantea un desafío considerable en el control de la geometría. Esto es especialmente relevante cuando se centra en la regeneración del tejido cartilaginoso.

1.4.1.2 Método de Fundición con disolventes/Lixiviación de partículas (FDLP)

La técnica de fundición con disolventes/lixiviación de partículas (FDLP) es una técnica comúnmente utilizada en la IT, particularmente en la fabricación de andamios 3D para regeneración de hueso y cartílago [114]. Implica la fabricación de andamios porosos utilizando una solución polimérica que pudiera contener partículas bioactivas dispersas, que se deposita en un molde y luego se solidifica por la evaporación controlada del disolvente (Figura 1.10) [124]. Esta metodología ofrece diversas ventajas, como la capacidad de controlar la porosidad y la morfología de los andamios mediante la velocidad de evaporación del solvente, así como la incorporación de compuestos bioactivos para estimular la regeneración celular. Además, el proceso de fabricación es relativamente sencillo y puede adaptarse para producir andamios con geometrías específicas para diversas aplicaciones [125].

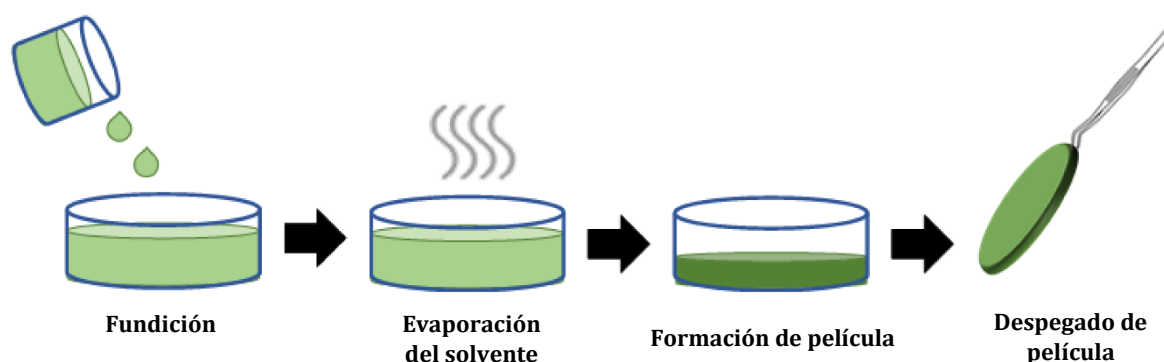


Figura 1.10. Ilustración de la formación de película mediante la técnica de fundición con disolvente. Tomada y modificada de Kanaan (2021) [126].

Sin embargo, esta técnica también presenta desafíos y desventajas. La uniformidad y la reproducibilidad en la estructura de los andamios pueden ser difíciles de lograr, lo que puede afectar la funcionalidad y la eficacia clínica. Además, la toxicidad residual del disolvente utilizado en el proceso puede ser problemática, especialmente cuando se trata de aplicaciones biomédicas [127]. La rigidez mecánica de los andamios generados puede no coincidir con las propiedades naturales del cartílago, lo que puede afectar la funcionalidad y adhesión celular a largo plazo, influyendo negativamente en la integración y la supervivencia del tejido generado [128,129].

En general, la técnica FDLP ofrece una opción sólida para la regeneración de tejido, pero aún se enfrenta a desafíos que requieren abordarse para lograr aplicaciones clínicas efectivas y exitosas.

1.4.1.3 Técnicas de gelificación y reticulación: hidrogeles.

Los hidrogeles son redes tridimensionales compuestas por cadenas poliméricas entrecruzadas [130]. Tienen la particularidad de mantener su integridad estructural al mismo tiempo que expresan propiedades altamente hidrofílicas [131,132]. Generalmente, esta alta afinidad al agua se debe a la presencia de grupos funcionales tales como los hidroxilos (-OH), amida I (-CONH-), amida II (-CONH₂) y sulfónicos (-SO₃H), distribuidos a lo largo de su superficie [133].

Los hidrogeles suelen ser materiales elásticos y suaves al tacto, lo que, combinado con su capacidad de retención de agua, les permite asemejarse a tejidos vivos (Figura 1.11), como la matriz extracelular (MEC). Durante su fabricación, es deseable que éstos tengan un grado de degradación que permita la incorporación de células, las cuales en el futuro remodelarán y reemplazarán el material con el tejido deseado [27]. Además, es importante que el hidrogel mantenga una resistencia mecánica apropiada (valores entre 800-900 kPa [134]) a lo largo del tiempo para soportar la diferenciación y funcionalidad celular [135].



Figura 1.11. Características esenciales de un hidrogel para su uso en IT. **A)** entrecruzamiento, **B)** estructura 3D, **C)** capacidad de hinchamiento, **D)** hidrofílico, **E)** capacidad de controlar la solubilidad.

Debido a estas características, en los últimos años, se ha observado un amplio uso de los hidrogeles en el campo de la ingeniería de tejidos (IT) como soporte estructural, en entornos acuosos, durante procesos de migración celular, morfogénesis y terapias de cicatrización de heridas [26]. Este creciente interés se debe tanto a las similitudes entre los hidrogeles y los tejidos nativos, como a la posibilidad de modificar sus propiedades químicas y físicas mediante el diseño y composición de los materiales precursores, así como el tipo y nivel del grado de entrecruzamiento [136]. Los hidrogeles pueden clasificarse según el tipo de entrecruzamiento en químico y físico, dependiendo del mecanismo utilizado para establecer las redes tridimensionales.

1.4.1.3.1. Entrecruzamiento químico

El entrecruzamiento químico (Figura 1.12) se logra mediante la formación de enlaces covalentes entre cadenas distintas de un material polimérico, lo que aporta estabilidad mecánica al evitar la dilución y disipación de la estructura [132]. Sin embargo, los agentes químicos responsables del entrecruzamiento a menudo se han reportado como tóxicos y con la capacidad de inactivar a los agentes bioactivos que ocasionalmente se incorporan dentro de su matriz [137].

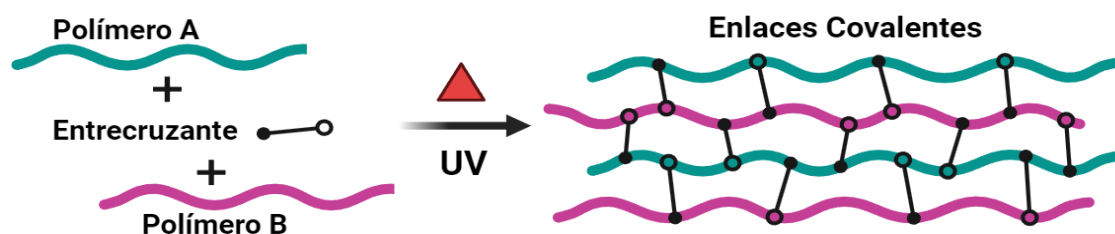


Figura 1.12. Representación gráfica del entrecruzamiento químico que ilustra el tipo de enlace dentro del material. Tomado y modificado de Ramachandran (2019) [138].

Los agentes de entrecruzamiento químico (AEQ) son, en esencia, moléculas reactivas capaces de formar enlaces covalentes con grupos funcionales presentes en los biopolímeros, tales como los hidroxilos (-OH). De este modo, los AEQ forman puentes interconectados a lo largo de las moléculas del biopolímero [139].

Aunque los AEQ pueden proporcionar las ventajas antes mencionadas, no están desprovistos de desventajas. Por ejemplo, se debe tener cuidado de eliminar los monómeros que no hayan reaccionado una vez finalizado el proceso de entrecruzamiento. Además, el peso molecular de las estructuras poliméricas pueden ser alterados significativamente, debido a la modificación de su estructura química y física por las reacciones que ocurren en este proceso [140]. Esto puede significar una reducción en la biodegradabilidad de la arquitectura del biopolímero [141], así como una disminución en el número de grupos funcionales disponibles en la estructura del biopolímero, alterando las posibilidad de reaccionar con su ambiente [142].

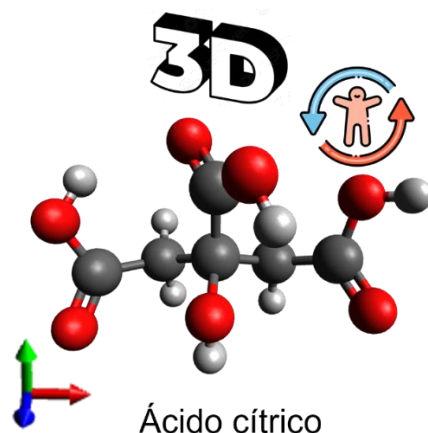


Figura 1.13. Estructura y disposición espacial del ácido cítrico.

En la búsqueda de soluciones, los investigadores han explorado diversos agentes de entrecruzamiento, como los ácidos policarboxílicos. Entre ellos, el ácido cítrico (AC), es el ejemplo más común. El AC es, un compuesto orgánico que posee tres grupos carboxílicos (Figura 1.13) y que se encuentra de forma natural en las frutas cítricas, ofrece diversas ventajas al ser utilizado como agente de entrecruzamiento. Entre estas se encuentra su baja exigencia de altas temperaturas de curado [143], capacidad de formar estructuras 3D debido a su disposición espacial [144] y, crucialmente, cualquier

residuo no reaccionado que pueda quedar tras el proceso de curado es considerado nutricionalmente aceptable para el cuerpo humano [145].

1.4.1.3.2. Entrecruzamiento físico

Los hidrogeles entrecruzados físicamente se forman a través de enlaces dinámicos y reversibles, los cuales se basan en diversas interacciones como las iónicas, hidrofóbicas, electrostáticas, puentes de hidrógeno, o combinaciones de éstas. En el caso particular de los polímeros, especialmente los polisacáridos, uno de los mecanismos más utilizados implica la formación de puentes de hidrógeno [137]. Este proceso se desarrolla cuando un átomo de hidrogeno se enlaza a un átomo electronegativo, generando cargas parciales negativas alrededor del átomo electronegativo y cargas parciales positivas alrededor del átomo de hidrógeno (Figura 1.14) [146]. Esta configuración conduce a la creación de interacciones electrostáticas entre ambos átomos, lo que a su vez desencadena el proceso de gelificación [147].

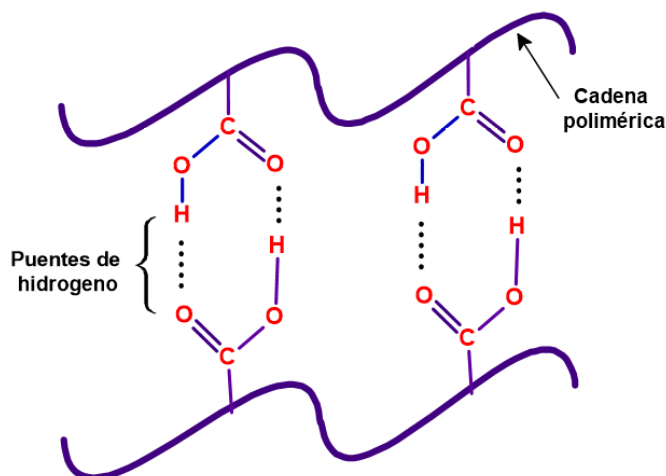


Figura 1.14. Diagrama esquemático del entrecruzamiento de cadenas de polisacáridos inducida por enlaces de hidrógeno. Tomada y modificada de Qureshi (2020) [137].

A pesar de que los hidrogeles con entrecruzamiento físico suelen tener propiedades mecánicas inferiores a los hidrogeles con entrecruzamiento químico debido a la debilidad de las interacciones físicas en comparación con las interacciones primarias como los enlaces covalentes [148], estas interacciones físicas tanto intermoleculares

como intramoleculares son suficientes para conferir insolubilidad a los hidrogeles en medios acuosos, manteniendo intacta su estructura 3D [149].

En el caso de los hidrogeles con entrecruzamiento químico, suele llevarse a cabo un paso de purificación después de su elaboración con el fin de eliminar los residuos de los agentes de entrecruzamiento u otros compuestos químicos [131]. La principal ventaja de los hidrogeles con entrecruzamiento físico radica en que no requieren el uso de agentes químicos, los cuales suelen ser tóxicos y pueden disminuir la biocompatibilidad de los hidrogeles [132]. Además, las condiciones de preparación de los hidrogeles con entrecruzamiento físico suelen realizarse a temperatura ambiente, a diferencia del uso de altas temperaturas, radiación y solventes orgánicos que se usan en los hidrogeles con entrecruzamiento químico [150].

1.4.1.4 Restricciones y perspectivas futuras

La fabricación de andamios multicapas representa una estrategia prometedora para la regeneración del cartílago, ya que permite replicar la estructura nativa de este tejido. Sin embargo, para aprovechar al máximo sus ventajas, es esencial abordar las restricciones específicas de cada técnica de procesamiento utilizada en la IT (Tabla 1.3). Cada una de estas técnicas presenta desafíos únicos en términos de fabricación, integración y biocompatibilidad. Superar estos obstáculos es fundamental para lograr aplicaciones clínicas más efectivas y exitosas en la reparación de lesiones cartilaginosas, ofreciendo soluciones consistentes y duraderas para esta importante área de la medicina regenerativa.

Tabla 1.3. Técnicas de procesamiento generalmente utilizadas para la creación de andamios multicapa.

Técnica	Ventajas	Desventajas	Referencias
<i>Modelado por deposición de fundido (MDF)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicidad. • Eliminación del uso de solventes. • Control preciso de la geometría. 	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de uniformidad en las fibras. • Disposición limitada de materiales biodegradables. • Falta de integración el tejido huésped. 	<i>F. Pati (2015) [116], M. Amin (2023) [117], S;M.S Gruber [118], A.Harynska [119].</i>
<i>Electrohilado (EH)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Control de la porosidad y morfología. • Estabilidad mecánica. • Alta área superficial. • Reproducibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Variación del tamaño de las fibras. • Requiere de mucho control en la condiciones de la solución y el equipo. • Disposición aleatoria de las fibras. 	<i>W.J. Li (2017) [23], F. Pati (2015) [116], J. Guo (2016) [123].</i>
<i>Fundición con disolventes/ Lixiviación de partículas (FDLP)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Control de la porosidad y morfología. • Capacidad de incorporar compuestos bioactivos. • Fabricación sencilla. • Geometrías específicas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja uniformidad y reproducibilidad. • Toxicidad residual del disolvente. • Rigidez mecánica incompatible. 	<i>A. Prasad (2017) [125], C. Jiao (2022) [127], M. Tschon (2021) [128], R. Revati (2017) [129].</i>

<i>Hidrogeles químicamente entrecruzados</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alta estabilidad mecánica. • Homogeneidad en el entrecruzamiento. 	<ul style="list-style-type: none"> • AEQ tóxicos. • Inactivación de agentes bioactivos. • Reducción de la biodegradación. 	<i>V.S. Ghorpade (2019) [132], D. Qureshi (2020) [137], X. Shen (2016) [139], H.M:C. Azeredo (2016) [141].</i>
<i>Hidrogeles físicaicamente entrecruzados</i>	<ul style="list-style-type: none"> • No usan AEQ. • Entrecruzamiento a temperatura ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Enlaces débiles y reversibles. • Malas propiedades mecánicas. 	<i>V.S. Ghorpade (2019) [132], D.L. Taylor (2016) [146], J.N. Hunt (2011) [148], W.E. Hennink (2002) [150].</i>

1.4.2 Biomateriales para andamios multicapa biomiméticos

Al elegir biomateriales para los andamios multicapa, es esencial considerar tanto las características bioquímicas como las mecánicas de dichos materiales [151]. Esto permitirá dirigir el proceso de diferenciación de las células sembradas/encapsuladas hacia los fenotipos presentes en el tejido cartilaginoso, así como la generación de componentes específicos de la matriz extracelular (MEC) para cada una de las capas del cartílago articular [152]. En esta sección, se explorarán estrategias para la selección de materiales, tanto naturales como sintéticos, basadas en las propiedades deseadas para los andamios.

1.4.2.1 Biomateriales de origen natural

En el campo de la ingeniería de tejidos (IT), se recurre a diversos materiales de origen natural para la fabricación de andamios y matrices, con el propósito de replicar las propiedades y funciones de los tejidos biológicos [153]. Estos materiales destacan por ser biocompatibles y biodegradables, además de contar con la capacidad de suministrar señales bioquímicas cruciales para el crecimiento y la regeneración de los tejidos [110,154]. Entre los materiales naturales más ampliamente utilizados se encuentran los biopolímeros y los biocerámicos.

1.4.2.1.1 Biopolímeros

Debido a un uso inadecuado e irresponsable, los polímeros sintéticos se han vinculado a una serie de problemas extensos en términos ambientales y de salud [155]. Esto ha suscitado un creciente interés entre los investigadores por los polímeros naturales, también conocidos como biopolímeros debido a su origen [156]. Los biopolímeros representan una categoría de polímeros de alto peso molecular que se encuentran en plantas, animales y organismos vivos, desempeñando funciones esenciales en su estructura, metabolismo y procesos biológicos [157]. Entre los biopolímeros más destacados se incluyen los polisacáridos, tales como el quitosano, el alginato, la celulosa y el condroitín sulfato (CS); las proteínas, como la gelatina o el colágeno; y los polinucleótidos, como el ADN [158,159].

1.4.2.1.1 Carboximetilcelulosa (CMC)

La celulosa, un polisacárido natural de cadena lineal, es un componente fundamental en la pared celular de plantas y bacterias, siendo el polímero natural más abundante en la Tierra [160]. Sus numerosos grupos hidroxilo (-OH) le confieren naturaleza hidrofílica [161] y permiten enlaces de hidrógeno tanto dentro como entre moléculas [162,163]. La modificación química, mediante el grado de sustitución de estos grupos hidroxilo, puede alterar las propiedades mecánicas, bioactivas e hidrofílicas de la celulosa [164,165].

La carboximetilcelulosa (CMC) se ha convertido en una de los derivados de la celulosa más usados en la industria alimenticia debido a sus características anfífilas y de retención de agua, convirtiéndola en un excelente agente espesante, estabilizante y emulsificante [166]. Recientemente, a partir del año 2020, la CMC ha ganado notoriedad en el campo de la IT para la regeneración de cartílago, debido a su gran capacidad de almacenamiento de agua y a su gran disponibilidad de grupos -OH [167]. Por ejemplo, Prasad *et. al.* [168], desarrollaron un hidrogel inyectable de CMC fotoentrecruzado con metacrilato para servir como andamio en la proliferación y diferenciación de condrocitos. Este material se ha elegido debido a las características biocompatibles, biodegradables y no tóxicas que presenta el material, además de su estabilidad mecánica y térmica, lo que permite mantener la morfología y el fenotipo de los condrocitos diferenciados. Del mismo modo, Namkaew *et. al.* [30], crearon un andamio compuesto por Polí(Alcohol Vinílico) (PVOH) y CMC entrecruzado con glutaraldehído, diseñado para promover la adhesión y proliferación celular de condrocitos mediante la capacidad de modular la arquitectura de los poros e incrementar la retención de agua del andamio.

1.4.2.1.2 Condroitín sulfato (CS)

La familia de los glucosaminoglicanos (GAG) comprende un grupo de heteropolisacáridos aniónicos que se encuentran ampliamente distribuidos en la MEC de diversos tejidos del organismo. Éstos desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural y las propiedades funcionales de estos

tejidos [169]. Uno de los miembros más destacados de esta familia es el condroitín sulfato (CS), un tipo de GAG compuesto por disacáridos alternos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-galactosamina unidos por un enlace $\beta(1-3)$. El CS presenta una variedad única en términos de densidad de carga debido a la presencia de grupos sulfato en distintas ubicaciones y cantidades, lo que lo convierte en un polisacárido altamente heterogéneo en términos de propiedades fisicoquímicas, biológicas y farmacológicas [170].

En el ámbito de la IT, Liu *et. al.* [171], desarrollaron un enfoque innovador para diseñar un hidrogel basado CS metacrilado y poli(γ -ácido glutámico) con una densidad de entrecruzamiento variable. Esta técnica combina métodos químicos y fotónicos para obtener un andamio de hidrogel que puede inducir la diferenciación de células madre (CM) hacia condrocitos al modificar la densidad de entrecruzamiento. Por su parte Sadeghi *et. al.* [172], proponen la fabricación de un andamio compuesto por CS, PVA y gelatina, procesado mediante electrohilado y entrecruzado químicamente con glutaraldehído. Este andamio de tres capas micrométricas ha demostrado efectividad en la cicatrización de heridas en tejidos dañados y la liberación controlada de fármacos. El CS juega un papel clave al mantener la liberación controlada del fármaco y regular la expresión de factores de crecimiento relacionados con la adhesión celular focalizada.

En otro enfoque, Gao *et. al.* [79], proponen el diseño de andamios de hidrogel biomiméticos para encapsular y liberar condrocitos con el objetivo de reparar el cartílago. Estos hidrogeles se fabricaron variando la composición y la proporción de colágeno de tipo I y ácido hialurónico/condroitín sulfato modificados. Esta modificación de los GAG, lograda mediante la introducción del grupo aldehído (-CHO) en el ácido hialurónico (AH) y el grupo hidrazina (R_2N-NR_2) en el CS, facilitó la reacción de entrecruzamiento tanto con el colágeno como entre ellos mismos. Además de sus características morfológicas, capacidad de retención de agua y propiedad de compresión, se observó que la variante denominada "C8CH", con una concentración de 10 mg/mL de CS, demostró ser biocompatible con las CM y logró mantener el fenotipo de los condrocitos, promoviendo la secreción de GAG por parte de las células.

1.4.2.1.2 Biocerámicos

Los materiales cerámicos también desempeñan un papel importante en la IT gracias a sus propiedades únicas, que incluyen como alta resistencia mecánica, durabilidad y estabilidad química, que los convierte en opciones adecuadas para aplicaciones en implantes y andamios [173].

La hidroxiapatita (HAp), el componente mineral principal del tejido óseo, se destaca por su alta compatibilidad con el cuerpo humano, y su uso principal se encuentra en la ingeniería de tejidos óseos debido a su estructural similar al hueso natural [174]. Cheng *et. al.* [175], proponen la creación de un andamio multicapa que combina quitosano, gelatina y una variante de la hidroxiapatita. Utilizando la técnica FDLF, lograron mejorar significativamente las propiedades mecánicas del andamio, en particular su resistencia mecánica, que aumentó de 15 MPa a 35 MPa al incorporar 30% (p/p) de HAp. Este incremento se observó mientras interactuaba con una solución tampón de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). Además de este beneficio, esta adición contribuyó a mejorar la biocompatibilidad del andamio.

1.4.2.2 Biomateriales de origen sintético

A diferencia de los biopolímeros, que se encuentran en la naturaleza, los polímeros sintéticos son fabricados en laboratorios o industrias a partir de monómeros diseñados por el hombre [176]. En la ingeniería de tejidos (IT), los polímeros sintéticos se usan principalmente para abordar las limitaciones mecánicas que a menudo presentan los biopolímeros [177]. Además, dado que pueden ser diseñados para cumplir requisitos específicos, como resistencia mecánica, degradación controlada y capacidad para interactuar con las células, se utilizan en la creación de andamios y matrices 3D [178].

1.4.2.2.1 Polí(ácido láctico) (PLA)

El Polí(Ácido láctico) o PLA, un poliéster alifático termoplástico y biodegradable derivado del ácido láctico, ofrece numerosas ventajas para su aplicación en implantes médicos. El PLA y sus variantes, son materiales económicos que poseen una mayor estabilidad térmica y mecánica en comparación con otros polímeros sintéticos. Además,

su biodegradabilidad y no toxicidad garantizan su uso seguro en el organismo, al mismo tiempo que sus desechos son amigables con el medio ambiente [179].

En el ámbito de la IT, algunas investigaciones recientes del PLA y sus aplicaciones se centran en la creación de andamios multicapa. Por ejemplo, las investigaciones de Owida *et. al.* [180], han explorado la combinación de mallas de nanofibras de PLA procesadas mediante electrohilado, con diferentes alineaciones y microcanales, en un hidrogel de ácido hialurónico (AH). Esta combinación dio lugar a un modelo de andamio híbrido capaz de inducir la proliferación y diferenciación en condrocitos, promoviendo la producción de MEC. Es interesante notar que utilizaron el hidrogel para unir las capas de PLA procesadas por electrohilado, sin recurrir a ninguna técnica de entrecruzamiento

Por su parte, Camareo & Espinosa *et. al.* [181], desarrollaron un andamio multicapa utilizando la técnica de fundición con disolvente, que incluía la impregnación de las capas individuales con un acetona para garantizar la unión. Este enfoque utiliza PLA e HAp con el propósito de conectar el tejido conectivo con el hueso subcondral, proporcionando al mismo tiempo estabilidad mecánica a través del PLA y un gradiente mecánico mediante el crecimiento de la HAp en soluciones de CaCl_2 y fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés). La combinación de PLA e HAp facilita la formación de tejidos con propiedades que se asemejan a las naturales, mejorando la integración con el hueso subcondral.

1.5 Dirección de la investigación

Un biomaterial que pretenda imitar el cartílago articular debe ser similar, estructural y funcionalmente, al tejido nativo [182]. Es decir, que posea una buena capacidad de adsorción de nutrientes, así como una afinidad intrínseca de enlazarse al agua, siendo de vital importancia en la formación de la macroestructura del cartílago nativo, al mismo tiempo que promueva el apropiado intercambio de oxígeno, desechos metabólicos y mediadores moleculares de viabilidad celular [183]. Además, el andamio debe ser capaz de resistir la deformación mecánica, así como absorber las cargas de compresión y establecer un excelente contacto matriz-célula que asegure la

diferenciación junto con la función celular, para lograr una perfecta integración con el tejido cartilaginoso adyacente y el hueso subcondral [6].

Así, la propuesta del presente trabajo de tesis considera la combinación de CMC, PLA, HAp y CS, que sería capaz de conservar todas las propiedades de interés de cada uno, mientras que sus limitaciones podrían ser subsanadas.

CAPÍTULO 2. Técnicas Experimentales

En este capítulo se mencionan los reactivos y dispositivos utilizados para la síntesis, caracterización y el estudio de su rendimiento biológico, del conjunto y por separado de cada una de las tres diferentes capas del andamio con base en PLA, así como del hidrogel de CMC-CS utilizado como interfase y HAp como aditivo bioactivo. La primera parte describe los precursores químicos y solventes utilizados, así como las condiciones en las cuales fueron usados, mientras que la segunda parte está orientada a la descripción de las técnicas analíticas utilizadas para estudiar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas del andamio.

2.1 Reactivos químicos utilizados

2.1.1 Procesamiento del andamio por FDLF

Se utilizaron como precursores químicos la Carboximetilcelulosa (CMC) (CAS 9000-11-7, DEIMAN®) y Polí(Ácido láctico) (PLA) (CAS 26100-51-6, DREMEL 3D); Hidroxiapatita (HAp) (CAS 1306-06-5Sigma Aldrich®) y Ácido cítrico anhidro (CAS 77-92-9, Karal®).

Como solventes se usaron Alcohol Etilico 96° (CAS 64-17-5, Fermont®) y Cloroformo ≥99.5% (CAS 67-66-3, Sigma Aldrich®). Todos los productos químicos se utilizaron tal como se recibieron de los proveedores.

2.1.2 Procesamientos de andamios por Impresión 3D y EH

Para este caso, se utilizaron como precursor químico al Polí(Ácido láctico) (PLA) (CAS 26100-51-6, DREMEL 3D). Como solvente se usó Cloroformo ≥99.5% (CAS 67-66-3, Sigma Aldrich®). y se utilizó tal como se recibió de los proveedores.

2.1.3 Construcción de andamios multicapa

Se utilizaron como precursores químicos Carboximetilcelulosa (CMC) (CAS 9000-11-7, DEIMAN®), Condroitin Sulfato (CS) sódico de tráquea bovina (CAS 39455-18-0, Sigma Aldrich®) y Ácido cítrico anhidro (CAS 77-92-9, Karal®). Como solvente se usó Agua

desionizada. Todos los productos químicos se utilizaron tal como se recibieron de los proveedores.

2.2 Técnicas de caracterización

En la Figura 2.1 se resumen las técnicas analíticas empleadas para estudiar las propiedades de los andamios poliméricos multicapa con base en PLA, CMC, CS y HAp. La Tabla 2.1 ofrece una descripción de cada de las técnicas. La preparación de las muestras se describe en la sección experimental del capítulo correspondiente.

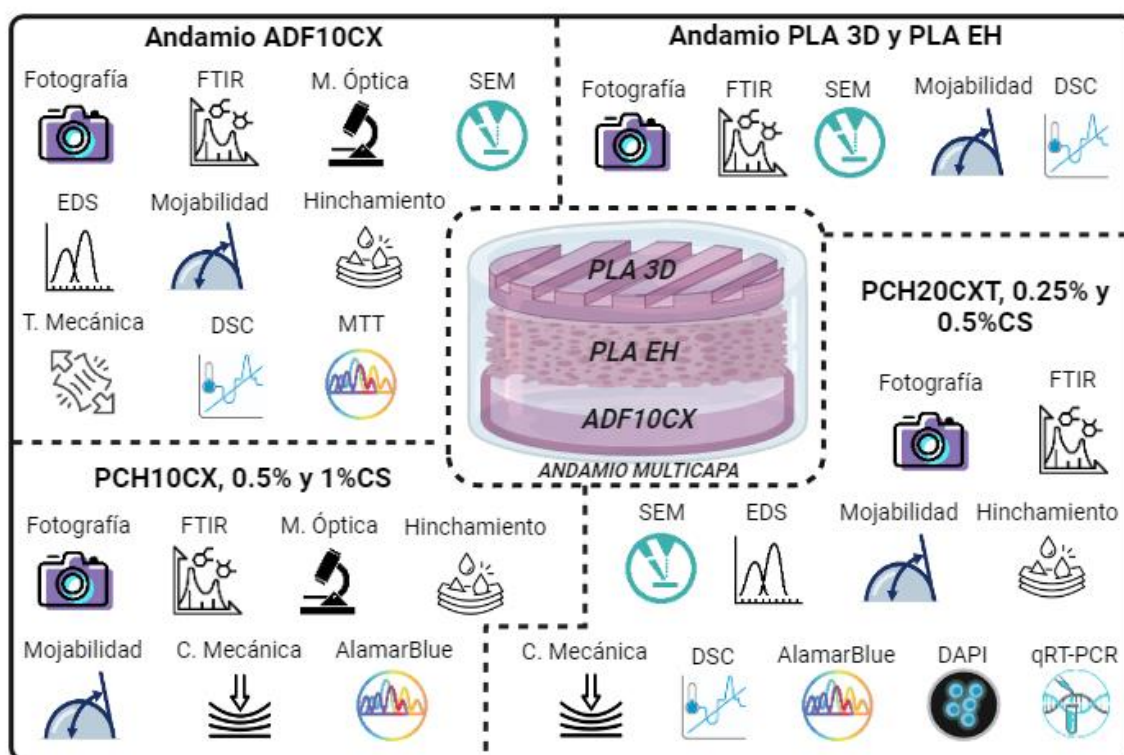


Figura 2.1. Esquema de las técnicas descritas en la Tabla 2 para cada una de las secciones que componen los andamios multicapa y las variaciones de los andamios multicapa en sí.

La mayoría de los análisis se realizaron en laboratorios del IPICYT: Laboratorio de Polímeros, Laboratorio Nacional de Nanociencia y Nanotecnología (LINAN) y Laboratorio de petroquímica y petrofísica (LabGeo-APP). Mientras que las evaluaciones biológicas y algunas mecánicas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biomateriales del Politécnico de Milán y en la Coordinación para la innovación y aplicación de la

ciencia y la tecnología (CIACyT) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP).

Tabla 2.1. Especificaciones generales de las técnicas analíticas utilizadas.

Técnica analítica (acrónimo)	Propiedad medida	Condiciones experimentales	Modelo	Proveedor
<i>Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier por Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR, por sus siglas en inglés)</i>	Interacciones químicas y grupos funcionales	Intervalo: 600-4000 cm ⁻¹ ; Número de escaneos: 32; Resolución 4 cm ⁻¹ :	Nicolet iS10	Thermo Scientific
<i>Microscopía óptica</i>	Morfología macroscópica cualitativa	Iluminación: Luz blanca artificial; Lente: Macro de 2 Mpx; Apertura <i>f</i> /2.4.	Note 8	Redmi
	Propiedades de superficie, morfología y tipo de agua enlazada a la superficie	Modo: Campo claro; Objetivos: 4x, 10x y 20x.	Eclipse Ci Pol	Nikon
<i>Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés)</i>	Propiedades de superficie, morfología, tamaño de partícula y composición química por EDX	Modo: Bajo vacío; Voltaje: 5-15KV; Presión: 110-130 Pa.	Quanta 250	FEI

<i>Ángulo de contacto por goniometría</i>	Propiedades de mojabilidad y ángulo de contacto	Modo: gota sésil; solvente: Agua desionizada; Volumen de gota: 2.5µL	TL100	Attension
<i>Capacidad de hinchamiento</i>	Propiedades hidrofílicas (retención de agua) y degradación hidrolítica	Tipo de solvente: Agua desionizada; Temperatura: 37°C	Precision PR305225M	Thermo Scientific
		Tipo de solución: PBS; Temperatura: 37°C	M20-VN	MPM Instruments
		Tipo de solución: SBF; Temperatura: 37°C	Precision PR305225M	Thermo Scientific
<i>Deformación mecánica por tensión</i>	Módulo elástico, elongación a la rotura y esfuerzo máximo de tracción	Tipo de celda: 5N; Normatividad: ASTM-D2370-16; Temperatura: Ambiente	3369	Instron
<i>Deformación mecánica por compresión</i>	Módulo elástico, rigidez, esfuerzo máximo de compresión y deformación residual	Normativa: ASTM D695-15; Temperatura: 37°C	Q800	TA instrument
	Módulo elástico, tenacidad y deformación residual	Capacidad de celda: 50 N; Normatividad: ASTM	3369	Instron

		D695-15; Temperatura: Ambiente		
<i>Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés)</i>	Temperatura de transición vítrea, Temperatura de cristalización / fusión y Entalpía de cristalización / fusión	Masa de la muestra: 5 ± 1 mg; Atmósfera: Nitrógeno; Intervalo de temperatura: 5-250°C; Velocidad de calentamiento: 20°C/min	Q2000	TA instrument
<i>Ensayo de viabilidad celular colorimétrico por MTT</i>	Actividad metabólica	Tipo de célula: CMM 500-010; Normatividad: ISO 10993-12:2021. Longitud de onda: 450 nm	FC Multiskan	Thermo Scientific
<i>Ensayo de viabilidad celular colorimétrico por AlamarBlue</i>	Citotoxicidad y biocompatibilidad	Tipo de célula: Fibroblastos L929 y Condrocitos HCS/2-8; Normatividad: UNE-EN ISO 10993-5:2009. Longitud de onda excitación: 554 nm; Longitud de onda emisión: 593 nm.	Synergy™ H1	BioTek,

		Tipo de célula: CMM 500-010; Normatividad: ISO 10993-12:2021. Longitud de onda excitación: 554 nm; Longitud de onda emisión: 593 nm.	Synergy™ H1	BioTek,
<i>Tinción de material genético con DAPI</i>	Evaluación de la integridad y la condición del ADN en las CMM	Tipo de célula: CMM 500-010; Concentración de DAPI: 1µg/mL; Longitud de onda: 450 nm.	ZOE Fluorescent Cell Imager	Bio-Rad
<i>Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR, por sus siglas en inglés)</i>	Expresión génica	Técnicas de detección: Colorante SYBR Green y Sondas TaqMan; Genes evaluados: Shh, Bmp-4, Sox9, Runx2, Col2a1 y Acan	QuantStudio™ 1	Thermo Scientific

CAPÍTULO 3. Fabricación y evaluación de un andamio de PLA-CMC entrecruzado con ácido cítrico, mediante la técnica de fundición de disolvente para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos (IT), desde hace ya varias décadas, se presentó como una disciplina científica y tecnológica fascinante que busca diseñar soluciones innovadoras para la reparación y regeneración de tejidos/órganos dañados en el cuerpo humano. En este contexto, los andamios tridimensionales desempeñan un papel fundamental, ya que ofrecen soporte para el crecimiento y la diferenciación celular, permitiendo así la formación de tejido funcional.

Entre los diversos métodos para la fabricación de estos andamios, destaca la técnica de fundición con disolventes/lixiviación de partículas (FDLP), una aproximación que implica la creación de matrices mediante la evaporación controlada del disolvente en una solución polimérica. Este enfoque ha demostrado ser especialmente efectivo en la generación de andamios altamente porosos y biocompatibles, con propiedades mecánicas y estructurales ajustables para adaptarse a una variedad de aplicaciones en IT.

El Capítulo 3 considera la descripción del método de procesamiento, así como las técnicas de caracterización aplicadas a los andamios constituidos por Poli(ácido láctico) (PLA), Carboximetilcelulosa (CMC) e Hidroxiapatita (HAp). A partir de los datos obtenidos, se plantea la discusión sobre las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y térmicas de los andamios, al mismo tiempo que se expone el cómo éstas pueden influir en su respuesta biológica.

3.1 Metodología experimental

3.1.1 Procesamiento mediante la técnica FDLP.

Para la obtención del andamio se realizó una modificación a la metodología propuesta por J. León *et. al.* [184], donde se utilizaron procesos separados de disolución y dispersión de PLA (previamente cargado con 1.5% (p/p) HAp [185]), ahora denominados como PLA HA, y CMC, respectivamente, en una proporción 1:1 (p/p). La disolución de PLA se llevó a cabo en una solución de 5 mL en relación 9:1 (v/v) de cloroformo y alcohol etílico al 96%, respectivamente. Para la dispersión de CMC, se usó la misma relación de alcohol etílico y cloroformo, añadiendo 3% (p/p) de ácido cítrico como pre entrecruzante. Ambas soluciones se agitaron con una velocidad constante de 500 rpm durante 30 minutos en una parrilla de agitación magnética Termoscientific® Sp131635 (Figura 3.1A).

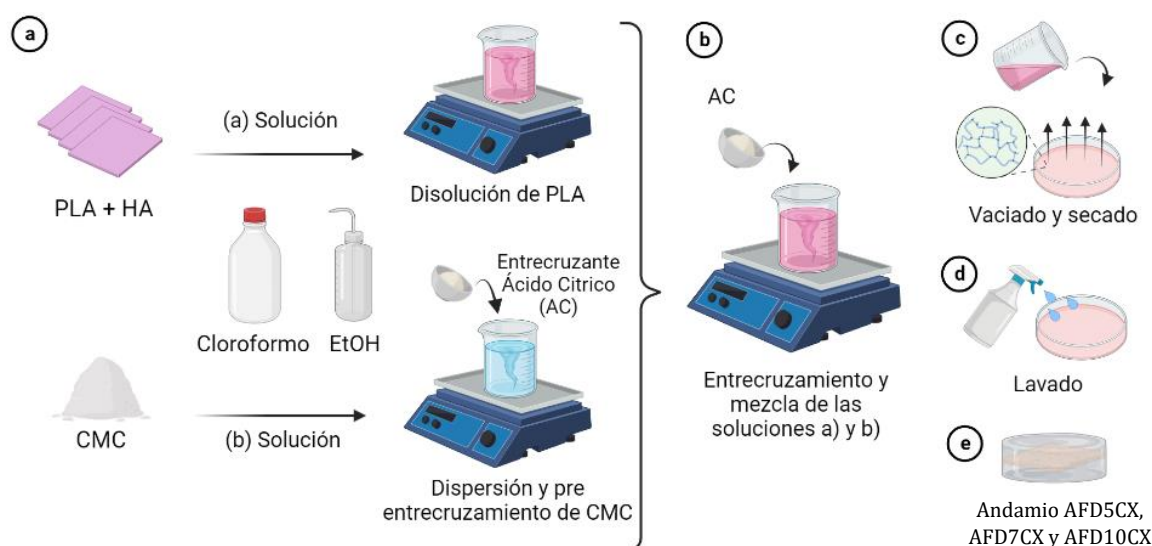


Figura 3.1. Metodología para la fabricación de andamios por la técnica FDLP a partir de PLA-CMC con diferente contenido de entrecruzante. **(a)** Preparación de la soluciones base; **(b)** entrecruzamiento; **(c)** evaporación del solvente; **(d)** eliminación de residuos del solvente y del AEQ; **(e)** obtención de los andamios.

Tras el periodo de agitación, se combinaron ambas soluciones y luego se añadieron 2%, 4% y 7% (p/p) de ácido cítrico (AC) extra para obtener muestras con concentraciones

finales de AC del 5%, 7% y 10% (p/p), respectivamente, de acuerdo con la metodología de N. Sharmin *et. al.* [186]. Cada solución se agitó nuevamente hasta lograr la mayor homogeneidad posible (Figura 3.1B). Las soluciones resultantes se vertieron en cajas Petri Kimax®, las cuales se colocaron dentro de una campa de flujo laminar, a temperatura ambiente, para evaporar el exceso de solvente (Figura 3.1C). Los andamios obtenidos se lavaron con tres pases de agua desionizada, cada uno de 20 mL, con el fin de eliminar cualquier residuo de solvente y del agente entrecruzante químico (AEQ) (Figura 3.1D). Al final, se obtuvieron tres andamios de aproximadamente 0.3 mm de grosor, denominados AFD5CX, AFD7CX y AFD10CX (Figura. 3.1E).

3.1.2 Caracterización macroscópica cualitativa.

Se utilizó un lente macro de 2Mpx con una apertura de f/2.4 de un smartphone Redmi Note 8® e iluminación artificial con tonalidad blanca para la adquisición de las fotografías .

3.1.3 Caracterización de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

La identificación de especies químicas de los andamios se realizó utilizando un espectrofotómetro ThermoScientific Nicolet iS10 en el modo de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros de cada muestra se registraron a temperatura ambiente en el intervalo de número de onda de 600–4000 cm^{-1} , con 32 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} .

3.1.4 Caracterización morfológica.

3.1.4.1 Microscopia óptica

La morfología macroscópica de los andamios entrecruzados con 5%, 7% y 10 % (p/p) de AC en estado seco y húmedo (inmersos en agua desionizada durante 1 hora), se examinó mediante un microscopio óptico petrográfico Nikon Eclipse Ci Pol en campo claro, con los objetivos de 4x, 10x y 20x.

3.1.4.2 Microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM)

La morfología de los diferentes andamios se examinó utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés) FEI QUANTA 250, equipado con un detector EDAX, en condiciones de bajo vacío, a un voltaje de 15KV y un presión de 110-130 Pa. Todas las muestras se colocaron en un pin de aluminio y se recubrieron con oro durante 30s, a 4 mA, mediante un Cressington 108 auto.

3.1.5 Humectabilidad y retención de agua.

3.1.5.1 Ángulo de contacto

La humectabilidad de los soportes 3D con base en compositos de PLA-CMC se evaluó a temperatura ambiente mediante un goniómetro Biolin Scientific TL100 utilizando la técnica de gota sesíl y se analizó con el software de imagen One Attetion. Para realizar el análisis de mojabilidad se colocó una gota de agua desionizada ($\approx 2.5\mu\text{L}$) sobre la superficie de los materiales con una jeringa micrométrica, posteriormente se capturaron las imágenes a 12 s para evaluar el ángulo de contacto entre la gota de agua con la superficie del andamio mediante la ecuación de Young-Laplace [].

3.1.5.2 Grado de hinchamiento

La prueba de absorción de agua se realizó sumergiendo las muestras en agua desionizada dentro de un horno de laboratorio Thermo Scientific Precision PR305225M a una temperatura de 37°C. Las muestras se pesaron, retirando el exceso de líquido mediante centrifugación de acuerdo con la norma NMX-C-428-ONNCCE-1995 (3000 rpm por 10 min), a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 24, 48, 72, 168, 336 y 504 horas) para determinar el grado de hinchamiento en función del tiempo. La relación de hinchamiento ($\Delta W\%$) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta W\% = \frac{W_x - W_o}{W_o} \times 100$$

Donde W_x el peso de la muestra hinchada y W_o el peso de la muestra seca antes de entrar en contacto con agua desionizada .

3.1.6 Caracterización mecánica por tensión

El análisis tensión de los andamios 3D obtenidos por la técnica FDLF de las diferentes composiciones se realizó utilizando una máquina de ensayo universal Instron 3369 a temperatura ambiente. El ensayo mecánico se realizó de acuerdo con la norma ASTM D2370-16 con una celda de carga de 5 N [187].

3.1.6 Caracterización térmica

Se evaluaron las transiciones térmicas de los compuestos materiales con distintas proporciones de AC utilizando un calorímetro diferencial de barrido modelo Q2000 de TA Instruments. Para ello, se precisaron 5 ± 1 mg de cada muestra y se dispusieron en un porta-muestras de aluminio de 18 mg. El análisis se llevó a cabo en un ciclo único bajo una atmósfera de nitrógeno. La muestra se enfrió hasta alcanzar los 5°C, se mantuvo en equilibrio durante 1 minuto y posteriormente se elevó la temperatura a 250°C con una velocidad de calentamiento de 20°C/min.

3.1.7 Caracterización biológica

3.1.7.1 Cultivo celular

Se obtuvieron de Notal células madre mesenquimales (CMM) extraídas de cordón umbilical humano, de la línea celular 500-010. Posteriormente, para su replicación, las células obtenidas fueron cultivadas en DMEM con suplementación al 10% en suero bovino fetal y antibiótico al 1% (10.000 unidades de Penicilina, 10mg de estreptomina y 25µg/mL de anfotericina B de Sigma Aldrich) a una temperatura de 37°C con 95% de humedad y una atmósfera al 5% de CO₂.

3.1.7.2 Ensayo MTT™

El ensayo de citotoxicidad por MTT es un ensayo colorimétrico utilizado para cuantificar células viables, de acuerdo con la práctica estándar ISO 10993-12:2021 [188]. Para ello, los andamios se cortaron en cilindros con un diámetro de 6 mm y una altura de 0.3 mm. Se esterilizaron por 30 minutos bajo luz UV. Posteriormente, cada uno se dispuso en un pozo dentro una caja de cultivo con 96 pocillos. A continuación, se cultivaron sobre ellos 50.000 células por pocillo en 50 µL de medio durante un período

de 24 horas a una temperatura de 37 °C, manteniendo una humedad máxima del 95% y una concentración de CO₂ del 5%. Las células se contaron en cámara de Neubauer con uso de azul tripan. Tras este periodo, se añadieron 20 µL de la solución MTT directamente en cada pocillo y se cubrieron con papel aluminio durante 4 horas. Finalizado este lapso, se analizaron las muestras en un lector de microplacas Thermo Scientific FC Multiskan® a 450 nm, evaluando las muestras por quintuplicado y comparándolas con la muestra control.

3.1.7.3 Análisis estadístico.

Se realizó el análisis ANOVA de una vía, mediante la prueba de Tukey ($p < 0.01$), con el software GraphPad prism 8.0.2 para el ensayo MTT realizado por quintuplicado.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Efecto del entrecruzamiento

En la Figura 3.2 se pueden observar los andamios que resultaron del procesamiento mediante la técnica FDPL. Los compuestos poliméricos entrecruzados con diferentes concentraciones de ácido cítrico (AC), es decir, 5%, 7%, y 10% (p/p), están dispuestos de izquierda a derecha en ambos casos representados en la Figura 3.2A y Figura 3.2B, que presentan las muestras en sus estados secos y húmedos, respectivamente.

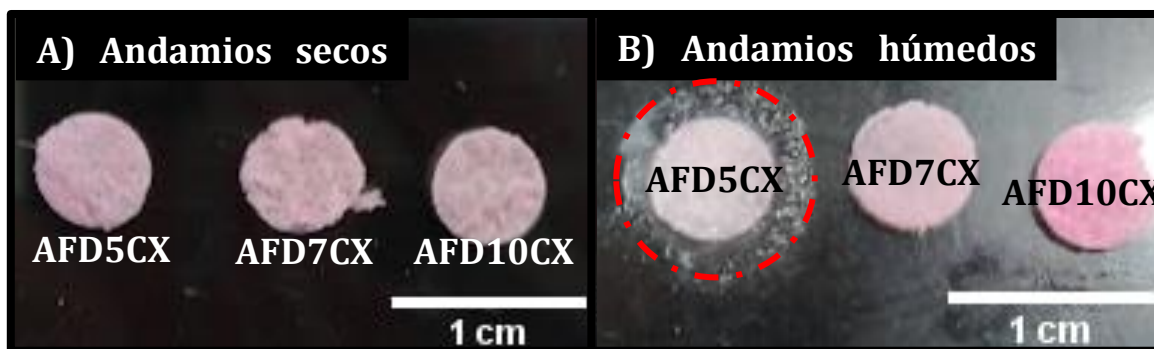


Figura 3.2. Fotografías de composites poliméricos entrecruzados **A)** secos y **B)** húmedos. Se destaca en la circunferencia roja un recubrimiento transparente.

En primer lugar, es importante destacar que los andamios muestran una notable tonalidad rosa, que es el pigmento característico del PLA comercial utilizado en este

estudio. Además, se observa una porosidad notable a simple vista, la cual parece estar directamente relacionada con la cantidad de agente entrecruzante químico (AEQ), ya que ésta parece aumentar al aumentar el AEQ añadido a las muestras.

Al sumergir muestras cilíndricas de los andamios en 20 mL de agua desionizada durante 1 hora, se observó la formación una sustancia transparente y viscosa, con características similares a la consistencia de los geles, que recubre toda la superficie del andamio AFD5CX (Figura 3.2B). En contraste, este fenómeno no se presentó en los andamios con 7% y 10% (p/p) de AC, debido a la presencia de una mayor concentración del agente de entrecruzamiento químico (AEQ). Estas observaciones serán de vital importancia para establecer correlaciones en los resultados posteriores.

3.2.2 Caracterización espectroscópica

La absorción de energía en bandas específicas, debida al desplazamiento de señales propias de los materiales precursores, así como la presencia/desaparición de nuevos grupos funcionales presentes en los andamios fue evaluada mediante la técnica de FTIR por Reflectancia Total Atenuada (ATR). Los grupos funcionales de cada uno de los espectros se encuentran enlistados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Valores destacados en el espectro FTIR.

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionales	Modo vibracional
1081	-C-C-O	Estiramiento
1267	-O-C-C	
1318	-OH	Flexión
1416	-CH ₂	Estiramiento
1587	-COO-	
1747	-C=O	
2923, 2878, 2971, 2995.	-CH	
3366, 3424, 3447, 3383	-OH	

La Figura 3.3 muestra los espectros de absorción correspondientes a los andamios AFD5CX, AFD7CX y AFD10CX, aunado a los espectros de los materiales poliméricos precursores, el CMC y el PLA HA. En el conjunto de los cinco espectros, se observa la presencia de los grupos funcionales característicos del Polí(ácido láctico) (PLA) y la carboximetilcelulosa (CMC) en todos los tratamientos. Además, es de especial interés la marcada modificación en la señal de dos bandas específicas: 1587 y 1747 cm^{-1} .

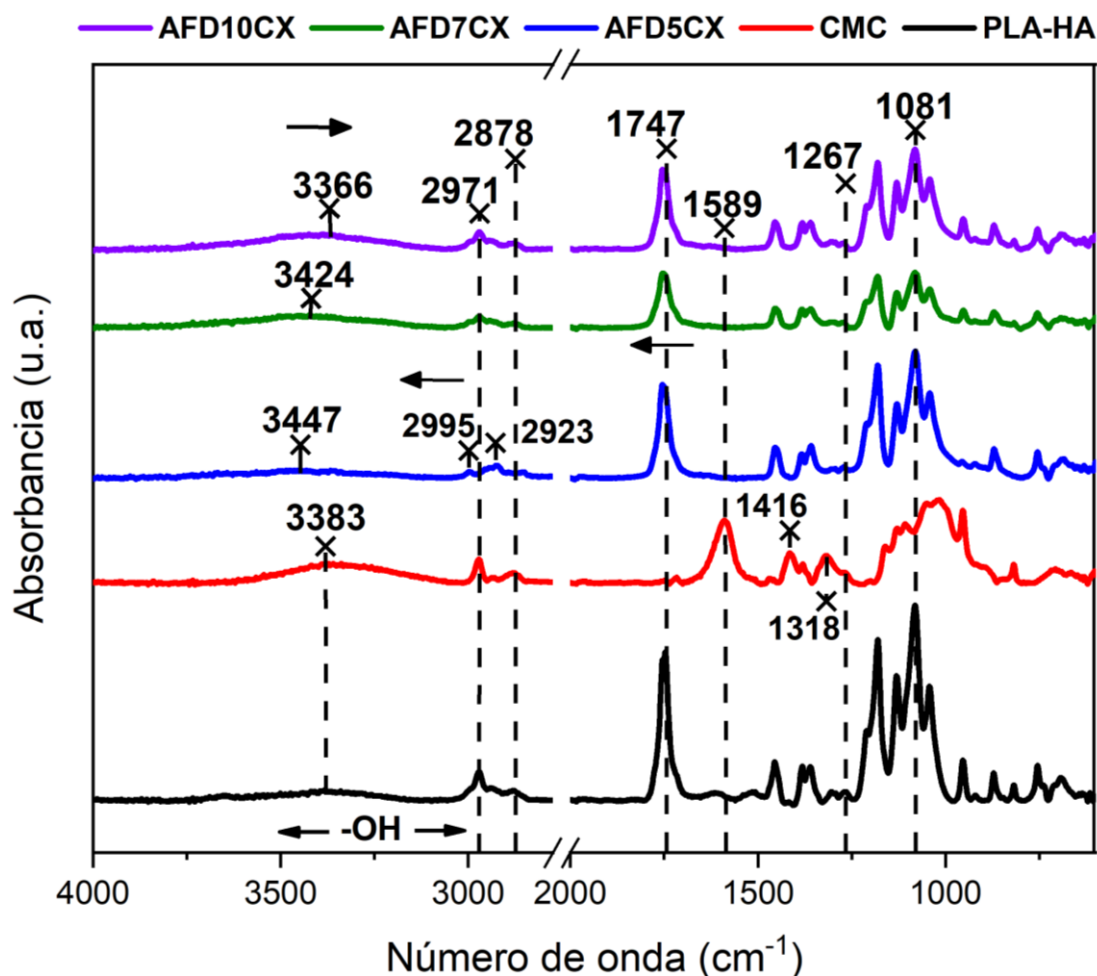


Figura 3.3. Espectro FTIT de las muestras AFD5CX, AFD7CX y AFD10CX, así como del CMC y PLA HA.

Al observar la banda a 1587 cm^{-1} , asociada al grupo $-\text{COO}^-$, es notable su completa desaparición en cada uno de los andamios. Generalmente, un desplazamiento o desaparición de las bandas, implica que existen interacciones primarias, en este caso,

sobre el propio CMC. De acuerdo con Su *et. al.* [189], la desaparición de dicha señal puede ser atribuida a la reacción de transesterificación durante el entrecruzamiento de los grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) del CMC; lo cual, a reserva de una confirmación posterior, indicaría que el proceso de entrecruzamiento se está llevando a cabo.

La hipótesis previa se refuerza con evidencias significativas. En primer lugar, se observa la desaparición de las bandas a 1318 y 1416 cm^{-1} , que corresponden a las vibraciones de flexión y estiramiento, de los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) y metileno ($-\text{CH}_2$), respectivamente [190]. Este cambio puede atribuirse a la formación de los enlaces covalentes en los extremos donde se encuentran los grupos carboxilato, afectando no solamente el espacio químico, sino también la disposición tridimensional de la molécula de CMC [191]. Como resultado, los grupos $-\text{OH}$ presentes en las hexosas de la celulosa y los grupos $-\text{CH}_2$ que se encuentran ramificados junto con los grupos carboxílicos, y no tienen suficiente espacio para llevar a cabo sus vibraciones habituales, generando así esta modificación.

Adicionalmente, se observan cambios en las bandas que se encuentran en el intervalo de 2900 a 3000 cm^{-1} , una región característica de los grupos metilo ($-\text{CH}_3$) y metilenos ($-\text{CH}_2-$) que están presentes tanto en la estructura molecular del PLA como en la del CMC, teniendo en cuenta su grado de sustitución [166,192]. Estas modificaciones en los espectros pueden interpretarse como una manifestación del cambio estructural mencionado previamente, el cual ocurre debido al espacio limitado en el que estas moléculas vibran durante el proceso de procesamiento de los andamios, en conjunto a la superposición de los grupos funcionales de los polímeros que están interactuando [193,194]. Finalmente, la existencia de las bandas a 1082 , 1267 y 1747 cm^{-1} en todos los andamios, y que corresponden a la vibración de grupos funcionales tipo éster [195,196], se presenta como evidencia adicional para confirmar la reacción de entrecruzamiento entre el CMC y el AC.

En lo que respecta a la HAp, el análisis por FTIR, a diferencia de lo reportado por Liu *et al.* [197], no parece ser la técnica más adecuada para confirmar su presencia en la estructura de los andamios. Esto se debe a que la mayoría de sus señales características, como las bandas a 1026 cm^{-1} , 1082 cm^{-1} , así como el intervalo de $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, que

corresponden a la vibración de los grupos PO_4^{3-} [198], $-\text{Si-O}-$ y $-\text{NH}_2$ [197], respectivamente, se superponen con las señales del PLA. Esta superposición plantea la necesidad de recurrir a otras técnicas para corroborar su presencia de manera concluyente.

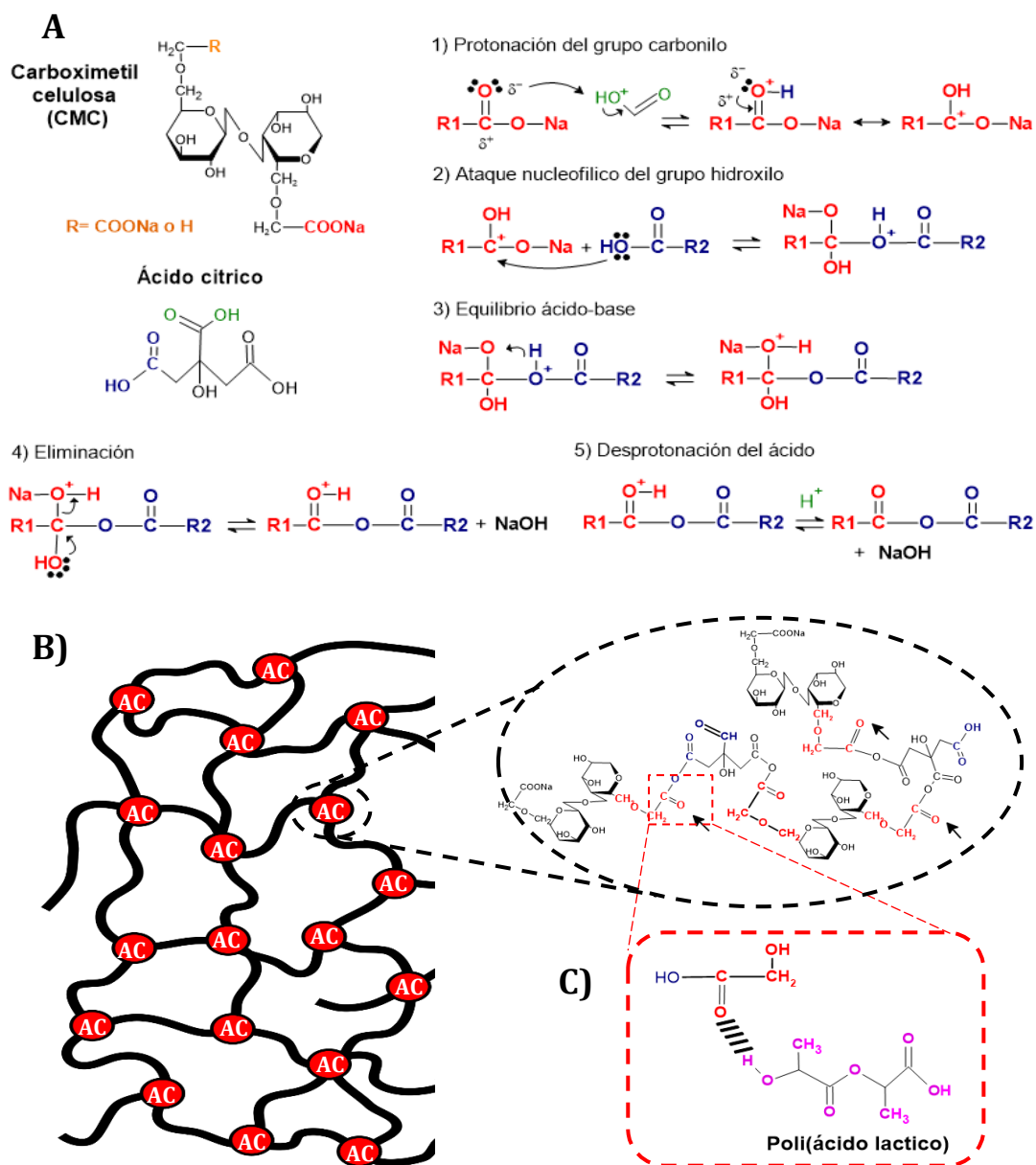


Figura 3.4. Esquema propuesto de **A)** la reacción de entrecruzamiento ente CMC-AC, **B)** con la capacidad de formar una red tridimensional e **C)** interactuar con el PLA.

Con base en los resultados anteriores, se presenta evidencia indirecta que apoya la hipótesis de una reacción de transesterificación entre los grupos -COO^- del CMC y los grupos -OH del AC, implicando que existe un intercambio de grupos alquilo (-CH) o acilo (C=O) entre un éster y un alcohol en presencia de un catalizador, generalmente un ácido o un base. Se piensa que, en esta reacción, el grupo acilo del CMC sufre un ataque electrofílico por acción de los radicales libres pertenecientes al -OH del carboxilo presente en el carbono cuaternario del AC [199], de esta manera se promueve un ambiente ácido que funciona como catalizador para reacción. La protonación facilita la ruptura del enlace éster y la formación de un carbocatión, que a su vez reacciona con el grupo hidroxilo del alcohol para formar el nuevo grupo éster (Figura 3.4A) [200].

De acuerdo con Wan Ishak *et. al.* [201], el ligero desplazamiento hacia números de onda menores en la banda a 1745 cm^{-1} está relacionado con interacciones tipo puentes de hidrógeno entre el PLA y la CMC mediante sus grupos carboxilo e hidroxilo terminales. A pesar de la inexistencia de un enlace primario entre el PLA y el CMC, el movimiento hacia número de onda menores de esta banda indica que ambos polímeros se encuentran interactuando mediante puentes de hidrógeno (Figura 3.4C). Estas condiciones son de gran ventaja, ya que los grupos funcionales en ambos polímeros se encuentran libres y con la capacidad de interactuar con algún otro compuesto, al mismo tiempo que poseen una estructura tridimensional (Figura 3.4B).

Gracias a la información que se puede obtener con ayuda de la técnica FTIR, no solo es posible detectar modificaciones químicas en los andamios, sino también llevar a cabo un seguimiento de éstas a lo largo del tiempo, como se ilustra en la Figura 3.5. En este caso, se monitoreó la evolución de la reacción de entrecruzamiento en el andamio AFD10CX en intervalos de 10 minutos, hasta alcanzar una exposición total de una hora a una temperatura de 100°C . La elección del andamio para este seguimiento se realizó con base en la mayor concentración de AEC utilizada.

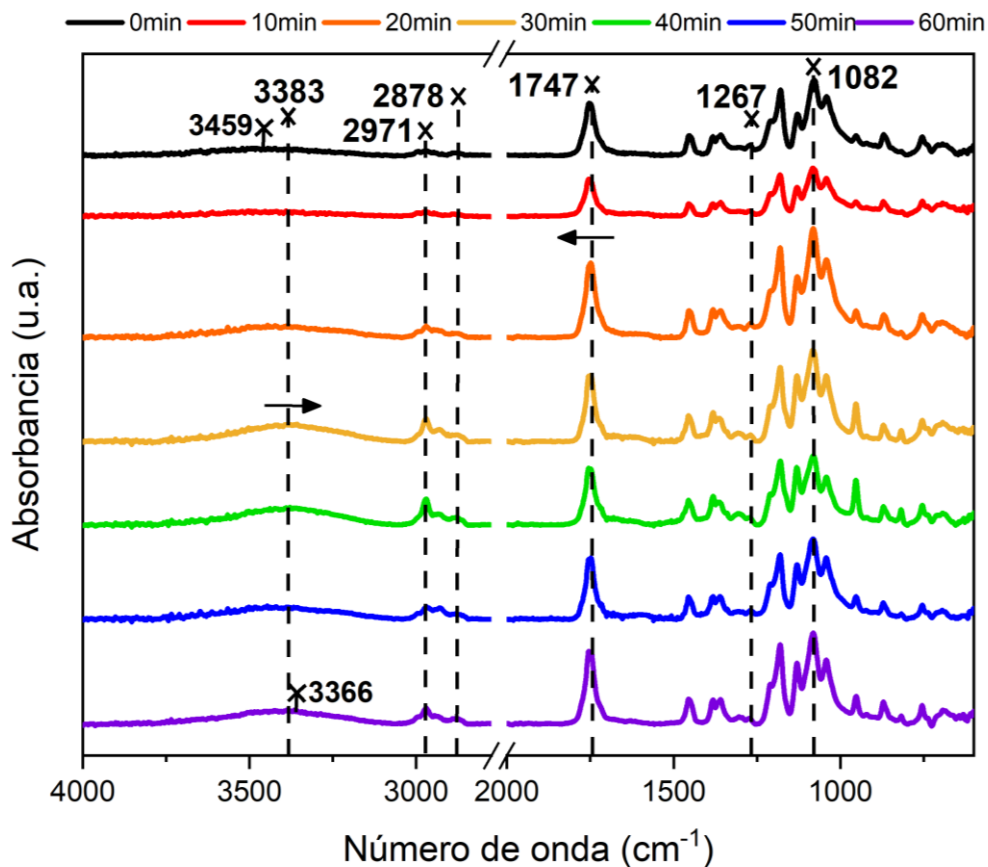


Figura 3.5. Seguimiento, a lo largo del tiempo, de la reacción de entrecruzamiento en el andamio AFD10CX.

Este seguimiento en el tiempo permite observar que, a medida que se acerca la hora de exposición, la banda característica de los grupos -OH comienza a ampliarse y desplazarse hacia números de más bajos. Esto no solo confirma la modificación en el ambiente químico que ocurre en los andamios debido a la concentración de AC, sino también el efecto de la temperatura en este proceso y como ésta, en conjunto con el AEQ, se encuentran relacionados de forma directa generando un cambio estructural en los andamios [200,201].

Esta presencia tan marcada de las bandas en el intervalo de 3000-3500 cm⁻¹, las cuales están asociados a las vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilo, revelan la capacidad hidrofílica del andamio [29,202].

Inicialmente, se observa la presencia de los grupos característicos de los polímeros precursores, independientemente del tiempo de exposición del andamio a la temperatura. No es hasta los 20 minutos de exposición, que se observa claramente un desplazamiento hacia números de onda mayores de la banda a 1747 cm^{-1} , al mismo tiempo que las bandas características asociadas a los grupos metilo y metilenos comienzan a tomar su forma típica.

Macroscópicamente las interacciones presentes entre ambos polímeros, así como la capacidad hidrofílica del CMC, se podrían interpretar como la formación de la película transparente que sobresalía del andamio AFD5CX y recubría a AFD7CX y AFD10CX, ya que, al no estar unido químicamente, el CMC comenzaría a hincharse al contacto con agua, dotando de este recubrimiento al PLA.

3.2.3 Caracterización morfológica

Los tres andamios obtenidos mediante la técnica FDPL se analizaron mediante microscopia óptica, microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva (EDX, por sus siglas en inglés) acoplada al SEM. El objetivo fue determinar el tamaño aproximado de las porosidades y dilucidar cómo el agua interactúa con ellas, así como la naturaleza de la superficie y los elementos presentes en cada muestra.

Mediante microscopia óptica, se observó una diferencia entre la morfología del PLA cargado con HAp (Figura 3.6A) y las muestras expuestas al AEQ. Estas últimas muestran una mayor cantidad de porosidades y una superficie rugosa, completamente diferente a la superficie lisa que presenta el PLA HA (Figura 3.6B-D). En particular, al realizar una ampliación en la zona donde se observan las porosidades en las muestras con una exposición directa al agua desionizada por 1 hora (Figuras 3.6B-D), se destaca la presencia de pequeñas gotas de tamaño micrométrico que se adhieren a la circunferencia de dichas porosidades.

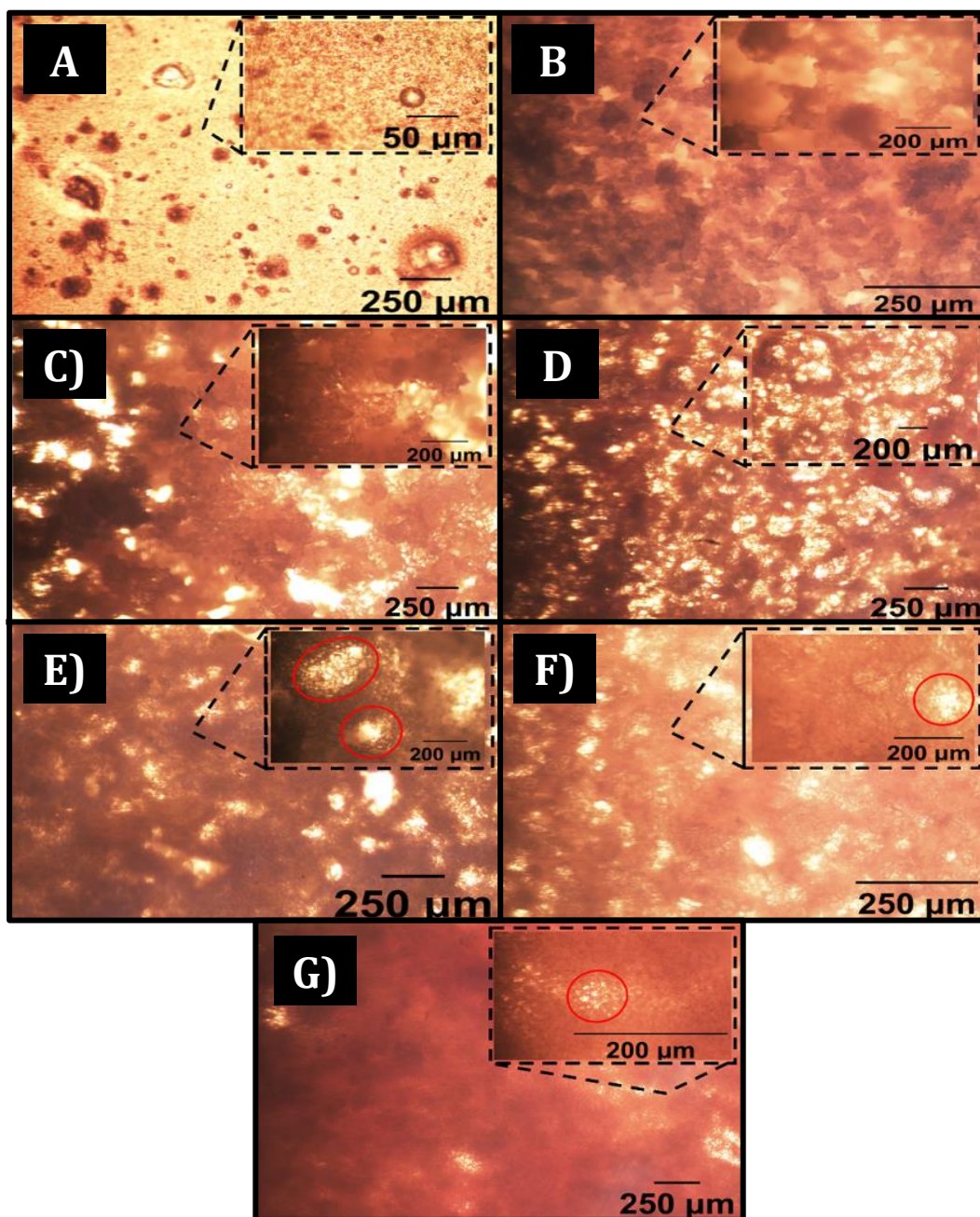


Figura 3.6. Imágenes ópticas de los andamios secos y húmedos obtenidos por FDPL. **A)** PLA HA; **B)** AFD5CX seco; **C)** AFD7CX seco; **D)** AFD10CX seco; **E)** AFD5CX húmedo; **F)** AFD7CX húmedo y **G)** AFD10CX húmedo.

Es importante mencionar que el agua presente en los hidrogeles se puede clasificar en tres categorías: agua enlazada a la cadena polimérica, agua libre y agua semi enlazada. Dadas las observaciones anteriores, se sugiere la hipótesis que, cuando los andamios

secos son introducidos en agua, las primeras moléculas de agua penetran en su estructura y se unen a los grupos hidrofílicos (-OH) de la cadena polimérica. A medida que todos los grupos -OH se hidratan, la cadena polimérica se hincha y expone los grupos metilo (-CH₃), considerados hidrofóbicos, lo que da lugar a moléculas de agua semi enlazadas de manera hidrofóbica [202]. Después de que los sitios hidrofílicos e hidrofóbicos del andamio interactúan con moléculas de agua, la red absorbe agua adicional debido a las fuerzas osmóticas de la cadena polimérica principal. Este hinchamiento adicional es resistido por el entrecruzamiento físico y químico del hidrogel, resultando en las propiedades elásticas de éste [164]. El agua adicional que es absorbida por el hidrogel es llamada agua libre y llena los espacios disponibles entre las cadenas poliméricas [203], siendo ésta la que se observa acoplada alrededor de las porosidades en los andamios.

Este comportamiento hidrofílico en su mayoría es atribuido a la presencia del CMC en los andamios [204]. Al observar la Figura 3.6G, se plantea que los andamios, al momento de interactuar bajo un ambiente húmedo, llevan a cabo un proceso de anclaje o retención de agua en los poros distribuidos a lo largo de toda su superficie. Sin embargo, esta gran cantidad de agua almacenada en forma de gotas, genera un colapso en su estructura debido al gran tamaño y cercanía entre ellas [205], lo que se observa como una disminución en la cantidad de porosidades a medida que el grado de entrecruzamiento aumenta. Las observaciones previas, en conjunto con las bandas detectadas por FTIR, corroboran que los andamios presentan una respuesta hidrofílica al encontrarse en ambientes acuosos.

Al examinar la superficie de los andamios mediante microscopia electrónica de barrido, se aprecia un cambio notorio en su morfología. Este hallazgo, respaldado por las observaciones previas mediante microscopía óptica, confirma de manera concluyente que los andamios son materiales completamente distintos en comparación con nuestro control, y lo que es aún más destacable, difirieren entre sí (Figura 3.7A-D). La marcada variación en la morfología de los constructos depende en gran medida de la metodología utilizada en su procesamiento, específicamente, si la interacción durante la evaporación del solvente se llevó a cabo en contacto con el aire o con la superficie lisa

del vidrio. Esta diferencia en el proceso confiere dos morfologías distintas a los constructos, como se aprecia en las Figuras 3.7B y D.

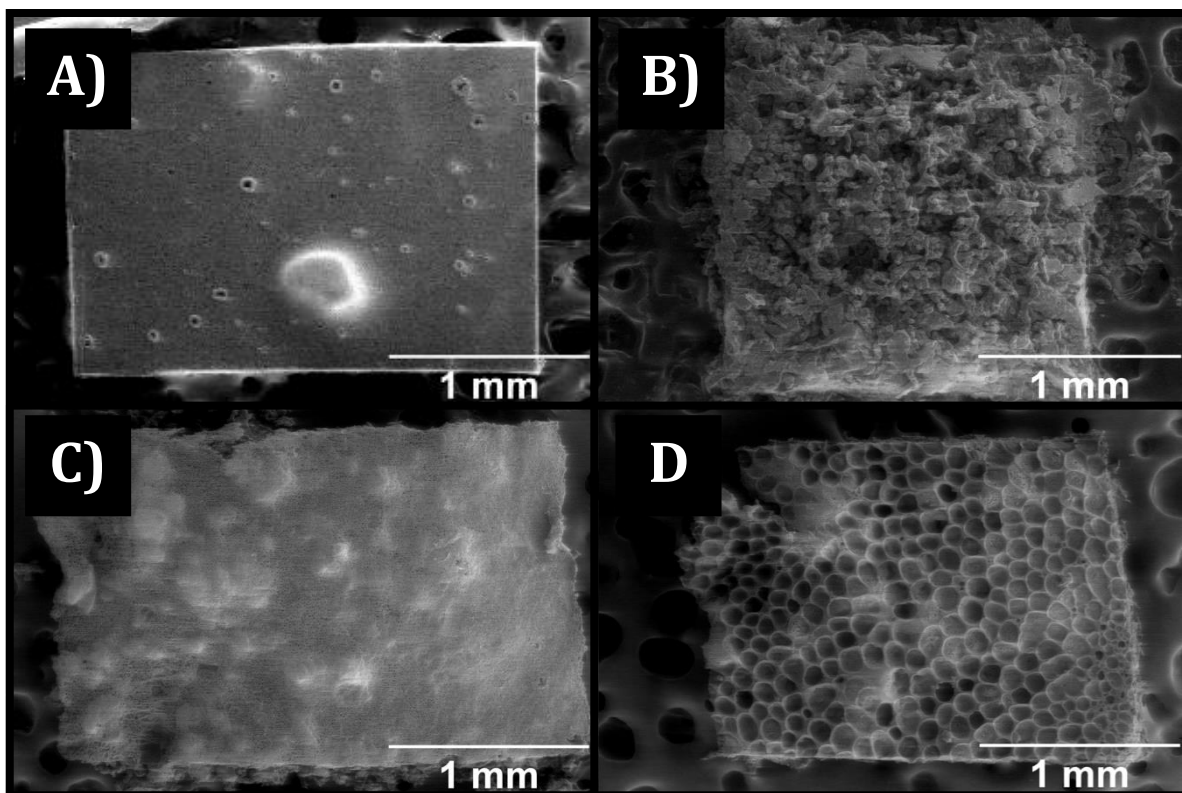


Figura 3.7. Imágenes SEM de los andamios obtenidos a una magnificación de 70x. **A)** PLA HA; **B)** AFD5CX; **C)** AFD7CX; **D)** AFD10CX.

Ampliar el área de interés de análisis nos brinda la capacidad de realizar observaciones más detalladas de la superficie de los andamios. Esto nos permite distinguir con mayor precisión tanto la cantidad como el tamaño de los poros presentes en el área de la superficie seleccionada, además de obtener una idea más clara sobre las características morfológicas presentes en éstos (Figura 3.8A-D). El material control, que corresponde al PLA HA (Figura 3.8A), presenta poros con un tamaño promedio de $4.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$, mientras que el andamio AFD10CX muestra poros de $97.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$. Esta observación sugiere que a medida que aumenta la cantidad de AC los poros más pequeños tienden a fusionarse, formando poros más grandes (Figura 3.8C-D), mostrando un comportamiento similar al observado mediante microscopía óptica. Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas por Mikheeva *et. al.* [206], al corroborar

que la concentración de AC tiene un efecto directo en la cantidad y el tamaño de los poros presentes en los andamios.

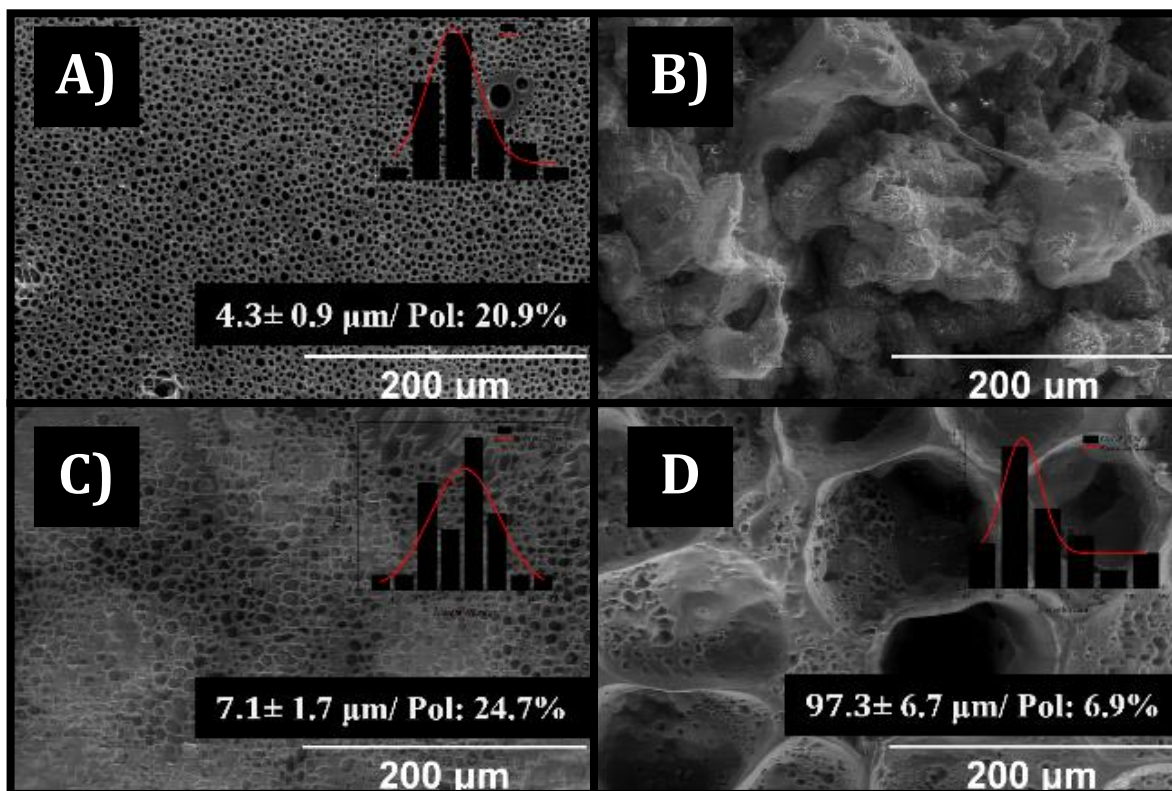


Figura 3.8. Imágenes SEM de los andamios obtenidos a una magnificación de 500x. **A)** PLA-HA; **B)** AFD5CX; **C)** AFD7CX; **D)** AFD10CX.

De acuerdo con la información proporcionada por Han *et. al.* [207], los andamios con un tamaño de poro en el intervalo de 90-250 μm promueven un entorno propicio para la adhesión y proliferación de células por lo que, basándonos en esta información, la muestra con una concentración de 10%(p/p) de AC se propone como la predilecta para promover dicho ámbito.

Mediante aumentos en la magnificación, es posible adentrarse aún más en la estructura y examinar con mayor detalle la superficie de los andamios. En la Figura 3.9B-D, se pueden apreciar agregados adheridos a las fibras de los andamios poliméricos. La presencia de estos agregados parece ser independiente de la sección a analizar los andamios, lo que sugiere que estos agregados podrían estar dispersos a lo largo de toda la estructura. En comparación con la muestra control, donde no se observan agregados,

se pueden apreciar ciertas fracturas en la superficie a causa de la interacción del haz de electrones con la capa de recubrimiento de oro. El PLA, al ser un material no conductor, comienza a deformarse debido a la intensidad energética del haz de electrones [208]. Esto provoca que la capa del metal conductor comience a fracturarse, ya que no posee las mismas propiedades mecánicas que el polímero.

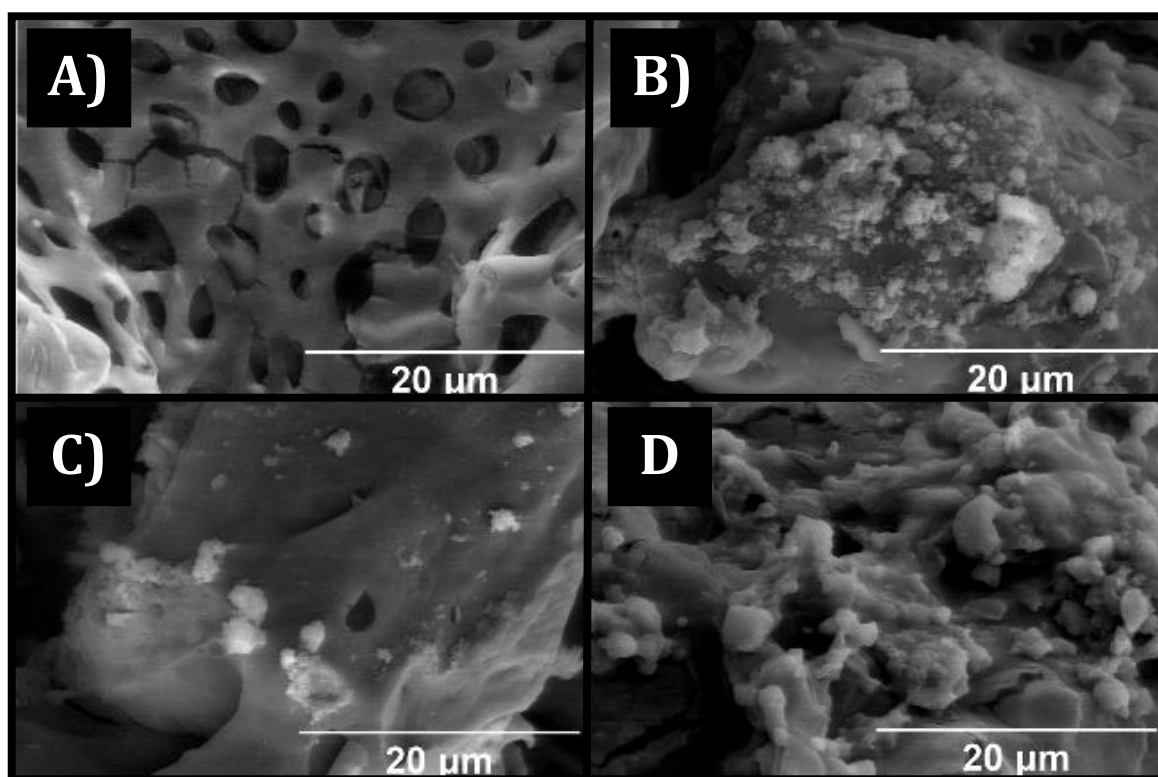


Figura 3.9. Imágenes SEM de los andamios obtenidos a una magnificación de 5,000x. **A)** PLA HA; **B)** AFD5CX; **C)** AFD7CX; **D)** AFD10CX.

Para el caso del andamio AFD10CX, los agregados parecen haber experimentado un proceso de modificación en su morfología, ya que, en comparación con las otras muestras, presentan una morfología tipo placa, más definida. Esto podría indicar que el ácido cítrico (AC) no solamente interactúa con la cadena polimérica de la CMC, cambiando su morfología sino que también podría influir en los aditivos bioactivos agregados a los andamios [209].

Mediante una exploración más detallada de estos agregados (Figura 3.10A-C), se observa su presencia a lo largo de la superficie y en el interior de cada uno de los andamios. En

este caso, los agregados presentan una morfología tipo placa, que, de acuerdo con Zuhán *et. al.* [210], presentan similitud con una muestra de hidroxiapatita (HAp), la cual presenta propiedades de alta selectividad biológica sobre las proteínas al mismo tiempo que favorece la adhesión celular gracias a su gran área superficial [211]. Aunado al hecho que este tipo de HAp posee características similares, morfológicamente, a las que se encuentran en la estructura ósea nativa [212].

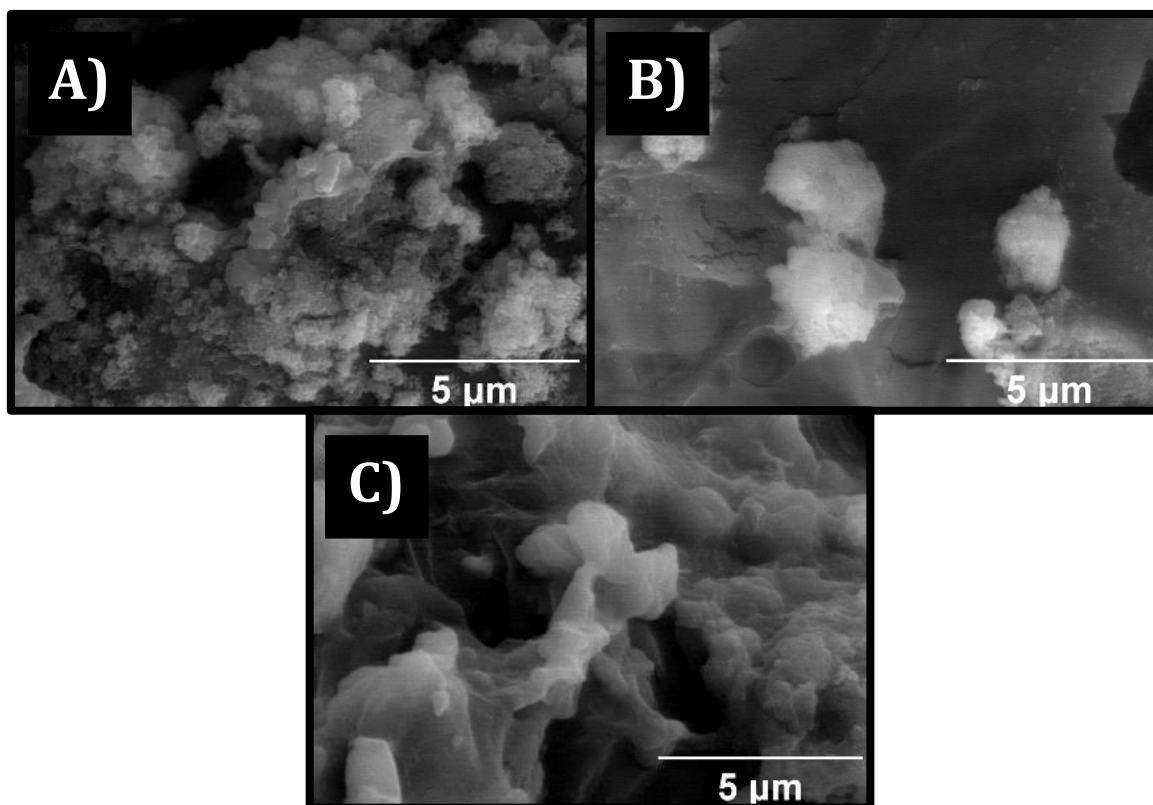


Figura 3.10. Imágenes SEM de los andamios obtenidos a una magnificación de 15,000x.

A) AFD5CX; **B)** AFD7CX; **C)** AFD10CX.

Mediante un análisis EDX (Figura 3.11) se obtuvo información semicuantitativa sobre los elementos que conforman a los agregados, de manera que se pueda dilucidar cuál es su posible origen y naturaleza.

Los resultados revelaron la presencia de Calcio y Fósforo en la superficie de los tres andamios (Figura 3.11), componentes esenciales de la estructura química de la HAp [213]. Sin embargo, para confirmar de forma precisa la naturaleza de estos agregados, se requiere un análisis por difracción de rayos-X.

Al mismo tiempo, se observó la presencia de sodio, el cual está presente en la estructura química del CMC [214]. Estos resultados, junto con las observaciones realizadas mediante microscopía óptica, confirman la existencia de un polímero en la estructura de los andamios, específicamente la presencia de carboximetilcelulosa (CMC) [215]. En consecuencia, el uso de ácido cítrico (AC) como agente entrecruzante demuestra la capacidad de crear andamios tridimensionales compuestos a partir de materiales poliméricos naturales y sintéticos, los cuales exhiben propiedades hidrofílicas [216].

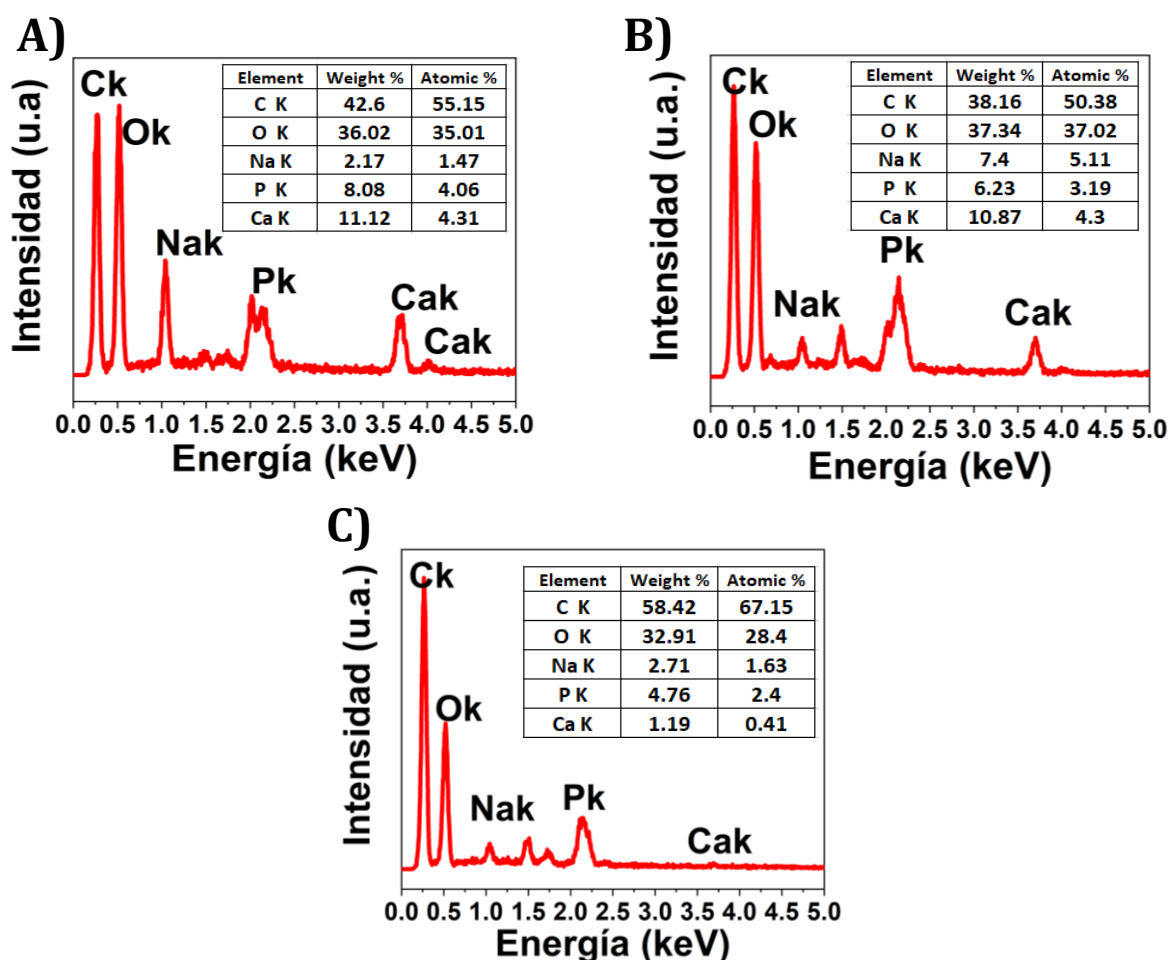


Figura 3.11. Análisis EDX de los andamios **A)**AFD5CX, **B)**AFD7CX y **C)**AFD10CX.

3.2.4 Caracterización mecánica

La evaluación mecánica de las muestras se llevó a cabo con el objetivo de determinar las capacidades mecánicas de cada uno de los andamios FDLP. Las curvas de esfuerzo-deformación de los andamios se muestran en la Figura 3.12.

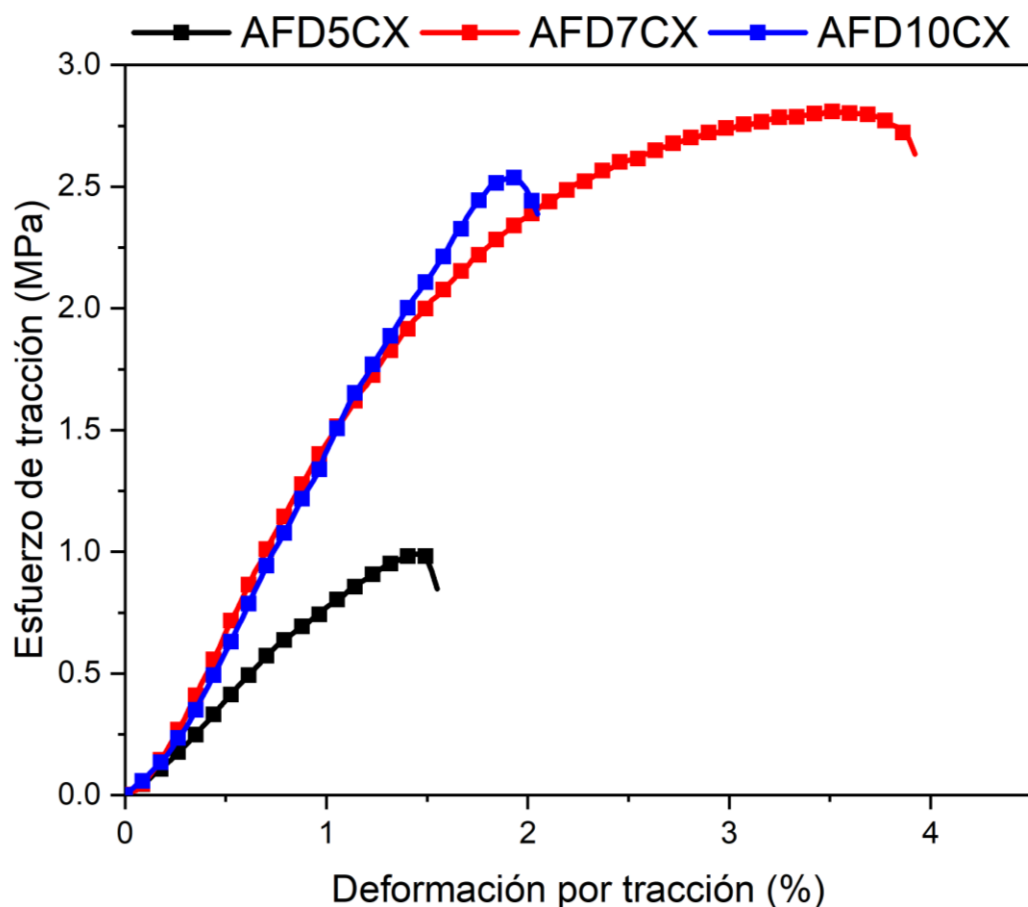


Figura 3.12. Comportamiento esfuerzo-deformación de las diferentes muestras bajo cada uno de los tratamientos.

Para el caso del andamio AFD5CX, los datos sugieren una interacción significativamente menor entre el PLA y la CMC en comparación con los otros dos tratamientos. Esto se refleja en valores más bajos, tanto para el módulo elástico como para la elongación a la ruptura. El comportamiento mecánico del andamio AFD5CX, se atribuye principalmente a la baja concentración de AC utilizada durante el proceso de entrecruzamiento, lo que a su vez limita la capacidad elástica de fibras poliméricas lo que le permite disipar una mayor cantidad de energía [217].

Los resultados sugieren que el efecto del AEQ no se limita a alterar la morfología y el tamaño de los poros en la superficie de los andamios, sino que también afecta sus propiedades mecánicas [218]. Esto se ejemplifica al comparar el andamio AFD5CX con el AFD7CX. Un aumento del solo 2% (p/p) en la concentración de AC conduce a un

incremento del 36% en el módulo elástico y mayor elongación a la ruptura, lo que resulta en un material con un mejor comportamiento mecánico y con mayor capacidad de disipación de energía antes de la ruptura.

Estos efectos pueden atribuirse a la estabilidad lograda en la estructura tridimensional mediante las interacciones primarias y secundarias presentes entre el CMC, el AC y el PLA [219].

Sin embargo, este efecto positivo en la estructura tiene sus límites. Al examinar el desempeño del andamio AFD10CX, se observa una ligera reducción de su capacidad elástica y la reducción al 50 % del valor de elongación máxima antes de la rotura (Tabla 3.2), indicando que el material comienza a volverse más rígido a medida que aumenta la concentración de AC, lo cual se atribuye a una mayor densidad de entrecruzamiento. Además, la presencia de porosidades con mayor diámetro parece tener un efecto negativo, ya que promueven discontinuidades en la superficie del andamio, lo que dificulta la capacidad de recuperación de la matriz polimérica ante los esfuerzos.

Tabla 3.2. *Parámetros mecánicos de cada andamio.*

Muestra	Módulo de Young (MPa)	Elongación a la ruptura (%)	Esfuerzo máximo de tracción (MPa)
<i>AFD5CX</i>	121.0 ± 36.1	1.5 ± 0.1	1.0 ± 0.05
<i>AFD7CX</i>	165.1 ± 49.2	3.9 ± 0.2	2.8 ± 0.2
<i>AFD10CX</i>	153.2 ± 55.2	2.0 ± 0.4	2.5 ± 0.03

Por lo tanto, a medida que aumenta el porcentaje de AEQ, los andamios se vuelven más resistentes y, al mismo tiempo, muestran una mayor elongación antes de la ruptura debido a la influencia del ácido cítrico que genera entrecruzamientos, modificando su desempeño mecánico. Aunque esta mejoría parece limitarse a concentraciones hasta del 10% (p/p), ya que, después de dicha concentración, los andamios muestran una disminución en todos sus parámetros mecánicos, lo cual se atribuye a mayor densidad

de entrecruzamiento. Estos hallazgos son coherentes con las investigaciones previas realizadas por Khairunnisa-Atiqah *et. al.* y Ghorpade *et. al.* [196,220], donde se establece que el porcentaje de agente de entrecruzamiento químico (AEQ) en los andamios tiene un impacto significativo en su comportamiento mecánico.

3.2.5 Caracterización de la humectabilidad

La capacidad de retención de agua suele utilizarse para evaluar la capacidad de los andamios para mantener su estructura en presencia de cambios dimensionales cuando se ven expuestos a un ambiente acuoso.

El andamio con 5% (p/p) de ácido cítrico (AC) muestra una excelente capacidad de retención de agua durante la primera hora de inmersión, alcanzando aproximadamente 400% en la capacidad de hinchamiento (Figura 3.13A). Lamentablemente, con el paso del tiempo, el andamio comienza a perder una cantidad considerable de masa. De acuerdo con la investigación realizada por El-Lakany *et. al.* [221], es partir una concentración del 7% (p/p) de AEQ que los andamios presentan una mejor estabilidad mecánica, evitando así su disolución en el medio.

Debido a la baja concentración de AEQ presente en el andamio AFD5CX, las cadenas poliméricas, al entrar en contacto con el agua, comienzan a separarse cada vez más, hasta el punto en que el material comienza a disolverse e inicia un proceso de degradación hidrolítica [222]. Esto se evidencia con mayor claridad en la imágenes macroscópicas de los andamios en los que después de 1 hora en contacto con el agua desionizada (Figura 3.2). Dado que la concentración de AEQ es menor, la carboximetilcelulosa (CMC) no entrecruzada comienza a hidratarse y a escapar de la estructura en forma del recubrimiento transparente que aparece en el andamio AFD5CX al poco tiempo de interactuar con el agua (Figura 3.13B).

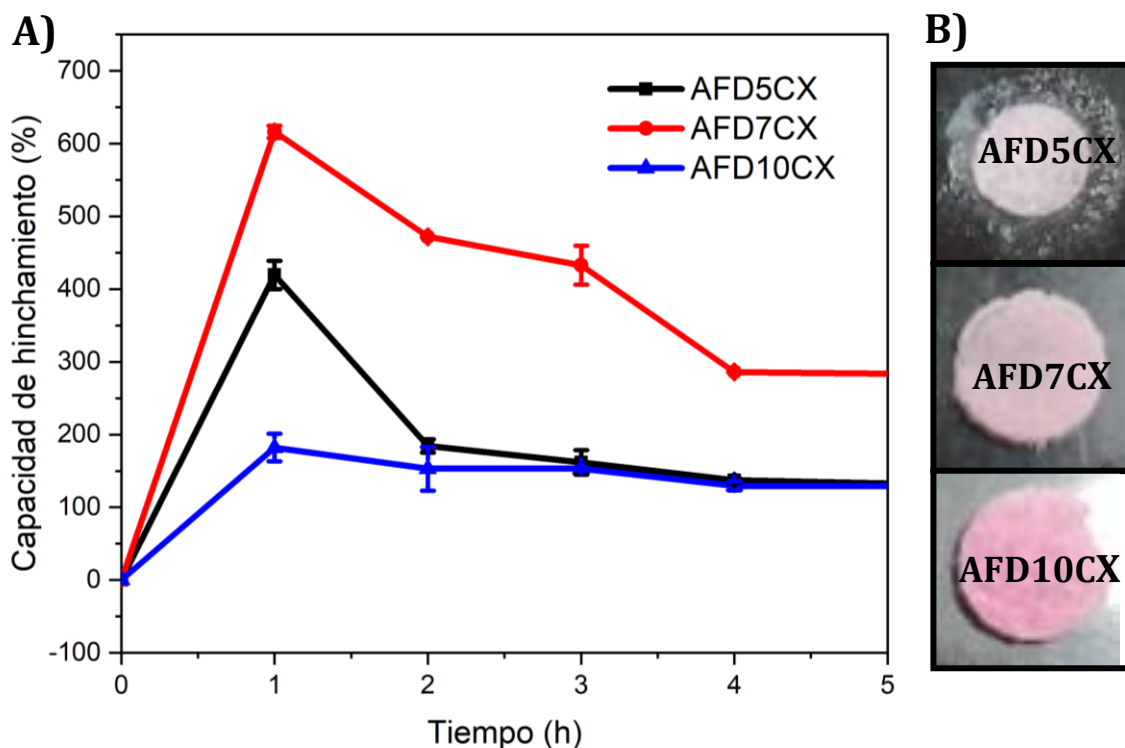


Figura 3.13. A) Efecto del tiempo de entrecruzamiento en la capacidad de absorción de agua en los andamios PLA-CMC durante las primeras 5 horas; **B)** Representación macroscópica del hinchamiento durante la primera hora.

En contraste, el andamio que tiene mayor concentración de AEQ [10% (p/p)] muestra un comportamiento diferente. Aunque su capacidad de hinchamiento disminuye hasta el 190%, el andamio AFD10CX exhibe la mejor estabilidad a lo largo de tres semanas, manteniendo un promedio en la capacidad de retención de agua del 100% (Figura 3.14A). No es hasta después de 500 horas que comienza a observarse un proceso de degradación en este andamio, al ir perdiendo masa por el efecto descrito anteriormente.

Para el andamio con AFD7CX, al observar la Figura 3.13A, pareciera ser el material predilecto durante las primeras 5 horas, debido a que muestra el mayor grado de hinchamiento entre los tres andamios, en conjunto con una relativa estabilidad de su estructura. Sin embargo, después de 56 horas, este material comienza a perder una gran

parte de su masa, al igual que el andamio AFD5CX, para finalmente iniciar el proceso de degradación hidrolítica a partir de las 350 horas (Figura 3.14).

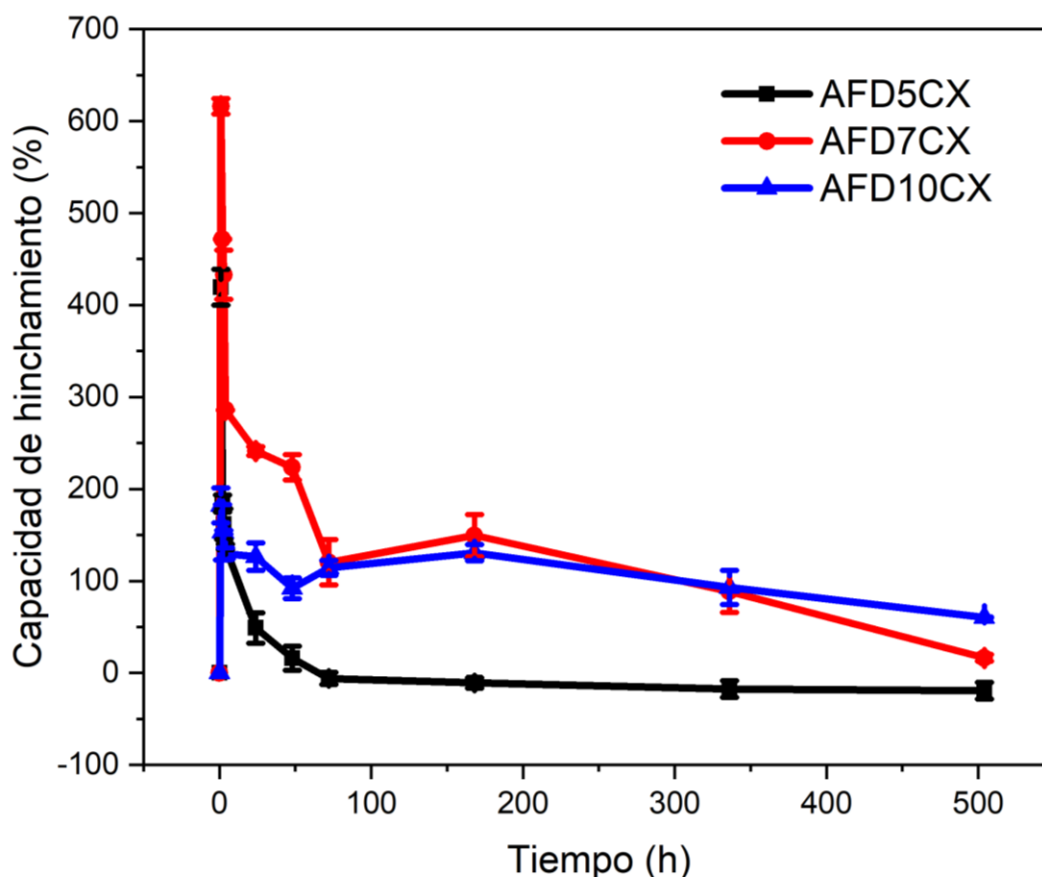


Figura 3.14. Efecto del tiempo de entrecruzamiento en la capacidad de hinchamiento en los andamios PLA-CMC durante 3 semanas.

De acuerdo con estos resultados, se puede inferir que el comportamiento en la retención de agua está estrechamente relacionado con la concentración de AEQ utilizado, ya que éste influye fuertemente en la superficie y estructura del material, lo que modifica la distribución y disponibilidad de grupos -OH, repercutiendo directamente en las propiedades hidrofílicas de los andamios [223,224]

La capacidad de retención de agua en los biomateriales, sin comprometer la estabilidad mecánica y con un tamaño de poro promedio de entre 90-200 μm , de acuerdo con la literatura, proporciona una adecuada transferencia de oxígeno y nutrientes, creando un microambiente propicio para la proliferación celular en el andamio [225]. Por esta

razón, el andamio AFD10CX se presenta como el andamio predilecto debido a las características que ha presentado hasta el momento.

La evaluación del carácter hidrofílico que presentan los andamios se realizó a través de la medición del ángulo de contacto (Figura 3.15). Los resultados revelaron un aumento en la hidrofiliidad de los andamios de PLA y CMC debido a la capacidad del CMC para crear un entorno húmedo gracias a la presencia de sus grupos hidroxilo (-OH) [30].

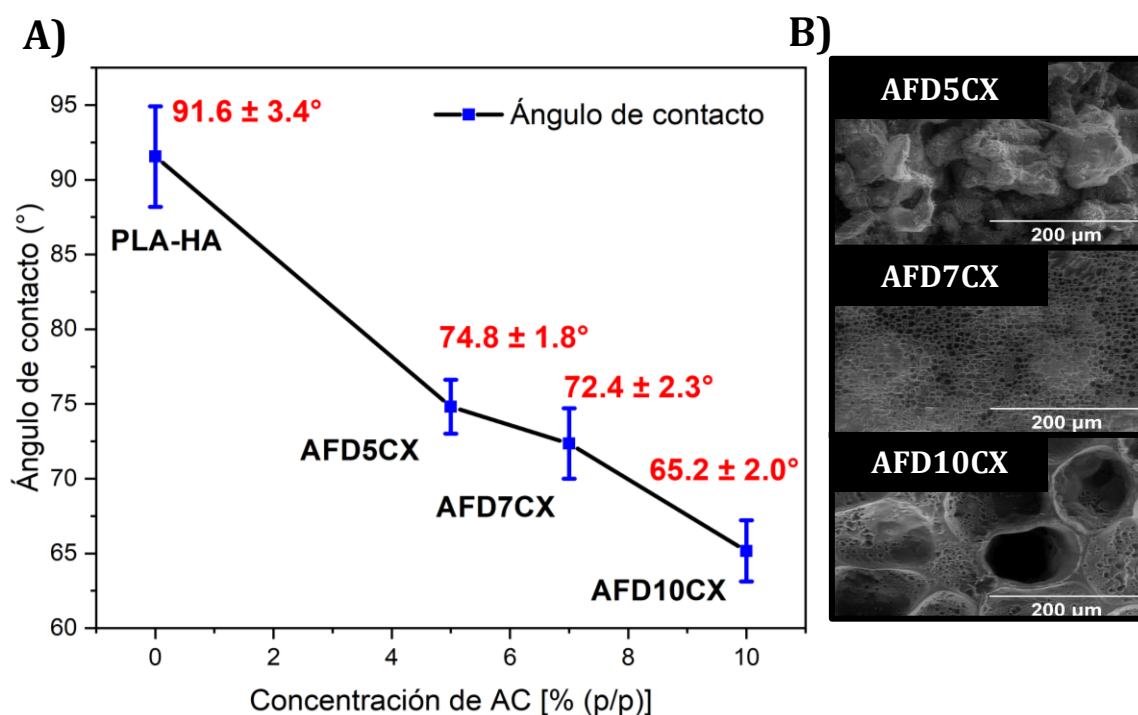


Figura 3.15. A) Tendencia que presenta el ángulo de contacto contra la concentración de AC agregado en los andamios. **B)** Tamaño de poro observado en los andamios bajo tres diferentes concentraciones de AC.

A diferencia de lo reportado por Castillejos *et. al.* [192], los resultados muestran que no es necesario realizar modificaciones químicas o copolimerizaciones extras, con uno o más polímeros, para lograr que un material sintético presente propiedades hidrofílicas. Simplemente, el hecho de combinar un polímero con propiedades hidrofílicas con un polímero hidrofóbico, en relación 1:1, se le confiere un carácter higroscópico al material compuesto. Además, esta aproximación resulta ser más sencilla y económica, ya que no requiere equipos sofisticados ni altas temperaturas de curado. Al mismo tiempo que

ofrece la posibilidad de incorporar aditivos, como la HAp, que le otorgarían propiedades bioactivas.

Al igual que con las propiedades mecánicas, según los resultados de este análisis, el AC desempeña un papel significativo en el control de las propiedades de humectabilidad. En la Figura 3.15, se puede observar una tendencia en los andamios con tamaños de poros más grandes: reducen su ángulo de contacto a medida que aumente el diámetro del poro. En particular, el andamio AFD10CX, con un diámetro de poro más grande con respecto a los otros dos andamios (Figura 3.8), promueve una mayor capacidad de permeabilidad y absorción del agua en su superficie en comparación con el andamio AFD7CX, que tiene con un tamaño de poro más reducido ($7.1 \pm 1.7 \mu\text{m}$). Esto se refleja en ángulo de contacto que disminuye de $72.4 \pm 2.3^\circ$ a $65.2 \pm 2.0^\circ$, respectivamente. Sin embargo, esta variación en el ángulo de contacto puede verse influenciada por factores adicionales que se tomaron en cuenta, como la porosidad heterogénea y la rugosidad intrínseca del material, lo que contribuye al error en las mediciones ya que se genera una interfaz aire-agua [226].

En definitiva, la cantidad del AEQ tiene un impacto directo en propiedades esenciales para los biomateriales, como su desempeño mecánico, capacidad de hinchamiento, carácter hidrofílico, así como el diámetro y cantidad de porosidades.

3.2.6 Caracterización térmica

La Figura 3.16 muestra los termogramas correspondientes a los materiales precursores (PLA HA y CMC) y del andamio entrecruzado con una concentración de 10% (p/p) de AC. A pesar de que el andamio PCH7CX muestra mejores características mecánicas; sus capacidades de retención de agua, ángulo de contacto y diámetro de los poros, resultan inferiores a las que exhibe el andamio PCH10CX. Las características mencionadas anteriormente fueron determinantes en la elección del andamio para evaluar su desempeño térmico.

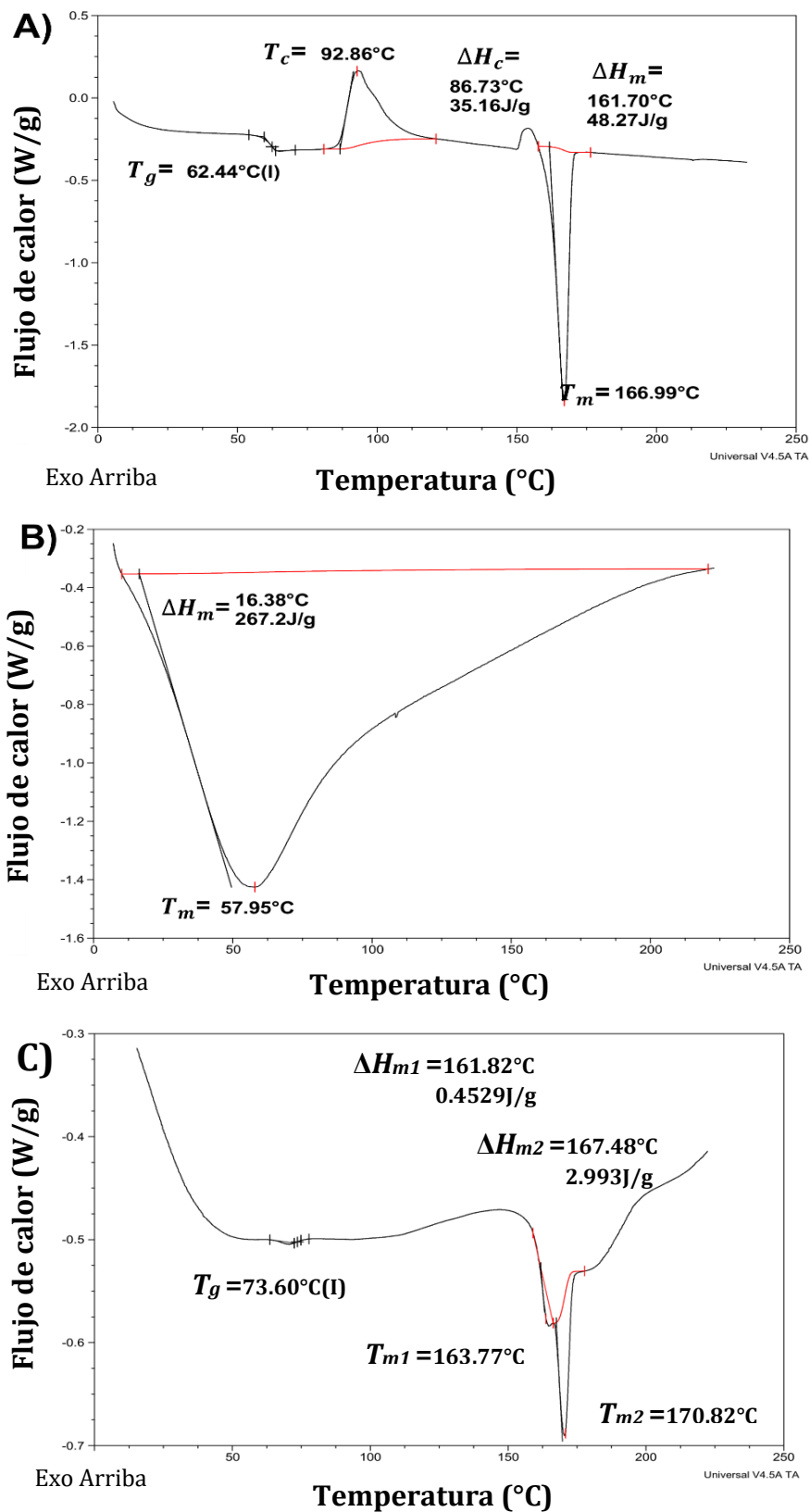


Figura 3.16. Termogramas DSC de **A)**PLA-HA, **B)** CMC y **C)** ADF10CX.

A primera vista, se observa una variación de aproximadamente 11°C en la temperatura de transición vítrea (T_g) de la muestra AFD10CX en comparación con la muestra PLA HA (Figura 3.16A y C). Esta alteración en la T_g , que va de 62.44°C a los 73.60°C, se descarta como una mera fluctuación debido a la desviación estándar inherente al quipo utilizado para el análisis DSC. En realidad, dicho aumento en la T_g se correlaciona directamente con el incremento en la concentración de AC durante el proceso de entrecruzamiento, lo que reduce la movilidad de las cadenas poliméricas y, por lo tanto, aumenta la T_g , lo cual coincide con lo informado previamente Wilpiszewska *et. al.* y Priya *et. al.* en sus investigaciones [227,228].

Es importante considerar que, durante el proceso de entrecruzamiento, la red tridimensional formada por la CMC, a partir de la reacción con el AC (Figura 3.4), podría generar una pérdida en la regularidad de las cadenas poliméricas del PLA y, como consecuencia provocar la desaparición de la curva correspondiente a la temperatura de cristalización en la Figura 3.16C [229]. Esta pérdida de la regularidad y la posible separación de las cadenas del PLA, en conjunto con la velocidad de evaporación del solvente en los andamios procesados por FDLP, genera el desplazamiento de la curva de fusión del PLA [228].

En termodinámica, la entalpía de fusión (ΔH_m), también conocida como calor latente de fusión, se refiere a la cantidad de energía necesaria para que una sustancia pase de su estado sólido a líquido [230]. Un cambio en esta magnitud puede reflejar cambios en la morfología de la estructura o la presencia de interacciones en ésta [231]. Al centrarnos en el valor de ΔH_m del andamio ADF10CX (Figura. 3.16A), se observa no sólo la presencia de dos entalpías de fusión, sino además su reducción con respecto al material base, pasando de 46.27 J/g a 2.993 J/g y 0.45 J/g. Ya que las temperaturas de fusión son prácticamente las mismas (166.99°C para el PLA y 170.82°C para el PCH10CX), este cambio en ΔH_m se atribuye totalmente a una alteración conformacional en la estructura del PLA [232], incentivada por la presencia de la estructura 3D formada por la CMC entrecruzada [233].

Estos resultados, en conjunto con los datos obtenidos mediante FTIR (Figura 3.3), confirman que el entrecruzamiento, mediante una reacción de transesterificación, ocurre únicamente entre el CMC y el AC. Además, esta estructura 3D y la existencia de interacciones secundarias, como la única forma de interacción posible, entre el CMC y el PLA [234,235] propicia la aparición de la segunda curva de fusión atribuida a una segunda especie cristalina en el PLA. Sin embargo, dado que las interacciones secundarias tienen un impacto limitado en la T_g [236], resulta necesario realizar un análisis más puntual, como H-NMR, para identificar la naturaleza precisa de las interacciones presentes entre los materiales precursores y el AEQ al momento de la evaporación del solvente.

3.2.7 Caracterización biológica

La citotoxicidad, en términos de actividad metabólica, se evaluó durante un periodo 24 horas en células madre mesenquimales (CMM), de la línea celular 500-010. Este análisis se llevó a cabo mediante un ensayo basado en la fluorescencia de sales MTT/formazan, cuyo principio se esquematiza en la Figura 3.17A. Esta técnica se basa en la reducción de una sal interna de MTT por la acción de la enzima mitocondrial deshidrogenasa presente en las células vivas, produciendo formazan (un compuesto coloreado). La cantidad de formazan generada se mide con un espectrofotómetro, donde su absorbancia está directamente relacionada con el número de células vivas en el cultivo.

Para validar el protocolo experimental y los resultados obtenidos, se incluyó un control positivo que consistió en el material precursor PLA-HA, expuesto a la misma línea celular junto con DMEM. Este control mostró una notable reducción en la señal de fluorescencia al compararlo con el andamio AFD10CX, indicando un aumento en la actividad metabólica de las células al interactuar sobre este andamio en particular (Figura 3.17B). Al mismo tiempo, se observa que las fibras poliméricas de PLA cargadas con HAp no indujeron un efecto tóxico en las células sembradas sobre éste. Estos resultados son consistentes con la ampliamente documentada biocompatibilidad del PLA y la HAp [237,238].

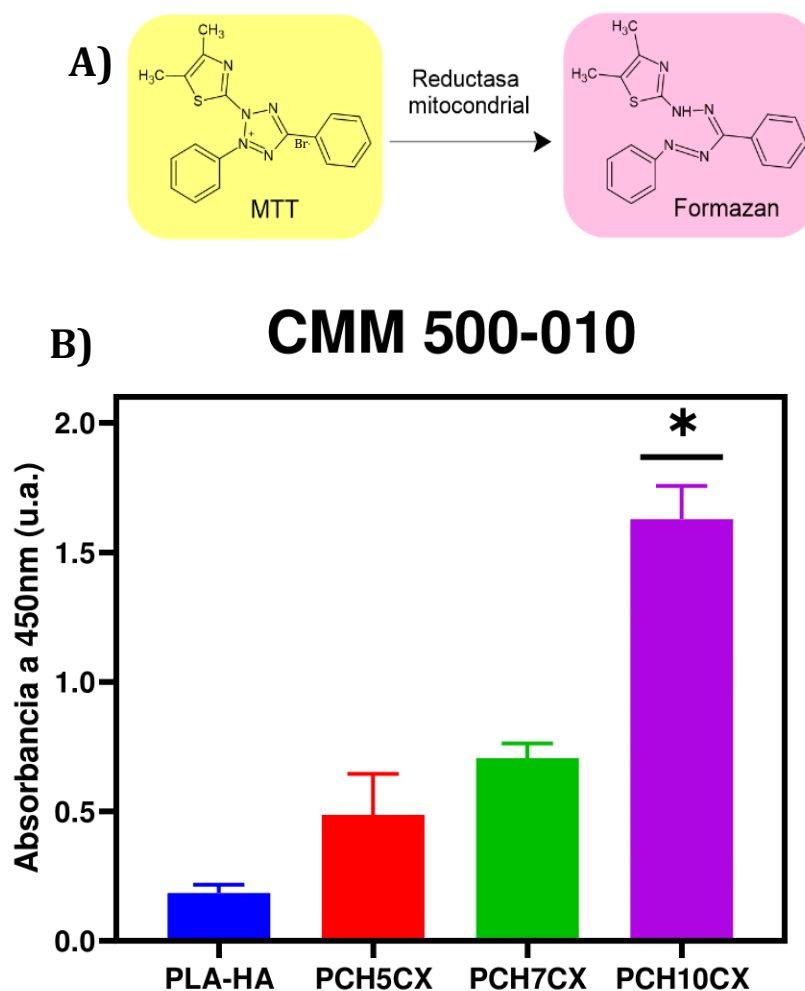


Figura 3.17. A) Esquema de la viabilidad celular basado en el ensayo MTT. **B)** Actividad metabólica de las células sembradas en los andamios después de 24 horas de incubación con CMM 500-010. $*(p < 0.01)$.

La concentración de AC demostró tener un impacto considerable en las propiedades mecánicas, morfológicas y de absorción de los andamios, convirtiéndolo en un factor determinante durante la creación de un andamio que pueda recrear un microambiente para simular las condiciones nativas en las que se encuentran las células. Con base en estos resultados, el andamio AFD10CX se perfila como candidato ideal para aplicaciones en ingeniería de tejidos (IT). A pesar de no contar con el mejor desempeño mecánico entre todos los andamios analizados, exhibe otras características sobresalientes, como un tamaño del poro entre 90-250 μm , alta hidrofiliidad y mayor

estabilidad térmica en su estructura. Estas propiedades contribuyen a un mejor desempeño biológico al reducir la citotoxicidad.

Estos hallazgos se alinean con las investigaciones previas de Raucci *et. al.* [239], quienes desarrollaron andamios para la diferenciación osteogénica, observando efectos positivos en la adhesión, proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales humanas. La diferencia radica en que ellos utilizaron concentraciones iguales o superiores al 10% (p/p) de AC como AEQ en andamios de CMC. Por último, se observó que la actividad metabólica de las células aumenta con la presencia de al menos 50% (p/p) de un polímero natural en los andamios procesados por FDLP. Efecto que ya se ha observado en andamios compuestos por celulosa y su derivados [228].

A pesar de estos resultados prometedores en el campo de la IT, es esencial realizar una evaluación más exhaustiva del desempeño biológico de los andamios para confirmar su seguridad en futuras aplicaciones humanas.

3.3 Notas finales del capítulo

La combinación de PLA con CMC en un relación 1:1 (p/p), en conjunto con una concentración de AC al 10% (p/p), generan estructuras 3D con la capacidad de simular un microambiente que aumenta la actividad metabólica de las CMM.

A pesar de sus limitaciones, el andamio AFD10CX puede tener aplicaciones en el área de IT, sobre todo donde se busque utilizar andamios que contengan un alto número de porosidades que garanticen vías para intercambio de nutrientes, oxígeno y eliminación de desechos metabólicos, sumando a una buena adhesión celular en la superficie, en un entorno acuoso.

Además, la interacción del AC con los aditivos bioactivos y su potencial influencia en la morfología de éstos, así como la naturaleza precisa de las interacción entre el PLA y el CMC, son áreas que necesitan análisis más rigurosos para establecer su origen y/o un mecanismo específico que respalde con mayor certeza nuestras aseveraciones.

CAPÍTULO 4. Análisis de la variación estructural en andamios de PLA procesados por diversas técnicas.

La ingeniería de tejidos (IT) es un campo en constante evolución que busca desarrollar estructuras tridimensionales (3D) para la regeneración de tejidos y órganos. En este contexto, los andamios poliméricos desempeñan un papel crucial, ya que actúan como matrices de soporte para el crecimiento y la diferenciación celular. Sin embargo, la elección de la técnica de procesamiento utilizada para fabricar estos andamios puede tener un impacto significativo en su estructura y, por lo tanto, en su capacidad para promover la regeneración tisular.

El capítulo 4 se centra en explorar y comparar la variación estructural de los andamios de poli(ácido láctico) (PLA) procesados mediante diferentes técnicas en el contexto de la ingeniería de tejidos. A través de un análisis detallado, examinaremos cómo estas diferencias pueden influir en las propiedades y el rendimiento de los andamios, con el objetivo de proporcionar una comprensión más completa de su potencial en aplicaciones de regeneración tisular.

4.1 Metodología experimental

4.1.1 Procesamiento por impresión 3D

Para la fabricación del andamio, se utilizó la impresora Wanhao Duplicator 4S® configurada para la extrusión por medio de una única boquilla de 0.4 mm. El diseño del andamio de PLA se llevó a cabo mediante el software Thinkercad®, siguiendo la metodología propuesta por Farto-Vaamonde *et. al.* [240]. Este diseño contempla un andamio de dimensiones de 20 x 20 x 0.2 mm con dos capas de 0.1 mm cada una, dispuestas en una rotación de 90° entre sí (Figura 4.1A).

Para la impresión, se configuró el software ReplicatorG® con un relleno del 30%, una velocidad de impresión y desplazamiento de la boquilla de 10 mm/s en ambos casos. Además, se mantuvo una temperatura constante de 220°C para el extrusor y 110°C en la plancha de calentamiento [240]. La muestra resultante se etiquetó como PLA-3D.

4.1.2 Procesamiento por electrohilado (EH)

El proceso de electrohilado se realizó siguiendo la metodología propuesta por Gutiérrez-Sánchez *et. al.* [241]. Para llevar a cabo este proceso, se usó el equipo TL-01 durante 4 horas, aplicando una tensión de 7kV y utilizando una aguja de acero inoxidable No. 6 (Figura 4.1B).

Como material base para la construcción del andamio, se utilizó una solución de PLA en cloroformo al 8% (p/p). Las configuraciones del equipo incluyeron una velocidad de 100 rps para el colector y 10 rps para el desplazamiento de la jeringa sobre el colector. Además, se mantuvo una distancia de 5 cm entre los sensores y 15 cm entre la aguja y el colector. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones ambientales. Como resultado de este proceso, se obtuvo una película de PLA de aproximadamente 0.2 mm de grosor. La muestra resultante se identificó como PLA-EH.

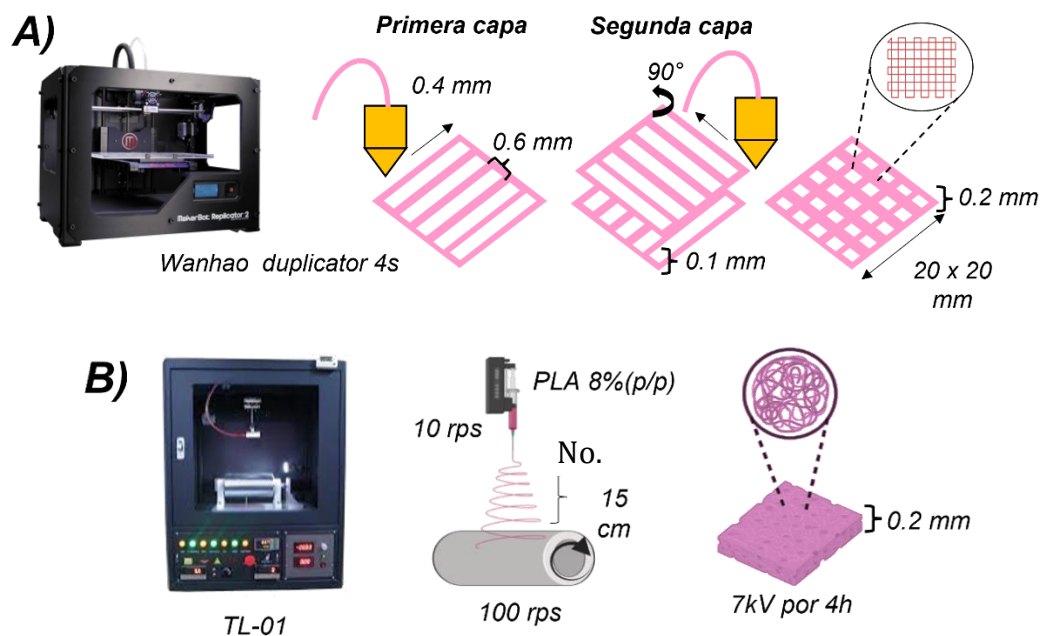


Figura 4.1. Esquema de la metodología para el procesamiento de andamios por medio de las técnicas **A)** Impresión 3D y **B)** electrohilado (EH).

4.1.3 Caracterización macroscópica cualitativa

Se utilizó un lente macro de 2Mpx con una apertura de f/2.4 de un smartphone Redmi Note 8® e iluminación artificial con tonalidad blanca para la adquisición de las fotografías.

4.1.4 Caracterización de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La identificación de especies químicas de los andamios se realizó utilizando un espectrofotómetro ThermoScientific Nicolet iS10 en el modo de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros de cada muestra se registraron a temperatura ambiente en el intervalo de número de onda de 600–4000 cm^{-1} , con 32 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} .

4.1.5 Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM).

La morfología de los diferentes andamios se examinó utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM) FEI QUANTA 250 en condiciones de bajo vacío, a un voltaje de 15kV y un presión de 110-130 Pa. Todas las muestras se colocaron en un pin de aluminio y se recubrieron con oro durante 30s, a 4 mA en condiciones de vacío mediante un Cressington 108 auto [241].

4.1.6 Caracterización de la humectabilidad por ángulo de contacto

La humectabilidad de los andamios PLA EH y PLA 3D se evaluó a temperatura ambiente mediante un goniómetro Biolin Scientific TL100 utilizando la técnica de gota sésil y se analizó con el software de imagen One Attetion. Para realizar el análisis de mojabilidad se colocó una gota de agua desionizada ($\approx 2.5\mu\text{L}$) sobre la superficie de los materiales con una jeringa micrométrica, posteriormente se capturaron las imágenes a 12 s para evaluar el ángulo de contacto mediante la ecuación de Young-Laplace [241].

4.1.7 Caracterización térmica

Se evaluaron las propiedades térmicas de los andamios procesados a distintas metodologías utilizando un calorímetro diferencial de barrido modelo Q2000 de TA

Instruments. Para ello, se pesaron 5 ± 1 mg de cada muestra y se dispusieron en un porta-muestras de aluminio sin tapa de 18 mg. El análisis se llevó a cabo en un ciclo único bajo una atmósfera de nitrógeno. La muestra se enfrió hasta alcanzar los 5°C , se mantuvo en equilibrio durante 1 minuto y posteriormente se elevó la temperatura a 250°C con una velocidad de calentamiento de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Evaluación preliminar de la estructura interna de los andamios

La Figura 4.2 muestra las estructuras resultantes que fueron obtenidas a través de los diferentes procesos: electrohilado (Figura 4.2A) e impresión 3D (Figura 4.2B). Ambos andamios dimensiones de 20×20 mm, pero con diferencias en el grosor: el andamio obtenido por electrohilado (PLA EH) tiene un grosor de 0.1 mm, mientras que el andamio fabricado mediante impresión 3D (PLA 3D) tiene un grosor de aproximadamente 0.3 mm.

Utilizando un microscopio monocular digital VKTECH 500X, se llevó a cabo la observación preliminar de la estructura interna de cada uno de los andamios. A pesar de la limitación en la cantidad de aumentos disponibles, en la Figura 4.4C es posible observar la disposición aleatoria de las fibras poliméricas en el andamio PLA-EH (Figura 4.2C). Por otro lado, la Figura 4.4D presenta con mayor detalle la estructura tipo malla, en la cual se observan algunas discontinuidades entre cada sección de 0.8 mm de diámetro que conforma la segunda capa. Además, las intersecciones entre las dos capas del mallado forman espacios libres con dimensiones de 0.4×0.5 mm. Estas discontinuidades, así como las diferencias observadas en las dimensiones de las secciones con respecto al diseño original, se atribuyen a las limitaciones técnicas que presenta este modelo de impresora 3D al momento de generar una estructura de estas dimensiones. Asimismo, el andamio PLA 3D pareciera tener una superficie completamente homogénea.

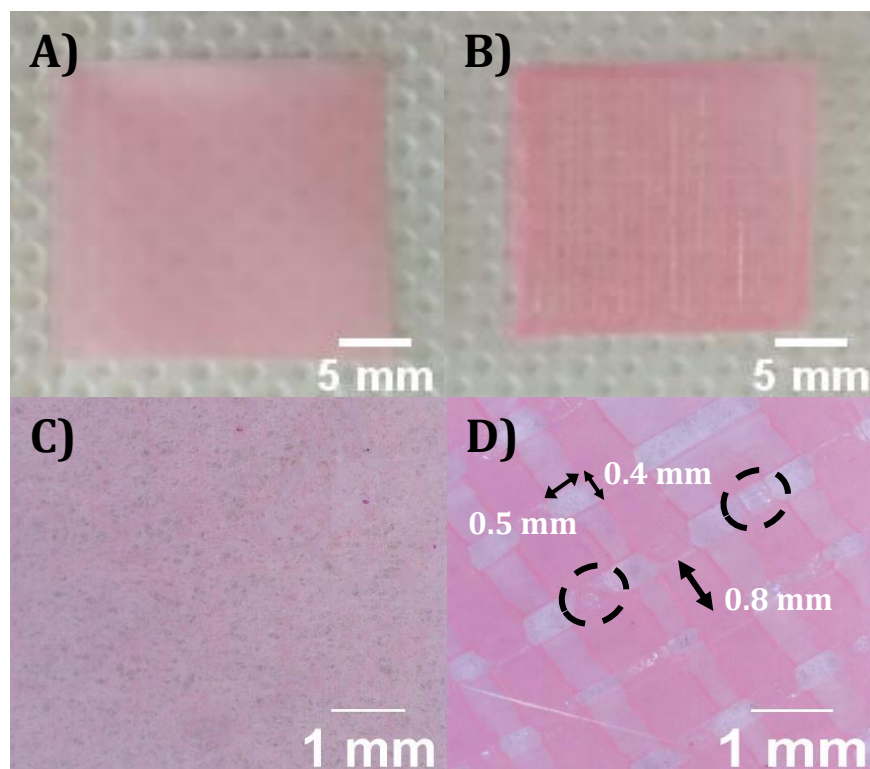


Figura 4.2. Andamios de PLA procesado mediante **A)** EH e **B)** impresión 3D. Estructura interna de los andamios **C)** PLA-EH y **D)** PLA-3D, bajo microscopía óptica de campo claro a una magnificación de 500x.

Al igual que en la Figura 3.1, el característico color rosa se atribuye al pigmento utilizado en el carrete de PLA comercial. Cabe destacar que previamente se ha demostrado que este pigmento no afecta negativamente sobre el metabolismo de las células, al menos durante las primeras 24 horas, como se ilustra en la Figura 3.17.

4.2.2 Caracterización mediante espectroscopía FTIR-ATR

El análisis FTIR (Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier) desempeña un papel crucial como primera exploración ya que, esta técnica, permite examinar las estructuras moleculares y composición química de los andamios con gran precisión, resultando especialmente útil para identificar alteraciones en la morfología de los materiales evaluados sin recurrir a técnicas más avanzadas o costosas [242]. La Figura 4.3 presenta el espectro del PLA utilizado como base, así como los espectros correspondientes al PLA procesado por las técnicas de EH e impresión 3D.

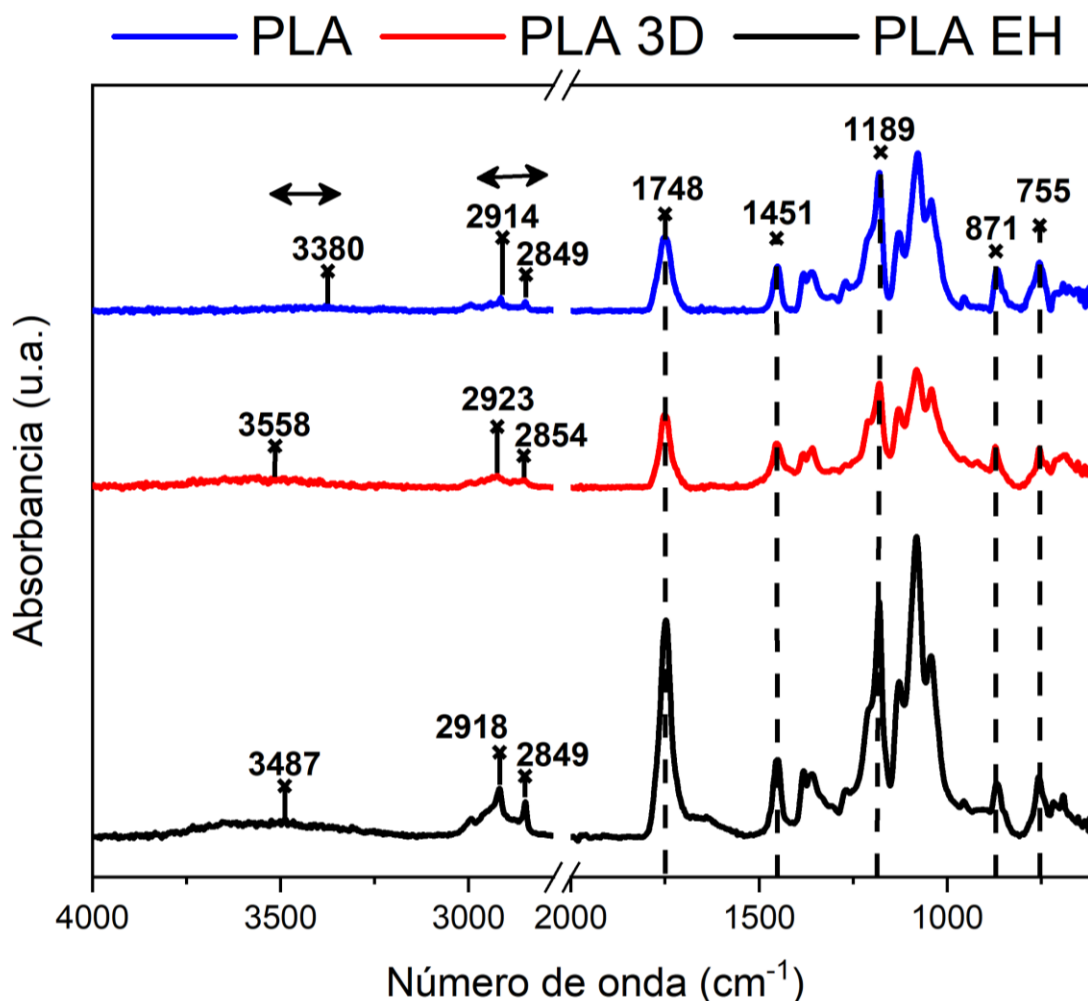


Figura 4.3. Espectros FTIR-ATR de los andamios obtenidos mediante diferentes técnicas de procesamiento.

Las bandas de importancia fueron identificadas en cada espectro y se presentan en la Tabla 4.1, en conjunto con su respectivo modo vibracional. En primera instancia, los tres espectros de FTIR presentan las señales características del PLA en la región de 700-1800 cm^{-1} , específicamente las bandas a 755, 1189, 1451 y 1748 cm^{-1} . El grupo funcional principal del PLA, que corresponde a la vibración de tensión del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), se encontró tanto en la frecuencia de 755 cm^{-1} como a 1748 cm^{-1} , indicando la presencia del grupo éster característico del ácido láctico [243]. De la misma forma, la banda a 1189 cm^{-1} puede ser atribuida a la vibración de tensión de los enlaces $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ presente en estos mismos ésteres [244], mientras que la banda a 1451

cm⁻¹ se tribuye a la vibración de flexión de los enlaces C-H presente en los grupos metilo (-CH₃) que se encuentran ramificados en la estructura del PLA [245].

Tabla 4.1. Asignación de bandas características para los andamios de PLA procesados por distintas técnicas

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionales	Modo vibracional
755	-C=O c	-
871	-C=O a	-
1189	C-O-C	Tensión
1451	-CH, -CH ₃	Flexión
1748	-C=O	Tensión
2800-3000	-CH, -CH ₃	Tensión simétrica y antisimétrica
3000-3500	-OH	Tensión

*c = banda correspondiente a la fase cristalina del PLA.

*a = banda correspondiente a la fase amorfa del PLA.

Al observar la modificación de las señales en la región de 2800-3000 cm⁻¹, que corresponden a los estiramientos simétricos y antisimétricos de los enlaces C-H en los grupos metilo [246], sugieren que, si bien la estructura principal del PLA no presenta ningún cambio, sí lo hay en sus grupos metilo ramificados. Esto nos indicaría que las técnicas de procesamiento no modifican la estructura química del material base (PLA), sin embargo sí modifican la disposición espacial de las estructuras químicas ramificadas, por ende, sus propiedades químicas, físicas, así como la forma de interacción con otras moléculas y con ellas mismas [247].

Esta aseveración se refuerza con las variaciones en las señales presentes en la región de los hidroxilos (3000-3500 cm⁻¹) [248]. El desplazamiento de los grupos hidroxilos (-OH) de 3380 cm⁻¹ a 3558 y 3487 cm⁻¹ suele estar asociado a la formación de puentes de hidrogeno debido a las interacción entre los extremos del PLA [249]. Estas

modificaciones en los espectros pueden interpretarse como una manifestación del cambio estructural mencionado previamente, el cual ocurre debido a la disposición espacial de las moléculas del PLA durante el procesamiento de los andamios.

Cabe aclarar que esta variación encontrada en los andamios de PLA, por efecto de la metodología seleccionada para fabricar el andamio, modifica solamente la orientación molecular, ya que durante el procesamiento los polímeros pueden experimentar un cambio de orientación debido a las fuerzas de flujo o estiramiento [250], generando la anisotropía observada en el rango de 2800 a 3000 cm^{-1} . Si bien, algunas técnicas de procesamiento, como la extrusión, pueden cambiar la cristalinidad del polímero, esto se vería reflejado en modificaciones de su espectro FTIR [251], ya que los polímeros cristalinos y amorfos tienen bandas características, en este caso para el PLA esas bandas corresponden a las señales a 871 y 755 cm^{-1} , respectivamente [252]. Por lo tanto, es necesario un análisis más específico con el objetivo de corroborar o descartar una modificación en la cristalinidad del andamio.

4.2.3 Caracterización morfológica mediante SEM.

A través de la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), se llevó a cabo la caracterización morfológica de los andamios procesados mediante EH e impresión 3D, con el fin de analizar el efecto en la morfología (porosidad, la distribución de poros, la estructura y la topografía superficial), que supone el uso de cada técnica de procesamiento.

La Figura 4.4A muestra las fibras no tejidas de poli(ácido láctico) (PLA) resultantes del procesamiento por electrohilado (EH), en esta se puede observar como las fibras dispuestas de forma aleatoria generan una microestructura porosa en 3D, con canales interconectados. Cabe señalar que dichas estructuras 3D están constituidas por fibras que presentan una variedad de espesores, de los cuales se observan dos predominantes, el primero corresponde a fibras con un diámetro de $0.3 \pm 0.03 \mu\text{m}$ y el segundo presenta valores a $0.8 \pm 0.15 \mu\text{m}$ (Figura 4.5A). Al comparar la distribución del tamaño de la fibra (DTF), podemos observar que, para el primer caso, la variabilidad en el tamaño de las fibras es reducida, al tener solo un 10% comparado con el 20% presente en el segundo caso. Dado estos resultados, al procesar el PLA mediante la técnica de EH bajo estas

condiciones experimentales, resulta más probable encontrar una mayor cantidad de fibras no tejidas con un diámetro de $0.3 \pm 0.03 \mu\text{m}$ a lo largo de la superficie 3D.

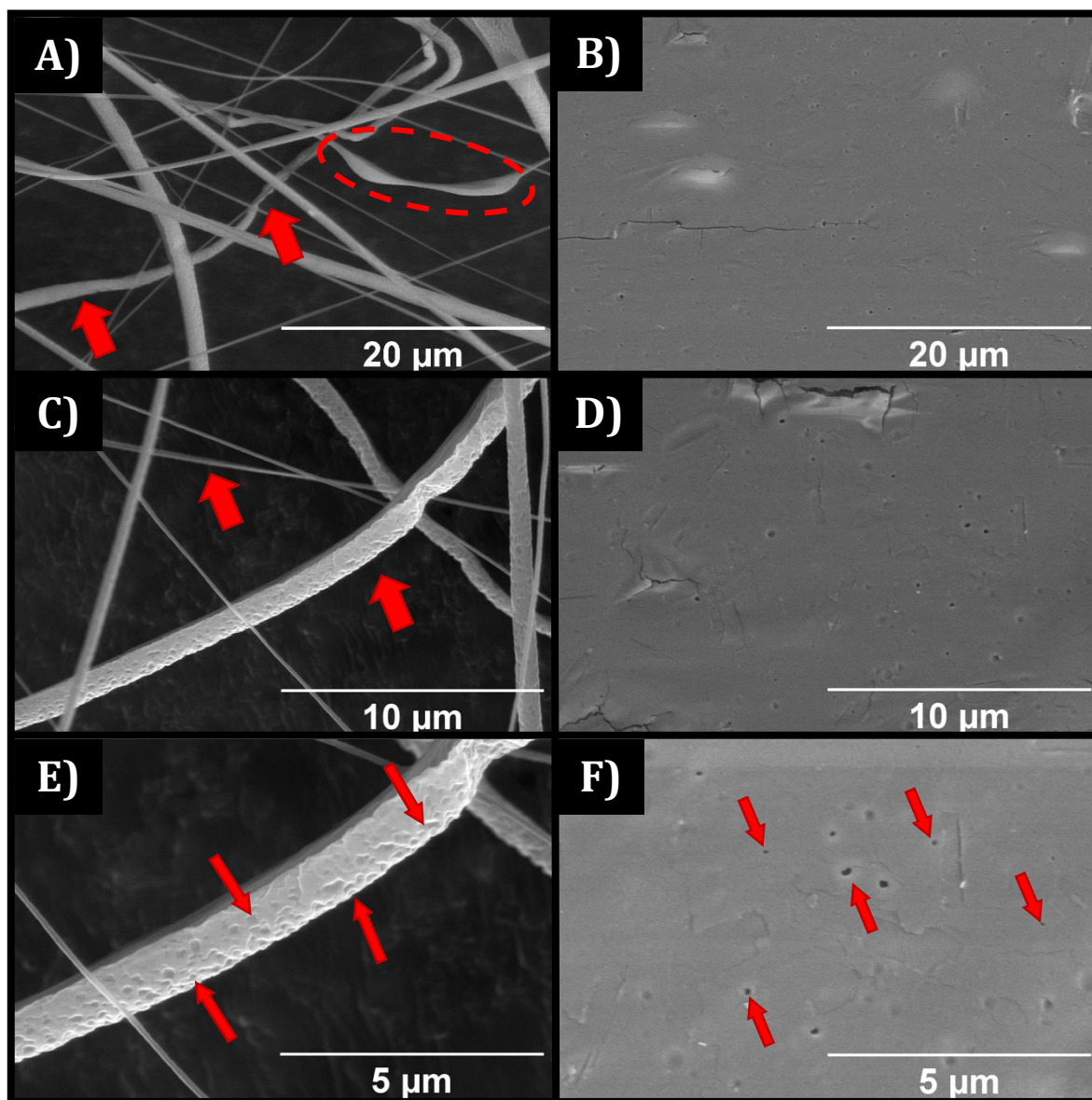


Figura 4.4. Micrografías de los andamios procesados mediante electrohilado (PLA EH), a **A)** 5000x, **C)** 10,000x y **E)** 20,000x, e impresión 3D (PLA 3D), a **B)** 5000x, **D)** 10,000x y **F)** 20,000x.

A diferencia de lo reportado por Gutiérrez-Sánchez *et. al.* [241], bajo estas condiciones experimentales, en algunas fibras de PLA se pueden observar aglomeraciones seguidas de pequeños tramos más delgados (Figura 4.4A), conformando una morfología

denominada “estructura de cuentas” o “bead-on-string structure ” [253]. Esta variabilidad en el diámetro individual la fibras y posiblemente la variabilidad en el DTF (Figura 4.4C), se atribuye principalmente a la velocidad a la que se inyecta el polímero en solución, la concentración de PLA en la solución y el voltaje utilizado [254]. Si bien, la presencia de estas fibras fue mínima, es necesario optimizar algunas de las condiciones experimentales para evitar las aglomeraciones, ya que estas pueden dar como resultado diámetros individuales no uniformes de las fibras en la matriz, lo que afecta la homogeneidad del material. Esto puede conducir a variaciones en las propiedades mecánicas y térmicas, al mismo tiempo que disminuye la porosidad [255,256].

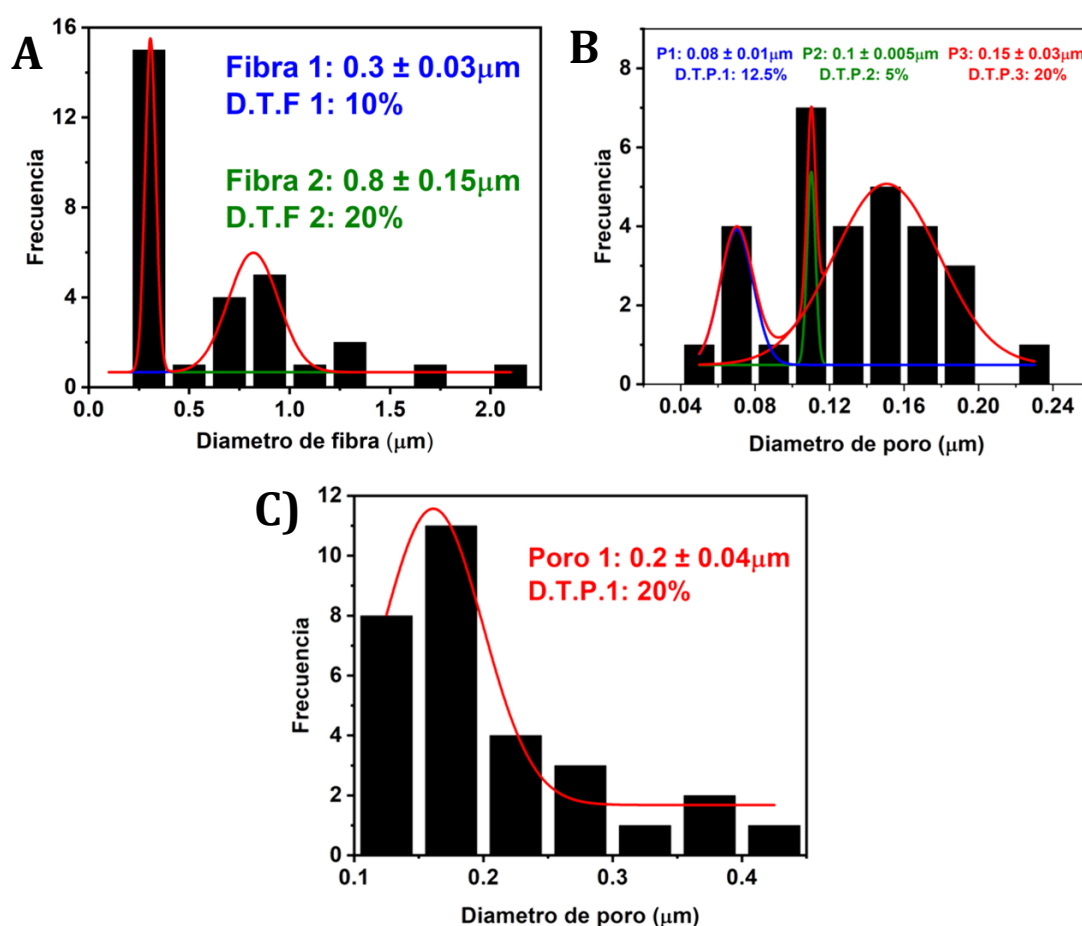


Figura 4.5. *A)* Distribución del tamaño de las fibras (DTF) y *B)* Distribución del tamaño de los poros (DTP) observados en el andamio de PLA EH. *C)* Distribución del tamaño de los poros (DTP) observados en el andamio de PLA 3D.

Al examinar de cerca las fibras no tejidas de PLA (Figura 4.4 C y E), se observó una topología rugosa, así como la presencia de al menos tres distintos diámetros de poro, del cual desatacan los poros con un tamaño promedio de $0.15 \pm 0.03 \mu\text{m}$, ya que presenta una distribución más uniforme y por lo tanto es más probable que la fibra presente este tipo de porosidades a lo largo de su superficie (Figura 4.5B).

La rápida evaporación del disolvente de la solución PLA-Cloroformo, junto con las interacciones eléctricas entre las cargas presentes en el polímero y el campo eléctrico, puede dar lugar a deformaciones en las fibras a medida que el polímero se deposita sobre el sustrato. Estos procesos conducen a la formación de porosidades macroscópicas y a la generación de rugosidades en la superficie durante la elongación y formación de las fibras del polímero [257,258]. De acuerdo con las investigaciones publicadas por Nedjari *et. al.* & Tian *et. al.* [259,260], la superficie rugosa presente en la macroestructura, en conjunto con los microporos, generan un efecto inductor sobre la adhesión, crecimiento y proliferación celular.

Por su parte, la morfología lisa exhibida por el andamio de PLA en la impresión 3D (Figura 4.4B) es el resultado de una interacción de varios factores. Ya que el PLA tiene una temperatura de fusión relativamente baja ($180\text{-}220^\circ\text{C}$) en comparación con otros polímeros utilizados en impresión 3D [261], permite un proceso de fusión y deposición suave y controlado. Esta fusión suave, junto con las propiedades de adhesión entre las capas de impresión y una baja contracción en el procesamiento (entre 0.3% y 0.5%), minimiza la deformación y las imperfecciones en la superficie de la impresión durante el proceso de enfriamiento [262,263].

Al examinar detenidamente la estructura lisa del andamio PLA 3D, se pueden identificar poros a lo largo de la superficie (Figura 4.4 D y F) con un diámetro promedio de $0.2 \pm 0.04 \mu\text{m}$ (Figura 4.5C). Varios factores pueden contribuir a la formación de poros en la superficie de las piezas impresas en PLA utilizando técnicas de impresión 3D. Si la velocidad de impresión es demasiado alta ($>30 \text{ mm/s}$), el material puede no tener suficiente tiempo para fundirse completamente y adherirse correctamente entre capas, lo que podría llevar a la formación de porosidades en la superficie [264]. Además, la

calidad del filamento PLA utilizado es crucial, ya que los filamentos de baja calidad o con impurezas pueden contener partículas extrañas que interrumpen la uniformidad de la impresión y generan poros en la superficie [265]. El diseño de la pieza también influye, ya que cambios bruscos de dirección o estructuras complicadas pueden dificultar la impresión de capas suaves y sin poros [266]. Por último, la elección de parámetros como el relleno y la altura de capa también puede afectar la aparición de poros, ya que un relleno por debajo del 40% o una altura de capa mayor a 0.2 mm pueden generar imperfecciones en la superficie [264,267].

A pesar de que la aparición de poros en los andamios producidos mediante impresión 3D puede tener un impacto negativo en las propiedades mecánicas y acelerar la velocidad de degradación, estos poros ofrecen ventajas significativas en el contexto de la ingeniería de tejidos (IT) [268]. En el campo de la IT, es fundamental tener un control preciso sobre el diámetro de estos poros, ya que, de acuerdo con Abidin *et al.* [269], a partir de un diámetro superior a 0.4 mm, estos poros promueven la migración celular, estimulan la proliferación celular y regulan la velocidad de degradación del andamio, lo que facilita la sustitución gradual del andamio por tejido nuevo a medida que se desarrolla [270].

Tanto la técnica de impresión 3D como la de EH, se requiere un control preciso de las condiciones experimentales para ajustarse y lograr andamios con las características deseadas para su aplicación en IT. Es importante destacar que la elección de una técnica de procesamiento no solo afecta la morfología final del andamio, sino que también influye en su topología. Por ejemplo, la evaporación del solvente en la EH puede generar una superficie rugosa, mientras que en la impresión 3D, las propiedades de fusión del material pueden resultar en una superficie más lisa. Además, ambas técnicas tienen la capacidad de crear porosidades de diversas formas en los andamios.

4.2.4 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es una medida que nos proporciona información valiosa sobre la hidrofobicidad o hidrofilia de una superficie y cómo la morfología y la topología de los andamios pueden influir en esta característica [271]. En el caso específico de los

andamios de PLA (Figura 4.6), su aplicabilidad en áreas como la IT depende en gran medida de cómo interactúan con líquidos de origen biológico y otros componentes [272].

La Figura 4.6 proporciona información sobre la interacción del PLA con el agua en relación con la morfología y topología adquirida en cada una de las técnicas de procesamiento. Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con el valor del ángulo de contacto del PLA prístino ($60.1^\circ \pm 1.3^\circ$) reportado por Galindo *et. al.* [273], se observa una diferencia notable.

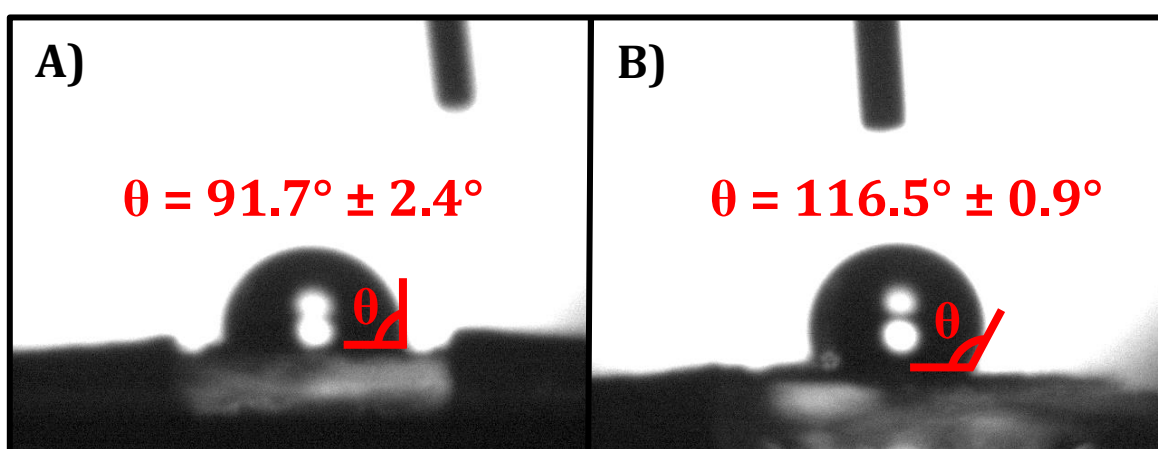


Figura 4.6. Ángulo de contacto de los andamios **A)** PLA 3D y **B)** PLA EH.

Como se evidenció en el análisis SEM, la morfología y topología de la superficie de los andamios poliméricos varían significativamente entre las técnicas de EH e impresión 3D. En el procesamiento por EH, las fibras exhiben una superficie más rugosa con una notable presencia de macroporosidades (Figura 4.4E), atribuida a las condiciones experimentales, mientras que en la impresión 3D, la superficie es más lisa y muestra menos macroporosidades, así como un menor diámetro en éstas (Figura 4.4F).

El cambio substancial en la humectabilidad del andamio PLA EH en comparación con los otros se debe a la rugosidad heterogénea de la superficie. La morfología del andamio PLA EH, combinada con los macroporos presentes en las fibras, se ajustan a las características del modelo propuesto por Cassie-Baxter, en el cual la gota de agua crea espacios donde el aire queda atrapado en la cavidades superficiales, minimizando el

área de contacto entre el sólido y el agua, mientras que el área entre el aire y el agua se maximizan, permitiendo así que el agua forme una gota esférica (Figura 4.6B) [274]. Por su parte, el andamio PLA 3D presentan un tamaño similar en las porosidades a lo largo de la superficie; sin embargo, debido a su superficie más homogénea, la fase líquida penetra todas las cavidades y huecos en la superficie, aumentando el ángulo de contacto en comparación con el PLA prístino (Figura 4.6A), de acuerdo con el modelo de Wenzel [275].

Los andamios de PLA EH y PLA 3D presentan cambios en la hidrofobicidad de la superficie en comparación con el PLA prístino, y estos cambios se deben principalmente a la influencia de la topología de los andamios. Estos cambios pueden tener implicaciones importantes en la adhesión celular y otras propiedades de los andamios utilizados en aplicaciones de IT.

4.2.5 Caracterización térmica

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es una herramienta fundamental que nos permite comprender cómo las condiciones de procesamiento afectan las propiedades térmicas y la estabilidad de estos materiales [276]. La Figura 4.7 muestra las curvas de DSC de los andamios PLA 3D y PLA EH donde se observan las transiciones térmicas (Figura 4.7A), la temperatura de transición vítrea (T_g) (Figura 4.7B). Al mismo tiempo, la Tabla 4.2 muestra una cuantificación de los parámetros térmicos más relevantes de los materiales obtenidos por ambas técnicas de procesamiento, así como para el PLA prístino que reportan Hevilla *et. al.* [277]. La cristalinidad del PLA se determinó con base en la siguiente ecuación:

$$Cristalinidad (\%) = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{\Delta H_m^\circ} \times 100$$

Donde ΔH_m es la entalpía de fusión, ΔH_{cc} es la entalpía de cristalización y ΔH_m° es la entalpía de fusión para los homopolímeros de PLLA o PDLA 100% cristalinos, con un valor de 93.1 J/g [278].

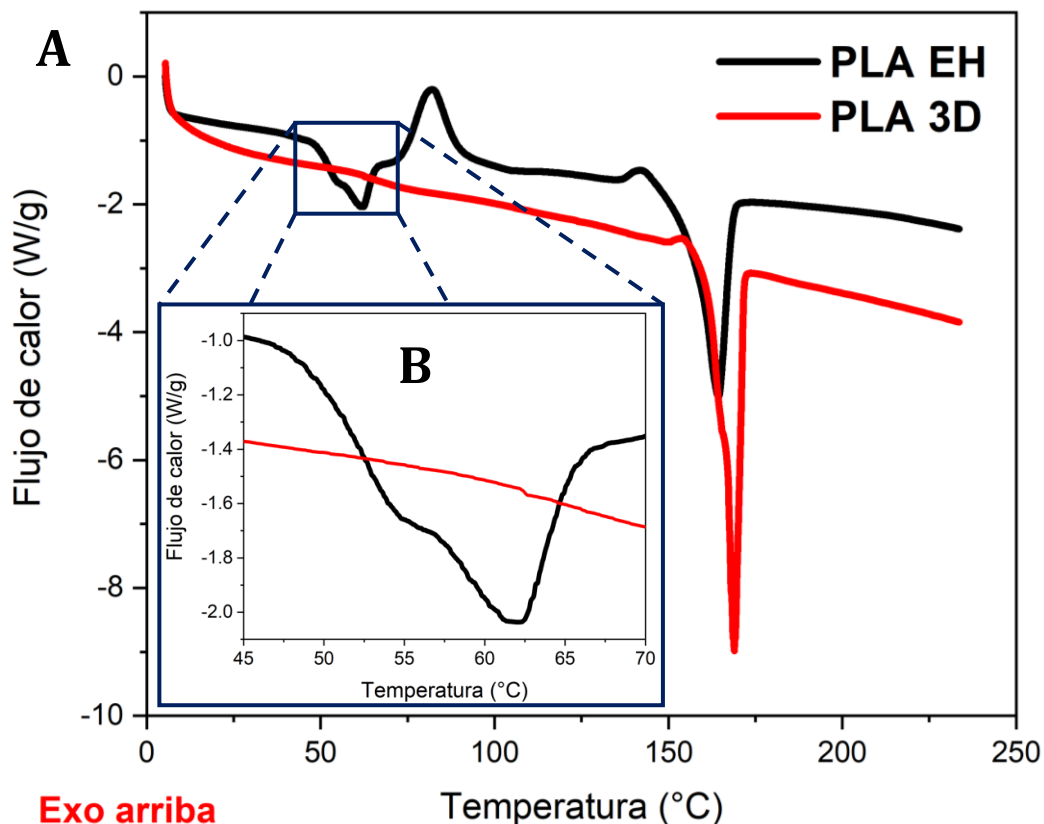


Figura 4.7. A) Curvas DSC del procesamiento del PLA por impresión 3D y EH. **B)** Intervalo de temperatura de la transición vítrea en el PLA 3D y PLA EH.

El electrohilado (EH) se destaca como una técnica altamente versátil para la fabricación de andamios, ofreciendo un control preciso sobre una variedad de parámetros estructurales como el diámetro, textura superficial, la porosidad y la orientación de las fibras poliméricas [279,280]. En el proceso de EH, el polímero se disuelve en un solvente para formar una solución que posteriormente se extruye a través de una aguja cargada eléctricamente. La corriente eléctrica hace que la solución se estire y forme una fibra continua. El diámetro de la fibra resultante depende de varios factores y la distribución de pesos moleculares del polímero es uno de ellos [281].

Cuando se utiliza un polímero con una distribución de pesos moleculares más bajos, las cadenas poliméricas individuales en la solución son más cortas, por ende, menos propensas al entrelazamiento y la formación de agregados en la solución. Además, las cadenas de menor peso molecular tienen menos entrelazamientos y grupos laterales

que puedan ejercer fuerzas de tracción intermolecular [164,282]. Estas características facilitan el estiramiento de las cadenas durante el proceso de electrohilado, lo que resulta en la formación de fibras más delgadas [283]. En contraste, las cadenas más largas y con más enlazamientos, así como grupos laterales, tienden a agruparse y enredarse, dificultando su estiramiento y generando fibras más gruesas [284]. Tal como se observa en las Figuras 4.4 A y 4.5A, nuestro caso parece presentar este mismo comportamiento, ya que se observa una clara dicotomía de fibras gruesas y fibras delgadas, lo que en primera instancia podría indicar que en el polímero existe dos distribuciones de pesos moleculares predominantes.

Tabla 4.2. *Parámetros térmicos obtenidos de los diferentes procesamientos.*

Muestra	T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)	ΔH_c (J/g)	ΔH_m (J/g)	T_c (°C)	T_m (°C)	X_c (%)
<i>PLA</i>	60	-	32	37	101	165	5.4
<i>PLA 3D</i>	62.4	-	-	35.4	-	168.5	38
<i>PLA EH</i>	52.6	59.6	15.1	32.1	81.9	164.2	18.3

Esta asunción se corrobora al observar una reducción de la temperatura de cristalización y fusión (Tabla 4.2). De acuerdo con las observaciones realizadas por Pan *et. al.* [285], a lo largo del calentamiento, el PLA de bajo peso molecular ($M_n = 15,000$ g/mol) solo cristalizó en el polimorfismo α' a temperaturas por debajo de 100°C, mientras que en el PLA de alto peso molecular ($M_n = 118,000$ g/mol) se cristalizó en el alótropo α a una temperatura de aproximadamente 100°C. Además, en relación con la investigación realizada por Hsieh *et. al.* [286], la fusión de los cristales tipo α sucede en el rango de temperatura entre 150 y 170°C, mientras que los cristales tipo α' sucede en el rango de temperatura entre 140 y 150°C. Por último, de acuerdo con Zhang *et. al.* [287], cuando la temperatura de cristalización (T_c) < 110°C, la curva de DSC del PLA se caracteriza por la presencia de un pequeño pico exotérmico antes del pico de fusión, denominado T_{exo} , donde el PLA- α' se transforma en PLA- α , lo que explica el ensanchamiento de la curva al momento de la fusión (T_m) (Figura 4.7A), indicando que

la muestra es heterogénea en términos de su estructura cristalina debido a la presencia de varios polimorfismos.

Esto implica que la presencia del PLA- α' se caracteriza por una temperatura de cristalización y fusión más baja que la del PLA puro, ya que la presencia de diferentes estructuras cristalinas puede interferir con el ordenamiento de las cadenas del polímero, ya que el PLA- α' se caracteriza por un mayor espacio de separación en sus cadenas poliméricas, lo que disminuye las interacciones de las fuerzas moleculares entre las cadenas poliméricas (Van Der Waals y puentes de hidrógeno) [288]. Por lo tanto, la presencia tanto de cristales tipo α como tipo α' , modifica el empaquetamiento lamelar y orden de las cadenas poliméricas en el PLA, restringiendo de dos formas distintas el movimiento de la parte amorfa del polímero, generando así la aparición de dos T_g en el termograma obtenido por DSC (Figura 4.7B). Donde el valor de T_{g1} a 52.6°C, se asocia con el PLA de bajo peso molecular, mientras que el valor de T_{g2} a 59.6°C, se asocia con el PLA de alto peso molecular, de acuerdo con los resultados proporcionados también por Pan *et. al.* [285].

En la impresión 3D, se lleva a cabo la deposición de material termoplástico capa por capa para construir objetos tridimensionales. Durante este proceso, el material se funde y solidifica rápidamente para dar forma a la estructura deseada [116]. Posteriormente, es posible someter el objeto en 3D a un proceso de tratamiento térmico o “*annealing*” para modificar sus propiedades mecánicas y térmicas [289]. En este contexto, dado que el grosor de las capas es muy pequeño (0.2 mm), se presupone que la exposición a la temperatura de la placa de calentamiento (100°C), seguida de un enfriamiento lento a temperatura ambiente sobre la misma placa, generó un efecto similar al recocido en la estructura del andamio. La Figura 4.7A muestra que el PLA 3D presenta un termograma más suave y limpio en comparación con el PLA EH, confirmando que las condiciones de procesamiento modificaron la estructura del PLA de manera similar a los resultados descritos por Tábi *et. al.* [290], donde al PLA se le aplicó un tratamiento térmico.

Al observar el termograma del PLA 3D y compararlo con el del andamio PLA EH, éste presenta cambios significativos. Específicamente, la transición exotérmica que indica la

cristalización del PLA desaparece, mientras que la transición característica de la T_g se vuelve prácticamente imperceptible (Figura 4.7B). La ausencia de curva de cristalización en el PLA 3D, así como disminución en la visibilidad de la T_g , se asocia al alto grado de cristalinidad que el PLA alcanzó durante el proceso de impresión [281]. Este fenómeno podría ser el resultado de la combinación de la extrusión y la temperatura, que inducen un ordenamiento en la estructura cristalina del PLA. Dicho ordenamiento se refleja en una curva de fusión más pronunciada para el PLA 3D en comparación con el PLA EH (Figura 4.7A), lo que se traduce en un aumento en la entalpía de fusión (ΔH_m), pasando de 32.1 J/g, para el PLA EH, a 35.4 J/g para el PLA 3D. Estos resultados se reflejan en el cálculo de la fracción cristalina del polímero, que aumentó del 18.3% en el PLA EH al 38% en el PLA 3D (Tabla 4.2).

El andamio PLA 3D, en comparación del PLA prístino, refleja un aumento en la temperatura de fusión (T_m) al mismo tiempo que una disminución en la ΔH_m . El aumento en la T_m del PLA 3D de 165°C a 168.5°C, en comparación con el PLA prístino, se debe a la modificación en la orientación molecular de las cadenas del polímero, que se vuelven más alineadas durante el proceso de impresión 3D, lo que a su vez demanda una mayor energía térmica para la fusión [281]. Por otro lado, de acuerdo con Zhou *et al.* [291], la disminución en la ΔH_m se debe a la existencia de múltiples fases cristalinas, polimorfismos α y α' , cada uno con diferentes entalpías de fusión. La reducción en la presencia del polimorfismo α' , que tiene una temperatura y entalpía de fusión más bajas que la fase α [286], debido a la influencia de la temperatura durante el procesamiento por impresión 3D, contribuye al aumento general de la T_m en el polímero. Esto se confirma al observar la disminución del pico exotérmico en el termograma antes de la fusión del PLA 3D en comparación con el andamio PLA EH (Figura 4.7A).

Sin embargo, para corroborar de manera contundente estos resultados sobre la presencia de diferentes fases cristalinas en el PLA, es necesario utilizar la técnica de Difracción de Rayos-X (DRX), tal como lo describen las investigaciones de Hevilla *et al.* & Gómez-Pachón *et al.* [277,281].

4.3 Notas finales del capítulo

La elección de una técnica de procesamiento específica no sólo afecta la morfología final del andamio, sino que también influye en su topología.

Las condiciones de procesamiento y la calidad de los precursores pueden alterar la orientación preferencial de las cadenas del polímero en una dirección particular, entre otros aspectos. Estas variaciones, a su vez, tienen un impacto significativo en propiedades clave para la ingeniería de tejidos (IT), tales como la estabilidad térmica, la rugosidad, la hidrofiliidad y el tamaño de los poros en la superficie del andamio. Por lo tanto, la combinación de diversas metodologías de procesamiento de andamios con enfoque en la IT podría contribuir a resolver los principales desafíos individuales asociados con cada técnica, al mismo tiempo que aprovecha las ventajas inherentes de cada una de las técnicas.

CAPITULO 5. Diseño, construcción y evaluación biológica de un andamio polimérico multicapa para su aplicación en ingeniería de tejidos.

Los materiales compuestos surgen de la combinación de dos o más materiales con marcadas diferencias físicas y químicas. En muchas ocasiones, se crean compuestos que fusionan diversos tipos de polímeros para elevar la resistencia mecánica de los andamios y mejorar su interacción con los tejidos. No obstante, los soportes poliméricos presentan limitaciones significativas, como su baja resistencia mecánica y su tendencia a la deformación a lo largo del tiempo. Para abordar estas limitaciones y potenciar su interacción con los sistemas biológicos, se han comenzado a utilizar polímeros en combinación con materiales biocerámicos [173].

Aunque la aplicación de materiales compuestos en biomateriales es relativamente nueva y se enfoca en áreas como la fijación de fracturas, cemento óseo, reemplazo de cartílagos, tendones y ligamentos, el desarrollo de nuevos compuestos orgánico-minerales para tratar defectos cartilaginosos constituye un reto fundamental. Estos nuevos materiales compuestos deberían satisfacer varios requisitos, entre ellos la baja toxicidad, alta bioactividad, propiedades mecánicas equiparables a las del cartílago y, sobre todo, una velocidad de degradación que coincida con la generación de nuevo tejido.

El capítulo 5 contempla la evaluación en las propiedades fisicoquímicas, así como el desempeño mecánico y biológico de los andamios multicapa de Poli(ácido láctico) (PLA) y carboximetilcelulosa (CMC), entrecruzados con una concentración de 10% (p/p) de ácido cítrico (AC), cuando se les integra un componente esencial de la matriz extracelular (MEC) de las células cartilaginosas: el condroitín sulfato (CS). Además, se explora la capacidad de este componente para modificar las características mecánicas y biológicas de los andamios.

5.1 Metodología experimental

5.1.1 Construcción del andamio multicapa

Se utilizaron secciones de 20 x 20 mm de cada una de las tres capas (AFD10CX, PLA 3D y PLA EH) para construir el andamio bioinspirado. Inicialmente, se pesó una muestra de CMC en una relación 1:1 (p/p) con respecto a la cantidad total de PLA utilizado (Figura 5.1A). Posteriormente, se prepararon tres soluciones en vasos de precipitado, donde se combinó el CMC con 10%(p/p) de AC en relación con la cantidad de CMC, así como 0%, 0.5% y 1.0%(p/p) de CS respecto a la masa conjunta del PLA y el CMC. Además, se agregó agua desionizada en una proporción de 1mL por cada 100 mg de CMC. La solución se agitó a 1000 rpm por 15 min en una parrilla de agitación magnética (Figura 5.1B).

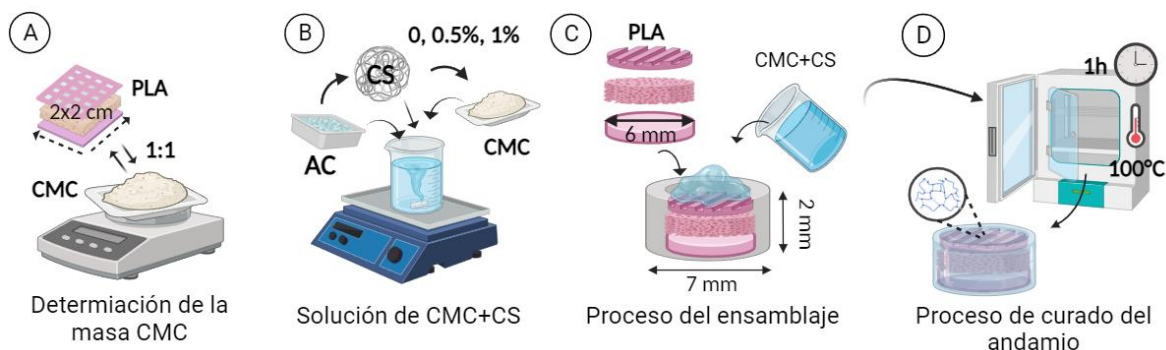


Figura 5.1. Esquema de la metodología propuesta para construir andamios poliméricos multicapa. (a)determinación de la cantidad de CMC; (b)formulación de la solución de anclaje; (c)montaje del andamio y (d)entrecruzamiento de los polímeros.

Al finalizar el tiempo de agitación, se obtuvo una pasta transparente que se dispuso junto con secciones cilíndricas de 6 mm de diámetro de cada uno de los andamios, específicamente, una sección correspondiente a la impresión 3D, tres secciones provenientes del PLA EH y finalmente una sección de FDLP. Cada una de estas secciones se colocaron sobre un molde cilíndrico con diámetro de 7 mm x 2 mm de altura, abarcando todo el volumen disponible (Figura 5.1C). Posteriormente, el molde se introdujo en una estufa de laboratorio a 100°C por 1 hora, con el fin de completar la reacción de entrecruzamiento (Figura 5.1D). Esto permitió obtener tres tipos de andamios multicapa con diferente contenido de CS: 0% (p/p), 0.5% (p/p) y 1% (p/p).

Estos andamios se identificaron como PCH10CX, PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS respectivamente.

5.1.2 Eliminación del agente entrecruzante químico (AEQ) residual

La eliminación adecuada del ácido cítrico (AC) residual, durante el proceso de entrecruzamiento, es de suma importancia, ya que un exceso de este compuesto, a pesar de sus propiedades previamente mencionadas como seguras para el cuerpo humano, podría alterar el pH de la solución, creando un entorno ácido [292] que no favorecería la proliferación celular. Para llevar a cabo este proceso, los andamios previamente curados se colocaron en una placa de 48 pocillos bajo una campana de flujo laminar.

Se realizaron tres lavados con agua estéril, utilizando un volumen de 750 μ L por cada lavado, y se dejó un periodo de reposo de 30 minutos entre cada lavado (Figura 5.2A). Al término del tercer lavado, se reemplazó el agua por 750 μ L DMEM. Siguiendo una estrategia similar, se realizaron dos lavados adicionales utilizando el mismo volumen de DMEM, pero con un tiempo de reposo de 1 hora entre cada lavado. Esto se hizo con el propósito de alcanzar un pH en la solución de 8.5. Finalmente, los residuos de DMEM fueron refrigerados para su posible uso futuro (Figura 5.2B).

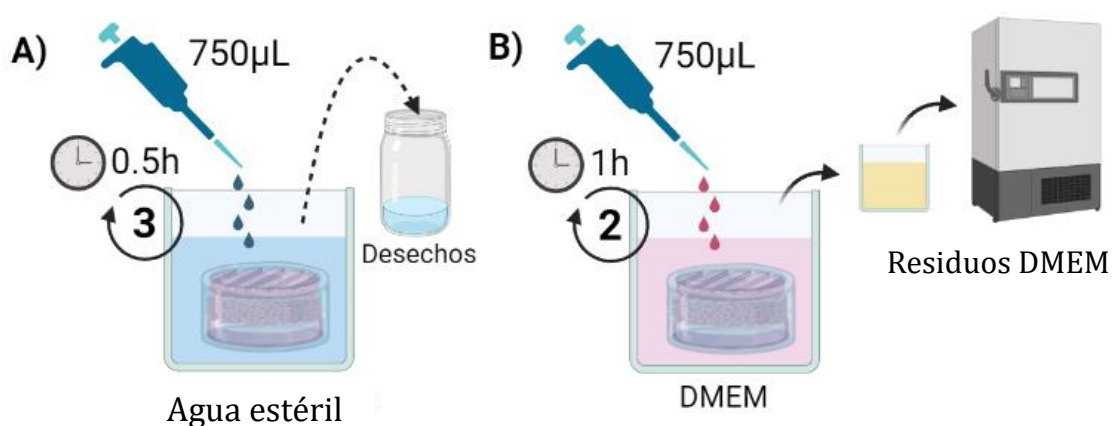


Figura 5.2. Metodología para la remoción de AC remanente: **A)** ajuste de pH con agua estéril hasta alcanzar pH de 6.5 y **B)** ajuste de pH con medio de cultivo hasta alcanzar un pH de 8.5.

5.1.3 Caracterización macroscópica cualitativa

Se utilizó un lente macro de 2Mpx con una apertura de $f/2.4$ de un smartphone Redmi Note 8® e iluminación artificial con tonalidad blanca para la adquisición de las fotografías.

5.1.4 Caracterización espectroscópica

La identificación de especies químicas de los andamios multicapa se realizó mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) utilizando un espectrofotómetro ThermoScientific Nicolet iS10 en el modo de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros de cada muestra se registraron a temperatura ambiente en el intervalo de número de onda de $600\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, con 32 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} .

5.1.5 Caracterización morfológica por microscopía óptica

La morfología de las células cultivadas en contacto con los eluatos durante las evaluaciones biológicas fue observada bajo un microscopio óptico de campo claro Olympus BX51WI. Prueba realizada en Milán, Italia.

5.1.6 Caracterización de la capacidad de retención de agua

La prueba de retención de agua se realizó sumergiendo los andamios multicapa en una solución tampón de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) dentro de un horno de laboratorio MPM Instruments M20-VN a 37°C . Las muestras se pesaron, retirando el exceso de líquido mediante centrifugación de acuerdo con la norma NMX-C-428-ONNCCE-1995 (3000 rpm por 10 min), a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 24, 48, 72, 168, 336 y 504 horas) para determinar el grado de hinchamiento en función del tiempo. La relación de hinchamiento ($\Delta W\%$) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta W\% = \frac{W_x - W_o}{W_o} \times 100$$

Donde W_x el peso de la muestra hinchada y W_o el peso de la muestra seca antes de entrar en contacto con la solución PBS. Prueba realizada en Milán, Italia.

5.1.7 Ángulo de contacto

La humectabilidad de los andamios multicapa basados en PLA-CMC-CS fue evaluada a temperatura ambiente mediante un goniómetro Biolin Scientific TL100 mediante la técnica de gota sésil y se analizó con el software de imagen One Attetion. Para realizar el análisis de mojabilidad se colocó una gota de agua desionizada ($\approx 2.5\mu\text{L}$) sobre la superficie de los materiales con una jeringa micrométrica, posteriormente se capturaron las imágenes a 1.5 s para evaluar el ángulo de contacto entre la gota de agua con la superficie del andamio mediante la ecuación de Young-Laplace.

5.1.8 Caracterización mecánica por compresión

Las propiedades mecánicas de compresión de los andamios compuestos ($n=3$) se evaluaron utilizando un analizador mecánico dinámico Q800 de TA Instruments, a una temperatura de 37 °C. El ensayo de compresión se realizó bajo los parámetros establecidos por la norma ASTM D695-15, tomando como referencia el trabajo de R. Donate *et. al.* [293], con una pequeña modificación recomendada en el trabajo de N. Contessi *et. al.* [294] específica para este tipo de materiales. Esta modificación consistió en aplicar un ciclo de una precarga a una velocidad del $2.5\% \text{ min}^{-1}$ hasta una deformación del -30%, seguida de un ciclo de descarga a una velocidad del $5\% \text{ min}^{-1}$ hasta el 1%. Posteriormente, se aplicó una carga a una velocidad del $2\% \text{ min}^{-1}$ hasta alcanzar una deformación del -30%. Prueba realizada en Milán, Italia.

5.1.9 Caracterización biológica

5.1.9.1 Cultivo celular

Se obtuvieron del laboratorio BioCell, del Politécnico de Milán, fibroblastos Murinos de la línea celular L929. Posteriormente para su replicación, fueron cultivados en DMEM, con suplementación al 10% en suero bovino fetal y antibiótico al 1% a 37°C con 95% de humedad y una atmósfera de CO₂ al 5%. Prueba realizada en Milán, Italia.

5.1.9.2 Ensayo AlamarBlue™

La pruebas de citotoxicidad *in vitro* por medición indirecta en todos los andamios se realizaron de acuerdo con la práctica estándar UNE-EN ISO 10993-5:2009 [295]. Para

estas pruebas se usaron las líneas celulares de fibroblastos murinos L929. El medio de cultivo consistió en DMEM con 15% de suero bovino fetal en volumen, piruvato sódico 1 mM, glutamina 2 mM y una solución de penicilina/estreptomicina 1% v/v.

Los eluatos del medio de cultivo se obtuvieron de los andamios en contacto con el medio de cultivo ($n = 3$ por día de muestreo). Estos andamios se encontraban en una placa de cultivo de 48 pocillos, con 1.5 mL de medio de cultivo por cada uno. Posteriormente, los andamios se incubaron a 37 °C con una concentración 5% de CO₂ durante 1, 3 y 7 días con medio de cultivo. Cada día también se incubó medio de cultivo sin muestras para utilizarlo como control. Tanto las células L929, como las HCS/2-8, se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 1×10^4 células por pocillo, y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, se reemplazó el medio de cultivo por los eluatos ($n = 3$ por muestra, por día de muestreo) y los controles de medio de cultivo. Las células fueron cultivadas nuevamente durante 24 horas en contacto con los eluatos. Después de este período, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se sustituyó por la solución AlamarBlue™, incubando a 37 °C con un 5% de CO₂ durante 4 horas. Posteriormente, se transfirieron 150 µL de cada pocillo a un nueva placa de 96 pocillos, y la fluorescencia resultante se midió con un espectrofotómetro (Synergy™ H1, BioTek, lector de lector de microplacas). Finalmente se calculó el porcentaje de viabilidad celular mediante la siguiente ecuación:

$$viabilidad\ celular\ [\%] = \frac{f_{eluato} - f_{AlamarBlue}}{f_{control} - f_{AlamarBlue}}$$

Donde f_{eluato} es el valor de fluorescencia de la células en contacto con el eluato, $f_{control}$ es el valor de la fluorescencia del medio de cultivo usado como control y $f_{AlamarBlue}$ es el valor de fluorescencia de la solución de Alamar Blue™. Prueba realizada en Milán, Italia.

Las pruebas de citocompatibilidad *in vitro* por medición directa (realizadas también en Milán, Italia) se llevaron a cabo utilizando células L929, proporcionadas por el laboratorio BioCell del Politécnico de Milán, hasta los 7 días, sembrando 1×10^4 células en cada muestra, previamente descritas para las pruebas de citotoxicidad. En cada punto de tiempo, se realizó el ensayo de AlamarBlue™ como se ha descrito

previamente. La actividad metabólica de las células sembradas en las muestras se evaluó considerando la Unidad de Fluorescencia Relativa (RFU), obtenida mediante la siguiente ecuación:

$$RFU = RFU_{\text{Muestra con células}} - RFU_{\text{Muestra sin células}}$$

5.1.9.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis ANOVA de dos vías, mediante la prueba de Tukey ($p < 0.01$), en el software GraphPad prism 8 para el ensayo AlamarBlue™.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Caracterización macroscópica de los andamios

La observación macroscópica de los andamios multicapa de PLA proporciona una visión general de las características y propiedades observadas a simple vista en estos materiales. Mediante la Figura 5.3 se observa la morfología y la topología superficial de los andamios multicapa de PLA recubiertos con CMC y cómo este recubrimiento puede influir en su apariencia macroscópica.

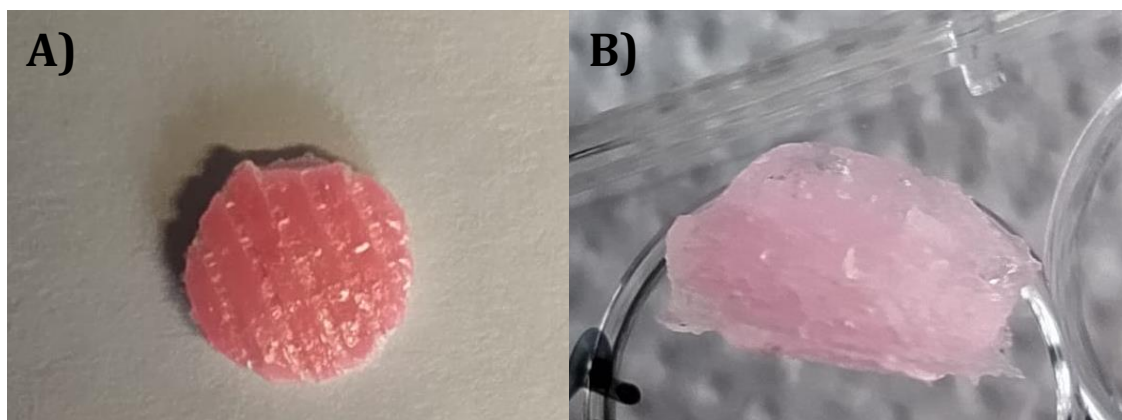


Figura 5.3. Fotografías macroscópicas del compuesto multicapa PCH10CX-1%CS **A)**seco y **B)**húmedo.

La Figura 5.3 ilustra el resultado del proceso de ensamblaje según la metodología utilizada. A simple vista, se aprecia que el andamio multicapa presenta una estructura compacta debido al recubrimiento de CMC en todas las superficies de las capas de PLA (Figura 5.3A). Macroscópicamente, no se observan indicios de cambios físicos en el

andamio al agregar una concentración de 1% (p/p) de CS, ya que mantiene su transparencia característica. Sin embargo, en un entorno húmedo o en contacto directo con el agua, se puede observar con mayor detalle cómo la estructura 3D del CMC entrecruzado embebe las capas de PLA (Figura 5.3B), lo que demuestra una vez más la capacidad del AC como agente de entrecruzamiento (AEQ) para materiales con base en celulosa, tal como lo informa Fahmy *et. al.* [296].

5.2.2 Reflectancia Total Atenuada mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

La técnica de caracterización espectroscópica FTIR-ATR ha demostrado ser una herramienta esencial en el análisis de la estructura química de los materiales poliméricos [297].

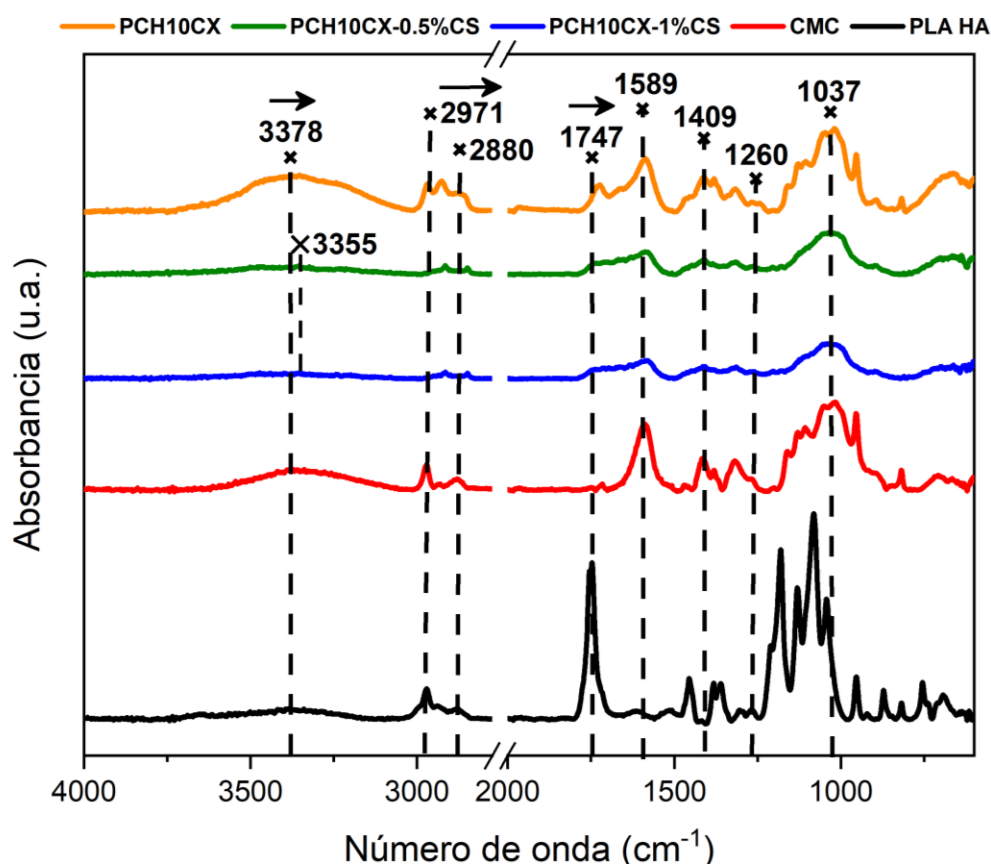


Figura 5.4. Identificación y comparativa de los grupos funcionales presentes en los espectros FTIR-ATR de los andamios multicapa con respecto a los materiales base.

En este contexto, los espectros obtenidos mediante esta técnica proporcionan información valiosa sobre las interacciones moleculares presentes en los andamios poliméricos multicapa basados en PLA-CMC. En total, se identificaron entre 9 y 12 bandas características en los espectros de cada andamio (Figura 5.4).

La lista de grupos funcionales asignados a los números de onda, junto con sus tipos de vibración, se presentan en la Tabla 5.1 Al observar minuciosamente estos espectros, es evidente la nula presencia de las bandas características del polímero sintético (PLA), ya que las señales en el intervalo de los 900-1250 cm^{-1} han desaparecido casi por completo. Este comportamiento puede atribuirse, en primera instancia, al hecho de que los andamio multicapa se encuentran inmersos en un hidrogel de CMC. Por lo tanto, no sorprende que las bandas predominantes en los 3 andamios multicapa provengan en su mayoría del CMC, como se aprecia en los espectros PCH10CX, PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS. Además, es importante destacar que, a primera vista, existe una diferencia significativa entre los andamios que contiene CS en comparación con los que no lo contienen.

Tabla 5.1. Asignación de bandas características para los andamios multicapa.

Número de onda (cm^{-1})	Grupos funcionales	Modo vibracional
1037	-C-O-C	Tensión
1260	-O-SO ₃ ⁻	
1409	-OH	Flexión, torsión
1589	-COO ⁻	Tensión
1747	-C=O	
2800-2900	-CH	
3378, 3355	-OH + -NH	

Una de las primeras diferencias más notables al introducir CS en la estructura del hidrogel de CMC, es la aparición de una banda a 1037 cm^{-1} , que, de acuerdo con la

literatura, corresponde a las vibraciones de tensión de los enlaces C-O-C de los éteres presentes en las cadenas arilo ($R-C_6H_5$) o alquilo (C_nH_{n+2}) de la estructura aromática central, así como en los grupos metileno ($-CH_2$) sulfatados en la estructura molecular del CS [298].

En este sentido, los andamios PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS también mostraron una banda apenas perceptible a 1260 cm^{-1} , que se atribuye a una señal característica de los grupos sulfato desprotonados ($-O-SO_3^-$) en materiales cargados con CS, de acuerdo con la investigación de Tóth *et. al.* [299]. Esta banda indica claramente la presencia de glucosaminoglicano (GAG) sulfatado en la estructura de los andamios; sin embargo, la baja concentración de este aditivo podría ser la razón principal por la que la banda no es muy evidente en el análisis.

Adicionalmente, la banda a 1409 cm^{-1} corresponden a la vibración de flexión-torsión de los grupos hidroxilos ($-OH$) presentes en ácidos carboxílicos libres que se encuentran en el CS [298]. Las vibraciones de torsión, como esta, son típicas en moléculas que contienen enlaces sencillos o enlaces simples, como los que se encuentran en los grupos carboxilo ($-COOH$). Es relevante mencionar que las vibraciones de flexión-torsión suelen dar lugar a bandas de absorción de baja intensidad en el espectro FTIR y, a menudo, son difíciles de observar. No obstante, su identificación resulta crucial para el análisis de moléculas complejas, como polímeros y biomoléculas [300,301].

Al analizar la banda a 1587 cm^{-1} , que corresponde a la estructura química del CMC, se hace evidente un pequeño desplazamiento hacia números de onda más bajos con respecto a los andamios cargados con CS, junto con disminución en la absorbancia de dicha banda. Este desplazamiento menor y la baja reducción de absorbancia, sugieren una disminución en la formación de enlaces covalentes entre los grupos carboxilato ($-COO^-$) del CMC y los $-OH$ del AC [189]. A diferencia de los resultados de FTIR-ATR obtenidos en el capítulo 3, en los espectros que se muestran en la Figura 5.4 prevalece la banda a 1587 cm^{-1} , lo que indica que el hidrogel de CMC que recubre las diferentes capas de PLA presenta una reducción en la formación de enlaces covalentes dentro de su estructura.

Esta modificación en el espectro se atribuye a la posible interacción entre el CS y el AC, ya que algunos grupos -OH del AC pueden formar complejos con los carboxilatos ionizados (-COO^-) del CS [302]. Esto sugiere que el AC tiene la capacidad de interactuar electrostáticamente con el CS debido a las cargas opuestas de los grupos funcionales, lo que provoca un desplazamiento gradual hacia números de onda mayores, posiblemente debido a la formación de puentes de hidrógeno entre ellos [303]. Esta nueva interacción podría tener un efecto significativo en la disposición espacial y la estructura de la red polimérica.

El PLA, en esencia, se origina a partir del ácido láctico, una molécula que contiene una cantidad substancial de ésteres con grupos funcionales carbonilo (C=O). Esta característica permite confirmar la presencia del PLA mediante la detección de su vibración por tensión distintiva en el intervalo de los 1740 a 1750 cm^{-1} [245,247]. En nuestro análisis, la señal de los C=O se identificó a 1747 cm^{-1} . Se observa un ligero desplazamiento hacia números de onda mayores cuando el hidrogel cubre los andamios; sin embargo, como en los resultados previos, este pequeño desplazamiento se les atribuye a interacciones mediadas por fuerzas electrostáticas en lugar de enlaces químicos primarios [201]. No obstante, al introducir el CS en la estructura del hidrogel, las interacciones entre el PLA y el CMC se ven mermadas. Esto se evidencia en los espectros de las muestras PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS, donde la banda de los C=O vibra a la misma frecuencia que la del material base. Este comportamiento se atribuye a la carga negativa inherente de los agregados sulfatados [304], que neutraliza estas interacciones secundarias, como señala la investigación de Arenas *et. al.* [305].

El desplazamiento de las bandas hacia número de onda menores, como las señales a 2971 y 2880 cm^{-1} , que corresponden a la presencia de vibraciones de tensión por parte de los enlaces C-H en la estructura del PLA y del CMC, respectivamente [243,306], junto con las bandas en el intervalo de $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, que son características de los grupos hidroxilo (-OH) de ambas moléculas, demuestran como la adición de al menos un 0.5% (p/p) de CS efectivamente modifican las interacciones que suceden en el interior de la estructura de hidrogel.

En función de estos resultados, podemos establecer que, a partir del 0.5%(p/p) de CS, el hidrogel de CMC no sólo experimenta una disminución en cantidad de enlaces covalentes que se forman durante el entrecruzamiento, sino que, además, reduce las interacciones secundarias ente el hidrogel de CMC y las secciones de PLA.

5.2.3 Carácter hidrofílico de los andamios multicapa

Para verificar la capacidad de mantener su estructura ante los cambios dimensionales durante la exposición a ambientes acuosos y determinar el tiempo requerido para que los andamios multicapa alcancen el estado estacionario, se realizó un análisis de retención de agua, pero esta vez sobre un ambiente salino con la finalidad de emular condiciones similares a las del cuerpo humano (Figura 5.5).

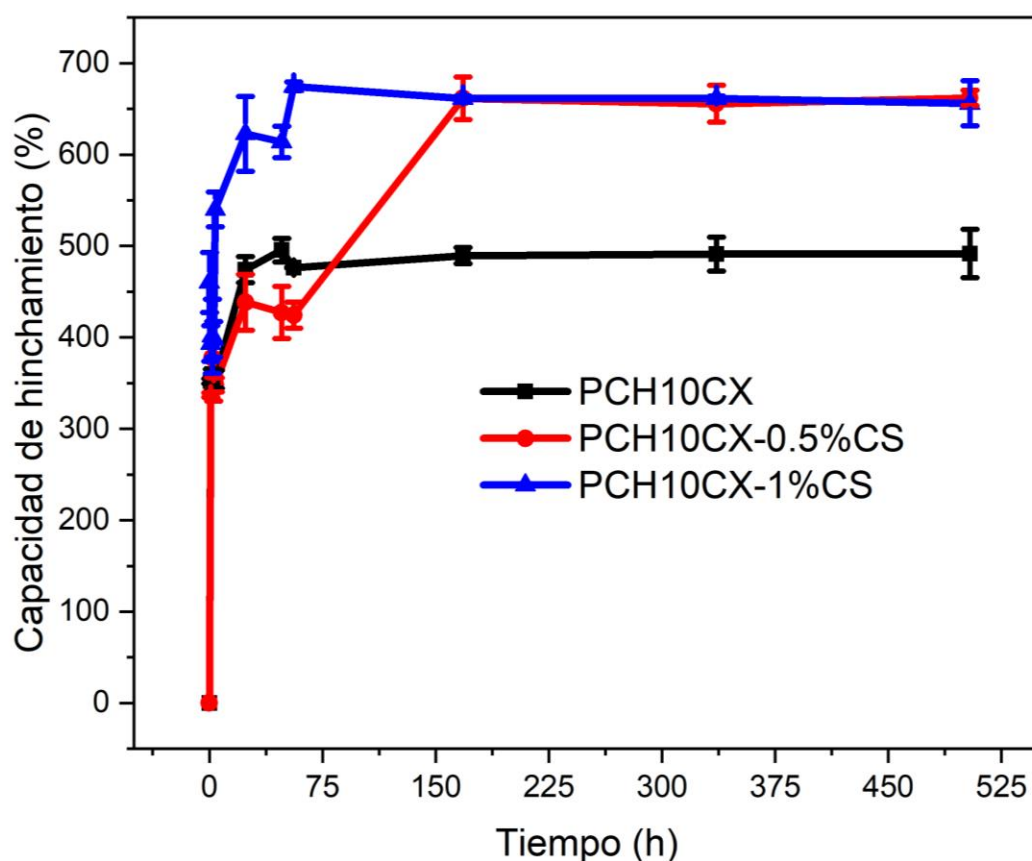


Figura 5.5. Efecto del CS sobre la capacidad de retención de agua en los andamios multicapa de PLA-CMC.

Así como en la parte inferior del andamio multicapa procesado mediante la técnica FDLP, se observa una alta capacidad de retención de agua en los andamios multicapa, llegando alcanzar hasta aproximadamente 700%. Este comportamiento altamente hidrofílico en los andamios PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS se atribuye en su mayoría a la presencia de CS en su estructura, como lo mencionan Sadeghianmaryan *et al.* [237], ya que la carga parcialmente negativa del CS atrae a las partículas de agua. Además, es debido a este efecto electrostático que el CS tiene la capacidad de interaccionar con una amplia variedad de macromoléculas, lo que le permite desempeñar un papel relevante en ciertos procesos biológicos [307].

Esta característica distintiva del CS para atraer el agua podría explicar el comportamiento inusual en el andamio PCH10CX-0.5%CS, ya que, al interactuar con el PBS durante aproximadamente 3 días, comienza a retener más agua en su estructura hasta mostrar un comportamiento similar al andamio PCH10CX-1%CS. Debido a que el andamio PCH10CX-0.5%CS contiene una menor cantidad de CS en su estructura, la cantidad de CS disponible para interactuar se ve reducida, sobre todo cuando se tiene en cuenta la interacción electrostática con el ácido cítrico (AC) durante el entrecruzamiento, como lo demuestran en su investigación Santos *et al.* [303]. No es hasta que comienza el proceso de degradación hidrolítica en los andamios multicapa que la cantidad de CS libre aumenta, permitiéndoles retener más agua en la estructura, como se observa en la Figura 5.5.

Con el objetivo de determinar la capacidad del agua para extenderse y adherirse a la superficie de los andamios, se llevó a cabo una caracterización a través de la medición del ángulo de contacto. La humectabilidad de los andamios se encuentra intrínsecamente ligada a las fuerzas intermoleculares, las cuales juegan un papel fundamental en la capacidad del agua para distribuirse sobre la superficie de los andamios, un factor crucial al momento de interactuar con las células. De acuerdo con la literatura, un ángulo de contacto menor a 90° indica que el agua puede extenderse y anclarse a la superficie del material, mientras que un valor superior a este umbral indica que el agua no se adhiere y en su lugar forma una gota con geometría esférica [308,309].

El valor del ángulo de contacto calculado para los andamios multicapa se presenta en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. *Ángulo de contacto de los materiales PLA, PCH10CX, PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS.*

Muestra	Valores de ángulo de contacto (°)
PLA	91.6 ± 3.4
PCH10CX	36.8 ± 1.5
PCH10CX-0.5%CS	26.3 ± 1.8
PCH10CX-1%CS	15.3 ± 2.1

Como se puede observar, los andamios multicapa desarrollados revelaron valores de ángulo de contacto en un intervalo de 37 a 15 grados, contribuyendo a la confirmación en torno a su naturaleza hidrofílica, especialmente en comparación con el valor obtenido para el material base (PLA), que registró un ángulo de contacto constante de $91.6^\circ \pm 3.4^\circ$ durante un período de 10 minutos. En contraste, los andamios multicapa mostraron un menor periodo de estabilidad, particularmente aquellos cargados con CS, que presentan una estabilidad de su ángulo de contacto de tan solo 1.5 segundos.

Los andamios PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS mostraron los valores más bajos de ángulo de contacto. Aunque la medición resultó algo desafiante debido a la rápida absorción de la gota de agua sobre los andamios, los resultados obtenidos concuerdan con los mostrados por Piai *et. al.* [310], estableciendo una clara correlación entre la concentración de CS en los andamios y su influencia al modificar la química superficial de los andamios multicapa y, por ende, una reducción del parámetro estudiado.

Si bien, la incorporación de CS como agente de modificación superficial tal como la CMC, es importante destacar que el aumento en la concentración de CS, aunque mejora las propiedades hidrofílicas, debe ser controlado, ya que en grandes cantidades puede

generar efectos negativos, incluso volviendo al material hidrofóbico debido a la densidad de carga negativa en su estructura [311]. Además, una mayor concentración de CS aumenta la retención de agua, lo que modifica significativamente la velocidad de degradación y, por ende, la estabilidad mecánica de los andamios cuando están expuesto a entorno acuoso. Estos resultados confirman la actividad hidrofílica del CS, y establecen el tiempo necesario para que los andamios alcancen ese estado estacionario para poder efectuar las caracterizaciones mecánicas posteriores.

5.2.4 Efecto de la incorporación del CS sobre las propiedades mecánicas de los andamios multicapa.

Para evaluar los efectos de la incorporación del condroitín sulfato (CS) en el comportamiento mecánico de los andamios multicapa, se llevó a cabo un análisis de compresión mecánica sobre las muestras (Figura 5.6).

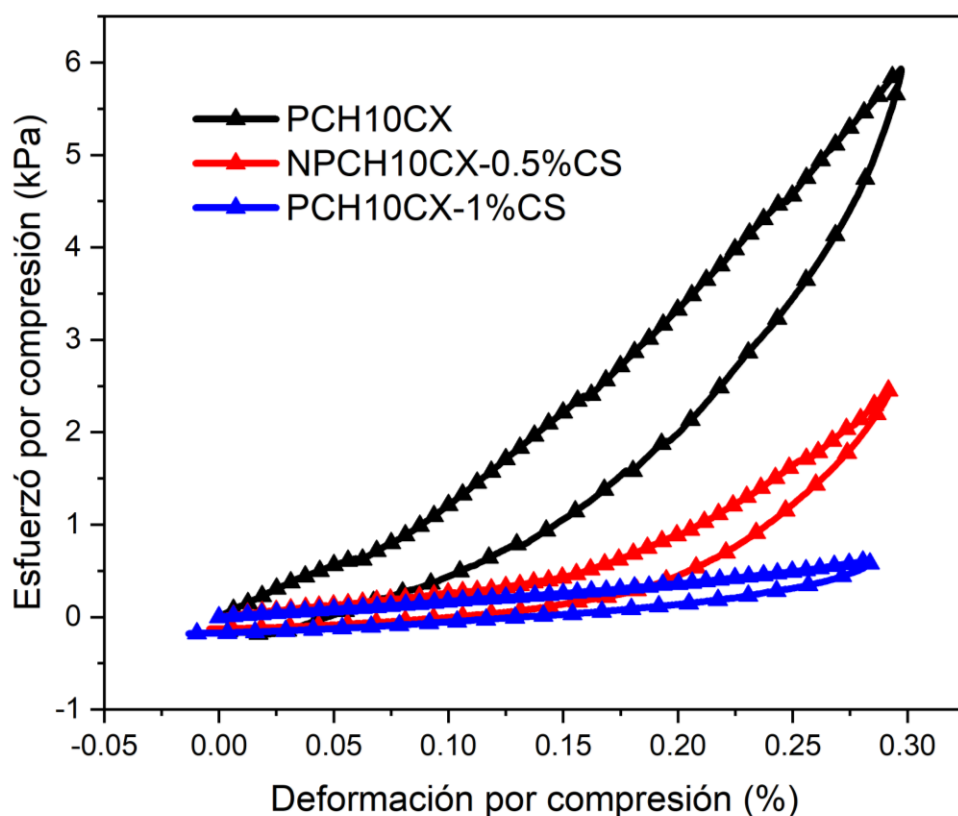


Figura 5.6. Comportamiento a la compresión de los andamios con 0%, 0.5% y 1% (p/p) de CS.

El comportamiento mecánico de estos andamios bajo compresión resulta un parámetro crítico, ya que su aplicación principal está destinada a la regeneración y reparación de tejidos, donde los materiales se someten principalmente a tensiones de compresión. Las curvas de esfuerzo-deformación de los andamios compuestos se muestran en la Figura 5.6, donde se muestra el comportamiento mecánico de los andamios al variar la cantidad CS.

El análisis de compresión de todos los andamios mostró pocas similitudes con las típicas curvas lineales de tensión-deformación con forma de “J” que se asemejan a las de los tejidos óseos o cartilagosos [312]. En su lugar, los resultados exhiben similitudes con las curvas no lineales que se observan en los tejidos suaves, como el tejido adiposo [313,314]. El valor del máximo esfuerzo por compresión fue de 5.7, 3.1 y 0.5 kPa para los andamios con 0, 0.5 y 1% (p/p) de CS, respectivamente (Tabla 5.3). Estos valores de esfuerzo por compresión de los andamios multicapa se encuentran en la misma magnitud (kPa) que los reportados para la compresión en el tejido adiposo abdominal humano [315].

Tabla 5.3. *Parámetros mecánicos de cada andamio multicapa ante el esfuerzo de compresión axial.*

Muestra	Módulo de Young (kPa)	Rigidez (kPa)	Esfuerzo máximo (kPa)	Deformación residual (%)
<i>PCH10CX</i>	12.7 ± 1.1	15.6 ± 2.7	5.7 ± 0.3	4.1 ± 0.05
<i>PCH10CX-0.5%CS</i>	3.9 ± 1.1	6.8 ± 1.1	3.1 ± 0.005	9.7 ± 0.4
<i>PCH10CX-1%CS</i>	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.05	0.5 ± 0.1	18.4 ± 0.3

La incorporación de CS en la estructura de los andamios muestra una clara alteración en las curvas de esfuerzo-deformación (Figura 4.8), lo que se traduce en una

disminución de su capacidad para soportar deformaciones. Esto es evidente en la deformación residual presente en los andamios, que aumenta de 4.1% a 18.4% al agregar una concentración de tan solo el 1% (p/p) de CS a los andamios multicapa.

Además, el módulo de compresión disminuyó de 12.77 kPa a 3.9 y 1.2 kPa cuando la concentración de CS incorporada a las estructuras fue del 0.5% y 1% (p/p), respectivamente. Se pudo observar una disminución de aproximadamente 10 veces en el módulo de compresión del andamio PCH10CX-1%CS en comparación con el andamio PCH10CX (Tabla 4.3).

La rigidez de los andamios, al igual que el módulo elástico, también desempeña un papel crucial al determinar la influencia de las propiedades mecánicas en su desempeño biológico. Cualquier variación en este parámetro pueden afectar la adhesión, morfología y diferenciación de las células que están en contacto con el andamio [316]. Siendo un parámetro más general, la rigidez en los andamios se puede interpretar como el desempeño mecánico conjunto de todos los materiales que componen el andamio. Al observar la Tabla 5.3, se aprecia una diferencia entre el módulo de Young y el valor de rigidez lo que sugiere que, efectivamente, el conjunto de los andamios multicapa junto con el recubrimiento de hidrogel, influye positivamente en el desempeño mecánico del andamio multicapa en comparación con cada componente por separado. Sin embargo, al igual que con las otras propiedades mecánicas, este parámetro se ve mermado por la incorporación de CS, disminuyendo el valor de rigidez de 15.6 kPa a 1.8 kPa para los andamio sin CS y el andamio con 1% CS (p/p), respectivamente.

Cuando observamos el comportamiento de los andamios bajo la compresión axial y lo comparamos con su desempeño hidrofílico (ver Figura 5.5), no es sorprendente encontrar valores bajos del módulo elástico, debido a su alta capacidad de retención de agua. Además, se evidencia claramente la influencia negativa que tiene una concentración de CS por encima del 0.5% (p/p) en las propiedades mecánicas de los andamios.

A pesar de que el CS es esencial para regular la diferenciación condrogénica y osteogénica en aplicaciones de ingeniería de tejidos [317], se observó que al aumentar

la cantidad de CS en la estructura de los andamios multicapa sus características mecánicas comienzan a deteriorarse, llegando al punto de reducir significativamente la resistencia ante deformaciones permanentes en la estructura del andamio, como es el caso para PCH10CX-1%CS. A partir de estos datos, al igual que la cantidad de entrecruzante, la cantidad de CS añadido a los andamios mejora sus propiedades hidrofóbicas, al modificar la química de la superficie de los andamios. Sin embargo, esta mejoría ocurre a expensas de las propiedades mecánicas, ya que la reducción tanto de las interacciones del CMC con el AEQ durante la reticulación como de las interacciones entre sus materiales base (PLA/CMC) reducen la cohesión del andamio y, por ende, su estabilidad mecánica. Por lo tanto, es necesario definir un límite superior en la cantidad de CS que se le agrega a los andamios, así como una modificación sobre la metodología utilizada para agregar el GAG sulfatado.

5.2.5 Respuesta citotóxica previo a la eliminación de excedente de AEQ

La supervivencia y crecimiento de los fibroblastos murinos de la línea celular L929, que se sembraron previamente en los andamios multicapa, se evaluaron mediante la realización del ensayo AlamarBlue™, basado en fluorescencia de sales metabolizadas. Este análisis se llevó a cabo durante 1, 3 y 7 días de contacto directo con los andamios. Además, para validar el protocolo experimental y los resultados obtenidos se incluyeron dos controles positivos que consistían en el material precursor PLA, procesado tanto por EH como por impresión 3D, expuestos a la misma línea celular en conjunto con el medio de cultivo DMEM.

La Figura 5.7 presenta los resultados de la actividad celular metabólica después de 7 días de exposición a los andamios multicapa con diferentes niveles de CS. En primer lugar, es importante destacar que los materiales de referencia, PLA 3D y PLA EH, mostraron un bajo o nulo grado de toxicidad hacia las células, con valores aproximados entre el 95% y 102%, y entre el 94% y el 100%, respectivamente. De acuerdo con la normativa internacional ISO 10993-5:2009, para que un material pueda ser considerado como seguro para su uso en aplicaciones relacionadas al ámbito de la salud, debe tener al menos un 75% de viabilidad celular para considerar que posee un respuesta citotóxica mínima bajo condiciones fisiológicas simuladas *in vitro* [295].

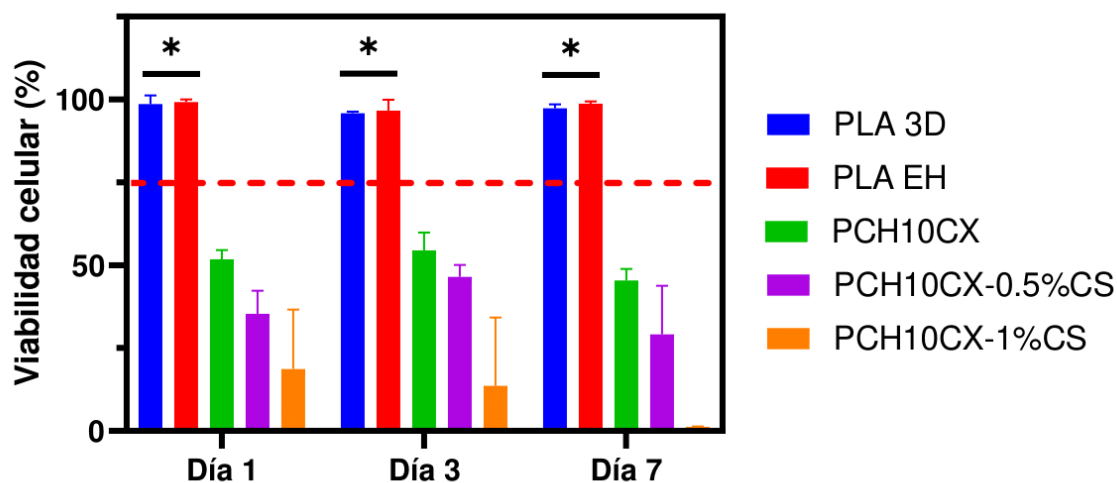


Figura 5.7. Viabilidad celular de lo Fibroblastos L929 después de 7 días de incubación sobre los andamios multicapa. $*(p>0.01)$.

Es relevante señalar que no se observa una diferencia significativa entre estos andamios durante los 7 días de exposición *in-vitro*. En el caso de los andamios multicapa, no parece que se presente una situación similar a la de los andamios control, ya que ambos controles muestran una diferencia significativa muy marcada. Al observar la Figura 5.7 es evidente notar que, en tan solo un día de interacción con las células; las estructuras entrecruzadas, además de la presencia de CS en concentraciones de 0.5 y 1% (p/p), parecen afectar negativamente la viabilidad celular en comparación con los controles positivos, alcanzando como máximo un 52% de viabilidad celular para el andamio PCH10CX. Esta disminución en la viabilidad persiste hasta llegar a tan solo un 1% después de 7 días de interacción directa para el andamio PCH10CX-1%CS.

La actividad citotóxica en los andamios puede observarse *in situ* en las Figuras 5.8 y 5.9, que presentan una comparativa de la morfología de los fibroblastos L929 desde el primer día de exposición a los andamios y al medio de cultivo, hasta alcanzar el séptimo día de exposición. Al analizar en la Figura 5.8, se aprecia que la morfología de los fibroblastos no difiere en ninguno de los controles ni en el medio de cultivo después de 7 días de exposición. En su mayoría, estas células exhiben una morfología tipo “adoquín”, un patrón característico que a menudo se observa cuando las células se

encuentran en una monocapa, generalmente debido a la disposición organizada y espaciada que toman en la placa de cultivo [318].

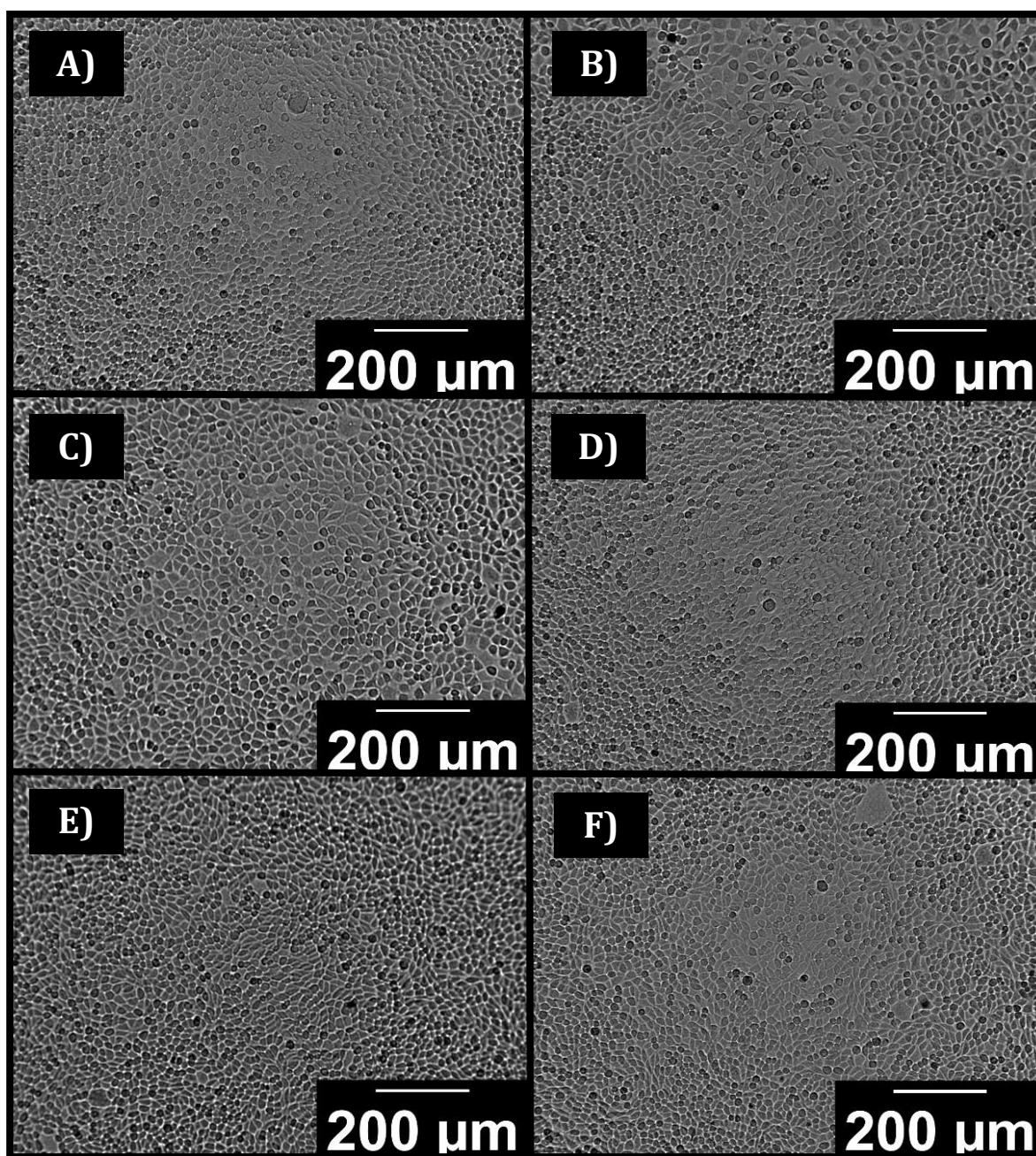


Figura 5.8. Morfología de las células expuesta al A) Medio de cultivo a 1 día y B) 7 días; Andamio PLA 3D a C) 1 día y a D) 7 días; Andamio PLA EH a E) 1 días y a F) 7 días.

Por otro lado, las células expuestas durante 7 días a los andamios multicapa (Figura 5.9) presentan un morfología diferente a los fibroblastos de la Figura 5.8. Estas células

presentan un apariencia más redondeada y encogida, típica de las células muertas [319].

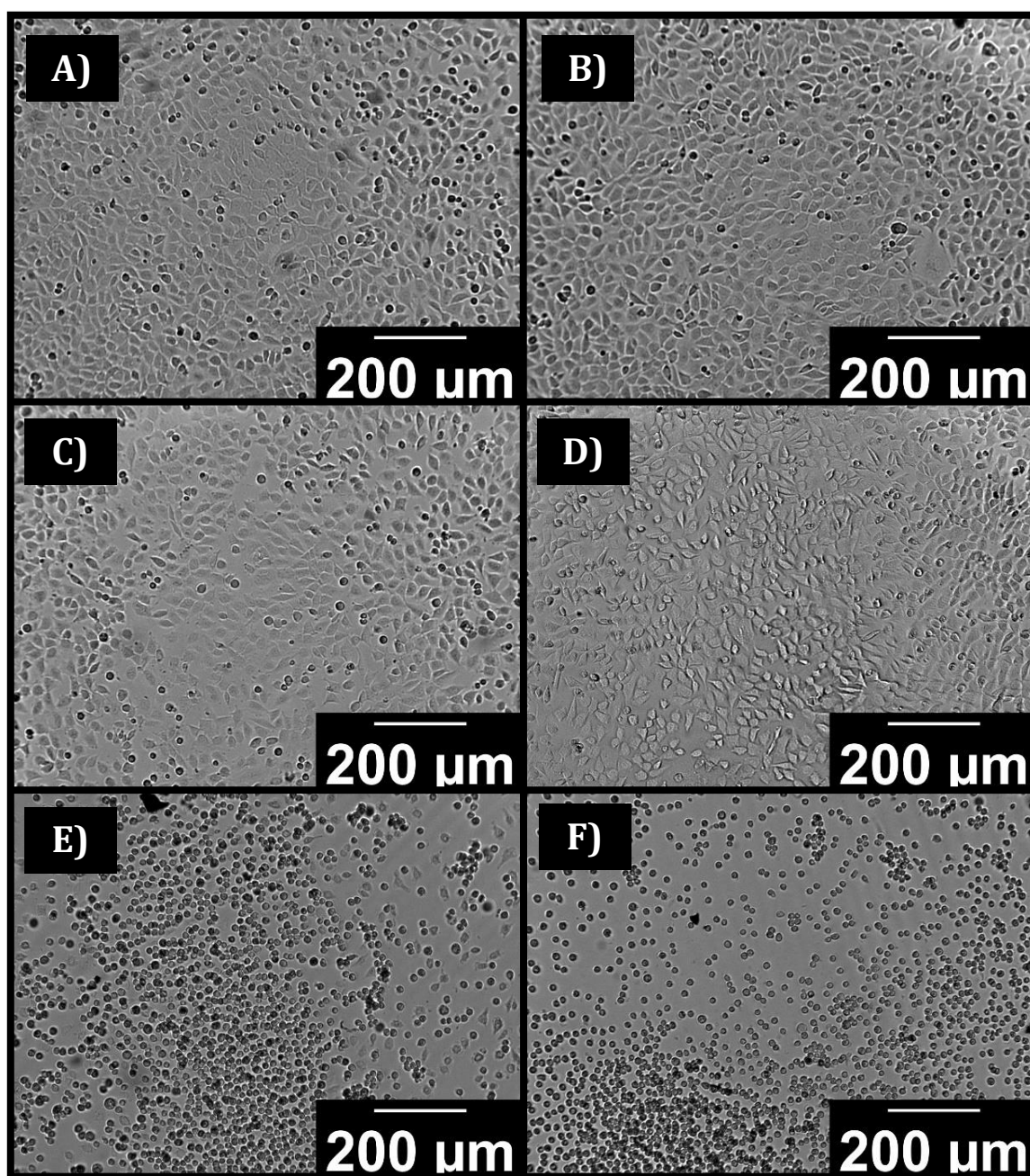


Figura 5.9. Morfología de las células expuesta a A)PCH10CX a 1 día y B) 7 días; PCH10CX -0.5%CS a c)1 día y D) 7 días; PCH10CX -1%CS a E) 1 días y F) 7 días.

Por su parte, los andamios PCH10CX y PCH10CX-0.5%CS (Figura 5.9A-D) presentan una combinación de ambos tipos de morfología, donde prevalece la morfología tipo

“adoquin”. Sin embargo, el caso más evidente de este comportamiento citotóxico lo muestra el andamio PCH10CX-1%CS, al predominar la morfología redonda y encogida (Figura 5.9E-F).

Esta citotoxicidad puede atribuirse a tres factores clave: en primer lugar, a pesar de que una concentración del 10% (p/p) de AC mostró resultados prometedores durante la elaboración del andamio por FDLF, al final resultó ser ineficaz bajo estas nuevas condiciones. La principal razón de esta ineficiencia radica en que, bajo esta metodología, la interferencia del CS durante el proceso de entrecruzamiento de la CMC, da como resultado un hidrogel mecánicamente insuficiente para actuar como soporte y medio de unión entre las capas al exponerlo a un ambiente con ciertas condiciones fisiológicas. Como se puede observar en la Figura 5.10A, al exponer los andamios poliméricos multicapa al medio de cultivo, estos se vieron afectados por la degradación hidrolítica en tan solo 7 días, provocando que cada una de las capas se separara, limitando considerablemente las condiciones para el crecimiento celular.

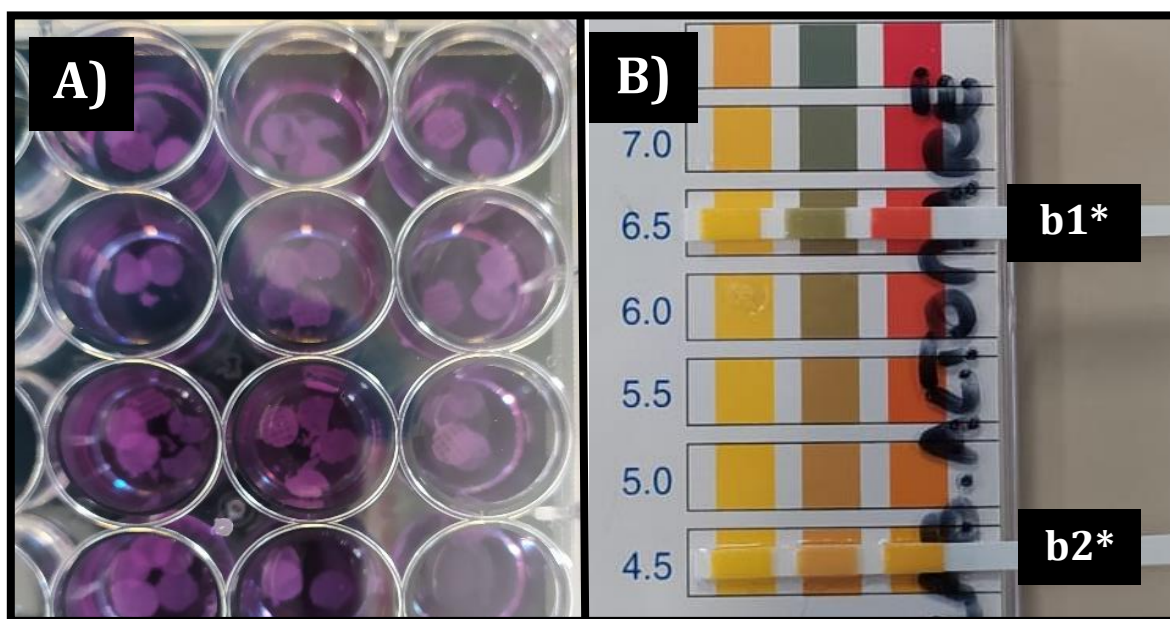


Figura 5.10. Posibles causas del efecto citotóxico. A) baja estabilidad estructural del andamio y b) pH ácido de los andamios observado a los 15 min de que la muestra entra en contacto con el agua (b2*), comparado con el pH del agua (b1*).

En primera instancia, esta modificación en la velocidad de degradación se podría atribuir a la concentración de sales minerales y algunos otros suplementos generalmente encontrados en el DMEM. Sin embargo, hasta el momento no existe información concreta sobre si el medio de cultivo y sus componentes tienen un impacto negativo en el rendimiento de los andamios, mucho menos en la magnitud observada en este estudio.

En algunos casos, el AC ha sido identificado como un agente de degradación en materiales poliméricos [186,227]. Según con Sharmin *et. al.* [186], esto se debe principalmente a su capacidad para acidificar el medio, ya que tiene la facultad intrínseca de donar electrones cuando se encuentra presente en medios acuosos [320,321]. Dado que los materiales procesados contienen una mayor cantidad de carboximetilcelulosa (CMC) entrecruzada en comparación con los andamios procesados por FDLP, la cantidad de AC remanente también aumenta, contribuyendo a la reducción del pH del agua desionizada de 6.5 a 4.5 después de 15 minutos de inmersión de los andamios (Figura 5.10b1-b2). Aunque el AC no se considera citotóxico, su presencia en las condiciones descritas anteriormente demostró acelerar la degradación de los materiales que lo contienen en exceso, como se muestra en la Figura 5.10A. Por lo tanto, la metodología previamente utilizada en el capítulo 3 para eliminar el excedente que no reaccionó resultó insuficiente.

Por otro lado, aunque el CS no resulta citotóxico hasta concentraciones por debajo del 6% (p/p), según los análisis más recientes de la FDA [322], su uso en concentraciones superiores puede tener efectos adversos en la actividad metabólica de las células sobre los andamios debido a varios mecanismos, lo cuales incluyen la alteración de la viscosidad del medio debido a la elevada producción de Glucosaminoglicanos (GAG) [323], la interferencia con la adhesión celular y con las interacciones proteína-célula en el medio de cultivo [324,325]. Específicamente, todos estos mecanismo se centran en la modificación química que genera el CS sobre la superficie de los andamios [326].

Al considerar los resultados de las propiedades mecánicas y las propiedades hidrofílicas, además de la alta concentración de AC remanente, no resulta sorprendente encontrar esta modificación en la velocidad de solvatación del hidrogel de CMC. Sin

embargo, este fenómeno se hace aún más evidente y rápido en el caso de los andamios cargados con condroitín sulfato (CS). La introducción de CS en esta red 3D puede interferir con la disposición de la red polimérica entrecruzada debido a la ocupación espacial y a que algunos de los grupos funcionales -OH del AC forman un complejo con los carboxilatos ionizados ($-\text{COO}^-$) del CS [327]. La formación de estos complejos puede dar lugar a una interacción iónica entre AC y CMC durante la reacción de entrecruzamiento. Por lo tanto, dado que algunos de los grupos hidroxilo del AC estarían enlazados con los carboxilatos del CS, es posible que la CMC solo pueda formar un entrecruzamiento parcial con el AC. De esta manera se explica por qué la adición de CS disminuyó las propiedades mecánicas, así como su comportamiento por FTIR, de manera dependiente de la concentración, corroborando los resultados del estudio realizado por Alinejad et. al. [328].

A pesar de que el CS promueve la dispersión y migración de las células debido al rol que presenta en la activación de factores de crecimiento relacionados con la adhesión focalizada [172] debido a la combinación de ciertos elementos, en los cuales se incluye el exceso de agente entrecruzante, así como una concentración por encima del 0.5% (p/p) de AC, al contrario de lo reportado por Alinejad et. al. [328], resultan en la generación de un ambiente tóxico para las células. Es por eso por lo que, para futuras evaluaciones, donde el CS se introduce directamente en la estructura durante una reacción de reticulación, se recomienda fijar como límite superior una concentración menor al 0.5% (p/p) de CS.

5.2.6 Respuesta citotóxica y actividad metabólica posterior a la eliminación de excedente de AEQ sobre fibroblastos L929.

El principal desafío que existe al momento de utilizar agentes de entrecruzamiento químicos (AEQ), es la necesidad de eliminar adecuadamente el exceso que no ha reaccionado ya que en la mayoría de los casos, éstos pueden tener efectos tóxicos en las células con las que interactúan [131,329]. Con el objetivo de abordar este problema, se modificó el protocolo experimental para reducir la presencia de agente entrecruzante remanente.

A diferencia de los resultados anteriores en concreto, la citotoxicidad mostró una reducción de hasta 52%, para el caso del andamio PCH10CX, después de realizar un protocolo de lavado más exhaustivo (Figura 5.11). Este aumento en la viabilidad celular es más notorio al tercer día de interacción de los fibroblastos con cada una de las muestras, sobre todo para los andamios con una concentración de 0.5% (p/p) de CS, los cuales mostraron una diferencia significativa con respecto a los otros dos tratamientos. No obstante, su comportamiento inicial, donde se observa una viabilidad celular cercana al 75%, se pudiera atribuir a este mismo efecto de interferencia descrito entre el CS y el AC.

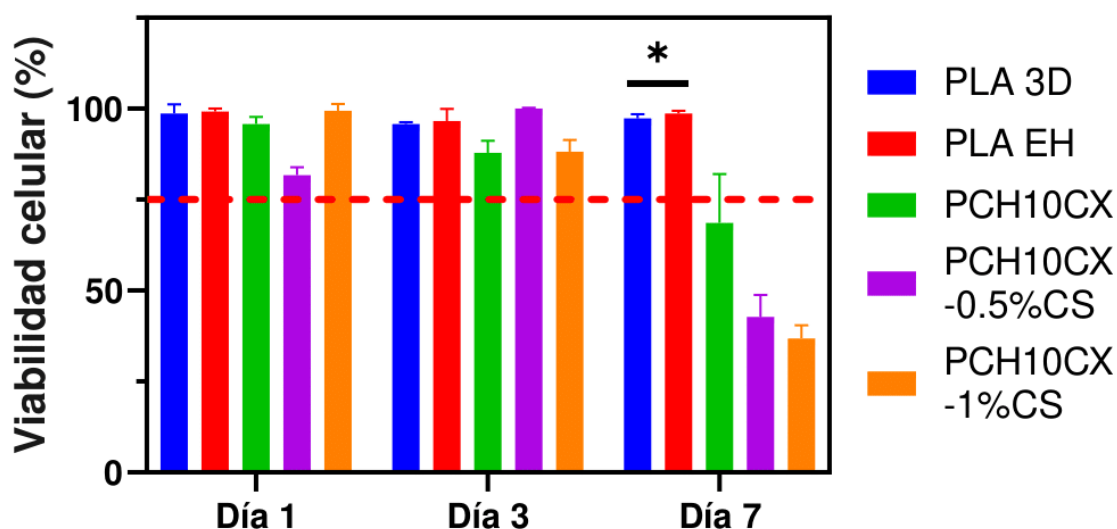


Figura 5.11. Respuesta citotóxica de la línea celular de los fibroblastos L929 posterior a la eliminación del exceso de AC. $*(p < 0.01)$.

A pesar de eliminar la presencia del exceso de AEQ, la viabilidad volvió a estar comprometida, alcanzando valores inferiores al 75% de viabilidad celular tras el último punto de muestreo. Este retroceso en el desempeño biológico podría deberse a los otros inconvenientes mencionados anteriormente, entre los que se incluye la reducción tanto de la estabilidad mecánica de los andamios multicapa como del hidrogel de CMC, por efecto de la incorporación de estas concentraciones de CS. Si la estabilidad mecánica se

ve comprometida, el andamio puede volverse menos eficaz como soporte estructural, lo que afecta negativamente la adhesión y migración celular [330,331].

Con el propósito de ahondar en el efecto citotóxico de estas concentraciones de CS, se analizaron los resultados de AlamarBlue™ de manera directa para obtener la actividad metabólica en RFU de los andamios multicapa PCH10CX, PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS. Como se aprecia en la Figura 5.12, después de un día de interacción de las células con los andamios, aquel que no está cargado con CS mostró una mayor actividad metabólica en comparación con los que sí lo están. Sin embargo, después del tercer día, se observó una modificación en esta tendencia, ya que los andamios cargados con CS muestran una mayor actividad, aunque en este punto no es posible determinar si hay una diferencia significativa en cuanto a la concentración de CS. Es hasta el séptimo día que se aprecia una clara diferencia entre los andamios PCH10CX-0.5%CS y PCH10CX-1%CS, siendo especialmente marcada en el andamio PCH10CX-0.5%CS en comparación con los demás.

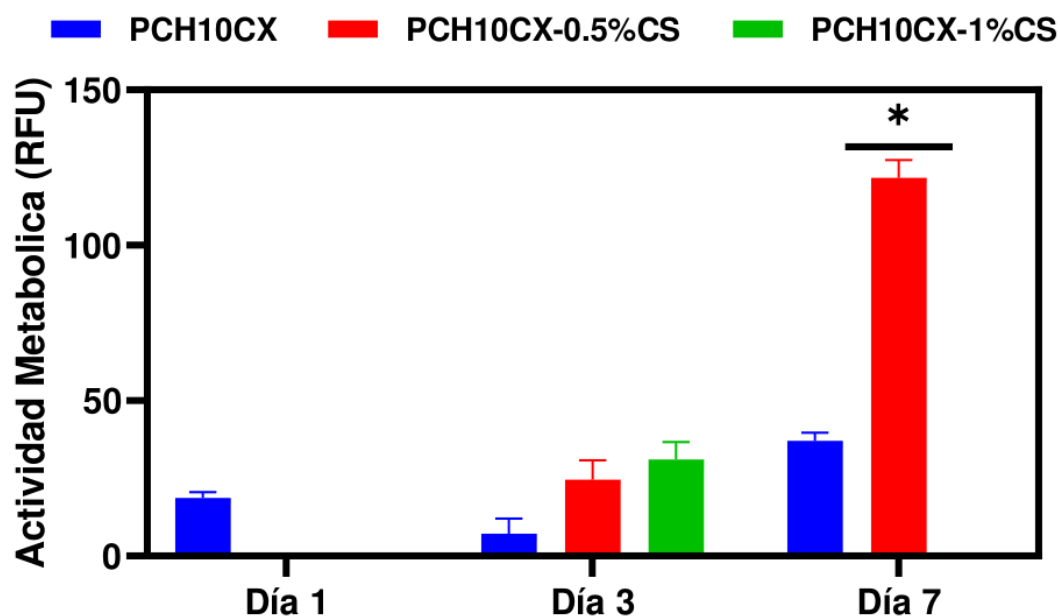


Figura 5.12. Respuesta de citocompatibilidad de la línea celular de los fibroblastos L929 posterior a la eliminación del exceso de AEQ. * ($p > 0.01$).

Este efecto tardío en la actividad metabólica puede ser causado por la metodología utilizada para introducir el CS a la estructura. A diferencia de lo que se encuentra comúnmente en la literatura, donde el CS se encuentra funcionalizado en la superficie de los andamios [332] en este caso, el CS se introduce en la superficie y muy seguramente se encuentra interactuando con el AEQ. Esto sugiere que, a medida que el hidrogel comienza a disolverse en el medio por efecto conjunto de la solvatación y la degradación hidrolítica, el CS se vuelve químicamente más disponible para interactuar con las células y aumentar su actividad metabólica [57,333], como se observa en la Figura 5.12.

Para este análisis, los resultados indican que las concentraciones superiores al 1% (p/p) de CS, en conjunto con la modificación de la química superficial por parte del CMC, en forma de recubrimiento, así como el exceso de AEQ remanente, finalmente contribuyen a la disminución de las propiedades mecánicas del andamios después de 7 días de exposición al medio acuoso. Si bien, la modificación del protocolo para eliminar el exceso de AC benefició significativamente la viabilidad celular de los andamios en comparación con los que tenían exceso de AEQ, aún se requiere la modificación de más condiciones experimentales (modificar la concentración de AEQ y CS) con el objetivo de asegurar un mejor rendimiento biológico.

5.3 Notas finales del capítulo

El uso de un hidrogel de CMC, tanto para unir las diferentes capas de PLA como para funcionar como soporte a moléculas bioactivas como el CS, se presenta como una estrategia prometedora. Sin embargo, al introducir concentraciones de CS por encima del 0.5% (p/p) directamente en la estructura, conduce a una reducción de la cohesión de todas las partes del andamio. Además, al emplear una concentración de AC por debajo del 10% (p/p), en conjunto con la metodología para integrar esta concentración de CS, propició una alta capacidad de retención de agua que, junto con la presencia de este AEQ sin reaccionar en el entorno, afectó negativamente las propiedades mecánicas, comprometiendo la estabilidad de estos andamios y finalmente, disminuyendo la viabilidad celular tras el séptimo día de interacción.

CAPITULO 6. Andamios poliméricos 3D multicapa, con base en PLA-CMC y agregados bioactivos para ingeniería de cartílago articular.

En la búsqueda constante de soluciones innovadoras en la ingeniería de tejidos, la utilización de andamios poliméricos multicapa ha emergido como una estrategia prometedora para la regeneración del cartílago articular. Estos andamios, con base en una matriz de poli(ácido láctico) (PLA) y carboximetilcelulosa (CMC), ofrecen una plataforma tridimensional (3D) que imita las características fundamentales del tejido cartilaginoso, una estructura esencial en nuestro sistema musculoesquelético.

La ingeniería del cartílago articular es considerada como un desafío científico y médico de gran envergadura, dado que este tejido tiene una capacidad limitada de autorreparación. Los andamios poliméricos multicapa representan una estrategia versátil para abordar este problema, al proporcionar un soporte mecánico y estructural que fomenta el crecimiento y la diferenciación de células en el sitio de la lesión. Además, la incorporación de agregados, como el condroitín sulfato (CS), ofrece una oportunidad única para influir en las propiedades biomecánicas y bioquímicas del tejido regenerado.

El capítulo 6 aborda la evaluación integral de los andamios multicapa basados en PLA-CMC. En esta ocasión, los andamios multicapa se sometieron a un tratamiento térmico posterior al proceso de reticulación con una concentración de 20% (p/p) de AC en su estructura. Siguiendo el enfoque del capítulo anterior, se investigó la interacción de estos andamios, ahora denominados PCH20CXT, con diferentes concentraciones de CS [0.25% y 0.5% (p/p)].

6.1 Metodología experimental

6.1.1 Construcción del andamio multicapa

Se utilizaron secciones de 20 x 20 mm de cada una de las tres capas para construir el andamio bioinspirado. Inicialmente, se pesó una muestra de CMC en una relación 1:1 (p/p) con respecto a la cantidad total de PLA utilizado (Figura 6.1A). Posteriormente,

se prepararon tres soluciones en vasos de precipitado, donde se combinó el CMC con 20% (p/p) de AC con relación a la cantidad de CMC y agua desionizada en una proporción de 1mL por cada 100 mg de CMC. Después de 30 minutos de agitación constante a 1000 rpm, se agregaron 0%, 0.25% y 0.50% (p/p) de CS con relación a la masa combinada de PLA y CMC. Las soluciones finales, se agitaron bajo las mismas condiciones por 15 min en una parrilla de agitación magnética (Figura 6.1B).



Figura 6.1. Esquema de la metodología propuesta para construir andamios poliméricos multicapa. (a) determinación de la cantidad de CMC; (b) formulación de la solución de anclaje; (c) montaje del andamio, (d) entrecruzamiento de los polímeros y (e) unión de las capas por temperatura.

Al finalizar el tiempo de agitación, se obtuvo una pasta transparente que se dispuso junto con secciones cilíndricas de 6 mm de diámetro de cada uno de los andamios, específicamente, una sección correspondiente a la impresión 3D, tres secciones provenientes del EH y finalmente una sección de FDLF. Estas se colocaron sobre un molde cilíndrico con diámetro de 7 mm x 2 mm de altura, disponiendo de todo el volumen disponible (Figura 6.1C). Posteriormente, el molde se introdujo en una estufa de laboratorio a 100°C por 1 hora, con el fin de completar la reacción de entrecruzamiento (Figura 6.1D), y 15 minutos a 180°C en una termobalanza OHAUS MB45 (Figura 6.1E) Esto permitió obtener tres tipos de andamios multicapa con

diferente contenido de CS: 0%, 0.5% y 1%. Estos andamios se identificaron como PCH20CXT, PCH20CXT-0.25%CS y PCH20CXT-0.5%CS respectivamente.

6.1.2 Eliminación del agente de entrecruzante residual

La eliminación adecuada del ácido cítrico residual del proceso de entrecruzamiento es de suma importancia, ya que un exceso de este compuesto, a pesar de sus propiedades previamente mencionadas como seguras para el cuerpo humano, podría alterar el pH de la solución, creando un entorno ácido [292] que no favorecería la proliferación celular. Para llevar a cabo este proceso, los andamios previamente curados se colocaron en una placa de 96 pocillos bajo una campana de flujo laminar.

Se realizaron una serie de lavados con agua estéril, utilizando un volumen de 250 μ L por cada lavado, con un periodo de reposo 30 minutos entre cada lavado hasta alcanzar un pH de 6.5 (Figura 6.2A). Al alcanzar el pH de 6.5, se remplazó el agua por 250 μ L DMEM. Siguiendo una estrategia similar, se realizaron lavados adicionales utilizando el mismo volumen de DMEM, pero con un tiempo de reposo de 1 hora entre cada lavado. Esto se hizo con el propósito de alcanzar un pH en la solución de 8.5. Finalmente, los residuos de DMEM fueron refrigerados para su posible uso futuro (Figura 6.2B).

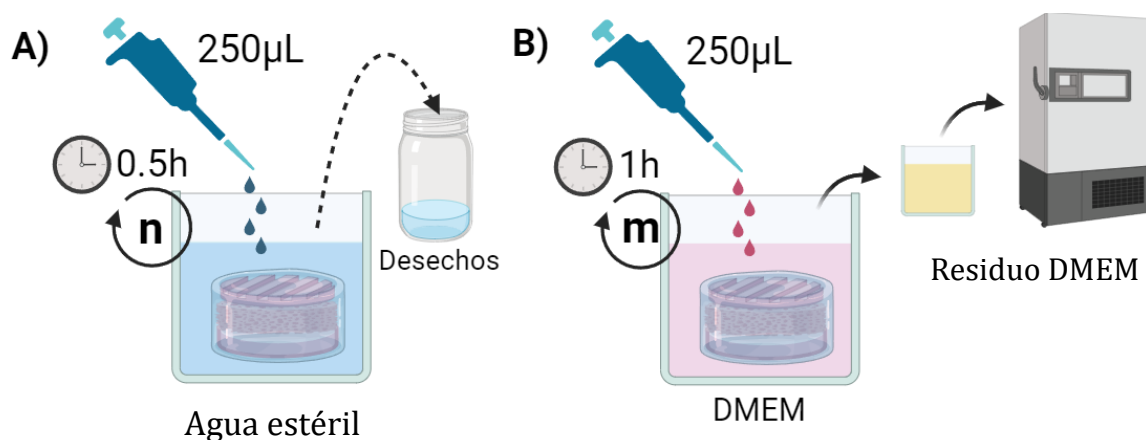


Figura 6.2. Metodología para la remoción de AC remanente: **A)** ajuste de pH con agua estéril hasta alcanzar pH de 6.5 y **B)** ajuste de pH con medio de cultivo hasta alcanzar un pH de 8.5.

6.1.3 Caracterización macroscópica cualitativa

Se utilizó un lente macro de 2Mpx con una apertura de f/2.4 de un smartphone Redmi Note 8® e iluminación artificial con tonalidad blanca para la adquisición de las fotografías.

6.1.4 Caracterización espectroscópica

La identificación de especies químicas de los andamios multicapa se realizó mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) utilizando un espectrofotómetro ThermoScientific Nicolet iS10 en el modo de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros de cada muestra se registraron a temperatura ambiente en el intervalo de número de onda de 600–4000 cm^{-1} , con 32 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} .

6.1.5 Caracterización morfológica

Para las muestras correspondientes a los andamios multicapa PCH20CXT, PCH20CXT-0.25%CS y PCH20CXT-0.5%CS, se llevó a cabo un proceso de fractura criogénica. Enseguida, estas muestras se montaron en un porta muestras de aluminio tipo Stub, con un corte angular de 45°, utilizando cinta doble cara de carbón. Todas las muestras se recubrieron con oro durante 30s, a 4 mA en condiciones de vacío mediante un Cressington 108 auto.

La morfología y la identificación de las distintas partes que componen los andamios multicapa se evaluaron mediante un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM) FEI QUANTA 250. Este equipo estaba equipado con un detector EDAX y se operó en condiciones de bajo vacío, utilizando un voltaje de 5-10 kV y una presión de 110-130 Pa.

6.1.6 Caracterización de la humectabilidad por ángulo de contacto y capacidad de retención de agua.

6.1.6.1 Ángulo de contacto

La humectabilidad de los andamios multicapa basados en PLA-CMC-CS, fueron evaluados a temperatura ambiente mediante un goniómetro Biolin Scientific TL100 utilizando la técnica de gota sésil y se analizó con el software de imagen One Attetion. Para realizar el análisis de mojabilidad se colocó una gota de agua desionizada ($\approx 2.5\mu\text{L}$) sobre la superficie de los materiales con una jeringa micrométrica, posteriormente se capturaron las imágenes a un segundo para evaluar el ángulo de contacto entre la gota de agua con la superficie del andamio mediante la ecuación de Young-Laplace.

6.1.6.2 Capacidad de hinchamiento

La prueba de retención de agua se realizó sumergiendo los andamios multicapa en fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés) dentro de un horno de laboratorio Thermo Scientific Precision PR305225M a 37°C . Las muestras se pesaron, retirando el exceso de líquido mediante centrifugación de acuerdo con la norma NMX-C-428-ONNCCE-1995 (3000 rpm por 10 min), a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 24, 48, 72, 168, 336 y 504 horas) para determinar el grado de hinchamiento en función del tiempo. La relación de hinchamiento ($\Delta W\%$) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta W\% = \frac{W_x - W_o}{W_o} \times 100$$

Donde W_x el peso de la muestra hinchada y W_o el peso de la muestra seca antes de entrar en contacto con SBF.

6.1.7 Caracterización mecánica por compresión

Las propiedades mecánicas de compresión de los andamios compuestos ($n=3$) se evaluaron utilizando una máquina de ensayo universal Instron 3369 a temperatura ambiente. El ensayo de compresión se realizó bajo los parámetros establecidos por la norma ASTM D695-15, tomando como referencia el trabajo de R. Donate *et. al.* [293], con una celda de carga de 50 N.

6.1.8 Caracterización térmica

Se evaluaron las propiedades térmicas de los andamios multicapa con variación en la concentración de CS utilizando un calorímetro diferencial de barrido modelo Q2000 de TA Instruments. Para ello, se precisaron 5 ± 1 mg de cada muestra y se dispusieron en un porta-muestras de aluminio sin tapa. El análisis se llevó a cabo en un ciclo único bajo una atmósfera de nitrógeno. La muestra se enfrió hasta alcanzar los 5°C, se mantuvo en equilibrio durante 1 minuto y posteriormente se elevó la temperatura a 250°C con una velocidad de calentamiento de 20°C/min.

6.1.9 Caracterización biológica

6.1.9.1 Cultivo celular

Se obtuvieron de Científica SENNA®, células madre mesenquimales (CMM) extraídas de cordón umbilical humano, de la línea celular 500-010. Posteriormente, para su replicación, las células obtenidas fueron cultivadas en DMEM con suplementación al 10% en suero bovino fetal y antibiótico al 1% (10.000 unidades de Penicilina, 10mg de estreptomicina y 25µg/mL de anfotericina B de Sigma Aldrich) a una temperatura de 37°C con 95% de humedad y una atmósfera al 5% de CO₂.

6.1.9.2 Proliferación cuantitativa por medio del ensayo AlamarBlue®

Las pruebas de citotoxicidad relativa *in-vitro* por medición indirecta en todos los andamios, se realizaron de acuerdo con la práctica internacional ISO 10993-12:2021 [188] y las indicaciones del fabricante Invitrogen/Thermo Fisher Scientific para el ensayo AlamarBlue® [188,334]. Para estas pruebas, se emplearon células madre mesenquimales (CMM) de la línea celular 500-010. Se obtuvieron eluciones del medio de cultivo (es decir, el medio en contacto con las muestras a evaluar) colocando las muestras (n=3 por cada punto temporal) en placas de cultivo de 96 pocillos y añadiendo 150 µL de medio de cultivo a cada muestra. Las muestras se incubaron a una temperatura de 37°C con una concentración de 5% de CO₂ durante 1, 3 y 7 días.

Para la evaluación de la citotoxicidad relativa de los andamios, las células CMP-500-010 se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de 1×10^4 células por pocillo

y se cultivaron durante 24 horas. Después de ese lapso, el medio de cultivo de cada pocillo fue reemplazado por los eluatos obtenidos de la interacción de los andamios con el medio de cultivo por día de muestreo. Después de 24 horas, se agregaron 50 μL de la solución Alamar Blue™ y se incubó durante 4 horas a una temperatura de 37°C bajo una atmosfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se transfirieron 200 μL de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos. La fluorescencia resultante se midió en un espectrofotómetro BioTek Synergy™ H1. Finalmente se calculó el porcentaje de viabilidad celular mediante la siguiente ecuación:

$$viabilidad\ celular\ [\%] = \frac{f_{eluato} - f_{AlamarBlue}}{f_{control} - f_{AlamarBlue}}$$

Donde f_{eluato} es el valor de fluorescencia de la células en contacto con el eluato, $f_{control}$ es el valor de la fluorescencia del medio de cultivo usado como control y $f_{AlamarBlue}$ es el valor de fluorescencia de la solución de AlamarBlue®.

Las pruebas de citocompatibilidad *in-vitro* por medición directa se realizaron utilizando células CMP-500-010 durante un máximo de 7 días, sembrando 1×10^4 células en cada muestra, como se describió para las pruebas de citotoxicidad. En cada punto temporal (1, 3 y 7 días), se realizó el ensayo de AlamarBlue™ como se describió anteriormente. La actividad metabólica de las células sembradas en las andamios se evaluó utilizando la Unidad de Fluorescencia Relativa (RFU), obtenida mediante la siguiente ecuación:

$$RFU = RFU_{Muestra\ con\ células} - RFU_{Muestra\ sin\ células}$$

6.1.9.3 Detección de apoptosis mediante tinción con DAPI

La tinción de las líneas celulares 500-010 y su posterior examen a través de microscopía de fluorescencia representan métodos adecuados para evaluar los cambios morfológicos y la expresión de citotoxicidad en la membrana celular y la cromatina. Se empleó el método de tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), según lo descrito por Benítez-Arvizu *et. al.* [335], para observar los indicadores visuales de apoptosis en

las células tratadas. Los cambios morfológicos relacionados con la apoptosis se detectaron utilizando el Bio-Rad ZOE Fluorescent Cell Imager, tras la tinción de las células con 1 µg/mL de DAPI PureBlu™ (Biorad, #1351303EDU).

6.1.9.4 Extracción y cuantificación de ARN total

Las muestras de los andamios se recolectaron en el último punto temporal (día 7) de exposición a las células para extracción y cuantificación de ARN de acuerdo con los lineamientos establecidos por el fabricante [336]. Por cada 100 mg de muestra, se añadió 1 mL de TRIzol (Roche, 11-667-157-001) y se mantuvieron a 4°C durante 2 días. Pasados los dos días, las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se homogenizaron utilizando el equipo VX-200 Vortex Mixer hasta lograr una disolución completa. Posteriormente, se agregaron 0.2 mL de cloroformo (Sigma, C2432) por cada 1 mL de TRIzol; enseguida, las muestras se agitaron enérgicamente durante 15 segundos y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente bajo una campana de flujo laminar.

Después de esta incubación, se centrifugaron las muestras a 12,000 g durante 15 minutos a 5°C utilizando una microcentrífuga Thermo Scientific Solvall Legend Micro 21R. Terminada la centrifugación, se recolectó la fase acuosa superior incolora en tubos estériles de 1.5 mL y se añadió 0.5 mL de isopropanol (Sigma, I9516) por cada 1 mL de TRIzol agregado. Se cerraron los tubos y se invirtió varias veces para homogenizar la solución. Las muestras se incubaron nuevamente durante 10 min a temperatura ambiente para precipitar el ARN. Al término de la incubación, se realizó un segundo proceso de centrifugación utilizando las mismas condiciones, pero reduciendo el tiempo a 10 min; al finalizar se descartó el sobrenadante.

A continuación, se añadió 1 mL de una solución al 75% de etanol absoluto (Merk, 54-17-5) por cada 1 mL de TRIzol añadido. Los tubos se agitaron vigorosamente en el vortex para eliminar el isopropanol residual y luego se centrifugaron por tercera ocasión a 7,000 g durante 5 minutos a 5°C. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar al aire en la campana de flujo laminar. Finalmente,

el pellet se resuspendió en 30 µL de agua destilada libre de Nucleasas (Promega, P119E). La concentración y pureza del ARN extraído de las muestras se evaluó con 1 µL en el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific, NanoDrop, USA). La concentración final de ARN total de todas las muestras se ajustó a 50 ng/µl para los análisis posteriores.

6.1.9.5 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

Este procedimiento involucró dos ensayos fluorogénicos de un paso utilizando los sistemas SuperScript™ III Platinum™ y SuperScript® III Platinum® SYBR® Green (Invitrogen, 11732-020 y 11736-051, respectivamente). Se prepararon dos reacciones estándar, cada una con un volumen final de 50 uL. En ambas reacciones, se utilizaron 0.7 µL de la solución que contenía el ARN total, junto con 1 µL de la mezcla de enzimas transcriptasa reversa SuperScript™ III y ADN polimerasa Platinum™ Taq, utilizadas para realizar la transcripción inversa del RNA a ADNc y amplificarlo durante la etapa de desnaturalización en la PCR. Adicionalmente, se añadieron 1.25 uL de la mezcla maestra de un solo paso para virus TaqMan™ Fast (Invitrogen, 4444434) junto con el kit SuperScript™ III Platinum™. A continuación, el ADN complementario (ADNc) obtenido en ambos ensayos se utilizó como molde para la amplificación de los genes diana indicados en la Tabla 6.1, que incluye los genes Shh, Bmp4, Runx2, Sox9, Agrecano (Acan) y colágeno tipo II alfa 1 (Col2a1). Las secuencias de los cebadores (ver Tabla 6.1) se obtuvieron de las investigaciones previas realizada por Zhou *et. al.*, Hu *et. al.* y Zhong *et. al.* [337–339]. Las muestras se analizaron por triplicado bajo las condiciones de temperatura estándar para qRT-PCR en un termociclador de microplacas Thermo Scientific QuantStudio™ 1. Todos los reactivos utilizados y volumen restantes para cada reacción de amplificación se ajustaron siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante [340,341].

Tabla 6.1. Cebadores utilizados para el análisis qRT-PCR.

Gen	Directo	Inverso
<i>SuperScript™ III Platinum™</i>		

<i>Shh</i>	GCT GAC AGA CTG ATG ACT CA	TCG TAG TGC AGC GAT TCC TC
<i>Bmp4</i>	CCC AGT TAC ATG CTG GAT C	CTTCGTAAATGTTTATCCG
<i>Runx2</i>	GTG ATA AAT TCA GAA GGG AGG	CTT TTG CTA ATG CTT CGT GT
<i>SuperScript® III Platinum® SYBR® Green</i>		
<i>Sox9</i>	GGC GGA GGA AGT CGG TGA AGA A	GGC GGA GGA AGT CGG TGA AGA A
<i>Col2A1</i>	GTC TGT GAC ACT GGG ACT GT	TCT CCG AAG GGG ATC TCA GG
<i>Acan</i>	CTG CAG ACC AGG AGG TAT GTG A	GTT GGG GCG CCA GTT CTC AAA T

6.1.9.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad, La Jolla, CA). Se realizó un análisis ANOVA de dos vías, mediante la prueba de Tukey. Cuando se obtuvo una $p < 0.05$, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas.

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Efecto del tratamiento térmico y la introducción del CS sobre las propiedades fisicoquímicas y térmicas de los andamios multicapa.

6.2.1.1 Caracterización macroscópica

La Figura 6.3 ilustra las características físicas macroscópicas de los andamios sumergidos durante 1 hora en agua desionizada, con concentraciones del 10% (Figura 6.3A) y 20% (Figura 6.3B) de AC. Bajo los criterios y consideraciones establecidos en el capítulo anterior, se lograron obtener los andamios multicapa de la Figura 6.3B.

Manteniendo la misma cantidad de CMC, pero aumentando la concentración de AC, el hidrogel en cuestión reduce su volumen, en comparación con las muestras que poseen una concentración menor de AC [10% (p/p)], al interactuar durante 1 hora con agua desionizada, como se observa en la Figura 6.3B. Respecto a la concentración de CS, al igual que en los resultados macroscópicos del capítulo 4, no parece tener un efecto visualmente significativo en el hidrogel, posiblemente debido a la baja concentración utilizada.

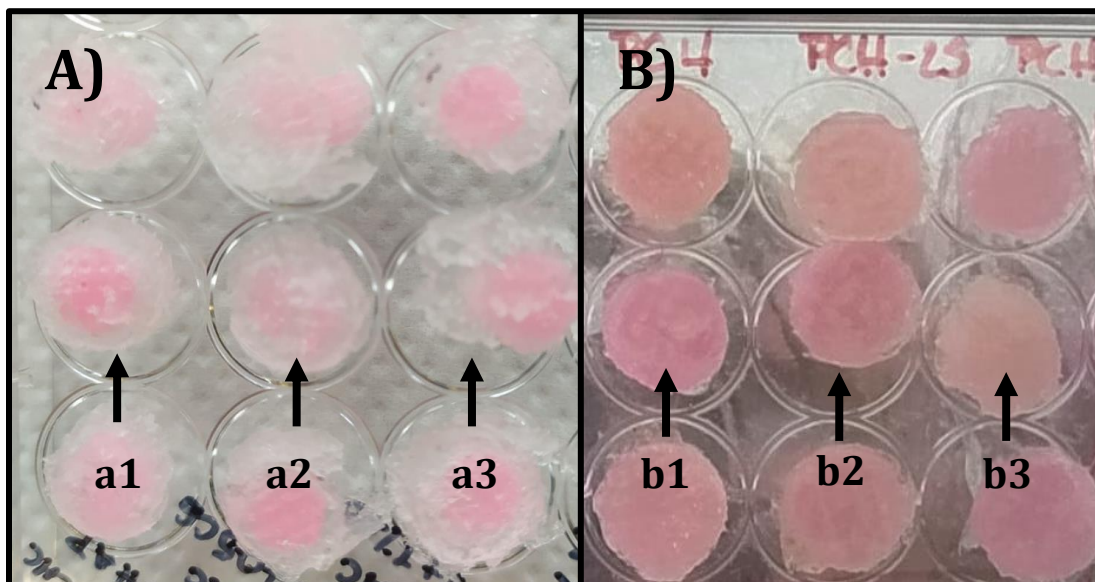


Figura 6.3. Diferenciación macroscópica de los andamios en función de la concentración de AC: **A)** 10% y **B)** 20%AC. Así como la variación en concentración de CS en cada una: a1) y b1) 0%; a2) 0.5% y b2) 0.25%CS; a3) 1% b3) 0.5%CS.

Estas observaciones macroscópicas sobre el comportamiento de los andamios multicapa al variar la concentración de AC y CS serán fundamentales para las evaluaciones posteriores de sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y biológicas, que se presentarán a continuación.

6.2.1.2 Caracterización de la química superficial mediante la espectroscopía FTIR-ATR.

6.2.1.2.1 Descripción espectroscópica del efecto que genera el cambio de concentración de AC y la exposición a un tratamiento térmico en los andamios multicapa.

De acuerdo con la literatura, la morfología de un material polimérico puede verse alterada por factores externos al proceso de fabricación, generando un impacto significativo en sus propiedades y aplicaciones. Exponer un material polimérico a cambios controlados de temperatura proporciona la energía térmica necesaria para la cristalización o la recristalización de las cadenas poliméricas [252]. Además, la incorporación de AEQ altera su disposición tridimensional, lo que puede influir en su

estructura interna y propiedades [194]. El análisis FTIR-ATR, ilustrado en la Figura 6.4, desempeña un papel fundamental en la evaluación de cómo la temperatura y la concentración de agentes entrecruzantes pueden afectar la estructura y las propiedades de los andamios multicapa. Al analizar las bandas de absorción infrarroja (ver Tabla 6.2) en función de las condiciones de procesamiento, es posible obtener información detallada sobre la reorganización de las cadenas poliméricas.

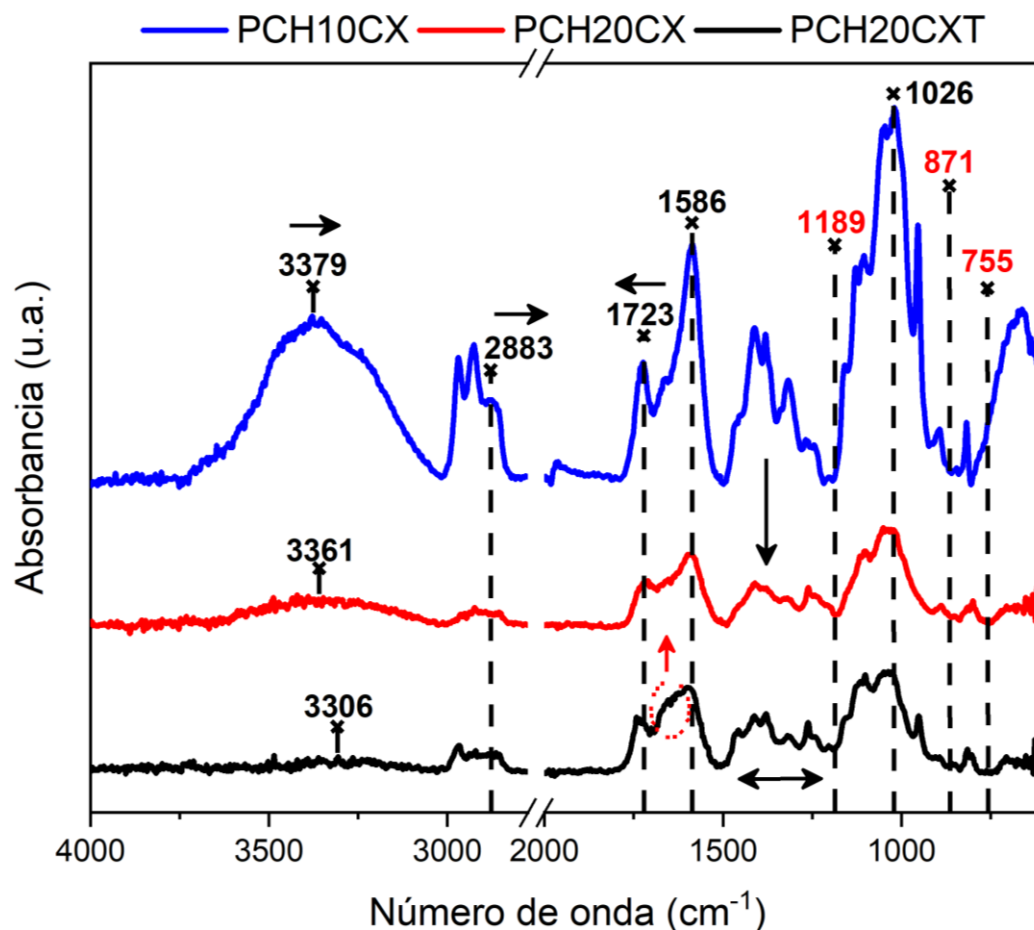


Figura 6.4. Espectros FTIR-ATR obtenido de los andamios multicapa al modificar la concentración de AEQ y exponerlos a un tratamiento térmico posterior.

Es importante destacar que al duplicar la concentración de AC utilizada para reticular la estructura del hidrogel, se producen modificaciones en el espectro FTIR del andamio PCH20CX. Esto se manifiesta en el desplazamiento de algunas de sus bandas hacia números de onda mayores, como las bandas características de los hidroxilos a

3379 cm^{-1} [248] y la banda de estiramiento asimétrico a 2883 cm^{-1} de los enlaces -CH en los metilos [243]. Este cambio implica que la exposición a una mayor concentración de agente de entrecruzamiento conduce a una reorganización de las cadenas poliméricas. Un indicio claro de esta reorganización es la desaparición de la banda a 1026 cm^{-1} , que corresponde a la vibración de los enlaces -C-O presentes en la cadena central del CMC [342]. Esto se debe a la mayor cantidad de enlaces covalentes formados entre los grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) del CMC y los hidroxilos ($-\text{OH}$) del AC.

Tabla 6.2. Asignación de las bandas identificadas en los andamios multicapa con una mayor concentración de AEC y un tratamiento térmico.

Número de onda (cm^{-1})	Grupos funcionales	Modo vibracional
1026	-C-O	Flexión
1586	$-\text{COO}^-$	Tensión
1723	-C=O	
2800-3000	-C-H, $-\text{CH}_3$	Tensión simétrica y antisimétrica
3000-3500	-OH	Tensión

En cuanto a la banda característica del PLA a 1747 cm^{-1} , su desplazamiento hasta 1723 cm^{-1} para ambos casos, PCH10CX y PCH20CX, se atribuye a la interacción mediante enlaces secundarios entre el PLA de los andamios y la CMC del hidrogel [201]. Es interesante notar que el uso de una concentración al 20% (p/p) pareciera no modificar estas interacciones.

Es importante señalar que, aunque se observan cambios en la absorción de todo el espectro cuando se duplica la cantidad de AC (andamio PCH20CX), no se puede confirmar con certeza que estos cambios sean exclusivamente ocasionados por la concentración de AC. No obstante, investigaciones anteriores sugieren que una mayor presencia de agente de entrecruzamiento químico (AEQ) reduce la absorción en la

banda de los hidroxilos ($3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) y la banda a 1586 cm^{-1} , correspondiente a los carboxilatos (-COO^-) del CMC, durante reacciones de esterificación [343,344]. Para contrastar estos resultados, sería necesario realizar mediciones de FTIR bajo el modo de transmisión o utilizar técnicas cuantitativas que permitan la adquisición precisa de especies químicas.

Al examinar el espectro del andamio PCH20CX después del tratamiento térmico (PCH20CXT), se observan ciertas modificaciones sobre éste. De nuevo, las bandas mencionadas anteriormente (3379 y 2883 cm^{-1}) muestran un desplazamiento hacia números de onda mayores. Sin embargo, en el caso del andamio PCH20CXT, la banda característica del PLA a 1723 cm^{-1} se desplaza hacia número de onda menores. Este comportamiento de la banda de los C=O se atribuye a un reordenamiento estructural del polímero inducido por la energía térmica [345,346].

A pesar de que se forma una mayor cantidad de enlaces primarios en la estructura del CMC, este tratamiento térmico, a primera vista, parece modificar únicamente al PLA, tanto en sus grupos metilo y carbonilo, como en su cadena principal. Esto se evidencia mediante la aparición de bandas más definidas en la región de $1250\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, así como el ensanchamiento en la región de $1580\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. Además, la desaparición de la banda a 1189 cm^{-1} que corresponde a la vibración de tensión de los enlaces C-O-C presente en los ésteres, se atribuye a la limitación espacial impuesta por los enlaces covalentes presentes en la estructura del hidrogel de CMC, especialmente a partir de una concentración del 10% (p/p) de AC.

Aunque en primera instancia, el aumento en la concentración del AEQ parece no afectar las interacciones entre el CMC y el PLA, sí podría contribuir a reducir la movilidad de del PLA, por efecto de una mayor formación de enlaces durante la esterificación. Además, dado que el tratamiento térmico sólo afecta al PLA, tal como se describe en la Figura 4.3, éste podría alterar su disposición molecular y, por ende, facilitaría un mejor contacto entre estos grupos ramificados.

6.2.1.2.2 Descripción espectroscópica del efecto que genera la variación en la concentración de bajas cantidades de CS en los andamios multicapa.

Por otro lado, la introducción de agentes externos, como biopolímeros, a las matrices poliméricas es un enfoque clave en la modificación de las propiedades y estructuras de los andamios. Estos biopolímeros se incorporan con el objetivo de mejorar la biocompatibilidad y las propiedades específicas de estos materiales. La adición de biopolímeros puede desencadenar cambios significativos en la estructura y morfología de los andamios poliméricos, lo que a su vez puede influir en su desempeño en diversas aplicaciones. En este contexto, el análisis FTIR presentado en la Figura 6.4, juegan un papel fundamental al proporcionar información detallada sobre las modificaciones que ocurren en los andamios multicapa como resultado de la incorporación de bajas concentraciones de condroitín sulfato (CS).

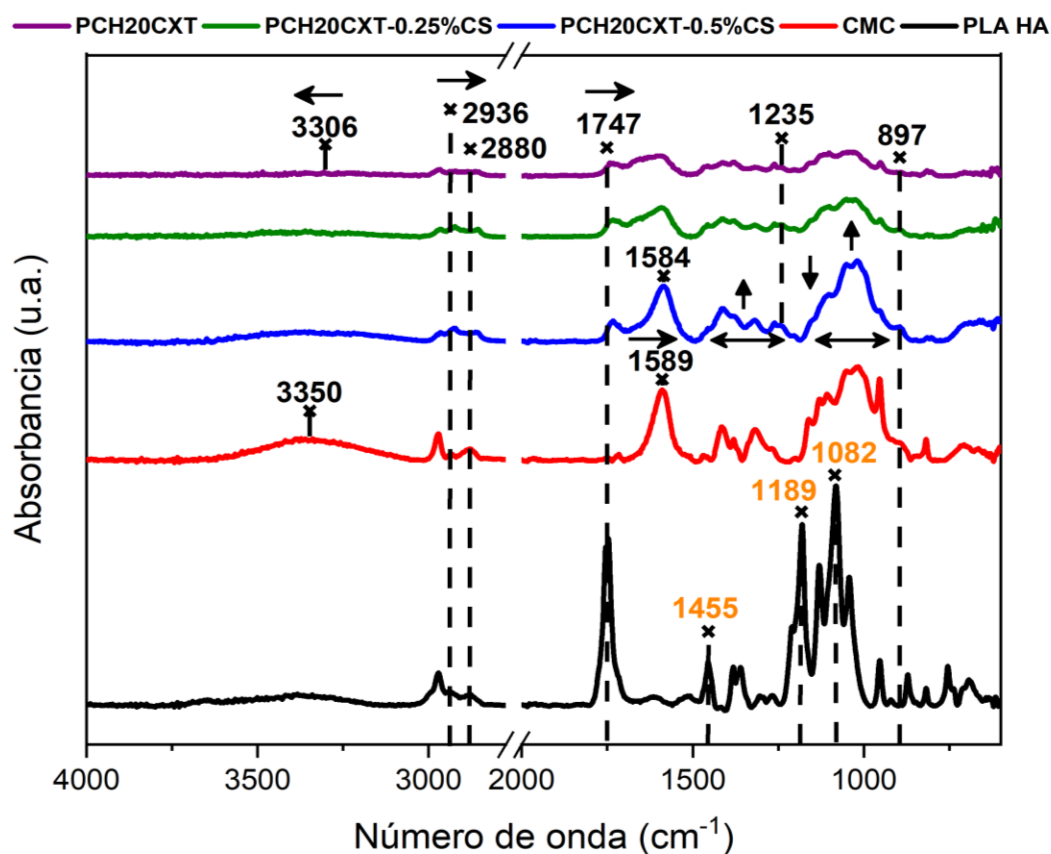


Figura 6.5. Espectros FTIR-ATR obtenido de los andamios multicapa con tratamiento térmico al modificar la concentración de CS.

Al analizar la señales presentes en la Figura 5.4, es evidente la escasa presencia de las bandas características del PLA (Tabla 6.3) . Específicamente, desaparecen las bandas a 1082, 1189 y 1455 cm^{-1} , que corresponden al estiramiento de los grupos C-C, C-O y C-H, respectivamente. Este efecto de apantallamiento sobre las bandas del PLA se debe a que los andamios multicapa están revestidos con hidrogel de CMC. Por tanto, no resulta sorprendente que las principales bandas observadas en los andamios PCH20CXT, PCH20CXT-0.25%CS y PCH20CXT-0.5%CS provengan en su mayoría del CMC, destacando sobre todos la banda a 1589 cm^{-1} , que, según Su *et. al.* [189], corresponde a la vibración de tensión de los grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$).

Tabla 6.3. Asignación de las bandas identificadas en los andamios multicapa PCH20CXT al incorporar CS.

Número de onda (cm^{-1})	Grupos funcionales	Modo vibracional
897	-C-O-C	Tensión
974-1185	-C-O-C, -NH	Tensión y Flexión en el plano
1235	S=O	Tensión simétrica
1270-1480	-CO, -OH	Tensión y Flexión
1589	$-\text{COO}^-$	Flexión
1747	-C=O	Tensión
2800-3000	-CH, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$	Tensión simétrica y antisimétrica
3000-3500	-NH, -OH	Tensión

A pesar de este apantallamiento, la señal característica de los grupos carbonilos ($-\text{C}=\text{O}$) del PLA a 1747 cm^{-1} se encuentra presente en las señales de FTIR. No obstante, esta señal comienza a desplazarse hacia números de onda menores a medida que aumenta el porcentaje de CS en la estructura de los andamios poliméricos, indicando que la

introducción de este biopolímero puede generar un cambio en el entorno químico alrededor de las moléculas del PLA, debido a la repulsión electrostática entre el PLA y los grupos sulfato, que son altamente electronegativos [347].

En general, los biopolímeros son moléculas que no se someten a altas temperaturas durante su procesamiento, ya que la exposición a temperaturas elevadas puede afectar su estructura y eficacia, al degradar parcial o totalmente su estructura [348]. No obstante, para el caso del CS, con una temperatura de degradación de 246°C [349], el tratamiento no debería suponer un inconveniente, ya que, mediante de la señal a 1235 cm^{-1} en los andamios PCH20CXT-0.25%CS y PCH20CXT-0.5%CS, corresponde al estiramiento simétrico del grupo sulfóxido ($\text{S}=\text{O}$) presente en los grupos sulfatos desprotonados ($-\text{O}-\text{SO}_3^-$) del CS [299], se logró identificar de manera exitosa la presencia del CS en ambas estructuras.

Al elevar tan solo un 0.25% más la concentración de CS en la estructura, las bandas de absorción del andamio PCH20CXT-0.5%CS reflejan un cambio significativo en varios aspectos. Entre estas modificaciones, se encuentra la absorción tenue de la banda a 897 cm^{-1} , la cual corresponde al estiramiento de los enlaces C-O-C presentes en los anómeros β del enlace glucosídico $\beta(1\rightarrow4)$. Esta banda se torna más nítida y definida en el andamio PCH20CXT-0.5%CS debido a una mayor presencia del átomo de oxígeno unido al C1 de la cadena principal de la acetilgalactosamina y el C4 de la cadena del ácido glucurónico, componentes centrales de la estructura química del CS [350].

Al mismo tiempo, las señales presentes en la región de 974 a 1185 cm^{-1} exhiben una modificación en la intensidad y el ancho de las bandas de absorción. Este comportamiento en los espectros, en el rango de 974 a 1080 cm^{-1} , se atribuye a la absorción de la banda a 1030 cm^{-1} , que corresponde a la vibración de estiramiento de los enlaces -C-O-C presentes en los ésteres de los grupos sulfato desprotonados ($-\text{O}-\text{SO}_3^-$) y la banda a 996 cm^{-1} , que corresponde a la vibración de flexión en el plano de los grupos amida (-NH) presentes en el ácido glucurónico [298]. En este mismo sentido, el ensanchamiento y definición de las bandas en el rango de 1080 a 1185 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de estiramiento de los enlaces -C-O y la flexión de los hidroxilos (-OH) a 1270 cm^{-1} y 1480 cm^{-1} , respectivamente, presentes en los ácido carboxilos de la

acetilgalactosamina [351]. Estos resultados indican que los cambios observados en los espectros de absorción se asocian con la presencia del CS en la estructura y probablemente una posible interacción entre éste y CMC, debido a la presencia de las bandas definidas que corresponden a su estructura.

Al observar la banda característica del CMC (1589 cm^{-1}), esta exhibe un ligero desplazamiento hacia número de onda mayores, pasando de 1589 cm^{-1} a 1584 cm^{-1} , al mismo tiempo que exhibe forma más nítida y definida de la banda. Los cambios en esta región del espectro FTIR se atribuyen a la presencia de las vibraciones de estiramiento de los carbonilos en los enlaces amida a 1560 cm^{-1} presentes en el CS, de acuerdo con Wang *et. al.* [352].

La región de $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ tampoco está exenta de presentar estas modificaciones. Específicamente, las señales que corresponden a las vibraciones de estiramiento simétricas y antisimétricas de los enlaces C-H en los grupos $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$ se desplazan hacia números de onda mayores. Este desplazamiento hacia una región de mayor energía podría implicar que la presencia de CS, por encima de una concentración de 0.5%, reduce las interacciones secundarias, mediante sus grupos funcionales ramificados, entre el PLA y el CMC, ya que los átomos electronegativos atraen con más fuerza los electrones en los enlaces químicos de los metilos, lo que podría aumentar la frecuencia de vibración de esos enlaces [353,354].

Finalmente, el desplazamiento hacia números de onda menores en la región de $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ indicaría que, al incrementar la concentración del CS, la absorbancia de la banda que corresponde a las vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H (3354 cm^{-1} [197]) se superpone cada vez más con las vibraciones de estiramiento de los -OH, desplazando su banda hacia una zona de menor energía.

6.2.1.3 Caracterización térmica

La comprensión en el comportamiento de los andamios multicapa después de un tratamiento térmico y la incorporación del condroitín sulfato (CS), resulta de vital importancia para determinar cómo estas modificaciones pueden afectar las

propiedades fundamentales de los andamios, especialmente en aplicaciones de ingeniería de tejidos (IT). La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) proporciona información valiosa para este propósito.

La Figura 6.6 muestra los termogramas obtenidos mediante DSC de los andamios PCH20CXT, PCH20CXT-0.25%CS y PCH20CXT-0.5%CS, donde se pueden observar las transiciones de fase en el conjunto de materiales poliméricos. La determinación de la cristalinidad se calculó mediante la siguiente ecuación :

$$Cristalinidad (\%) = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{\Delta H_m^\circ} \times 100$$

Donde ΔH_m es la entalpia de fusión, ΔH_c es la entalpia de cristalización y ΔH_m° es la entalpia de fusión para los homopolímeros de PLLA o PDLA 100% cristalinos, con un valor de 93.1 J/g [278]. La consideración en el valor para la entalpia de referencia (ΔH_m°) se realizó con base en el PLA, ya que la curvas observadas en la Figura 6.6 presentan un comportamiento más similar al PLA que al CMC (Figura 3.16).

Las observaciones en la Figura 6.6 muestran esta similitud entre los termogramas de los andamios multicapa con los del andamio PLA EH. Dado que teóricamente, el 60% del volumen total del andamio seco corresponde a capas de PLA EH, no resulta sorprendente encontrar la presencia de dos temperaturas de transición vítrea (T_g) que corresponden a los dos tipos de fibras presentes en el andamio PLA EH.

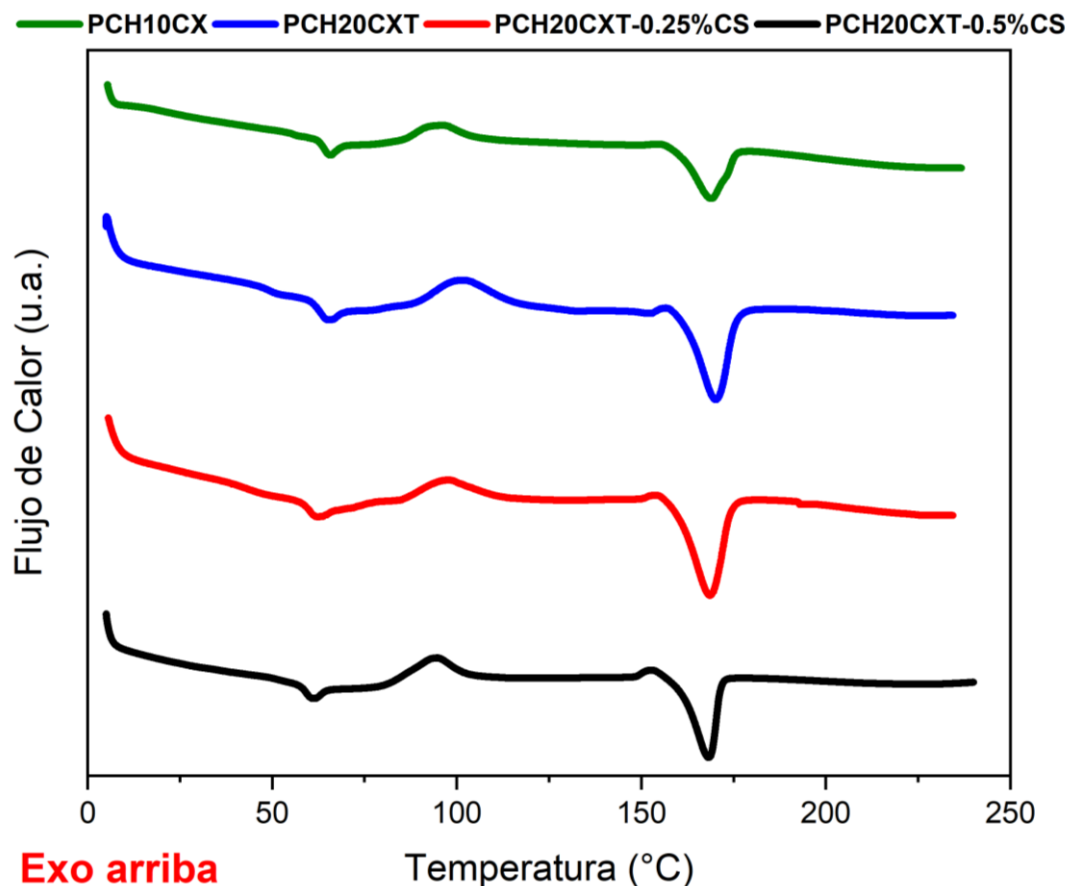


Figura 6.6. Termogramas generados a partir de la técnica DSC de los andamios multicapa.

Cuando duplicamos la concentración de agente de entrecruzamiento químico (AEQ) y aplicamos un tratamiento térmico, las T_g disminuyen para ambos casos, lo cual es inesperado (Tabla 6.4), ya que se esperaría un aumento [355]. Esto sugiere que el aumento en la concentración de AEQ funcionaliza al PLA, en lugar de entrecruzarlo; tal como se observa en el FTIR. Además, las fibras delgadas son más sensibles a los cambios de temperatura [356], lo que resulta en una disminución más marcada en la T_{g1} .

A diferencia de la T_g , las temperaturas de cristalización en frío (T_c) y de fusión (T_m) ofrecen una visión más general de las propiedades térmicas del material compuesto. A medida que aumenta la cantidad de AEQ, se generan más enlaces covalentes entre las cadenas de CMC [145], lo que reduce las interacciones entre el CMC y el PLA. Esto aumenta la movilidad del PLA y, por lo tanto eleva T_{cc} y T_m , haciéndolos más similares

al PLA pristino [277]. Este efecto se atribuye principalmente al hidrogel de CMC y se corrobora con los resultados de FTIR.

Tabla 6.4. Características térmicas más relevantes de cada andamio.

Muestra	T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)	ΔH_c (J/g)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
<i>PCH10CX</i>	55.6	64.1	95.7	168.7	12.4	17.01	4.9
<i>PCH20CXT</i>	50.1	63.4	102.1	170.3	14.4	16.2	1.9
<i>PCH20CXT- 0.25%CS</i>	43.2	60.2	97.1	168.6	6.8	18.5	12.6
<i>PCH20CXT- 0.5%CS</i>	53.3	59.2	93.5	168.1	13.3	18.7	5.8

El aumento de la entalpía de cristalización en frío (ΔH_{cc}) indica que, durante la reorganización de las cadenas poliméricas, se libera más energía, lo que promueve la movilidad de las cadenas del PLA [357] debido al aumento en la concentración de AEQ. Esto aumenta la formación de regiones cristalinas en el PLA [358,359], lo que se refleja en una reducción del ancho del endoterma, un aumento en su altura y la desaparición de la segunda curva de fusión observada en el andamio PCH10CX, lo que reduce la entalpía de fusión (ΔH_m) [360]. Sin embargo, a diferencia del andamio PCH10CX, es este mismo ordenamiento estructural previo en la estructura del PLA, por efecto del tratamiento térmico [361], podría generar la reducción en el porcentaje de cristales formados durante el análisis calorimétrico, pasando de 4.9 a 1.9 %.

Al observar los datos del andamio PCH20CXT-0.25%, se nota una disminución en todos sus parámetros térmicos al introducir el CS. El CS tiene la capacidad de generar interacciones iónicas a valores de pH bajos debido a la carga negativa de sus grupos sulfato desprotonados ($-O-SO_3^-$), generando un efecto de complejación polielectrolítica [362,363]. Al tener una menor disponibilidad de grupos funcionales libres, resulta

menos probable que el CS interactúe con el CMC, nos obstante, es posiblemente que estas interacciones pudieran estar sucediendo entre los grupos $-O-SO_3^-$ y los grupos $-COO^-$, tal como se propone en los resultados de FTIR.

Estas interacciones son más notables en las fibras de menor diámetro debido a su relación área/volumen. La presencia del CS, al igual que el aumento en la concentración de AEQ, podría reducir las interacciones entre el PLA y el CMC, lo que aumenta la movilidad del PLA y, por lo tanto, reduce T_g , T_{cc} y T_m , similar al efecto que ejercen los plastificantes [364]. Esta posible disminución de las interacciones podría explicar la reducción en la ΔH_{cc} , ya que las cadenas tienen una menor tendencia a ordenarse durante su enfriamiento [365]. Durante el calentamiento, las interacciones entre el CS y el PLA podrían promover una cristalización heterogénea, lo que resulta en una curva de fusión más amplia [366]. Por su parte, el aumento de la ΔH_m y la fracción cristalina, a pesar del posible ordenamiento heterogéneo sobre el andamio, indicaría que, en general, hay una presencia mayoritaria de zonas más cristalinas, por ende, hay una mayor presencia de las fibras delgadas en la sección del PLA EH, corroborando parcialmente los resultados de la observación a la microestructura de este andamio (Figura 4.5).

No obstante, al duplicar la concentración de CS, este biopolímero no solamente podría interactuar con el PLA, sino que también podría entablar interacciones adicionales consigo mismo, especialmente en presencia de iones o grupos funcionales cargados positivamente, dando lugar a la formación de enlaces iónicos o puentes de hidrógeno permitiendo una posible complejación entre sí [367,368]. Esta denominada “auto-complejación” del CS a una concentración del 0.5% (p/p) podría ocurrir preferentemente en las fibras delgadas, debido a su relación área/volumen, y generar una separación entre las cadenas poliméricas, lo que incentivaría la reducción observada T_{cc} y T_m . Además, dicha “auto-complejación” podría aumentar la ΔH_m , al igual que el amorfismo debido a las zonas en el PLA con baja interacción con el CS.

Este comportamiento sugiere que la estructura del CMC se ve influenciada principalmente por la concentración de AEQ, mientras que la estructura del PLA se

modifica principalmente por el tratamiento térmico y la concentración de CS. A una concentración del 0.5% de CS, la autoagregación modifica las propiedades térmicas del material multicapa.

6.2.1.4 Evaluación morfológica del andamio multicapa mediante SEM-EDS

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una herramienta esencial para la caracterización detallada de la morfología, topología y composición de materiales con aplicaciones en biomédica [369]. En este contexto, se utilizó el SEM para examinar la sección transversal de cada una de las capas que conforman el andamio, así como para evaluar la integridad de su unión a través del hidrogel. Además, la técnica de energía de dispersión de rayos-X (EDS, por su siglas en inglés) permitió confirmar la presencia del hidrogel en cada una de las capas (secciones A-E), así como la distribución de la HAp y el CS en la matriz.

La Figura 6.7 presenta una micrografía con una magnificación de 125x a la sección transversal del andamio multicapa PCH20CXT. Se observa que el tratamiento térmico no afectó significativamente la morfología ni la proporción general de las secciones que conforman cada capa del andamio. A primera vista, la sección compuesta por 3 capas de PLA EH es la más predominante representando aproximadamente el 58% del espesor total, similar a la zona media del cartílago articular [370]. La sección de PLA 3D, que simula la zona superficial del cartílago, constituye alrededor del 19%, mientras que la capa de ADF10CX, que emula la zona profunda, representa aproximadamente el 23%. Aunque hay variaciones en el espesor de estas secciones, se mantienen dentro de los límites reportados en la literatura [371]. Sin embargo, a pesar de estas consideraciones, la última sección presenta inconsistencias significativas en su espesor atribuidas a la técnica de procesamiento por FDPL, lo que sugiere la necesidad de optimizar la metodología para homogenizar esta variabilidad, posiblemente mediante el uso de equipo complementario para controlar el grosor.

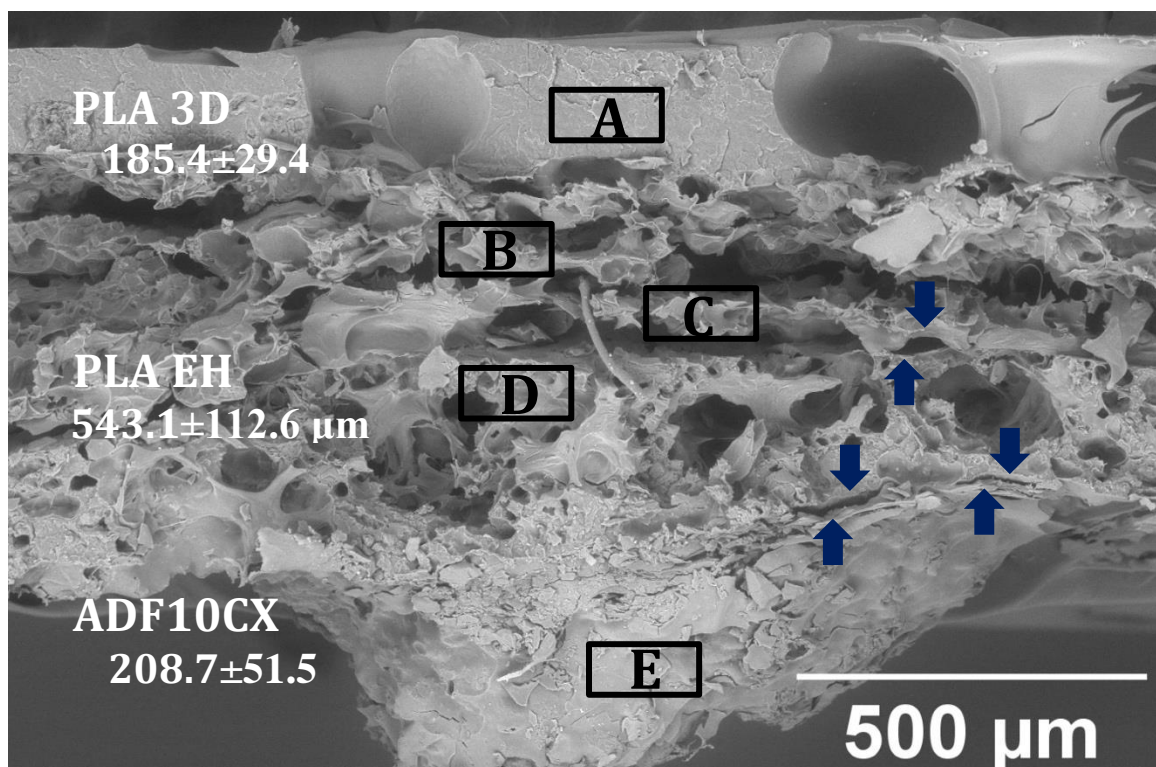


Figura 6.7. Sección transversal del andamio multicapa PCH20CXT a 125x, obtenida mediante fractura criogénica.

A partir de la Figura 6.7 se puede observar cómo el hidrogel actúa de manera eficaz entre las capas, reduciendo al mínimo la separación de éstas, lo que puede conducir a una mejor estabilidad mecánica del andamio [372]. Además, la introducción del hidrogel suaviza las transiciones entre las diferentes capas, reduciendo las discontinuidades en la superficie, dando como resultado una interfase más homogénea, similar a las técnicas de procesamiento más complejas que se reportan en la literatura [373,374]. Estableciendo que la inclusión del hidrogel para unir las capas del andamio demuestra ser una alternativa efectiva, mejorando la cohesión de la estructura 3D multicapa.

Al comparar la morfología del PLA EH antes y después de la incorporación del hidrogel, se observa un cambio drástico en su estructura (Figura 6.8B). Se presume que el hidrogel se adhirió a las fibras de PLA electrohilado debido a las características que presentaban en su topología, como rugosidad superficial y macroporosidades entre 0.08-0.15 μm de diámetro (Figura 4.4E). Este cambio proporcionó al andamio una

morfología con alta porosidad, aparentemente interconectada, propiciando un mayor índice de difusión de nutrientes y oxígeno, así como una vía eficiente para el transporte y eliminación de desechos metabólicos [375]. Sin embargo, es importante señalar que la incorporación del hidrogel no produjo el mismo efecto en los andamio PLA 3D y ADF10CX.

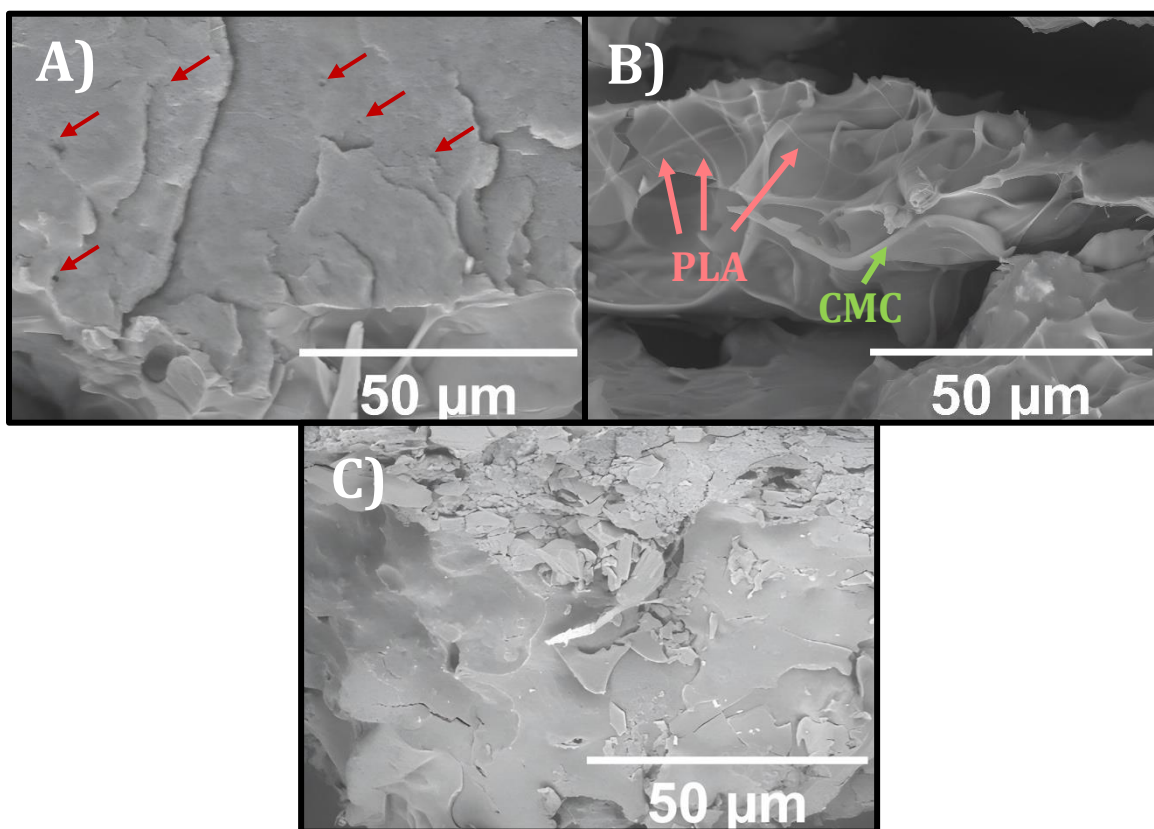


Figura 6.8. Magnificación a 2000x a cada estructura que compone el andamio PCH20CXT. **A)** PLA 3D, **B)** PLA EH, **C)** ADF10CX.

En el caso del andamio ADF10CX (Figura 6.8C), la inclusión del hidrogel junto con un tratamiento térmico posterior puede contribuir a modificar la topología superficial de esta capa al eliminar o reducir las macroporosidades previamente observadas (Figura 3.8D). Cuando el hidrogel impregna el andamio, las macroporosidades son llenadas, reduciendo así los vacíos y las cavidades en la estructura. Posteriormente, el tratamiento térmico se encarga de secar y endurecer el hidrogel, mejorando la unión entre éste y el andamio. No obstante, durante este proceso, el hidrogel puede

experimentar una contracción debido a la deshidratación [376], lo que podría resultar en una mayor compresión de las macroporosidades que originalmente estaban llenas del hidrogel, conduciendo a su reducción.

En lo que respecta al andamio PLA 3D, a simple vista, solo muestra las macroporosidades generadas por la intersección del mallado durante el proceso de impresión 3D (Figura 4.4F). No obstante, al examinar detenidamente la superficie del corte transversal, las macroporosidades de aproximadamente 0.2 μm se encuentran presentes también en el interior del material (Figura 6.6A). El nulo cambio en su morfología se atribuye a las limitaciones que posiblemente experimentó el hidrogel para incorporarse en la estructura de este andamio debido al diámetro de las porosidades en el material y a su topología principalmente lisa y homogénea. Por lo tanto, este comportamiento en el andamio PLA 3D podría tener implicaciones al limitar la adhesión celular y la migración durante el cultivo celular [377].

Las aseveraciones acerca de la permeación del hidrogel en los andamios se puede confirmar al observar los espectros de EDS de las Zonas B-E (Figura 6.9), correspondientes a las 3 capas de PLA EH (Zona B-D) y a la capa de ADF10CX (Zona E), donde la señal de sodio (Na), que corresponde a la presencia del CMC, se encuentra en mayor cantidad en comparación con el andamio PLA 3D (Zona A), lo que respalda la idea sobre la predisposición de los andamios, con una mayor presencia de porosidades y rugosidad superficial, para lograr una mejor interacción con el hidrogel de CMC. Aunque es evidente la presencia de Aluminio (Al) en los espectros, esto se atribuye completamente a los utensilios empleados en la metodología de fractura criogénica, por lo que hasta ahora descartamos la contaminación por este elemento.

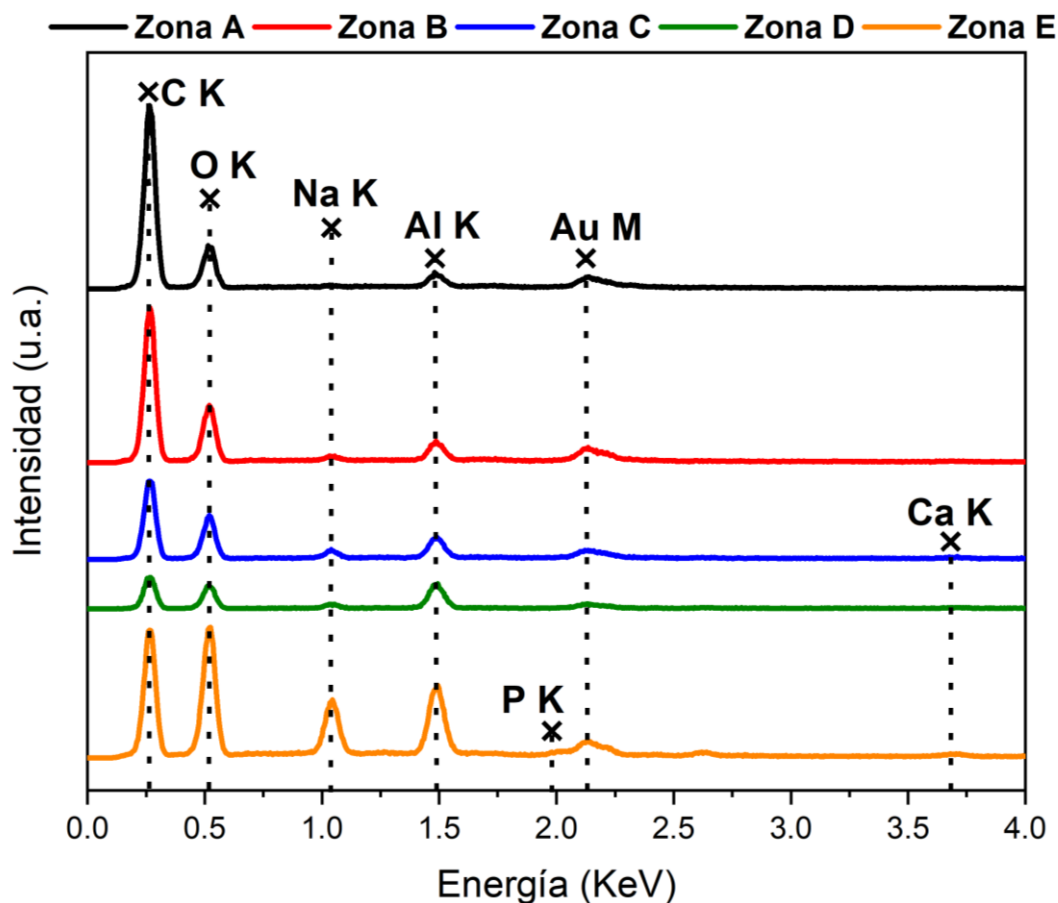


Figura 6.9. Análisis de la composición química mediante EDS en el Contexto del andamio multicapa PCH20CXT.

En un sentido más amplio, el uso de EDS nos permite supervisar la actividad de la HAp presente en el andamio ADF10CX. A través de la Figura 6.9, también es posible observar las señales características del Fósforo (P) y el Calcio (Ca), componentes principales de la HAp [378]. Sin embargo, también se aprecia una posible difusión del Ca hacia el interior del hidrogel. Este efecto de difusión se debe a la afinidad de la HAp para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua [379]. Cuando entra en contacto con el agua, los enlaces químicos en la estructura cristalina del HAp pueden romperse, liberando iones de Calcio (Ca^{+2}) y Fosfato (PO_4^{-3}) en el agua [380]. Dada la naturaleza altamente hidratada y permeable del hidrogel, permite que los iones se difundan en su matriz, propagándose a lo largo del andamio [381]. Posteriormente, mediante el

tratamiento térmico, la deshidratación del hidrogel crea una matriz sólida dentro del andamio que atrapa los iones.

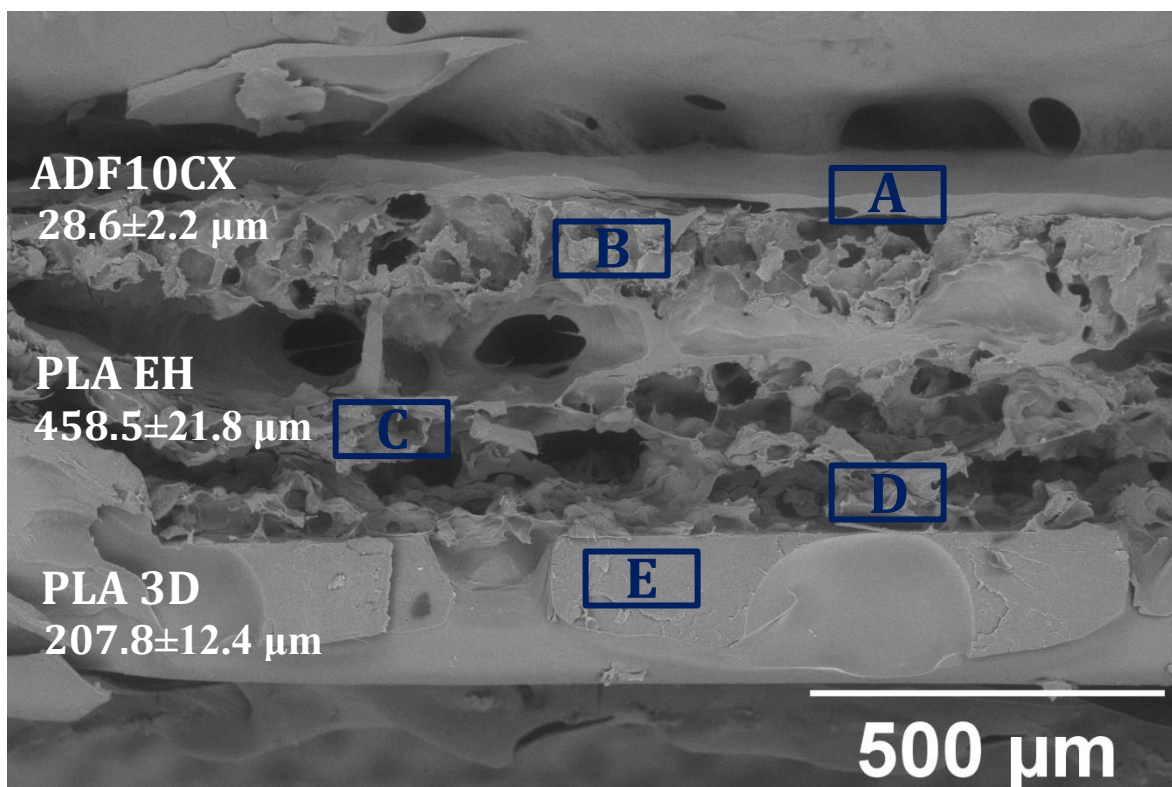


Figura 6.10. Morfología panorámica de una sección transversal del andamio PCH20CXT-0.25%CS a 125x.

En la Figura 6.10, se muestra una sección transversal de un andamio multicapa PCH20CXT al que se le añadió un 0.25% (p/p) de CS al hidrogel que recubre la estructura 3D. En comparación con el resultado anterior, esta muestra presenta una calidad superior en el proceso de fractura criogénica, sin muescas ni secciones incompletas en las capas que conforman el hidrogel.

Para el caso del andamio multicapa PCH20CXT-0.25%CS, de la superior a la inferior, se presentan el andamio ADF10CX, PLA EH y PLA 3D, correspondientes a la zona profunda, zona media y zona superficial respectivamente. Destaca el cambio drástico en el espesor de la capa que conforma el andamio ADF10CX en este caso en comparación con el resultado anterior. Este cambio en el espesor afecta el porcentaje total de cada una

de las secciones en el andamio, ya que para el andamio PLA EH pasa del 58% al 65.7%, mientras que para los andamios PLA 3D y ADF10CX, pasa del 19% al 30.1% y 23% al 4.2%, respectivamente.

Esta variación substancial en el espesor del andamio AFD10CX es un parámetro que no sólo afecta el porcentaje de participación en el andamio multicapa, sino que también estas fluctuaciones pueden generar alteraciones en la morfología de las secciones circundantes, como se observa en las flechas azules de la Figura 6.7. La homogeneidad presente en las capas de este andamio mejora aún más la unión entre ellas, reduciendo el espacio entre cada una hasta el punto en que es imperceptible en el andamio PLA EH. Esta reducción en el espacio es un factor importante, ya que, de acuerdo con Sadeghi *et al.* [172], el factor en la reducción del espacio, junto con la alta porosidad, proporciona un entorno propicio para la infiltración celular y la neovascularización.

Según las investigaciones más recientes de Stuart *et al.* [382], la incorporación de aditivos bioactivos como los glucosaminoglicanos puede tener un efecto significativo en la estructura y propiedades de los andamios resultantes. Esto es evidente en la Figura 6.11A, que muestra un acercamiento al andamio PLA EH, donde se observan modificaciones sustanciales en comparación con la superficie del andamio sin CS.

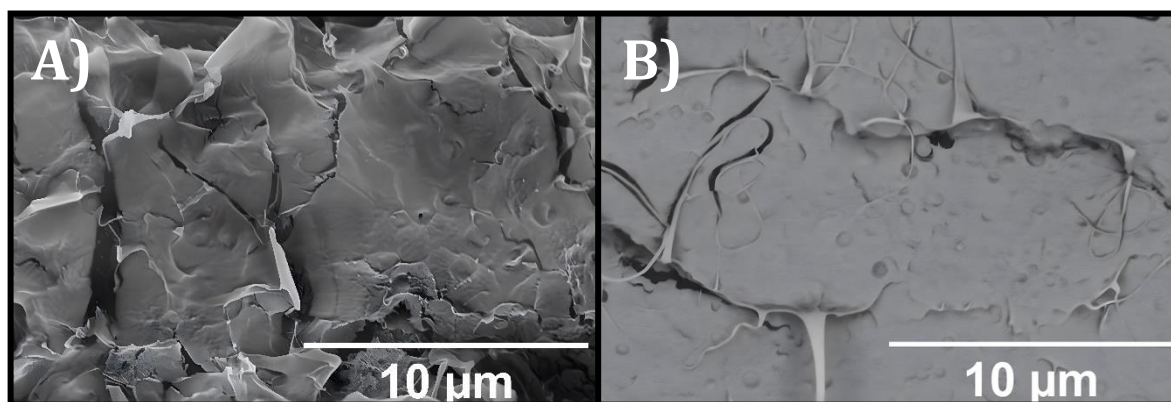


Figura 6.11. Magnificación a 10,000x a las estructuras **A)** PLA EH y **B)** PLA 3D, que componen el andamio PCH20CXT-0.25%CS.

Una característica destacada tras la incorporación de una concentración de 0.25% (p/p) de condroitín sulfato (CS), es la desaparición de las fibras resultantes del proceso del electrohilado del PLA. Esto se debe a que el CS, al no estar unido a la estructura del hidrogel, podría llenar pequeñas imperfecciones o irregularidades a medida que se distribuye entre las capas del andamio, creando una superficie más homogénea.

Al observar el andamio PLA 3D a estas magnificaciones (Figura 6.11B), es evidente un estiramiento del polímero. El PLA es un polímero termoplástico que generalmente se vuelve rígido y quebradizo a temperaturas por debajo de su temperatura de transición vítrea (T_g) [383]. Por lo tanto, bajo estas condiciones, el polímero no debería estirarse debido a la falta de deformación plástica [384]. Este comportamiento se atribuye a inconvenientes durante el proceso de criofractura, como una fractura incompleta y finalizada a temperaturas por encima de la que presenta el nitrógeno líquido (-196°C [385]) o una baja cantidad de volumen de nitrógeno utilizado, resultando en un aumento rápido de temperatura en algunas áreas microscópicas al entrar en contacto con el aire, causando el estiramiento observado en la superficie de la andamio PLA 3D.

Además, como se mencionó anteriormente, las macroporosidades observadas en la superficie del andamio PLA 3D también se encuentran en su interior, como se muestra en la sección transversal del andamio. Estas macroporosidades son generadas por efecto del aire atrapada durante el proceso de deposición de capa por capa en la impresión 3D, influenciado por parámetros como la geométrica del modelo y la velocidad de impresión [264,266]. Aunque en aplicaciones de ingeniería de tejidos (IT) estas macroporosidades son necesarias para permitir la infiltración celular y la vascularización del andamio, en este caso, parecen ser puntuales y dificultan la interacción del hidrogel con el interior del material, lo que resulta en un cambio nulo en la morfología, similar al andamio PCH20CXT.

Mediante la técnica de EDS, se puede confirmar la presencia de CS en la estructura del material, ya que, a diferencia del andamio PCH20CXT, la Figura 6.12 muestra una señal de azufre que no se detectó previamente, la cual se atribuye a los grupos sulfato desprotonados ($-\text{O}-\text{SO}_3^-$) característicos de la estructura del CS [386]. Además, la

incorporación de CS en la estructura parece no afectar o modificar las interacciones entre el hidrogel y la sección compuesta por el andamio PLA 3D. De manera similar al andamio PCH20CXT, la señal de Sodio del CMC es casi inexistente en el andamio PLA 3D, indicando que, una concentración de 0.25% (p/p) de CS resulta irrelevante para mejorar la unión entre el hidrogel y el PLA, sobre todo si el PLA no presenta las características topológicas/morfológicas (rugosidad, alta permeabilidad y porosidad) para que esto suceda.

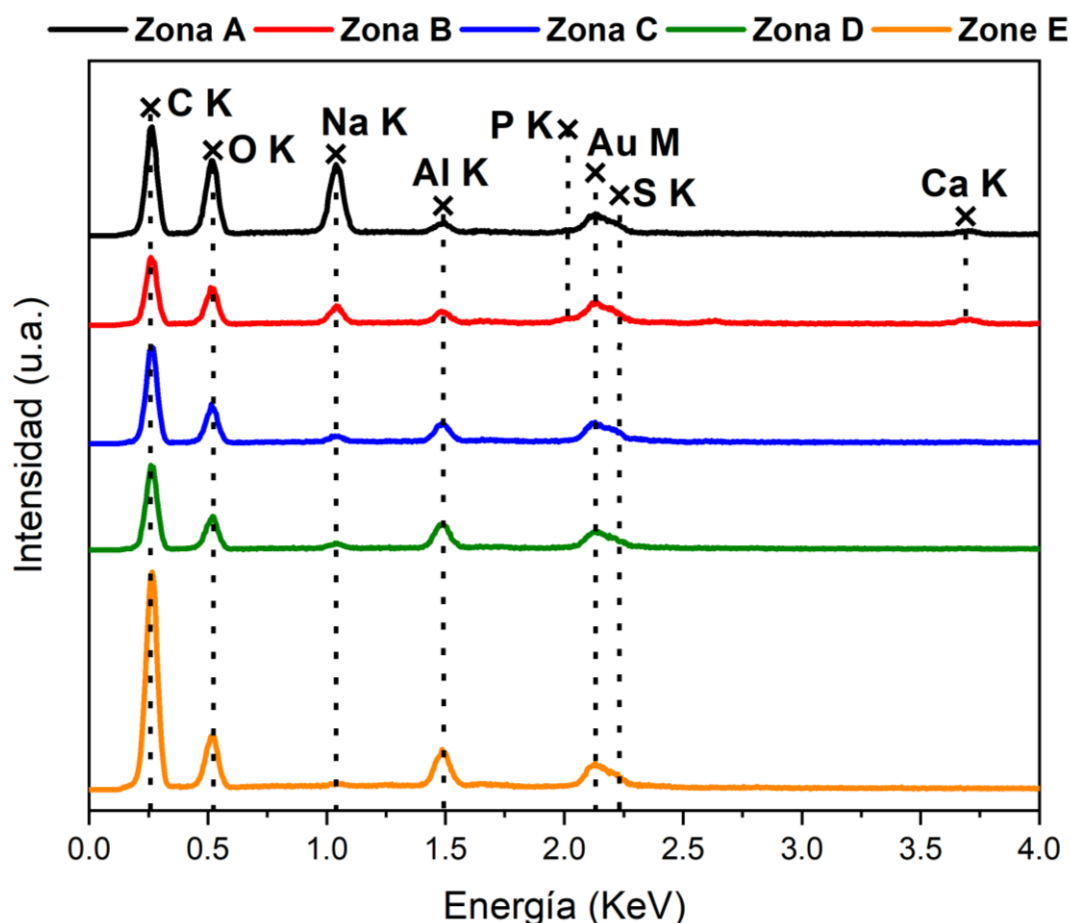


Figura 6.12. Seguimiento de la difusión de la HAp en el andamio y su efecto a interactuar con CS sobre andamio multicapa PCH20CXT-0.25%CS, mediante la identificación química por EDS.

Al observar las Zonas A y B (Figura 6.12), que corresponden al andamio ADF10CX y PLA EH respectivamente, es evidente una diferencia en la difusión de los iones de

hidroxiapatita (HAp). A pesar de su afinidad por el agua, se observó un fenómeno contrario al esperado. Tanto el CS como la HAp contienen grupos funcionales con cargas eléctricas que les permite interactuar con otros grupos funcionales o iones con carga positiva. En este caso, la HAp libera en mayor proporción iones de Calcio cuando se hidrata [387], mientras que el CS contiene grupos sulfato cargados negativamente. Este comportamiento, propiciado por el ambiente acuoso, generaría una atracción electrostática entre el CS y los iones de presentes en el agua, generando puentes de hidrógeno entre sus hidroxilos, tal como lo describen Venkatesan *et. al.* [388], dando como resultado que los iones de calcio liberados por la HAp queden retenidos en la capa de PLA EH, evitando que se difundan hacia capas más internas del andamio.

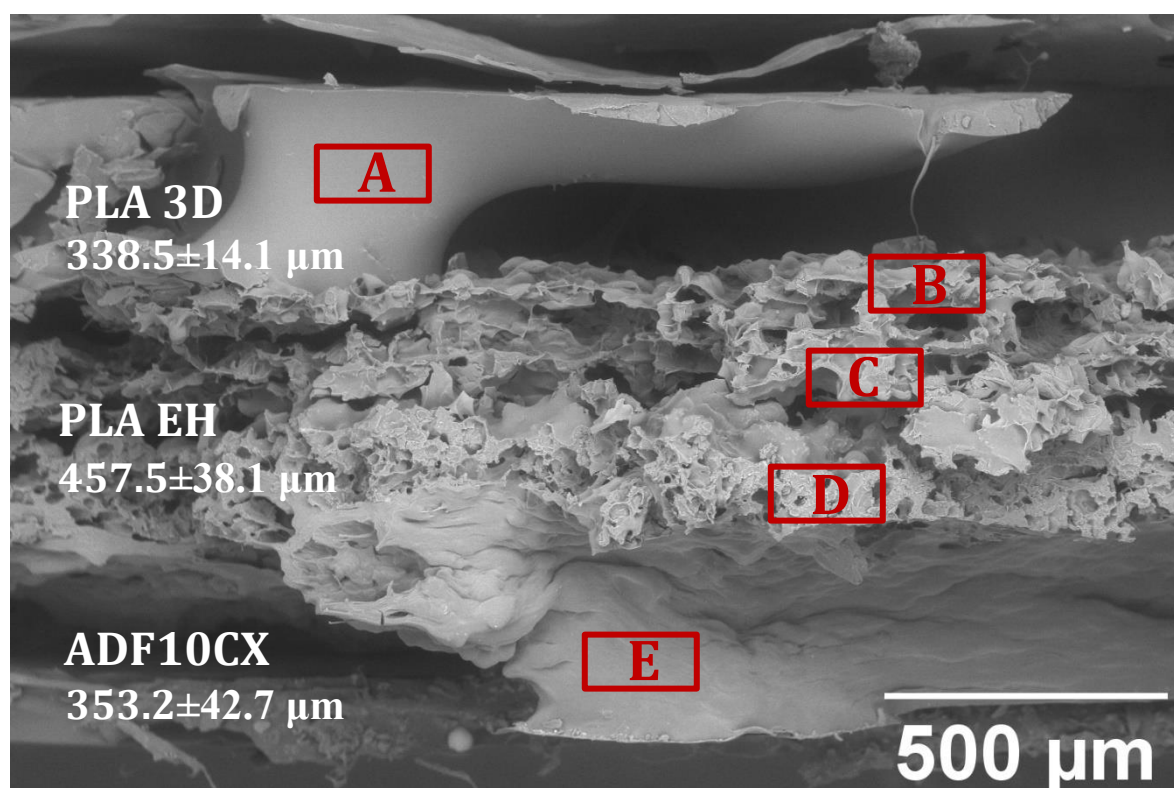


Figura 6.13. Sección transversal del andamio multicapa PCH20CXT-0.5%CS a 125x, obtenida mediante fractura criogénica.

La Figura 6.13 muestra los efectos en la microestructura al momento de duplicar la concentración de CS en la matriz del andamio multicapa, pasando de 0.25% (p/p) de CS a 0.5% (p/p) de CS. A primera instancia, se observa que la integridad de la estructura

se vio mayoritariamente más afectada que los dos casos anteriores. La apariencia de la sección que corresponde al andamio PLA 3D se debe en parte por la elección de la sección utilizada para formar el andamio, que fue de la periferia de la estructura donde posiblemente la unión entre las capas es menos sólida durante la impresión. Por lo que, al momento de enfriarse con el nitrógeno, la sección se fragmentó dejando la pieza que se observa en la micrografía (Sección A, Figura 6.13). Sin embargo, para los otros dos casos difiere este comportamiento, en su lugar, la reducción de la integridad se atribuye a un aumento en la rigidez y a la formación de porosidades heterogéneas en la mayor parte de la estructura interna posterior a la eliminación de la humedad.

El aumento de la concentración de CS en la estructura del andamio puede generar una mayor cantidad de interacciones iónicas entre el PLA y el CS, debido al aumento de los grupos sulfato, lo que resulta en una mayor cantidad de interacciones [389], y, por lo tanto, se podría generar una reducción en la interfase de las capas de cada sección, al reducir las discontinuidades de la superficie. Este comportamiento se observa no solo entre las capas de PLA EH, sino también en el espacio generado por la penúltima capa y el andamio ADF10CX, haciendo la interfase casi imperceptible.

No obstante, con este mismo aumento de la presencia de cargas negativas, tomando en cuenta la variación en la cantidad de interacciones descritas previamente, combinada con la deshidratación del hidrogel, podría generar áreas con variaciones en el efecto de contracción durante la formación del xerogel, generando áreas densas con poca porosidad y áreas con una porosidad relativamente alta [390]. Esta situación, en conjunto con las variaciones experimentales durante el proceso de fractura, pudo comprometer la integridad de la sección transversal que se presenta en la Figura 6.13.

La Figura 6.14 presenta un acercamiento a 5,000x a la estructura de cada una de las capas que conforman el andamio. Al observar detenidamente la sección compuesta por las capas del andamio PLA EH (Figura 6.14B), se pueden notar claramente las fibras de PLA electrohilado. En cierto modo, se esperaría que, al usar el doble de concentración de CS, las fibras fueran aún menos visibles. Por el contrario, la notoria presencia de estas fibras en una parte específica, a diferencia de lo observado en el andamio

PCH20CXT-0.25%CS, y ello refuerza la hipótesis sobre la interacción heterogénea del CS sobre el andamio de PLA.

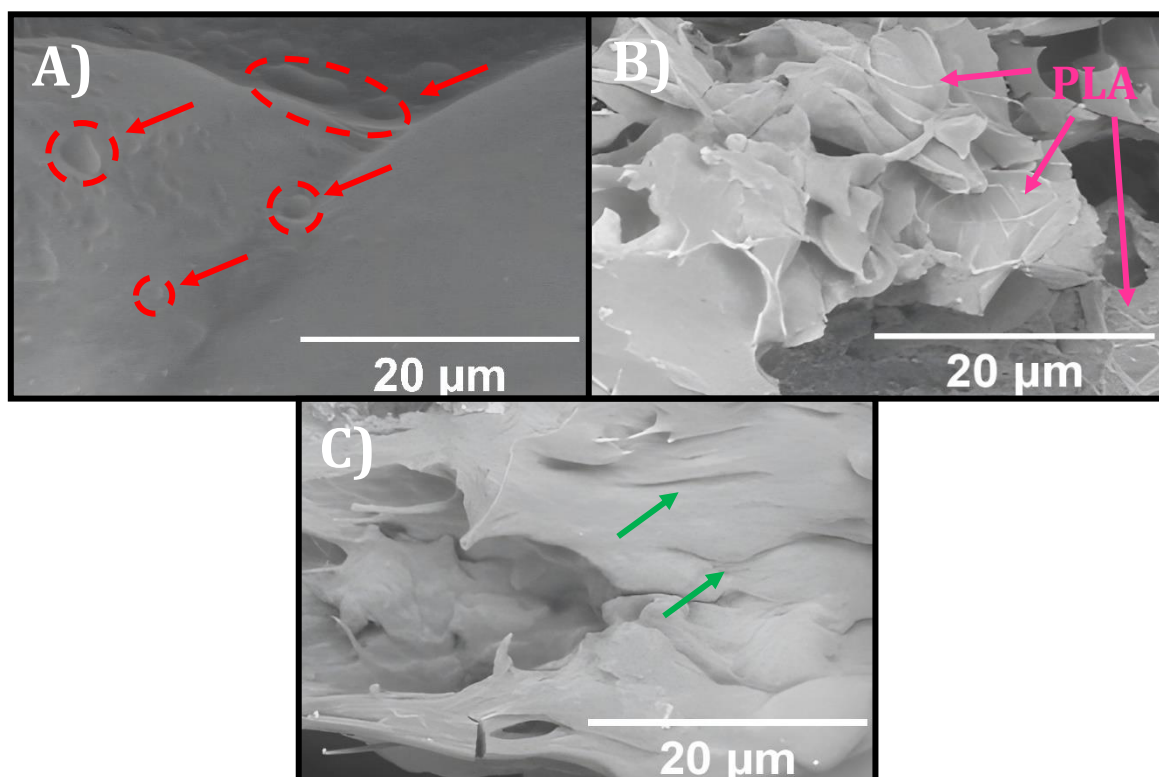


Figura 6.14. Magnificación a 5,000x a cada estructura que compone el andamio PCH20CXT-0.25%CS. A) PLA 3D, B) PLA EH y C) ADF10CX.

Otro aspecto por destacar es el cambio en la rugosidad superficial, tanto en la sección compuesta por las capas del PLA EH como en la sección que compone el andamio ADF10CX (Figura 6.14C). A pesar de que una concentración por debajo del 0.25% (p/p) de CS dio lugar a una superficie más homogénea, parece que con el 0.5% (p/p), las interacciones iónicas entre el CS y el PLA influyen en la organización y entrelazamiento de las cadenas poliméricas en la superficie del hidrogel [347], manifestándose como la rugosidad superficial observada.

En cuanto a la estructura del PLA 3D (Figura 6.14A), a primera vista, parece no existir ninguna modificación durante la conformación del andamio multicapa, al mismo tiempo que exhibe las porosidades previamente observadas en la superficie de la estructura. Sin embargo, a diferencia de las secciones de PLA 3D presente en los

andamios anteriores, parece que durante el procesamiento de las secciones cercanas a los extremos de la malla 3D, las macroporosidades de la superficie parecen fusionarse debido a su forma ovalada. Este comportamiento sugiere que el software de la impresora 3D, bajo las condiciones de procesamiento, podría aumentar la velocidad en estas secciones del andamio PLA 3D debido a la geometría del andamio, generando una mayor incorporación del volumen de aire en la estructura, dando forma a estas geometrías ovaladas o porosidades con un aumento sustancial en su diámetro [265,391].

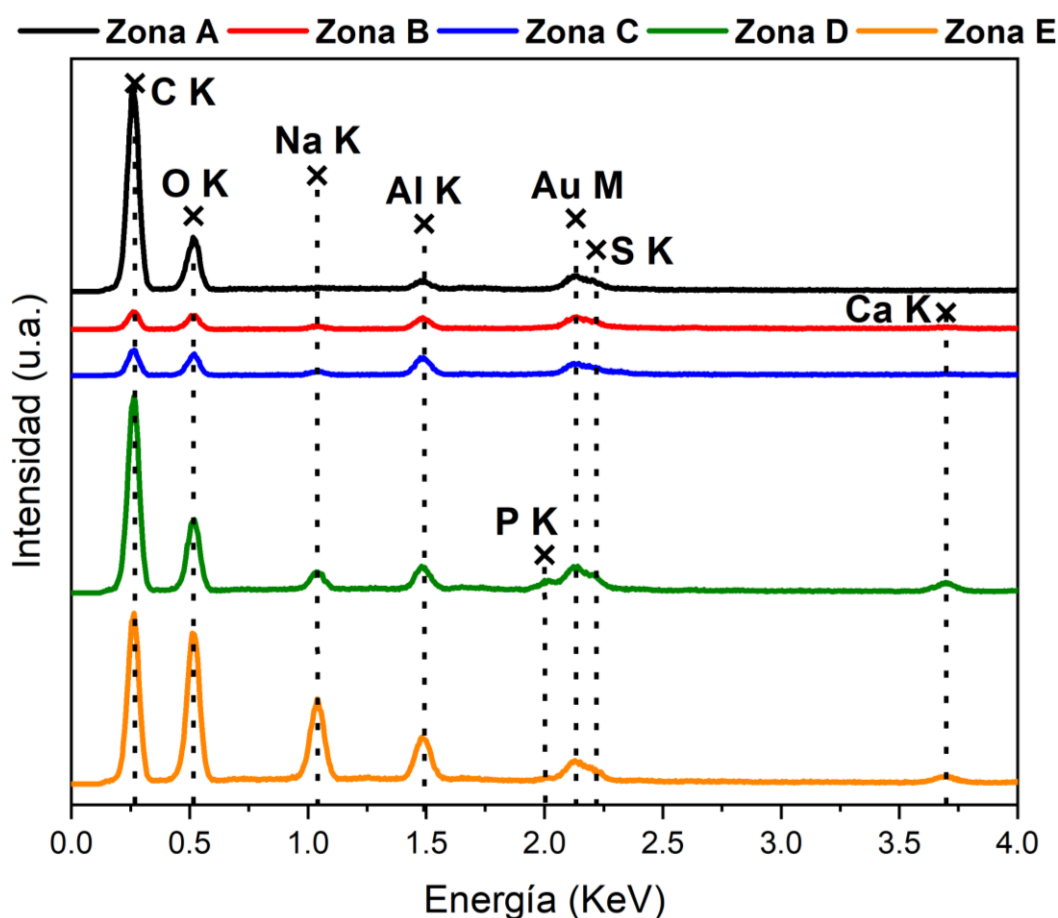


Figura 6.15. Seguimiento de la difusión de la HAp en el andamio y su efecto al interactuar con una concentración de 0.5% (p/p) de CS, mediante la identificación química por EDS.

En relación con los resultados de EDS presentados en la Figura 6.15, es evidente que el mismo comportamiento, con respecto a la identificación del CMC, se repite en este andamio. Por otra parte, lo que realmente llama la atención es la visualización de la difusión de los iones liberados por la HAp tras su hidratación. Si bien, se esperaría que una mayor concentración de grupos sulfato ayudaría a retener una mayor cantidad de iones de calcio y fosfato [367] en la región que simula la capa profunda del cartílago, parece no ser el caso. Esta suposición no considera la fuerte afinidad del CS por el agua, lo que genera un aumento en la permeabilidad del hidrogel y una reducción de la viscosidad [392], facilitando el paso de estos iones a través de la matriz del hidrogel y permitiendo que prácticamente alcancen la zona superficial del andamio.

La inclusión de hidrogel como agente de unión y el tratamiento térmico en el andamio multicapa puede afectar la morfología de las capas, pero generalmente resulta beneficioso para mantener la integridad estructural, funcionalidad y compatibilidad biológica del andamio. Sin embargo, es crucial monitorear la difusión de aditivos en el sistema y la concentración de CS. Concentraciones superiores al 0.25% de CS pueden influir en no solo en las propiedades térmicas del material, sino también ejercer una influencia en su estructura, generando la rugosidad superficial del hidrogel. Estos resultados sugieren que agregar un 0.25% de CS al hidrogel mejora significativamente la integridad de las capas del andamio. Además, la concentración de CS parece desempeñar un papel importante en la reducción de la interfaz entre las capas del andamio.

6.2.2 Efecto de la introducción del CS en el carácter hidrofílico y la estabilidad mecánica de los andamios multicapa.

6.2.2.1 Caracterización de la humectabilidad mediante el ángulo de contacto.

El objetivo principal de los biomateriales poliméricos en condiciones biológicas depende de varios factores, siendo la mojabilidad un de los prerrequisitos para garantizar una respuesta biológica idónea, como la adhesión celular al sustrato [221]. La mojabilidad se refiere a una propiedad influenciada por interacciones moleculares que determina la capacidad de una gota de líquido para extenderse sobre una superficie

sólida determinada [309]. Una forma de determinar la mojabilidad es mediante la medición del ángulo de contacto estático, que resulta del equilibrio entre las tensiones interfaciales entre las fases sólida, líquida y gaseosa [393]. Los ángulos de contacto pequeños ($\leq 20^\circ$) indican superficies superhidrofílicas [394], mientras que los ángulos entre 20° y 90° se refieren a superficies hidrofílicas, los ángulos de contacto grandes (90° - 150°) corresponden a superficies hidrofóbicas y ángulos por encima de 150° se consideran superficies superhidrofóbicas [395].

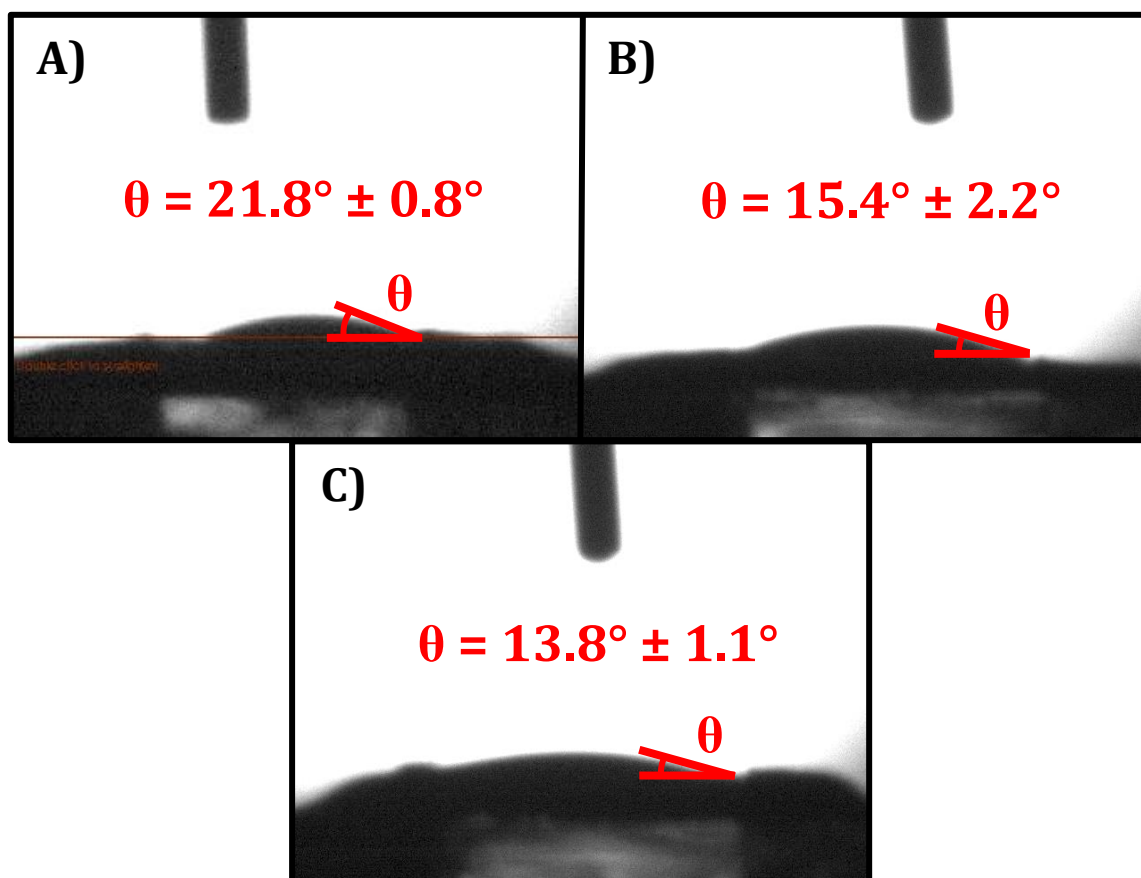


Figura 6.16. Medición del ángulo de contacto de los andamios **A)** PCH20CXT, **B)** PCH20CXT-0.25%CS y **C)** PCH20CXT-0.5%CS.

Al analizar el comportamiento de la mojabilidad en los andamios multicapa (Figura 6.16), se observa que el conjunto tiene un menor ángulo de contacto en comparación con cada una de sus capas individuales. Por ejemplo, el andamio PCH20CXT muestra ángulo de contacto de $21.8^\circ \pm 0.8^\circ$ (Figura 6.16A), mientras que los andamios PLA 3D,

PLA EH y ADF10CX muestran ángulos de contacto de $91.7^\circ \pm 2.4^\circ$, $116.5^\circ \pm 0.9^\circ$ y $65.2^\circ \pm 2^\circ$, respectivamente. De acuerdo con Kasalkova *et. al.* [308], la mojabilidad puede ser alterada mediante la modificación de la química superficial (introduciendo nuevos grupos funcionales en la superficie del substrato sólido) o la morfología (mediante un cambio en la rugosidad).

Por ese motivo, la incorporación de CMC, en forma de recubrimiento, disminuye la tensión superficial entre las moléculas de agua que interactúan con la superficie del andamio, al modificar la química de la superficie mediante la incorporación de abundantes grupos hidroxilo (-OH) [309]. Además, para el caso de las secciones compuestas a partir del andamio PLA EH, las micrografías de alta resolución (Figuras 6.7, 6.10 y 6.13) muestran un cambio en la morfología, en específico se observa un conjunto de porosidades heterogéneas y superficies con alta rugosidad. A partir del trabajo de Murakami *et. al.* [396], se puede corroborar las observaciones que presentó Wezel, donde se describe la relación entre la rugosidad y la mojabilidad, afirmando que agregar rugosidad a la superficie mejora la mojabilidad de ésta al tener más sitios de anclaje para los grupos funcionales hidrofílicos, dando pie a que la morfología exhibida por los andamios multicapa presentan una mayor capacidad para almacenar y retener agua.

Al agregar CS a la composición del hidrogel, su ángulo de contacto disminuye aún más, pasando de una superficie considerada hidrofílica a una superficie superhidrofílica, con valores de $15.4^\circ \pm 2.2^\circ$ y $13.8^\circ \pm 1.1^\circ$ para los andamios con una concentración de 0.25% (p/p) y 0.5% (p/p), respectivamente (Figura 6.16B y C). Es importante destacar que, al duplicar la concentración de CS, el ángulo de contacto también disminuye, implicando que la concentración de CS también juega un papel importante en la modificación de la química superficial. Esto se debe a que el CS es un polisacárido rico en grupos sulfato (-SO₃⁻) en su estructura, que resultan ser altamente hidrofílicos debido a su capacidad de interactuar a través de fuerzas iónicas con las moléculas de agua [397]. Ya que los grupos sulfatos poseen una carga negativa generada por los átomos de oxígeno que rodean al azufre, estos tienen la capacidad de generar una atracción con la molécula dipolar del agua, específicamente con los hidrógenos, formando de esta manera

interacciones secundarias tipo puentes de hidrógeno, que tienen la capacidad de retener al agua [398]. Además, la modificación de la morfología que genera la incorporación del CS puede incrementar un más estas interacciones con el agua.

Si bien las características morfológicas son importantes para determinar las propiedades de mojabilidad, no son suficientes por sí solas para garantizar adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular en los biomateriales [399]. Por lo que es necesario que la morfología esté acompañada de una química superficial con características que le otorguen afinidad al agua. En palabras de Agrawal *et. al.* [309], *“En lugar de simplemente proporcionar espacio vacío para el crecimiento interno del tejido, es deseable que el entorno del andamio impulse y guíe activamente el crecimiento del tejido de interés”*.

6.2.2.2 Capacidad de hinchamiento.

El hinchamiento es un parámetro crucial a considerar, ya que puede afectar directamente la capacidad de transporte de nutrientes y metabolitos en el andamio [400]. Las Figuras 6.17 y 6.18 exploran en detalle el impacto de la adición de Condroitín Sulfato (CS) en el comportamiento de la capacidad de retención de agua y cómo este cambio podría influir en la funcionalidad de los andamio multicapa mientras se encuentran inmersos en una solución de fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés). Esto permite observar con mayor detalle el desempeño de los andamios multicapa en un entorno que simula las condiciones fisiológicas del cuerpo humano.

Tras una hora de inmersión, los andamios alcanzaron un hinchamiento de alrededor del 100-150%, destacando especialmente el andamio PCH20CXT-0.5%CS. Al observar el desempeño de los andamios durante las primeras 4 horas, todos presentan variaciones considerables en su porcentaje de hinchamiento (Figura 6.17). En general, durante las primeras horas que los andamios están en contacto con la solución SBF, existe una variación en la cantidad de agua que pueden almacenar. Esto puede deberse a varios factores, entre los que se encuentran la presencia de las porosidades heterogéneas observadas en las micrografías SEM o las condiciones del medio acuoso donde se encuentran sumergidos [401,402].

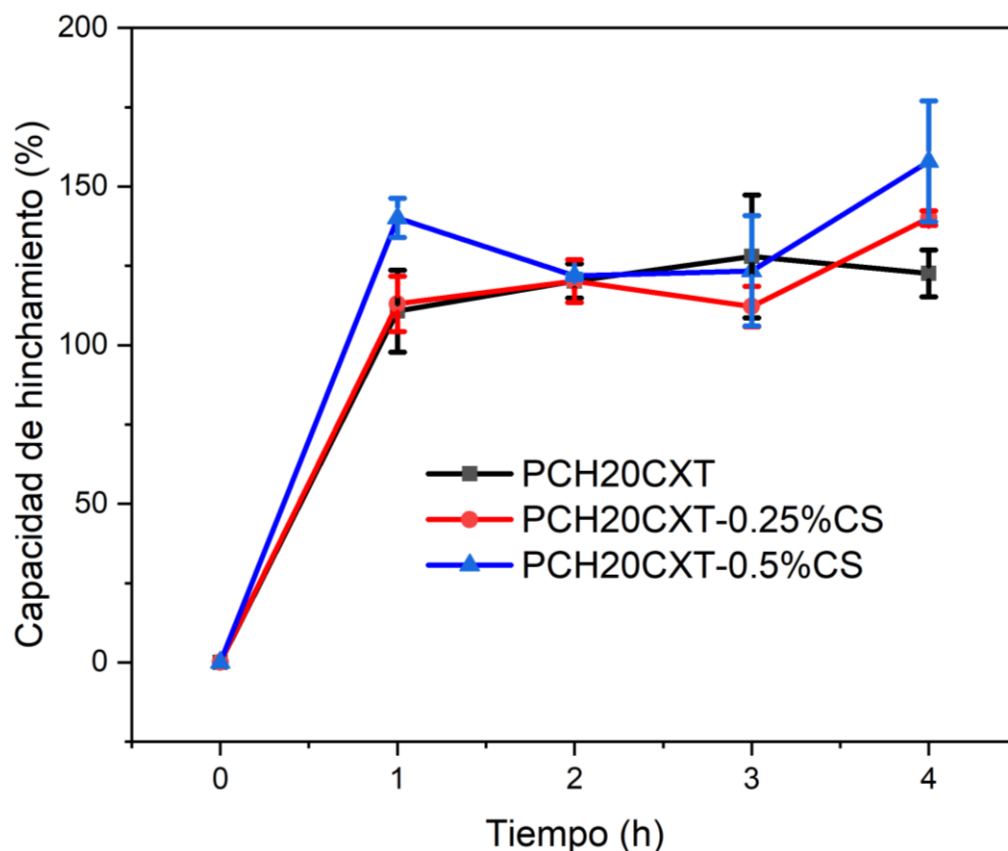


Figura 6.17. Capacidad de absorción de agua de los andamios multicapa después de un período de 4 horas de exposición a la solución SBF.

Cuando los andamios multicapa secos se exponen al agua, ésta generalmente interactúa de tres distintas formas. En una etapa inicial, las moléculas de agua penetran en la estructura del andamio y se adhieren a los grupos hidrofílicos (-OH) presentes en la cadena polimérica del CMC, generando un hinchamiento a mediada que los grupos hidrofílicos son hidratados [403]. Una vez que todos los grupos -OH se han hidratado, la cadena polimérica hinchada expone los grupos metilo (-CH₃) del PLA, que son hidrofóbicos, generando la formación de moléculas de agua semi enlazadas [202]. Posterior a estas interacciones, la red del andamio continúa absorbiendo agua adicional debido a las fuerzas osmóticas generadas por la cadena polimérica, llenando los espacios disponibles entre las cadenas poliméricas presentes en los andamios [203]. Por lo tanto, una distribución heterogénea de las porosidades podría modificar la capacidad de hinchamiento, ya que en áreas donde la porosidad es baja o la estructura

del andamio es densa, es posible que se forme un gradiente de concentración de agua libre, lo que implica que áreas circundantes con porosidad más alta y posiblemente interconectada pueden retener más agua, mientras que otras pueden estar relativamente secas [403].

Adicionalmente, la composición química de la solución puede influir significativamente en el hinchamiento inicial del hidrogel. La presencia de iones en la solución, que interactúan con las cargas eléctricas del hidrogel, puede limitar las interacciones del agua con los grupos funcionales de la cadena polimérica [404]. De la misma forma, la concentración de sales también tienen impacto en la osmolaridad y, por lo tanto, en el equilibrio del agua dentro y fuera del hidrogel [405].

Hasta este punto, no se le puede atribuir influencia alguna a la concentración de CS sobre la capacidad de retención de agua. No obstante, es importante señalar que el hinchamiento observado a lo largo del tiempo se le atribuye en su totalidad al hidrogel de CMC que recubre los andamios, tal como se menciona en la investigación de Liao *et al.* [204].

A través de un seguimiento más extenso a lo largo del tiempo, es cuando realmente se puede notar una clara diferencia en su comportamiento referente a la introducción del CS en la estructura (Figura 6.18). En el caso del andamio PCH20CXT-0.5%CS, es notable su diferencia con el resto de los andamios multicapa tras el primer día de exposición al SBF, alcanzando entre 350-400% de hinchamiento. En contraposición, tanto el andamio cargado con una concentración de 0.25% (p/p) de CS como el andamio sin CS oscilan entre 200-250%. Sin embargo, en el segundo día, este comportamiento cambia, ya que el andamio PCH20CXT-0.25%CS alcanza el mismo porcentaje de hinchamiento que el andamio PCH20CXT-0.5%CS, específicamente alcanzando entre 450-500% de hinchamiento, mientras que el andamio PCH20CXT, si bien también muestra un aumento en su capacidad de hinchamiento, se queda por debajo, logrando solo entre 325% y 400% tras el segundo día de inmersión.

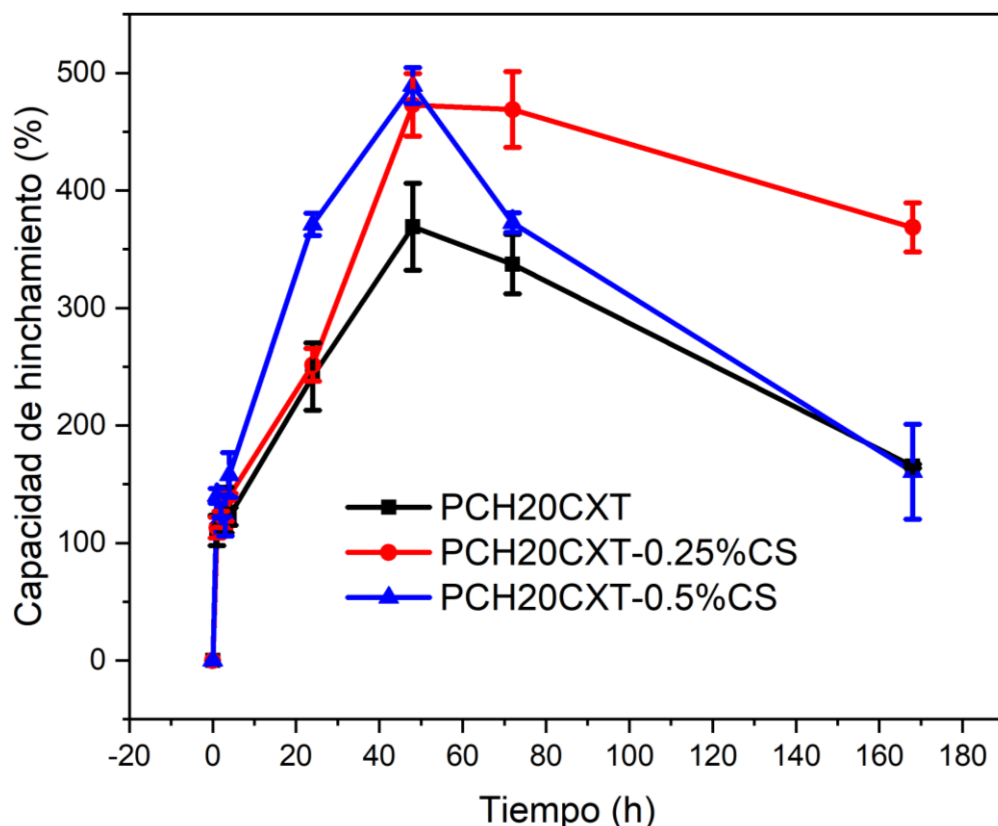


Figura 6.18. Representación gráfica de la evolución del hinchamiento en los andamios multicapa a lo largo de una semana de interacción con la solución SBF.

Aunque estos resultados muestran la gran capacidad de retención de agua que presentan los andamios con una concentración de 20% (p/p) de ácido cítrico (AC), es innegable la diferencia con los andamios con una concentración de 10% (p/p) de AC, donde se alcanzó un hinchamiento de hasta aproximadamente el 700%. La reducción en su capacidad de retención de agua se debe a que al incrementar la concentración de agente de entrecruzamiento químico (AEQ) al doble, se crea una estructura más densa y rígida al tener un número mayor de enlaces covalentes, por ende, la cantidad de agua que se puede anclar a las cadenas poliméricas es menor, reduciendo el hinchamiento macroscópico [406], como se observa en la Figura 6.1.

No es sino hasta las 72 horas de exposición al SBF que se muestra una diferencia contrastante entre los andamios cargados con CS con el andamio PCH20CXT. La adición del CS en la estructura del hidrogel puede modificar su capacidad de interacción con el

agua, ya que esta molécula presenta una gran afinidad natural por agua [397], resultando en esa diferencia de casi el doble en cuanto a su capacidad de hinchamiento entre el andamio PCH20CXT y el PCH20CXT-0.5%CS. A medida que el CS atrae y retiene agua, las capas del andamio experimentan un mayor hinchamiento, ya que el agua se infiltra y llena los espacios intermoleculares en el hidrogel incrementando así el volumen de agua libre presente en la estructura [407]. Sin embargo, este comportamiento no parecer ser el mismo cuando se utiliza una concentración de 0.25% (p/p) de CS en la estructura.

Tras el paso de un día en inmersión, el andamio PCH20CXT-0.25%CS presenta el mismo comportamiento que el andamio PCH20CXT. No es hasta el segundo día de inmersión que este andamio exhibe el mismo comportamiento que el andamio PCH20CXT-0.5%CS. Este efecto podría atribuirse a la posible complejación polielectrolítica entre los grupos sulfato desprotonados ($-O-SO_3^-$) y los enlaces C-H presentes en los grupos metilos ($-CH_3$) del PLA [362,363], generando el desplazamiento hacia números de onda mayores en la banda a 1584 cm^{-1} del CMC, al reducir las interacciones con PLA (Figura 6.5).

Esta interacción iónica puede crear una barrera física que, en conjunto con los enlaces covalentes formados en la reticulación, limitan las interacciones de los grupos -OH con el agua de la solución [408]. Sin embargo, a medida que el andamio continua inmerso, la afinidad natural del CS por agua desplaza estas interacciones, generando así una interacción directa con el agua que incrementa el volumen de agua libre y, por ende, la capacidad de hinchamiento del andamio [409]. En contraste, el comportamiento del andamio que contiene una concentración del 0.5% (p/p) CS implica que una parte del CS cargado en la estructura esta interactuando con las moléculas del PLA, mientras que otra parte no lo hace y se encuentra libre en la estructura del hidrogel, propiciando el comportamiento observado a las 24 horas de inmersión.

Se esperaría que al aumentar la concentración del agente entrecruzante mitigaría la degradación hidrolítica a la podrían estar expuestos los andamio multicapa. Por el contrario, este comportamiento, a diferencia de lo que reporta Guarnizo-Herrero *et al.*

[408], no contempla la interacción de los andamio en el ambiente que ofrece el SBF junto con la presencia del CS en la matriz del andamio. Tras 72 horas, tanto el andamio PCH20CXT como el andamio PCH20CXT-0.5%CS muestran una reducción substancial en la capacidad de hinchamiento, llegando al punto donde tras 168 horas de inmersión, presentan valores similares a los mostrados durante las primeras horas.

La degradación hidrolítica, con base en lo informado en la literatura [410], se produce en los enlaces éster, generando un grupo extremo hidroxilo y uno carbonilo. De acuerdo la más reciente investigación de Vaid *et. al.* [411], la presencia de iones hidroxilo (OH⁻) en la solución aumenta la velocidad de degradación del PLA, desencadenando un ataque nucleofílico a los carbonos carbonilos deficientes en electrones, dando como resultado la escisión de la cadena y, por lo tanto, la degradación del PLA. De la mismas forma, posiblemente este mecanismo reacción sea también el responsable de la degradación del hidrogel de CMC y CS mediante la escisión de los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ glucosídicos presentes en ambos polisacáridos. Además, la gran cantidad de porosidades a lo largo de toda la estructura del andamio multicapa podría favorecer un aumento en la velocidad de esta degradación [412].

Tomando en consideración todo lo descrito con anterioridad, el andamio PCH20CXT-0.25%CS muestra una reducción menor en la capacidad de hinchamiento en comparación con los otros andamios después de una semana. Este comportamiento podría deberse al mismo efecto “barrera”, limitando el acceso a factores externos, como el agua, mitigando así degradación y, por ende, exhibiendo una menor reducción su capacidad de hinchamiento. Sin embargo, para confirmar esto, es necesario realizar un análisis complementario como resonancia magnética nuclear (¹H-NMR, por sus siglas en inglés) o la caracterización del potencial Z, de manera que se pueda corroborar la existencia y naturaleza de las interacciones observadas entre el PLA y CS.

6.2.2.3 Comportamiento mecánico bajo esfuerzos de compresión.

El estudio de las propiedades mecánicas es esencial para comprender cómo la adición de CS en la matriz del andamio afecta su capacidad para mantener la integridad estructural y funcionalidad, en condiciones que imitan el ambiente biológico [413,414].

En esta sección de la discusión, abordaremos los resultados del seguimiento de las propiedades mecánicas de compresión de los andamios multicapa a los cuales se les incorporó condroitín sulfato (CS). El seguimiento de las propiedades mecánicas se basó en el comportamiento de los andamios multicapa durante las prueba de retención de agua, específicamente durante las fluctuaciones más significativas en la capacidad de hinchamiento a 0, 24, 72 y 168 horas de inmersión en fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés).

Para este análisis de esfuerzo-deformación, lo más notorio fue encontrar dos distintos tipos de curvas para los materiales base CMC y PLA. Esta consideración se realizó con base en las propiedades mecánicas reportadas en la literatura acerca de la aplicación de estos materiales en composites poliméricos con propuestas similares a las observadas en este trabajo [30,415,416].

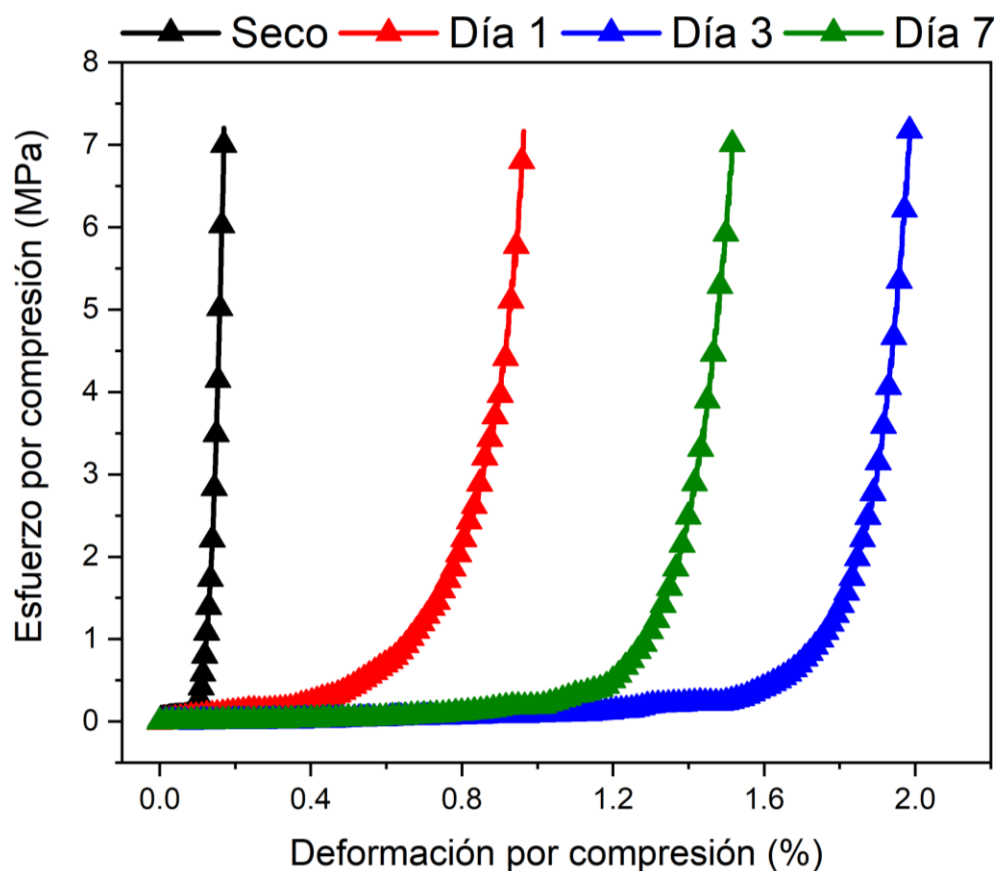


Figura 6.19. Curvas de esfuerzo deformación del andamio multicapa PCH20CXT a lo largo de una semana de inmersión en SBF.

La Figura 6.19 muestra el desempeño mecánico del andamio PCH20CXT durante primeras 24 horas de inmersión. En estado seco, el andamio PCH20CXT muestra valores bajos de deformación en comparación con la fuerza aplicada (Tabla 6.5), implicando que, la concentración de ácido cítrico (AC) utilizado para la conformación del hidrogel de CMC, genera una mayor rigidez en el andamio [417]. Al estudiar el comportamiento del andamio cuando interactúa con SBF, se observó que PCH20CXT experimentó una reducción en sus módulos de elasticidad durante las primeras 24 horas de inmersión. Este comportamiento se debe a su capacidad para absorber y retener agua, lo que aumento la deformación bajo compresión y disminuyó los valores del módulo de Young para ambos materiales [418], a costa de incrementar su capacidad de disipar esfuerzos [419]. Sin embargo, esta interacción continua con la solución acuosa provocó un aumento de la degradación hidrolítica, comprometiendo la estabilidad mecánica a lo largo del tiempo [420], tal como se observa en el incremento de la deformación residual.

Tabla 6.5. Resumen de las propiedades mecánicas del andamio PCH20CXT a lo largo de 7 días de inmersión.

Parámetros mecánicos	Puntos temporales de muestreo			
	Seco	Día 1	Día 3	Día 7
Módulo PLA (MPa)	1.8 ± 0.2	0.1 ± 0.002	0.4 ± 0.01	0.8 ± 0.1
Módulo CMC (MPa)	8.3 ± 0.3	2.4 ± 0.2	6.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1
Tenacidad (MJ/m ³)	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.02
Deformación residual (%)	4.7 ± 0.04	15.5 ± 0.3	19.08 ± 0.5	24.7 ± 0.6

Para los otros dos puntos temporales, la situación cambia drásticamente. A las 72 horas, se observa un aumento en el módulo elástico del CMC, aunque no alcanza el valor observado en estado seco. Los iones metálicos en el SBF parecen no afectar significativamente el carácter hidrofílico de los andamios, pero pueden influir en la estructura del hidrogel, ya que la interacción entre la difusión de la hidroxiapatita

(HAP) en el hidrogel y el SBF pueden generar una biomineralización que modifica las propiedades mecánicas del andamio [421,422].

En el caso del PLA, su comportamiento a lo largo de la exposición al SBF se atribuye principalmente a la degradación hidrolítica, que afectó tanto la deformación por compresión, como las propiedades mecánicas [420]. Esta posible formación de biomineralización contribuiría a mantener el módulo elástico prácticamente constante, a pesar de la degradación que experimentó el PLA.

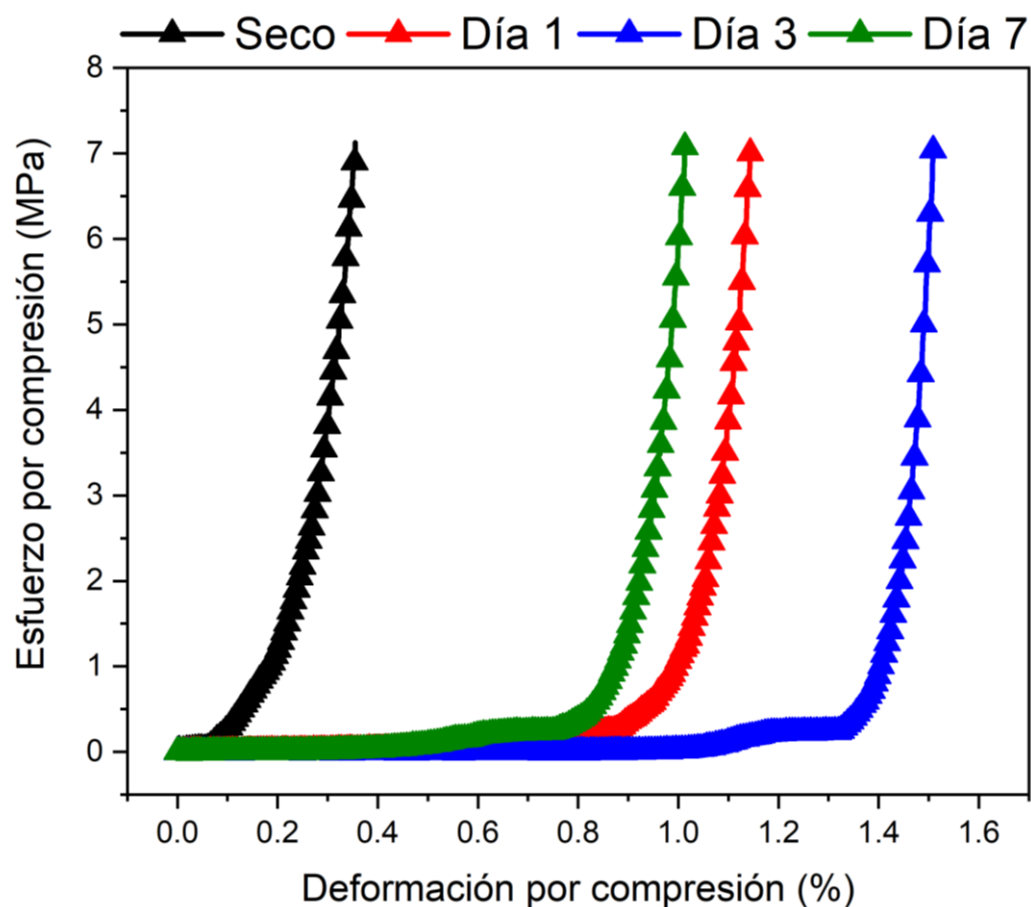


Figura 6.20. Curvas de esfuerzo deformación del andamio multicapa PCH20CXT-0.25%CS, a lo largo de una semana de inmersión en SBF.

La Figura 6.20 proporciona el comportamiento mecánico detallado sobre el andamio PCH20CXT-0.25%CS mientras se encuentra inmerso en el SBF bajo las mismas condiciones que el andamio PCH20CXT. Tal como se discutió en las pruebas de hinchamiento, la presencia de los grupos $(-O-SO_3^-)$ del CS pueden interactuar con otros

componentes del andamio, específicamente el PLA, formando enlaces iónicos e interacciones electrostáticas, que contribuye a una mayor cohesión y rigidez en la estructura del andamio [423,424], lo que se refleja en el aumento del módulo elástico para ambos casos, específicamente en el CMC, cuando el andamio esta deshidratado (Tabla 6.6).

Tabla 6.6. Resumen de las propiedades mecánicas del andamio PCH20CXT-0.25%CS a lo largo de 7 días de inmersión.

Parámetros mecánicos	Puntos temporales de muestreo			
	Seco	Día 1	Día 3	Día 7
Módulo CMC (MPa)	15.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.03
Módulo PLA (MPa)	20.6 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.7	2.1 ± 0.3
Tenacidad (MJ/m ³)	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.04
Deformación residual (%)	2.8 ± 0.1	5.2 ± 0.1	12 ± 0.04	16.6 ± 0.02

Tal como se observa en el andamio PCH20CXT, la interacción con el agua no solo modifica la deformación por compresión debido a la cantidad de agua libre en la estructura porosa, sino que también disminuye sus propiedades mecánicas a cambio de un incremento en la tenacidad (Tabla 6.5). Durante las 72 horas de inmersión, este denominado efecto “barrera”, que corresponde a la interacción del CS con el PLA, mantiene las propiedades mecánicas constantes, al mitigar el efecto de la degradación hidrolítica [408].

A pesar de la presencia de las interacciones entre el PLA y el CS, la degradación hidrolítica se puede observar tras 168 horas de inmersión con el SBF, ya que la cantidad de agua que puede retener disminuye, reflejando una reducción en su deformación máxima por compresión, que pasa de aproximadamente 1.5% a 0.9% (la menor disminución del trio de andamios). Comparado con el andamio PCH20CX, la integración del CS reduce significativamente la deformación residual, pasando de un 24.7% a un 16.6%.

La posible biomineralización debido a la difusión de los iones a lo largo de la superficie del hidrogel actuarían como refuerzo en las propiedades mecánicas del hidrogel. No obstante, aunque la formación de estos cristales en el hidrogel proporcione un efecto de refuerzo mecánico, su contribución puede no ser tan significativa como para imitar con mayor medida la degradación.

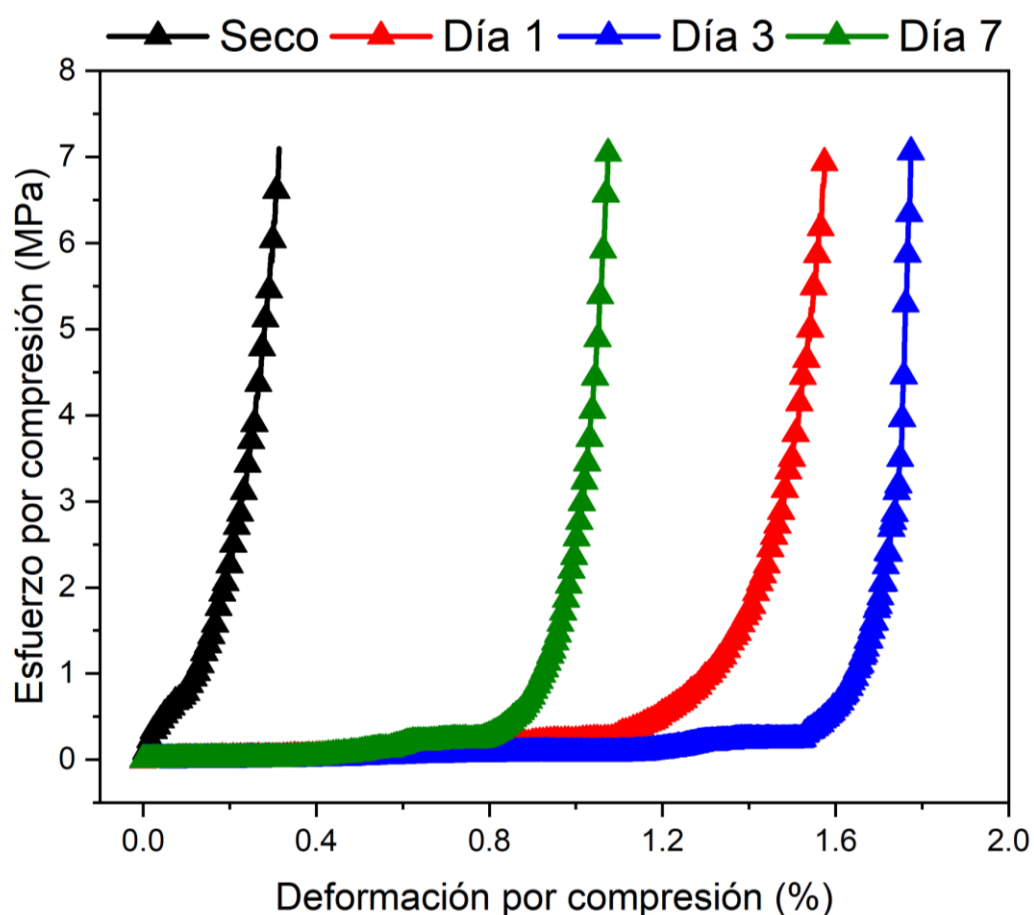


Figura 6.21. Curvas de esfuerzo deformación del andamio multicapa PCH20CXT-0.5%CS, a lo largo de una semana de inmersión en SBF.

Al comparar las propiedades mecánicas de los dos andamios que contienen condroitín sulfato (CS), se esperaría que, al duplicar la concentración de CS, las características mecánicas serían superiores (Figura 6.21). De la misma forma que en resultados anteriores, obtener un resultado contrario al esperado, ya no resulta sorprendente. La reducción en las propiedades mecánicas de los andamios PCH20CXT-0.5%CS (Tabla

6.6) se debe principalmente a la variación en las interacciones del complejo polielectrolítico [362]. Estas interacciones heterogéneas incitarían la formación de zonas con una mayor proporción de porosidades y zonas con una menor proporción o sin la presencia de porosidades, resultando en la disminución de los módulos elásticos y la estabilidad mecánica [375]. Por otro lado, el aumento observado en la tenacidad se atribuye a una mayor capacidad de retención de agua libre, propiciada a su vez por el incremento en la concentración de CS y, por ende, de cargas negativas que tienden a aumentar la capacidad higroscópica del andamio [237].

Tabla 6.7. Resumen de las propiedades mecánicas del andamio PCH20CXT-0.5%CS a lo largo de 7 días de inmersión.

Parámetros mecánicos	Puntos temporales de muestreo			
	Seco	Día 1	Día 3	Día 7
Módulo CMC (MPa)	15.1 ± 0.5	0.2 ± 0.04	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Módulo PLA (MPa)	14.2 ± 0.1	1.7 ± 0.6	2.4 ± 0.02	4.6 ± 0.4
Tenacidad (MJ/m ³)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.002	0.5 ± 0.03
Deformación residual (%)	6.7 ± 0.7	14.3 ± 0.8	19.1 ± 0.001	35.8 ± 2.7

A pesar de este contratiempo causado por el exceso de CS, la presencia de una mayor concentración de CS, formaría regiones con una mayor cohesión en su estructura que, combinada con la generación de una mayor cantidad de cristales de HAp debido a la gran difusión de los iones en la estructura del andamio, mejorando en promedio las propiedades mecánicas del andamio, como se observa en los resultados de las muestras a lo largo de los tres puntos posteriores de evaluación (24, 72 y 168 horas) (Tabla 6.7). Sin embargo, las regiones con una menor cantidad de CS y, por lo tanto, con porosidades de mayor tamaño, propician en mayor medida la degradación hidrolítica [425], tal como se observa en la reducción de la deformación máxima de compresión en el día 7 y en el aumento de la deformación residual del andamio.

Aunque de acuerdo con las investigaciones de Khairunnisa-Atiqah *et. al.* [196], el uso de CMC entrecruzado con AC para conformar una estructura de varias capas reduce gradualmente las propiedades mecánicas de los andamios, la conformación de la estructura propuesta en este trabajo parece contradecir estos resultados. La incorporación del CMC al PLA mejora la estabilidad mecánicas de los andamios. Además, mediante el uso de baja concentración de CS, aumenta más este parámetro mecánico, ya que el CS actúa como un mediador que incentiva la formación de nuevos cristales de HAp, al mismo tiempo que aumenta la cohesión entre cada una de las secciones del PLA, mitigando su degradación hidrolítica.

6.2.2.4 Análisis por Difracción de Rayos-X (DRX)

La caracterización superficial de las posibles estructuras cristalinas que se forman a lo largo de la matriz polimérica de los andamios multicapa durante la exposición continua por 168 horas a una solución de SBF, así como de las posibles interacciones del CS con las estructuras cristalinas tanto del PLA como del CMC durante el mismo periodo de tiempo que los andamios estuvieron en inmersión, fueron obtenidas mediante la difracción por rayos-X. La Figura 6.22 muestra los difractogramas de la sección transversal de cada uno de los andamio multicapa, así como el difractograma del PLA cargado con HAp (PLA HA) el cual, para fines de este análisis se utilizó como blanco.

En primer lugar, se puede observar que la señal del andamio PLA HA presenta características poco usuales en un polímero, ya que su difractograma muestra una mayor incidencia de estructuras ordenadas, destacando picos a 16.6° , 18.9° y 22.3° en 2θ , que son característicos de la fracción cristalina del PLA, como se ha informado en los resultados obtenido por Cherif *et al.* [426]. Este comportamiento parece ser el mismo para los andamios multicapa.

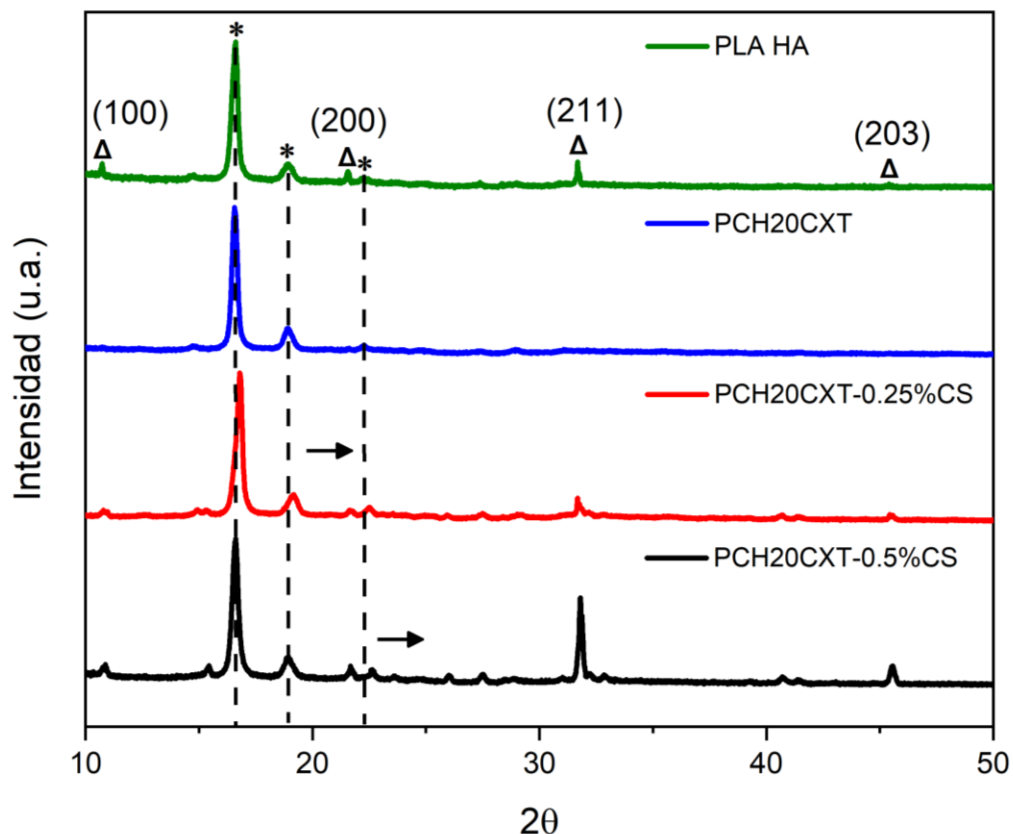


Figura 6.22. Difractogramas de los andamios multicapa tras 7 días de inmersión en SBF en contraste con PLA cargado con HAp.

Aunque los picos relacionados con el PLA son los más prominentes en el difractograma, también se pueden observar picos con menor intensidad. Estos picos a 11.7°, 21.6°, 31.7° y 45.4° en 2θ corresponden a los planos (100), (200), (211) y (203) de la estructura cristalina de la hidroxiapatita con un sistema hexagonal según la tarjeta 01-074-0566 de la ICDD. Estos resultados concuerdan con investigaciones previas de Alexopoulou *et al.* & Nanaki *et al.* [427,428], donde se encontraron cristales de hidroxiapatita (HAp) en la matriz polimérica de los andamios estudiados.

Es posible que la mayor presencia de fracción cristalina en los polímeros que componen el andamio multicapa sea el resultado de los métodos individuales utilizados para procesar cada sección del andamio, así como la presencia de HAp en la estructura cristalina debido a la exposición a la solución SBF durante 7 días.

El CS, con sus grupos sulfato desprotonados ($-O-SO_3^-$) y carbonilo ($-COO^-$), puede actuar como generador de sitios de nucleación para la formación de cristales de HAp [429]. Estos sitios ofrecerían puntos de unión para que los iones de calcio y fosfato, presentes en la solución SBF, se unan y comiencen a formar estas estructuras cristalinas. Esto implica que la presencia de concentraciones de CS, por debajo de 0.5%, en la estructura de los andamios generaría una mayor cantidad de cristales de HAp [430], tal como se observa en la Figura 6.22, donde se incrementa la intensidad de los planos correspondientes a la HAp. Este comportamiento podría ocurrir no solo en las condiciones de la solución SBF, sino también en ambientes acuosos con una concentración de iones de calcio y fosfato libres [431], tal como el exhibido por el análisis EDS (Figuras 6.9, 6.12 y 6.15), lo que hipotéticamente sería suficiente para generar estas estructuras cristalinas.

Al observar detenidamente el conjunto de difractogramas, se nota que la incorporación del CS no solo actúa como agente de nucleación, sino que también el efecto de complejación polielectrolítica entre el CS y el PLA, a bajas concentraciones de CS (0.25%), podría modificar la disposición de la estructura cristalina del PLA. Esta aseveración se basa al observar los picos del PLA, que pasan de 16.6° , 18.9° y 22.3° a 16.8° , 19.1° y 22.5° , respectivamente, generando un desplazamiento de 0.2° en todos los planos, indicando que a una concentración de 0.25% de CS, hay interacciones de origen electrostático que modifican la disposición de las cadenas poliméricas en el andamio [432]. Sin embargo, al observar el difractograma del andamio PCH20CXT-0.5%CS, no se observa este desplazamiento de 0.2° en los planos de 16.6° y 18.9° , aunque el pico a 22.3° permanece en la posición de 22.5° . Esto sugiere de manera contundente, que las interacciones entre el CS y el PLA disminuyen cuando se incrementa la concentración de CS al 0.5%, por el efecto de “auto-complejación” que exhibe el CS.

6.2.3 Actividad metabólica y expresión génica de Células Madre Mesenquimales (CMM) posterior a la incorporación de CS en los andamios multicapa.

6.2.3.1 Respuesta citotóxica y desempeño metabólico.

Al crear un biomaterial, una de las consideraciones principales es el posible efecto citotóxico, tanto de la interacción inicial de las células con el material como de los productos finales durante y después de la continua degradación del andamio en las condiciones de crecimiento celular [433,434]. El análisis AlamarBlue™ es clave para observar estos efectos. La Figura 6.23 muestra cualitativamente a lo largo de 7 días, el porcentaje de viabilidad de las CMM en cada capa que conforman a los andamios multicapa y el recubrimiento del CMC entrecruzado con el 20% de AC, que funcionan como blanco. También se presentan los andamios multicapa con concentraciones de 0%, 0.25% y 0.5% de CS en el hidrogel de CMC. Destaca que todas las muestras exhiben una viabilidad celular superior al 75%, considerado bajo la norma ISO 93195 [188], indicando una baja respuesta citotóxica, a pesar de utilizar una concentración del 20% (p/p) de AC [360]. Sin embargo, con el tiempo se nota una reducción de la viabilidad celular, especialmente en el andamio PCH20CXT-0.5%CS.

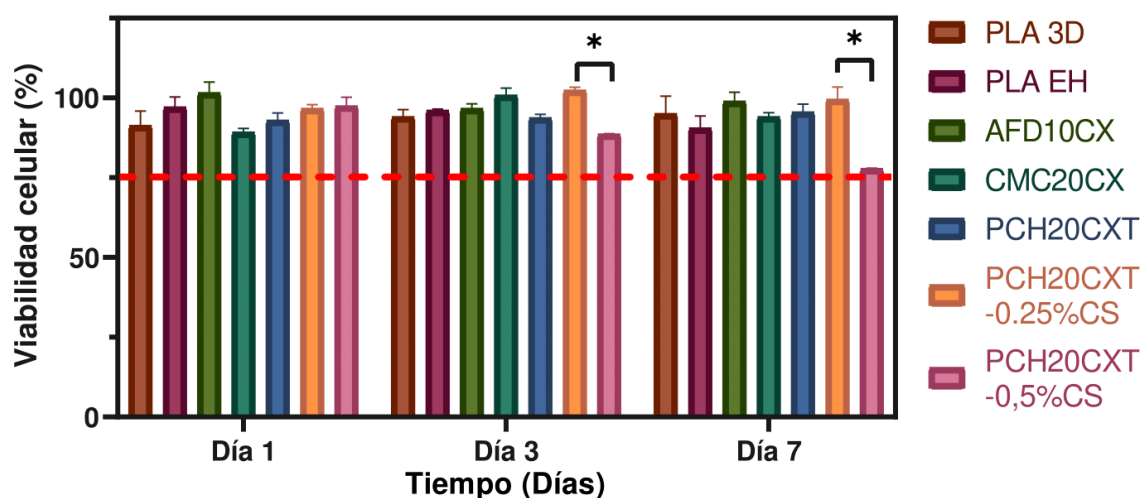


Figura 6.23. Comparativa del efecto citotóxico de los andamios multicapa mediante el análisis colorimétrico AlamarBlue™. *($p < 0.01$).

Aunque se esperaría que un aumento en la concentración de CS aumentara la viabilidad celular, el efecto de “auto-complejación” del CS le confiere una mayor susceptibilidad a la degradación hidrolítica en el andamio [435], afectando significativamente la viabilidad celular, disminuyendo del 98% al 77% después de 7 días de contacto con el medio de cultivo. Además de la degradación hidrolítica, otros factores también podrían estar afectando la viabilidad celular en el andamio PCH20CXT.

Para que las células proliferen en un andamio, se requiere que este proporcione factores como estabilidad mecánica y una superficie modificada química o físicamente que promueva la adhesión celular [436]. La auto-complejación del CS podría formar barreras físicas que dificulten la adhesión celular, limitando la capacidad de propagación y colonización celular [437]. Además, como se observa en la Figura 6.23, esta autoagregación podría interferir en la función celular, alterando el entorno químico circundante, incluyendo el pH y la concentración de iones [438], generando mayor toxicidad con el aumento de la concentración de CS a partir del 0.5% (p/p) de CS.

La tinción con DAPI de las células después de 7 días de contacto con cada andamio (Figura 6.24) ofrece información visual que ayuda a confirmar la presencia de células en fase de apoptosis, identificando el material genético fragmentado, mediante microscopía de fluorescencia [335].

Al comparar los resultados obtenidos indirectamente de la metodología AlamarBlue™ con la fluorescencia observada en las Figuras 6.24 A-C, es notable la casi nula presencia de células condensadas en apoptosis, que exhiben un color azul brillante, tal como lo describe Sharma *et. al.* [424]. Este comportamiento indica, tanto visual como cualitativamente, el bajo efecto citotóxico de los andamios considerado como muestra blanco, en las CMMP. No obstante, el andamio ADF10CX (Figura 6.24D), además de las células en estado de apoptosis, también muestra estructuras de mayor tamaño que las células sin morfología definida que igualmente exhiben esta misma fluorescencia azul brillante.

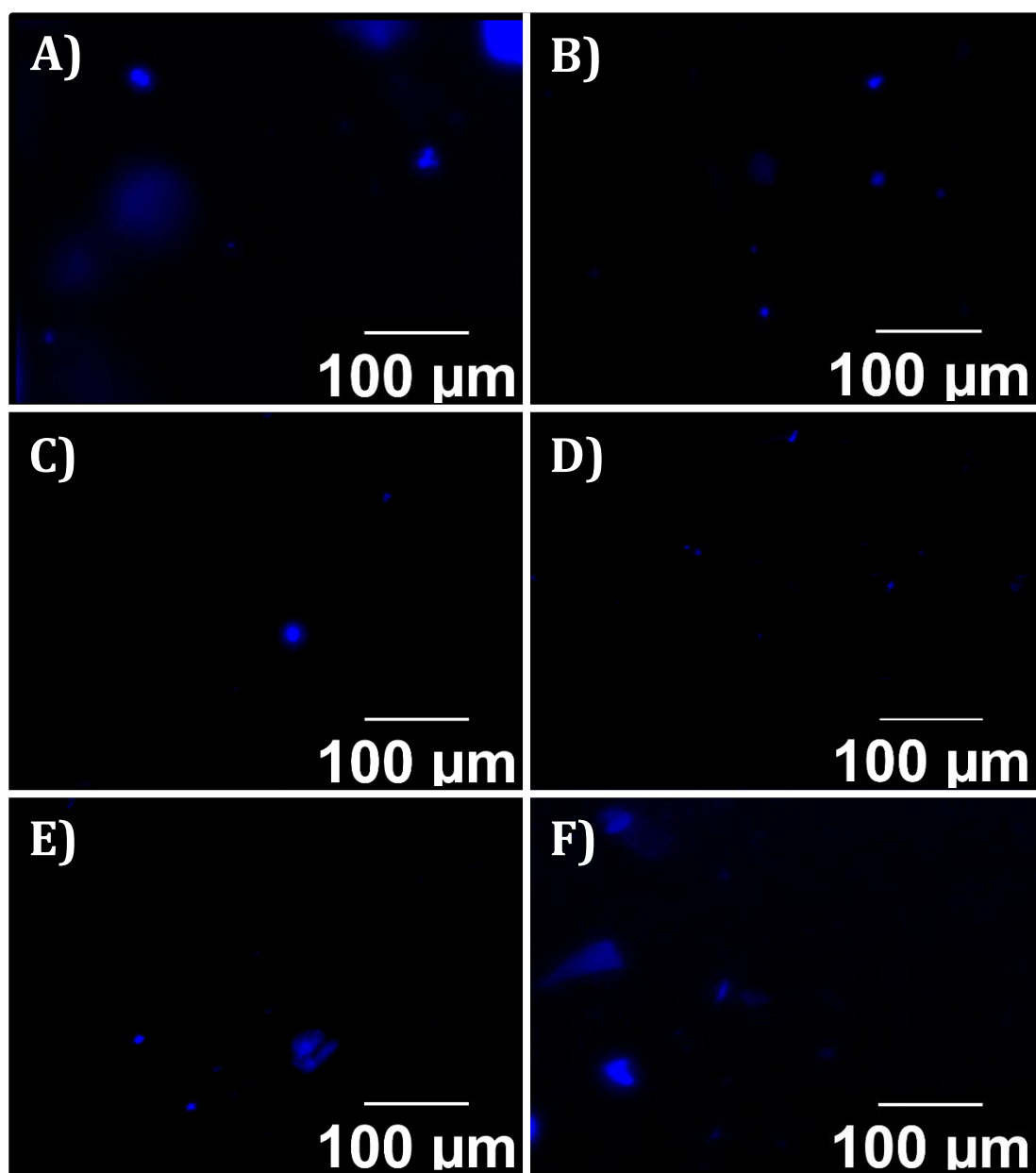


Figura 6.24. Fluorescencia azul de las células teñidas en su núcleo. A) ADF10CX, B) PLA 3D, C) PLA EH, D) PCH20CXT, E) PCH20CXT-0.25%CS, F) PCH20CXT-0.5%CS.

Al no existir información en la literatura sobre alguna evidencia de la respuesta fluorescente a 450 nm por parte de ninguno de los materiales base. Es posible que algunas secciones desprendidas del CMC hidratado, que conforma el andamio ADF10CX hayan retenido en su estructura, debido a sus propiedades hidrofílicas [161], una cantidad de la solución con DAPI utilizada para teñir las células, mostrando este respuesta en azul brillante, similar a la que se observó en las células. Esta respuesta

fluorescente, se podría considerar como evidencia de la degradación hidrolítica que experimentan los andamios, específicamente el hidrogel de CMC.

Al incorporar una concentración de CS en los andamios multicapa (Figura 6.4 E-F), su efecto en la inducción de muerte celular corresponde a lo observado en la viabilidad celular (Figura 6.23). Sin embargo, se observó el mismo efecto de degradación hidrolítica a medida que la concentración de CS aumenta, destacando sobre todo la presencia de una mayor cantidad de sección sin morfología definida en el andamio PCH20CXT-0.5%CS (Figura 6.24F) corroborando de manera visual, los resultados en la capacidad de hinchamiento y compresión mecánica al día 7 de exposición. Se esperaría que este mismo comportamiento se observara también en la fluorescencia del andamio PCH20CXT, sin embargo, debido a la ausencia de CS, las interacciones iónicas podrían no surgir entre los andamios, por lo que los materiales se disolverían más fácilmente, en lugar de generar las secciones observadas con anterioridad.

Respecto a los productos finales de su degradación como se observa, no presentaron ningún problema que disminuya la viabilidad celular, ya que al degradarse generan principalmente azúcares sencillos, provenientes de los polisacáridos (CS y CMC), AC y ácido láctico, por parte del PLA [439]. En el cuerpo humano, los azúcares pueden ser aprovechados mediante la glucólisis [440], mientras que el ácido cítrico se absorbe en el duodeno y se metaboliza en el hígado a través del ciclo de Krebs [145]. Del mismo modo, el ácido láctico se degrada en CO₂ y agua mediante el ciclo de Cori [441].

La Figura 6.25 muestra la actividad metabólica de las células CMM medida directamente a través del ensayo AlamarBlue™ en cada punto temporal. En general, la mayoría de los andamios exhiben actividad metabólica a lo largo de la semana de evaluación. Sin embargo, al realizar una comparación de los andamios control que no contienen en su estructura el hidrogel del CMC con los que sí lo incluyen, se evidencia una diferencia significativa en la supervivencia y el crecimiento celular, debido al microambiente que proporciona el hidrogel [168]. Si bien, estos resultados indican que cada andamio control por sí mismo proporciona condiciones para el crecimiento y la proliferación celular, su combinación genera un ambiente con mejores condiciones

químicas y morfológicas, que incentivan sustancialmente esta actividad metabólica a largo plazo [112,372–374,442,443].

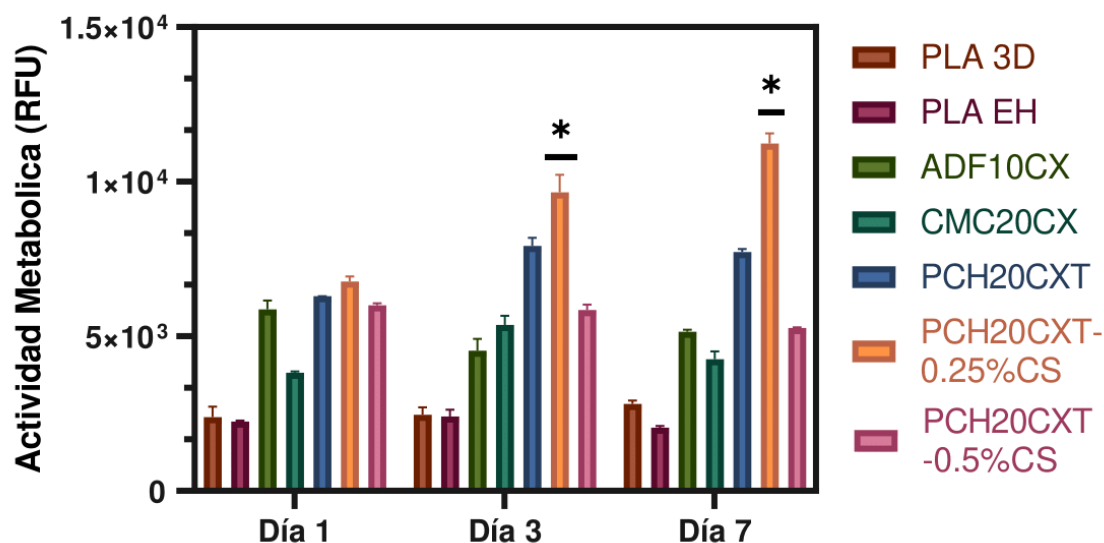


Figura 6.25. Comparación de la actividad metabólica de las CMM entre los grupos de control y los andamios multicapa. $^{*}(p < 0.01)$.

Este efecto de sinergia entre andamios con diferentes características superficiales, junto con las propiedades de química superficial que provee el hidrogel de CMC, genera un aumento en la actividad metabólica del andamio PCH20CXT. Aunque al inicio del ensayo no parece haber una diferencia significativa al introducir el CS en los andamios, esta situación cambia con el tiempo. Al evaluar la actividad metabólica en los días 3 y 7, se observa claramente el efecto del CS sobre la proliferación celular. El CS podría modular la adhesión celular y la interacción con células vecinas mediante la interacción iónica con sitios específicos en las integrinas de la membrana celular [444]. Al mismo tiempo, podría estimular la actividad de quinasas [445], inducir la producción y liberación de factores de crecimiento [446,447], y regular la expresión de genes que promuevan la transición del ciclo celular desde la fase G0/G1 a la fase S [448]. Esto aumentaría la actividad metabólica de las células madre mesenquimales (CMM) y, por lo tanto, garantizaría una mayor proliferación celular a lo largo del andamio.

Aunque las condiciones proporcionadas por el andamio multicapa PCH20CXT incentivan la adhesión y proliferación celular, aumentando la actividad metabólica, la reducción en la capacidad de hinchamiento y la disminución en la estabilidad mecánica debido a la degradación hidrolítica limitan la proliferación celular y, por ende, reducen la actividad metabólica.

A pesar de que tanto el andamio PCH20CXT como el PCH20CXT-0.5%CS presentan una disminución en su estabilidad mecánica y su capacidad de hinchamiento debido a la degradación hidrolítica, su actividad metabólica es completamente diferente. La “auto-complejación” del CS limitaría la interacción entre las células y la superficie, reduciendo la adhesión celular, la capacidad de migración y proliferación [437], lo que se refleja en la disminución de la actividad metabólica a lo largo de los días, de manera similar a su viabilidad celular.

6.2.3.2 Evaluación de las propiedades de inducción condrogénica de los andamios mediante qRT-PCR

La técnica Cuantitativa de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qRT-PCR, por sus siglas en inglés), permite una evaluación precisa sobre la capacidad de los andamio multicapa para inducir la condrogénesis.

Si bien el gen *Shh* desempeña un papel crucial en la especificación de las células precursoras hacia el linaje condrogénico, este resulta ser un factor de señalización que se expresa tempranamente, tal como lo menciona Yoon *et. al.* [449], por lo que su nula identificación tras una semana de interacción de las células con el andamio resulta congruente; sin embargo, se esperaría que pudiera ser detectado en los primeros días del experimento. A pesar de no observar la expresión del factor de señalización *Shh*, su presencia en la superficie celular permite la expresión del factor *Sox9*, un factor de transcripción maestro para la formación de condrocitos [450].

Al observar las curvas de amplificación de la Figura 6.26, se pueden distinguir claramente las fluctuaciones aleatorias en las señales a medida que el proceso de amplificación transcurre. Las interferencias o errores en el proceso de amplificación del

PCR pueden causar picos y valles irregulares en la curva dando lugar a la señales que suben y bajan de manera no sistemática en lugar de una amplificación uniforme y gradual en la señal a medida que avanza el ciclo [451]. Si bien, en ocasiones el ruido puede dar lugar a una amplificación tardía de la señal, afectando la eficiencia de la amplificación, el uso de un control negativo (sin cDNA) nos da la certeza de corroborar que las señales de expresión para Sox9 se encuentran por encima del ruido de fondo. Por lo tanto, se podría establecer que la expresión del factor maestro de transcripción Sox9 es un claro indicativo de que el microambiente generado por 6 de las 7 muestras analizadas proporciona las condiciones fisicoquímicas y mecánicas para que las CMM se dirijan hacia una diferenciación de un linaje condrogénico.

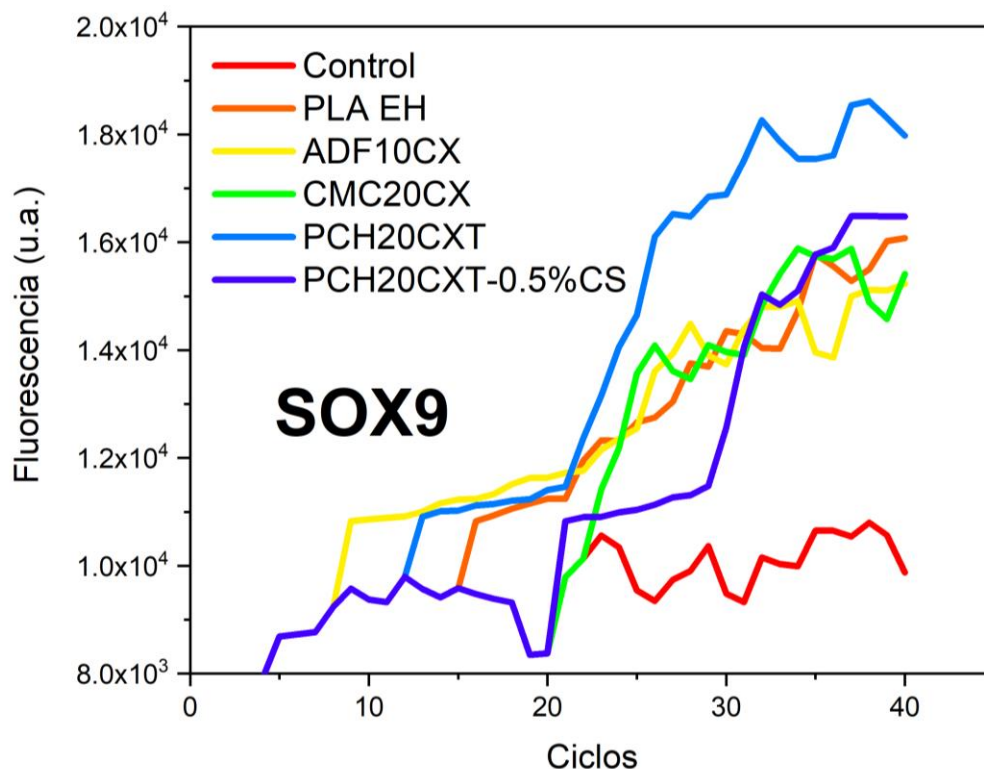


Figura 6.26. Representación gráfica de la curva de amplificación del gen Sox9, expresado al final del proceso de evaluación en los diferentes andamios.

No obstante, es importante considerar que la expresión génica es un proceso altamente regulado y dependiente de una serie de factores, en los que se incluye la fase del ciclo celular [452,453]. Al tener un cultivo celular primario asíncrono, como en este caso, las

células sembradas con diferentes fases del ciclo celular pueden mostrar niveles variables de expresión génica tras la exposición a los diferentes andamios [454]. Por lo que, a pesar de poder obtener el valor del umbral promedio (Cq) y generar una comparación entre cada una de las curvas de amplificación, no se podría indicar de manera precisa el efecto cualitativo o cuantitativo de las variaciones fisicoquímicas de cada uno de los andamios sobre las curvas de amplificación génica de las CMM.

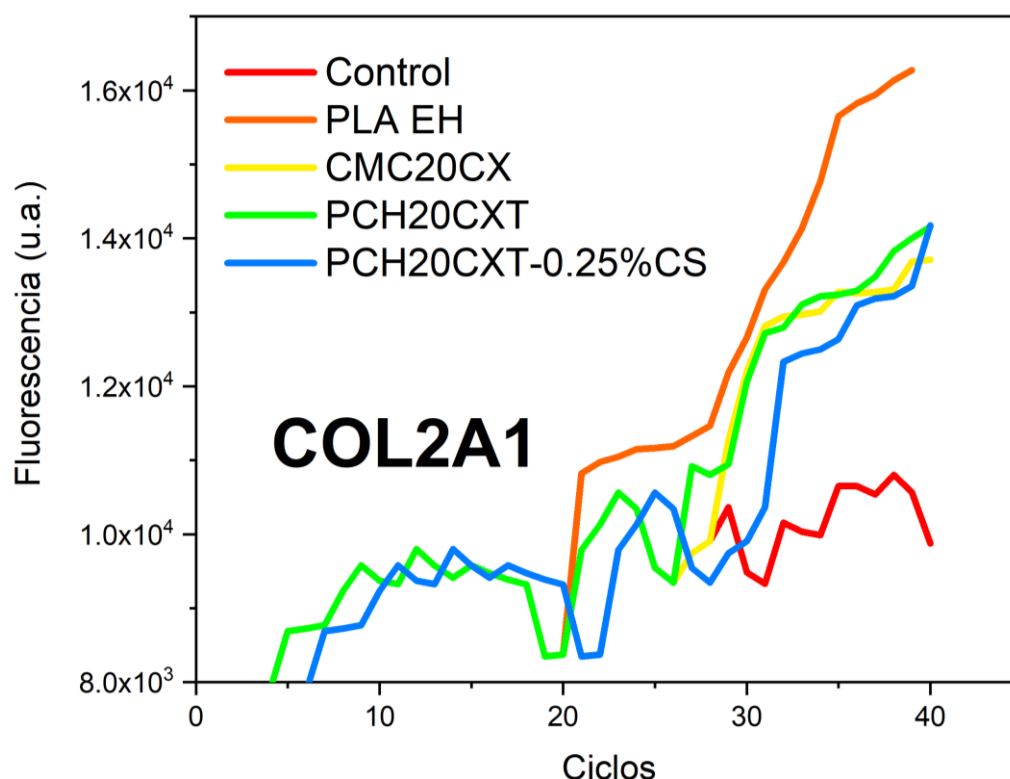


Figura 6.27. Representación gráfica de la curva de amplificación del gen *Col2a1*, expresado al final del proceso de evaluación en los diferentes andamios.

En el proceso de condrogénesis, la expresión de *Col2a1* (Figura 6.27) es crucial para la formación de la matriz extracelular (MEC) y la posterior adhesión celular en la estructura 3D del colágeno [455], principal proteína estructural del cartílago hialino [3]. *Col2a1* se emplea como marcador temprano en las fases iniciales de la formación del tejido cartilaginoso [456]. Aunque se observa una reducción en las fluctuaciones, la presencia de picos irregulares en las curvas, similar al gen *Sox9*, revela posibles

problemas en el proceso de amplificación. A diferencia de Sox9, Col2a1 solo se expresa en 4 de las 7 muestras analizadas: PLA EH, CMC20CXT, PCH20CXT y PCH20CXT-0.25%CS.

Uno de los factores que puede contribuir a esta discrepancia en la expresión de los genes, es la regulación temporal específica [457]. En este caso, al tener un cultivo inicial donde las células individuales pueden estar en diferentes fases del ciclo celular (asíncrono), éstas pueden estar experimentando diferentes procesos metabólicos y eventos de regulación génica, generando una variación en la expresión del gen Col2a1. No obstante, otros factores necesariamente deben estar cooperando en esta discrepancia, como por ejemplo la ausencia de proteínas morfogénicas de hueso (BMP, por sus siglas en inglés), u otros factores de transcripción como Sox5 o Sox6, al igual que las diferencias en el microambiente de cada uno de los andamios [458].

La zona media del cartílago, representada por el andamio PLA EH, mayormente compuesta de MEC con colágeno tipo II, actúa como regulador positivo para las células madre progenitoras condrogénicas (en este caso las CMM), expresando COL2A1 con éxito, según resultados de Ahmed *et al.* [459]. El hidrogel de CMC proporciona una estructura tridimensional (3D) que imita la MEC, induciendo la diferenciación hacia el linaje condrogénico, ya que las células madre responden a señales mecánicas y topológicas [460]. Dado que los andamios multicapa están mayoritariamente compuestos por PLA EH y el recubrimiento de hidrogel de CMC, no sorprende que exhiban expresión de Col2a1. Aunque no se puede establecer una correlación directa entre la concentración de condroitín sulfato (CS) en los andamios multicapa y la expresión de Col2a1, es interesante notar que el andamio PCH20CXT-0.5%CS no muestra expresión de este gen, pero si el andamio PCH20CXT-0.25%CS, a pesar de no expresar el gen Sox9.

A lo largo del tiempo, se ha demostrado que el CS tiene múltiples efectos positivos en la condrogénesis, imitando las condiciones fisiológicas de la MEC y estimulando la formación del tejido cartilaginoso [461]. Aunque la presencia de CS en el andamio PCH20CXT-0.5%CS podría crear un microambiente propicio para la activación de Sox9, la auto-complejación y la degradación hidrolítica reducen la superficie y estabilidad,

afectando la adhesión celular, la proliferación y la expresión génica de Col2a1, limitando la diferenciación avanzada de los condrocitos. Por su parte, la expresión del gen Col2A1 sin la identificación del gen Sox9 en el andamio CPH20CXT-0.25%CS, podría atribuirse al estado de la diferenciación en la que se encuentran las CMM; ya que el Sox9, al ser también un gen de expresión temprana [462], podría ya no expresarse en este punto temporal.

Por otro lado el agrecano, que codifica la el gen Acan [463], es un componente importante de la matriz extracelular (MEC) al mantener la integridad y funcionalidad al mismo tiempo que regula la hidratación de la MEC [464]. Acan se expresa a medida que los condrocitos continúan su maduración y secreción de matriz extracelular, lo que ocurre en etapas posteriores del desarrollo del cartílago [465].

Al observar las curvas presentes en la Figura 6.28, es innegable notar el mismo comportamiento en la variación de la intensidad de la fluorescencia durante el proceso de amplificación para el Acan. A pesar de mostrar este mismo comportamiento en la forma de las curvas de expresión para Sox9, no parecer ser el mismo caso para el número total de muestras que expresan el morfógeno Acan, ya que, de las 7 muestras testeadas solo 3 de ellas lo exhiben. No obstante, a diferencia del andamio multicapa PCH20CXT-0.25%CS, las otras dos muestras restantes no presentan de manera simultánea la expresión de Col2a1 y Acan.

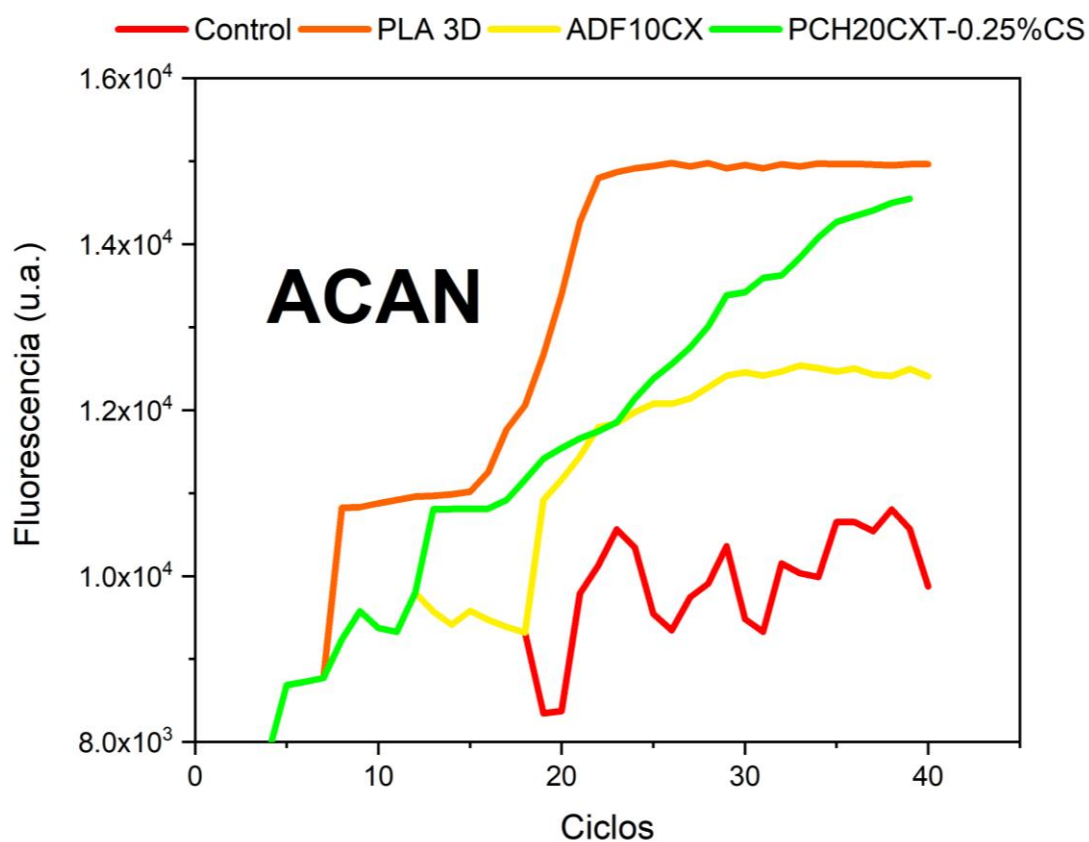


Figura 6.28. Representación gráfica de la curva de amplificación del gen *Acan*, expresado al final del proceso de evaluación en los diferentes andamios.

De entre las tres muestras que expresan ACAN, el andamio PLA 3D presenta el caso más particular, ya para este andamio en concreto no se observó la expresión de SOX9 ni de COL2A1. Es posible que para este caso esté ocurriendo una regulación diferencial del gen ACAN en respuesta a señales específicas del entorno generado por la morfología del andamio procesado por impresión 3D. Sin embargo, no se descarta su expresión debido la regulación por Bmp-2 o por los factores de transcripción Sox5 y Sox6. Por su parte el andamio ADF10CX parece proveer no solo las condiciones de químicas, sino también estructurales para promover la expresión del gen Sox9 y posteriormente Acan en las CMM.

En las articulaciones, la zona superficial del cartílago proporciona un deslizamiento suave, al mismo tiempo que le otorga cierta elasticidad [61]. Ambas características distintivas son propiciadas tanto por la abundante cantidad de fibras de colágeno como

por la presencia de condrocitos que expresan proteoglicanos [63,64]. Si bien, el objetivo principal del andamio PLA 3D es emular esta zona superficial al proporcionar una estructura similar a las fibras paralelas de colágeno, la falta de expresión de Sox9 en conjunto con Col2a1, excluyen no solamente la presencia de colágeno que sustituya la estructura del PLA 3D tras su degradación, sino también no es posible asegurar con estos marcadores génicos el linaje específico de estas posibles células diferenciadas.

Caso contrario del andamio ADF10CX, que con la expresión de Sox9 podemos estar más seguros de que las CMM se diferenciaron a una etapa temprana de la condrogénesis. Además, tal como se describe en la literatura, la zona profunda que pretende simular el andamio ADF10CX, que esencialmente se compone de proteoglicanos [3]. Indicando de esta manera, que probablemente las condiciones morfológicas propiciadas por la técnica de procesamiento FDLF generaron el microambiente que promovió la condrogénesis y posteriormente la síntesis de ácido hialurónico por parte de las células diferenciadas.

Por la su parte, el andamio PCH20CXT-0.25% se propone como el candidato ideal, ya no solamente expresa de manera efectiva Sox9 y Col2a1, sino también se observa la expresión del Acan. Con base en los resultados anteriores se podría suponer que la composición de los andamios multicapa generaría en todos los casos una respuesta por parte de los tres principales genes monitoreados durante la condrogénesis; sin embargo, este comportamiento se observa únicamente en el andamio PCH20CXT-0.25%CS. A pesar de que por sí solos, tanto el andamio PLA 3D, como el ADF10CXT generan la expresión del Acan, la combinación de su menor porcentaje de participación en el andamio y la variabilidad en el grosor del andamio ADF10CX, podrían ser factores diferenciales al momento de evaluar la expresión génica de su conjunto. De esta manera, se podría suponer que la expresión génica del Acan en el andamio PCH20CXT-0.25% podría ser modulada a través de la concentración de CS presente en el hidrogel que cubre la matriz polimérica mediante su interacción con receptores de superficie celular o factores de crecimiento sintetizados por las mismas células ya diferenciadas [466,467].

Al observar la Figura 6.28 es notable el cambio drástico en el comportamiento de la curva de amplificación de Runx2, donde se utilizaron sondas TaqMan, al compararla con las curvas de amplificación de los morfógenos (Sox9, Acan y Col2a1) donde se utilizó el tinte SYBR-Green. Este resultado sugiere que, si bien la elección del tinte SYBR-Green para los genes mencionados permite la identificación de varios genes a un bajo costo [468], la baja especificidad sobre las cadenas de ADN complementario que ofrece SYBR-Green evidencia posibles contaminaciones o malas praxis durante la extracción del ARN total de las CMM en los andamios tras 7 días de evaluación [469].

En general, el comportamiento mostrado por la mayoría de los andamios, destacando al PCH20CXT-025%CS, podría asegurar la formación y el mantenimiento del tejido cartilaginoso a lo largo del tiempo [443,470]; sin embargo, la identificación del gen Runx2 en todas las muestras podrían indicar todo lo contrario (Figura 6.29) [471].

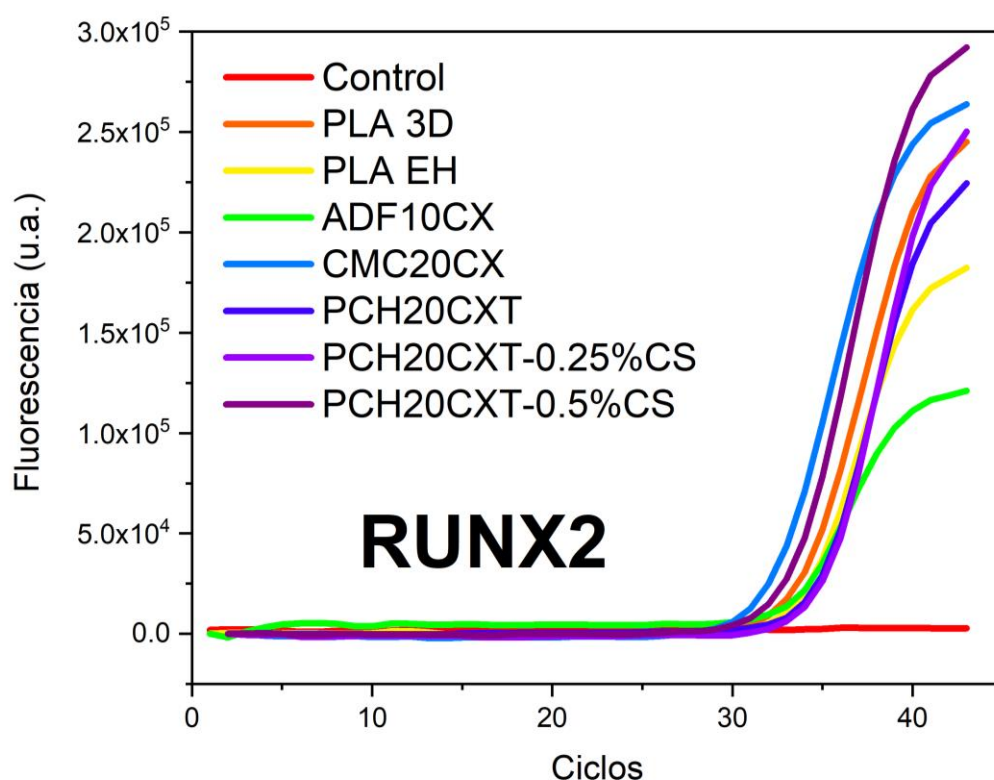


Figura 6.29. Representación gráfica de la curva de amplificación del gen Runx2, expresado al final del proceso de evaluación en los diferentes andamios.

Tal como Bmp-2 juega un rol importante en la expresión de Sox9 durante el inicio de la condrogénesis [472], el factor de diferenciación temprano Bmp-4 conduce la formación de hueso actuando como inductor inicial para la expresión de genes específicos de osteoblastos [473], como Runx2, que regulan la formación y mineralización del hueso [474]. Si bien este comportamiento se esperaría en las muestras que contienen hidroxiapatita (HAp) en su estructura (ADF10CX, PCH20CXT, PCH20CXT-0.25%CS y PCH20CXT-0.5%CS), la identificación en todas las muestras analizadas, con una diferencia de casi dos órdenes de magnitud en la intensidad de la fluorescencia, podría sugerir una diferenciación hacia un linaje mayoritariamente osteogénico [475,476], a pesar de la restricción en las comparaciones que establecen las condiciones experimentales.

A pesar de que, en un inicio, los andamios multicapa proporcionen las condiciones químicas y estructurales para incentivar la condrogénesis, si los niveles de expresión del gen Sox9 son bajos, generalmente por efecto de la regulación negativa de la vía de señalización Smad2/3 propiciada por la baja o nula traducción de estímulos celulares por parte de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK p38, por sus siglas en inglés) [477], Bmp-4 activa la vía de señalización Smad1/5/8 que propicia la expresión de marcadores hipertróficos como Runx2, promoviendo la diferenciación osteoblástica [450], tal como se observa al séptimo día de interacción de las CMM con los distintos andamios. Si bien, algunos estudios sugieren que la introducción de CS en los andamios reduce la expresión de marcadores hipertróficos [478,479], la generación sólo de estrés osmótico estático por parte de las cargas negativas que presenta una concentración en el CS, no resultan ser suficiente para evitar la hipertrofia del linaje condrogénico [480], por lo que necesariamente se tendría que considerar la aplicación de un estímulo de carga mecánica que genere cambios dinámicos en la osmolaridad del andamio y, por ende, un aumento en la actividad de MAPK p38 sobre la vía de señalización Smad2/3, inhibiendo así la hipertrofia de los condrocitos, tal como lo describió Aisenbrey *et. al.* [481].

6.3 Notas finales del capítulo

La propuesta de incorporar concentraciones por debajo de 0.5% (p/p) de condroitín sulfato (CS) a la estructura, junto con el tratamiento térmico no sólo reduce la cantidad mínima necesaria para inducir una respuesta en las células, sino también mitiga posibles repercusiones en el desempeño del andamio multicapa en ambientes biológicos. Aunque se requiere un análisis más detallado sobre la naturaleza de las interacciones que puede generar el CS, su interacción con la estructura del PLA modifica de manera positiva las propiedades generales de este polímero termoplástico para inducir esta respuesta favorable en las células madre mesenquimales (CMM).

En términos generales, este comportamiento sugiere que la mayoría de los componentes que constituyen los andamios multicapa, así como el andamio en sí, crean condiciones las superficiales, mecánicas y morfológicas para que las CMM expresen el factor de diferenciación condrogénico Sox9 y posteriormente Col2a1 y Acan, a pesar de la ausencia de factores de crecimiento transformadores (Tgf- β). Sin embargo, es necesario un análisis más detallado de la calidad de las materias primas, así como considerar la opción de incorporar metodologías que consideren el uso de estímulos externos de compresión mecánica para mantener un fenotipo estable a lo largo del tiempo.

CAPITULO 7. Conclusiones generales

7.1 Conclusiones generales

Este extenso trabajo de investigación ha explorado diversas facetas del desarrollo y evaluación de andamios poliméricos multicapa con aplicaciones en ingeniería de tejidos (IT). La combinación de PLA con CMC, junto con ácido cítrico, ha demostrado la capacidad de generar estructuras 3D que simulan un microambiente propicio para aumentar la actividad metabólica de las células madre mesenquimales (CMM).

El análisis integral de los andamios poliméricos multicapa ha revelado contribuciones significativas, destacando la identificación de factores clave que afectan la respuesta celular. Entre estos factores, se observó que la incorporación de condroitín sulfato (CS), con la metodología planteada, influye directamente en las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de los andamios, específicamente sobre el PLA, subrayando la importancia de encontrar un equilibrio en sus concentraciones para evitar efectos adversos.

La comparación entre las técnicas de procesamiento, entre las que se encuentran el electrohilado (EH), la impresión 3D y la fundición por disolventes (FDLP), ha revelado ventajas y desafíos específicos para cada método, sugiriendo la posibilidad de aprovechar estas técnicas de manera complementaria para optimizar las propiedades deseadas. La optimización de protocolos de lavado ha mejorado la viabilidad celular, aunque se reconoce la necesidad de abordar otros parámetros, como el grado de entrecruzamiento y la reducción de la concentración del hidrogel, para asegurar un desempeño biológico superior.

En el ámbito de la ingeniería de tejidos (IT), se obtuvieron resultados significativos, ya que, mediante técnicas sencillas de procesamiento, como EH, impresión 3D y FDLP, se permitió controlar con precisión la morfología y topología de los andamios. La caracterización detallada, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), ha proporcionado información valiosa sobre la superficie y composición química de los andamios,

respectivamente. La incorporación de agentes bioactivos, como la Hidroxiapatita (HAp), ha representado un paso adicional hacia la mejora de las propiedades mecánicas y bioactivas, abriendo perspectivas prometedoras en regeneración tisular.

En cuanto al estudio de la capacidad de los andamios multicapa para inducir la condrogénesis, se ha explorado de manera exhaustiva empleando la técnica cuantitativa de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qRT-PCR) como principal herramienta de evaluación molecular. La detección de la expresión la expresión de SOX9, y la exploración detallada de marcadores como COL2A1 y ACAN han proporcionado una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares involucrados en la condrogénesis. Sin embargo, la identificación del gen Runx2 mostró las limitaciones de estos andamios al simular el tejido cartilaginoso, estableciendo que es necesario considerar parámetros adicionales para asegurar la estabilidad del fenotipo durante la formación *in vitro* y en un futuro, *in vivo*, del tejido cartilaginoso hialino.

Este trabajo no solo contribuye al conocimiento fundamental en el campo de la IT y la medicina regenerativa, sino que también abre nuevas vías para el diseño y optimización de andamios biomiméticos con aplicaciones potenciales en medicina regenerativa y terapia tisular. Los resultados obtenidos refuerzan la importancia de considerar de manera integral factores químicos, mecánicos y biológicos en el diseño de andamios poliméricos multicapa para aplicaciones biomédicas e ingeniería de tejidos.

7.2 Contribuciones de esta tesis

Hasta donde es del conocimiento del autor, las contribuciones de esta tesis son las siguientes:

- Por primera vez se utilizaron, en su mayoría, materiales denominados como “materias primas”, como reactivos base para la conformación de los andamios multicapa, obteniendo un buen desempeño biológico con base en normativa internacional de calidad.

-
- Se desarrolló e implementó metodología innovadora para conformar el andamio multicapa a partir del manejo de técnicas de bajo costo y de fácil acceso.
 - Se estableció el efecto positivo de la estructura multicapa estratificada sobre el desempeño biológico de al menos dos tipos de líneas celulares, destacando su injerencia sobre las células madre mesenquimales en ausencia de factores de crecimiento externos.
 - Por primera vez, se sentaron las bases sobre las interacciones entre el CS y estructuras de PLA con morfología tipo fibra, así como su efecto en el desempeño general de un andamio multicapa expuesto a condiciones biológicas.
 - A diferencia de lo mostrado en la literatura, se estableció que una concentración más baja al 1% CS, también genera una respuesta biológica favorable en la diferenciación de células madre hacia condrocitos.

7.3 Productos científicos

7.3.1 Asistencia a congresos

Aceptados para presentación oral

G.A. Sanchez-Vega, V.A. Escobar-Barrios. *PLA-CMC crosslinked polymeric composite with potential use as scaffold for cell growth*. XXXV Congreso de la Sociedad polimérica de México, del 17 al 21 de octubre del 2022 en Monterrey, Nuevo León, México.

G.A. Sanchez-Vega, Luz Eugenia Alcántara-Quintanilla, V.A. Escobar-Barrios. *Influence of Additive Manufacturing Techniques and Polymer Blends in Chondrogenesis: A Study of Multilayer Scaffold based on PLA-CMC in Human Mesenchymal Stem Cells*. XXXIX International Conference of the Polymer Processing Society, del 19 al 20 de mayo del 2024 en Cartagena de Indias, Colombia.

7.3.2 Acuerdos generados

Se realizó, hasta donde tiene constancia el autor, el primer y único acuerdo internacional entre el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

(IPICYT) y el departamento de Química, Ingeniería en Materiales e Ingeniería Química “*Guilio Natta*”, perteneciente al Politécnico de Milán. Este acuerdo se realizó con el objetivo de la realización de una estancia corta de 3 meses en la ciudad de Milán, Italia durante el periodo de Marzo-Mayo del 2023, bajo la tutela de la Prof. Silvia Farè y la supervisión del Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios.

CAPÍTULO 8: Referencias Bibliográficas

- [1] S.W. O'DRISCOLL, Current Concepts Review - The Healing and Regeneration of Articular Cartilage*, JBJS. 80 (1998). https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/1998/12000/Current_Concepts_Review__The_Healing_and.11.aspx.
- [2] Julio César Sánchez Naranjo, Fisiología del condrocito articular, Rev. Colomb. Reumatol. 15 (2008) 21-33. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-81232008000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=es.
- [3] A.J. Sophia Fox, A. Bedi, S.A. Rodeo, The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function., Sports Health. 1 (2009) 461-468. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>.
- [4] J.C. Sánchez Naranjo, D.F. López Zapata, Fisiopatología celular de la osteoartritis: El condrocito articular como protagonista, Iatreia. 24 (2011) 167-178. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.9601>.
- [5] C.W. Archer, P. Francis-West, The chondrocyte., Int. J. Biochem. Cell Biol. 35 (2003) 401-404. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00301-1](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00301-1).
- [6] D. Correa, S.A. Lietman, Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions, Semin. Cell Dev. Biol. 62 (2017) 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.013>.
- [7] E.B. Hunziker, Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects, Osteoarthr. Cartil. 10 (2002) 432-463. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0801>.
- [8] J.R. Steadman, K.K. Briggs, J.J. Rodrigo, M.S. Kocher, T.J. Gill, W.G. Rodkey, Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up, Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg. 19 (2003) 477-484. <https://doi.org/10.1053/jars.2003.50112>.
- [9] R. Espinosa-morales, J. Alcántar-ramírez, C.A. Arce-salinas, L.M. Chávez-espina, J.A. Esquivel-valerio, J.J. Gutiérrez-gómez, L. De Lanza, J.L. Martínez-hernández, C. Méndez-medina, M.R. Román, E. Santillán-barrera, F. Torres-roldán, Reunión multidisciplinaria de expertos para el diagnóstico y tratamiento de la osteoartritis . Actualización basada en evidencias Multidisciplinary meeting of experts for diagnosis and treatment of osteoarthritis . Up-to-date based on evidence ., 34 (2018) 443-476. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2018/mim183m.pdf>.
- [10] S.L. Kolasinski, T. Neogi, M.C. Hochberg, C. Oatis, G. Guyatt, J. Block, L. Callahan, C. Copenhaver, C. Dodge, D. Felson, K. Gellar, W.F. Harvey, G. Hawker, E. Herzig, C.K. Kwoh, A.E. Nelson, J. Samuels, C. Scanzello, D. White, B. Wise, R.D. Altman, D. DiRenzo, J. Fontanarosa, G. Giradi, M. Ishimori, D. Misra, A.A. Shah, A.K. Shmagel, L.M. Thoma, M. Turgunbaev, A.S. Turner, J. Reston, 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee, Arthritis Care Res. 72 (2020) 149-162. <https://doi.org/10.1002/acr.24131>.
- [11] E.M.M. Peña, Gaceta Parlamentaria, Gac. Parlam. (2014) 8-34.
- [12] Programa Nacional de Salud 2007-2012 Por un México sano : construyendo alianzas para una mejor salud, 2012.
- [13] Central Ciudadano y Consumidor, Reporte sobre artritis reumatoide en México, (2019). https://issuu.com/centralcyc/docs/reporte_artritis_2019-5-20.

-
- [14] F. Guilak, Biomechanical factors in osteoarthritis., *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 25 (2011) 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2011.11.013>.
- [15] T.J. Klein, J. Malda, R.L. Sah, D.W. Hutmacher, Tissue Engineering of Articular Cartilage with Biomimetic Zones, *Tissue Eng. Part B Rev.* 15 (2009) 143–157. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0563>.
- [16] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, L. Peterson, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation., *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 889–895. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311401>.
- [17] A.J. Riff, H.P. Huddleston, B.J. Cole, A.B. Yanke, Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Allograft Transplantation Render Comparable Outcomes in the Setting of Failed Marrow Stimulation, *Am. J. Sports Med.* 48 (2020) 861–870. <https://doi.org/10.1177/0363546520902434>.
- [18] J.C. Mora, R. Przkora, Y. Cruz-Almeida, Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities., *J. Pain Res.* 11 (2018) 2189–2196. <https://doi.org/10.2147/JPR.S154002>.
- [19] M. Marcacci, G. Filardo, E. Kon, Treatment of cartilage lesions: What works and why?, *Injury.* 44 (2013) S11–S15. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(13\)70004-4](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(13)70004-4).
- [20] M. Bhattacharjee, J. Coburn, M. Centola, S. Murab, A. Barbero, D.L. Kaplan, I. Martin, S. Ghosh, Tissue engineering strategies to study cartilage development, degeneration and regeneration, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 84 (2015) 107–122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.010>.
- [21] L. Fu, Z. Yang, C. Gao, H. Li, Z. Yuan, F. Wang, X. Sui, S. Liu, Q. Guo, Advances and prospects in biomimetic multilayered scaffolds for articular cartilage regeneration., *Regen. Biomater.* 7 (2020) 527–542. <https://doi.org/10.1093/rb/rbaa042>.
- [22] S.C. Ligon, R. Liska, J. Stampfl, M. Gurr, R. Mülhaupt, Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing, *Chem. Rev.* 117 (2017) 10212–10290. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00074>.
- [23] W.-J. Li, Y.J. Jiang, R.S. Tuan, Chondrocyte Phenotype in Engineered Fibrous Matrix Is Regulated by Fiber Size, *Tissue Eng.* 12 (2006) 1775–1785. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1775>.
- [24] M. Montanari, A. Sangiorgi, E. Campodoni, G. Bassi, D. Gardini, M. Montesi, S. Panseri, A. Sanson, A. Tampieri, M. Sandri, Additive-Free Gelatine-Based Devices for Chondral Tissue Regeneration: Shaping Process Comparison among Mould Casting and Three-Dimensional Printing, *Polymers (Basel)*. 14 (2022) 1–18. <https://doi.org/10.3390/polym14051036>.
- [25] N.M. Kanafi, N.A. Rahman, N.H. Rosdi, Citric acid cross-linking of highly porous carboxymethyl cellulose/poly(ethylene oxide) composite hydrogel films for controlled release applications, *Mater. Today Proc.* 7 (2019) 721–731. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.12.067>.
- [26] V.O. Fasiku, C.A. Omolo, N. Devnarain, U.H. Ibrahim, S. Rambharose, M. Faya, C. Mocktar, S.D. Singh, T. Govender, Chitosan-Based Hydrogel for the Dual Delivery of Antimicrobial Agents Against Bacterial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm-Infected Wounds, *ACS Omega.* 6 (2021) 21994–22010. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02547>.
- [27] E. Hoch, G.E.M. Tovar, K. Borchers, Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering, *Bioinspired, Biomim. Nanobiomaterials.* 5 (2016) 51–66. <https://doi.org/10.1680/jbibn.15.00017>.
- [28] P. Tang, P. Song, Z. Peng, B. Zhang, X. Gui, Y. Wang, X. Liao, Z. Chen, Z. Zhang, Y. Fan, Z. Li, Y. Cen, C. Zhou, Chondrocyte-laden GelMA hydrogel combined with 3D printed PLA scaffolds for auricle regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.* 130 (2021) 112423. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112423>.

-
- [29] S. Gupta, A. Sharma, J. Vasantha Kumar, V. Sharma, P.K. Gupta, R.S. Verma, Meniscal tissue engineering via 3D printed PLA monolith with carbohydrate based self-healing interpenetrating network hydrogel, *Int. J. Biol. Macromol.* 162 (2020) 1358–1371. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.238>.
- [30] J. Namkaew, P. Laowpanitchakorn, N. Sawaddee, S. Jirajessada, S. Honsawek, S. Yodmuang, Carboxymethyl cellulose entrapped in a poly(Vinyl) alcohol network: Plant-based scaffolds for cartilage tissue engineering, *Molecules.* 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26030578>.
- [31] S.A. Ishak, M.F. Murshed, H. Md Akil, N. Ismail, S.Z. Md Rasib, A.A. Al-Gheethi, The Application of Modified Natural Polymers in Toxicant Dye Compounds Wastewater: A Review, *Water.* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/w12072032>.
- [32] X. Shen, J.L. Shamshina, P. Berton, G. Gurau, R.D. Rogers, Hydrogels based on cellulose and chitin: Fabrication, properties, and applications, *Green Chem.* 18 (2015) 53–75. <https://doi.org/10.1039/c5gc02396c>.
- [33] F. Baino, G. Novajra, C. Vitale-Brovarone, Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3 (2015). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00202>.
- [34] Y. Guo, T. Du, H. Li, Y. Shen, C. Mobuchon, A. Hieawy, Z. Wang, Y. Yang, J. Ma, M. Haapasalo, Physical properties and hydration behavior of a fast-setting bioceramic endodontic material, *BMC Oral Health.* 16 (2016) 23. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0184-1>.
- [35] B.N. Singh, V. Veeresh, S.P. Mallick, Y. Jain, S. Sinha, A. Rastogi, P. Srivastava, Design and evaluation of chitosan/chondroitin sulfate/nano-bioglass based composite scaffold for bone tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 133 (2019) 817–830. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.107>.
- [36] D. Bi, G. Chen, J. Cheng, J. Wen, N. Pei, H. Zeng, Y. Li, Boswellic acid captivated hydroxyapatite carboxymethyl cellulose composites for the enhancement of chondrocytes in cartilage repair, *Arab. J. Chem.* 13 (2020) 5605–5613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.03.030>.
- [37] IMSS, Seis de Cada 10 Adultos en México Tienen Mala Calidad Ósea: IMSS | Sitio Web “Acercando el IMSS al Ciudadano,” 128. (2018).
- [38] J. Zuart-Alvarado, Rubén; Martínez-Torres, Osteoartrosis y patologías crónicas, *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 49 (2011) 637–642.
- [39] G. Meza-Reyes, R. Espinosa-Morales, F. Torres-Roldán, A. Díaz-Borjón, M. Robles-San Román, Osteoartrosis: implementación de los algoritmos de diagnóstico y terapéutico vigentes, *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 55 (2017) 67–75.
- [40] A.A. Elhadad, A. Alcudia, B. Begines, E.M. Pérez-Soriano, Y. Torres, A multidisciplinary perspective on the latest trends in artificial cartilage fabrication to mimic real tissue, *Appl. Mater. Today.* 29 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2022.101603>.
- [41] D.J. Huey, J.C. Hu, K.A. Athanasiou, Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive, *Science (80-.).* 338 (2012) 917–921. <https://doi.org/10.1126/science.1222454>.
- [42] T. Li, X. Song, C. Weng, X. Wang, L. Gu, X. Gong, Q. Wei, X. Duan, L. Yang, C. Chen, Silk fibroin/carboxymethyl chitosan hydrogel with tunable biomechanical properties has application potential as cartilage scaffold, *Int. J. Biol. Macromol.* 137 (2019) 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.245>.
- [43] R.S. Krishna, J. Mishra, B. Nanda, S.K. Patro, A. Adetayo, T.S. Qureshi, The role of graphene and its

derivatives in modifying different phases of geopolymer composites: A review, *Constr. Build. Mater.* 306 (2021) 124774. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.124774>.

- [44] Z. Ren, Y. Ji, Y. Wang, L. Dong, Chondroitin sulfate from *Scophthalmus maximus* for treating osteoarthritis, *Int. J. Biol. Macromol.* 108 (2018) 1158–1164. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.091>.
- [45] H. Bougatef, Z. Ghilissi, R. Kallel, I. Ben Amor, T. Boudawara, J. Gargouri, Z. Sahnoun, N. Volpi, A. Sila, A. Bougatef, Chondroitin/dermatan sulfate purified from corb (*Sciaena umbra*) skin and bone: In vivo assessment of anticoagulant activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 164 (2020) 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.096>.
- [46] K. Higashi, Y. Okamoto, A. Mukuno, J. Wakai, S. Hosoyama, R.J. Linhardt, T. Toida, Functional chondroitin sulfate from *Enteroctopus dofleini* containing a 3-O-sulfo glucuronic acid residue, *Carbohydr. Polym.* 134 (2015) 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.082>.
- [47] F. Krichen, H. Bougatef, N. Sayari, F. Capitani, I. Ben Amor, I. Koubaa, F. Maccari, V. Mantovani, F. Galeotti, N. Volpi, A. Bougatef, Isolation, Purification and Structural Characteristics of Chondroitin Sulfate from Smooth hound Cartilage: In vitro Anticoagulant and Antiproliferative Properties, *Carbohydr. Polym.* 197 (2018) 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.040>.
- [48] G. He, Y. Yin, X. Yan, Q. Yu, Optimisation extraction of chondroitin sulfate from fish bone by high intensity pulsed electric fields, *Food Chem.* 164 (2014) 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.032>.
- [49] A. Rani, R. Baruah, A. Goyal, Physicochemical, antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 159 (2017) 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.015>.
- [50] P.A. Parmar, L.W. Chow, J.P. St-Pierre, C.M. Horejs, Y.Y. Peng, J.A. Werkmeister, J.A.M. Ramshaw, M.M. Stevens, Collagen-mimetic peptide-modifiable hydrogels for articular cartilage regeneration, *Biomaterials.* 54 (2015) 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.079>.
- [51] J. Wang, H.-S. Kim, Visualizing the Landscape of Home IoT Research: A Bibliometric Analysis Using VOSviewer, *Sensors.* 23 (2023). <https://doi.org/10.3390/s23063086>.
- [52] H. Wang, H. Fu, Y. Fu, L. Jiang, L. Wang, H. Tong, Z. Xie, P. Huang, M. Sun, Knowledge mapping concerning applications of nanocomposite hydrogels for drug delivery: A bibliometric and visualized study (2003–2022), *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10 (2022) 1099616. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1099616>.
- [53] L. Han, A.J. Grodzinsky, C. Ortiz, Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix, *Annu. Rev. Mater. Res.* 41 (2011) 133–168. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-062910-100431>.
- [54] H. John, H. Michael, Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 14th Edition, 2021.
- [55] L.P. Gartner, J.L. Hiatt, *Texto de Histología: Atlas a Color*, 5th ed., Elsevier, 2021.
- [56] K.M. Fischenich, J.A. Wahlquist, R.L. Wilmoth, L. Cai, C.P. Neu, V.L. Ferguson, Human articular cartilage is orthotropic where microstructure, micromechanics, and chemistry vary with depth and split-line orientation, *Osteoarthr. Cartil.* 28 (2020) 1362–1372. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.06.007>.
- [57] X. Zhou, J. Wang, W. Fang, Y. Tao, T. Zhao, K. Xia, C. Liang, J. Hua, F. Li, Q. Chen, Genipin cross-linked type II collagen/chondroitin sulfate composite hydrogel-like cell delivery system induces differentiation of adipose-derived stem cells and regenerates degenerated nucleus pulposus, *Acta Biomater.* 71 (2018) 496–509. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.019>.

-
- [58] S.L. Woo, J.A. Buckwalter, AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987., *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 6 (1988) 907–931. <https://doi.org/10.1002/jor.1100060615>.
- [59] X. Cartílago articular normal: anatomía, fisiología, metabolismo y envejecimientoChevalier, P. Richette, *Cartílago articular normal: anatomía, fisiología, metabolismo y envejecimiento*, EMC - Apar. Locomot. 38 (2005) 1–13. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-935X\(05\)43399-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-935X(05)43399-7).
- [60] M. Wong, P. Wuethrich, P. Eggli, E. Hunziker, Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: A new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography, *J. Orthop. Res.* 14 (1996) 424–432. <https://doi.org/10.1002/jor.1100140313>.
- [61] A.D. Pearle, R.F. Warren, S.A. Rodeo, Basic science of articular cartilage and osteoarthritis, *Clin. Sports Med.* 24 (2005) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2004.08.007>.
- [62] R. Sasisekharan, R. Raman, V. Prabhakar, GLYCOMICS APPROACH TO STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF GLYCOSAMINOGLYCANS, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8 (2006) 181–231. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095745>.
- [63] B.A. Rogers, C.L. Murphy, S.R. Cannon, T.W.R. Briggs, Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage., *J. Bone Joint Surg. Br.* 88 (2006) 1670–1674. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.88B12.18132>.
- [64] D.J. Huey, J.C. Hu, K.A. Athanasiou, Unlike Bone, Cartilage Regeneration Remains Elusive, *Science* (80-.). 338 (2012) 917–921. <https://doi.org/10.1126/science.1222454>.
- [65] E. Kozhemyakina, M. Zhang, A. Ionescu, U.M. Ayturk, N. Ono, A. Kobayashi, H. Kronenberg, M.L. Warman, A.B. Lassar, Identification of a Prg4-expressing articular cartilage progenitor cell population in mice, *Arthritis Rheumatol.* 67 (2015) 1261–1273. <https://doi.org/10.1002/art.39030>.
- [66] L.C. Hughes, C.W. Archer, I. Ap Gwynn, The ultrastructure of mouse articular cartilage: Collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review, *Eur. Cells Mater.* 9 (2005) 68–84. <https://doi.org/10.22203/eCM.v009a09>.
- [67] J.A. Buckwalter, H.J. Mankin, Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation., *Instr. Course Lect.* 47 (1998) 487–504.
- [68] P.A. Simkin, Synovial perfusion and synovial fluid solutes., *Ann. Rheum. Dis.* 54 (1995) 424–428. <https://doi.org/10.1136/ard.54.5.424>.
- [69] J.R. Levick, J.N. McDonald, Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules., *Ann. Rheum. Dis.* 54 (1995) 417–423. <https://doi.org/10.1136/ard.54.5.417>.
- [70] F. Forriol Campos, El cartílago articular: aspectos mecánicos y su repercusión en la reparación tisular, *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.* 46 (2002) 380–390. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-cirugia-ortopedica-traumatologia-129-articulo-el-cartilago-articular-aspectos-mecanicos-13038046>.
- [71] S. Oussedik, K. Tsitskaris, D. Parker, Treatment of articular cartilage lesions of the knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: A systematic review, *Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg.* 31 (2015) 732–744. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2014.11.023>.
- [72] D. Ishimaru, N. Sugiura, H. Akiyama, H. Watanabe, K. Matsumoto, Alterations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee, *Osteoarthr. Cartil.* 22 (2014) 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.11.010>.

-
- [73] L. Chen, J. Li, X. Bi, J. Ji, L. Wang, J. Cheng, Chondroitin sulfate micro granules embedded with oligochitosan-calcium complexes for potential osteoporosis prevention, *J. Funct. Foods.* 90 (2022) 104984. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104984>.
- [74] M.M. Mata-Miranda, L.E. Paredes-González, C.M. Martínez-Martínez, G.J. Vázquez-Zapién, Implante de condrocitos autólogos con potencial regenerativo en lesiones articulares, *Rev. Colomb. Ortop. y Traumatol.* 29 (2015) 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.rccot.2015.10.004>.
- [75] F. Liu, X.M. Huang, B. Ling, Glucosamine, chondroitin sulfate combined with bone health exercise can promote bone mineral density and muscle strength in postmenopausal women: A random community trial, *Chinese J. Tissue Eng. Res.* 23 (2019) 2303–2307. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.1171>.
- [76] S.P. Grogan, E.W. Dorthé, D.D. D'Lima, Chapter 12 - Cartilage 3D Printing, Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800547-7/00012-6>.
- [77] N.A. Moghadam, F. Bagheri, M.B. Eslaminejad, Chondroitin sulfate modified chitosan nanoparticles as an efficient and targeted gene delivery vehicle to chondrocytes, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 219 (2022) 112786. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112786>.
- [78] D. Correa, S.A. Lietman, Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions., *Semin. Cell Dev. Biol.* 62 (2017) 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.013>.
- [79] Y. Gao, K. Li, L. Guo, H. Fan, Y. Fan, X. Zhang, Fabrication of biomimetic hydrogel for chondrocyte delivery, *Mater. Lett.* 258 (2020) 126660. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126660>.
- [80] C.W. Grayson, R.C. Decker, Total Joint Arthroplasty for Persons With Osteoarthritis, *PM&R.* 4 (2012) S97–S103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2012.02.018>.
- [81] Y. Liu, K.M. Shah, J. Luo, Strategies for Articular Cartilage Repair and Regeneration., *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021) 770655. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.770655>.
- [82] J.R. Steadman, W.G. Rodkey, K.K. Briggs, Microfracture: Its History and Experience of the Developing Surgeon, *Cartilage.* 1 (2010) 78–86. <https://doi.org/10.1177/1947603510365533>.
- [83] J.R. Steadman, W.G. Rodkey, J.J. Rodrigo, Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects., *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2001) S362–9. <https://doi.org/10.1097/00003086-200110001-00033>.
- [84] D. Goyal, S. Keyhani, E.H. Lee, J.H.P. Hui, Evidence-Based Status of Microfracture Technique: A Systematic Review of Level I and II Studies, *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* 29 (2013) 1579–1588. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arthro.2013.05.027>.
- [85] J.R. Steadman, K.K. Briggs, J.J. Rodrigo, M.S. Kocher, T.J. Gill, W.G. Rodkey, Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up., *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. North Am. Int. Arthrosc. Assoc.* 19 (2003) 477–484. <https://doi.org/10.1053/jars.2003.50112>.
- [86] A.J. Krych, D.B.F. Saris, M.J. Stuart, B. Hacken, Cartilage Injury in the Knee: Assessment and Treatment Options, *JAAOS - J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 28 (2020). https://journals.lww.com/jaaos/Fulltext/2020/11150/Cartilage_Injury_in_the_Knee_Assessm ent_and.2.aspx.
- [87] T. Matsushita, T. Tokura, K. Okimura, S. Sano, K. Nishida, K. Nagai, Y. Hoshino, Surgical treatment of cartilage lesions in the knee: A narrative review, *J. Jt. Surg. Res.* 1 (2023) 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.jjoisr.2023.02.001>.
- [88] D.W. Jackson, M.J. Scheer, T.M. Simon, Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options., *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 9 (2001) 37–52.

<https://doi.org/10.5435/00124635-200101000-00005>.

- [89] R.S. Tuan, A.F. Chen, B.A. Klatt, Cartilage regeneration., *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 21 (2013) 303–311. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-21-05-303>.
- [90] T. Minas, A. Von Keudell, T. Bryant, A.H. Gomoll, The John Insall Award: A Minimum 10-year Outcome Study of Autologous Chondrocyte Implantation, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 472 (2014). https://journals.lww.com/clinorthop/Fulltext/2014/01000/The_John_Insall_Award_A_Minimum_10_year_Outcome.10.aspx.
- [91] L. Peterson, T. Minas, M. Brittberg, A. Nilsson, E. Sjögren-Jansson, A. Lindahl, Two- to 9-Year Outcome After Autologous Chondrocyte Transplantation of the Knee, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 374 (2000). https://journals.lww.com/clinorthop/Fulltext/2000/05000/Two_to_9_Year_Outcome_After_Autologous.20.aspx.
- [92] E.M. Samuelson, D.E. Brown, Cost-Effectiveness Analysis of Autologous Chondrocyte Implantation: A Comparison of Periosteal Patch Versus Type I/III Collagen Membrane, *Am. J. Sports Med.* 40 (2012) 1252–1258. <https://doi.org/10.1177/0363546512441586>.
- [93] C.R. Gooding, W. Bartlett, G. Bentley, J.A. Skinner, R. Carrington, A. Flanagan, A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered, *Knee.* 13 (2006) 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.knee.2006.02.011>.
- [94] J.R. Ebert, M. Fallon, D.J. Wood, G.C. Janes, A Prospective Clinical and Radiological Evaluation at 5 Years After Arthroscopic Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation, *Am. J. Sports Med.* 45 (2016) 59–69. <https://doi.org/10.1177/0363546516663493>.
- [95] M. Brittberg, D. Recker, J. Ilgenfritz, D.B.F. Saris, Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Five-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial, *Am. J. Sports Med.* 46 (2018) 1343–1351. <https://doi.org/10.1177/0363546518756976>.
- [96] S.L. Sherman, J. Garrity, K. Bauer, J. Cook, J. Stannard, W. Bugbee, Fresh osteochondral allograft transplantation for the knee: Current concepts, *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 22 (2014) 121–133. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-22-02-121>.
- [97] D.T. Briggs, K.N. Sadr, P.A. Pulido, W.D. Bugbee, The Use of Osteochondral Allograft Transplantation for Primary Treatment of Cartilage Lesions in the Knee, *Cartilage.* 6 (2015) 203–207. <https://doi.org/10.1177/1947603515595072>.
- [98] J. Chahal, A.E. Gross, C. Gross, N. Mall, T. Dwyer, A. Chahal, D.B. Whelan, B.J. Cole, Outcomes of Osteochondral Allograft Transplantation in the Knee, *Arthroscopy.* 29 (2013) 575–588. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2012.12.002>.
- [99] F. Familiari, M.E. Cinque, J. Chahla, J.A. Godin, M.L. Olesen, G. Moatshe, R.F. LaPrade, Clinical Outcomes and Failure Rates of Osteochondral Allograft Transplantation in the Knee: A Systematic Review, *Am. J. Sports Med.* 46 (2017) 3541–3549. <https://doi.org/10.1177/0363546517732531>.
- [100] Y.D. Levy, S. Görtz, P.A. Pulido, J.C. McCauley, W.D. Bugbee, Do fresh osteochondral allografts successfully treat femoral condyle lesions?, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 471 (2013) 231–237. <https://doi.org/10.1007/s11999-012-2556-4>.
- [101] V. Wylde, C. Livesey, A.W. Blom, Restriction in participation in leisure activities after joint replacement: an exploratory study, *Age Ageing.* 41 (2012) 246–249. <https://doi.org/10.1093/ageing/afr180>.
- [102] A. Yamashita, Y. Tamamura, M. Morioka, P. Karagiannis, N. Shima, N. Tsumaki, Considerations in hiPSC-derived cartilage for articular cartilage repair, *Inflamm. Regen.* 38 (2018) 17.

<https://doi.org/10.1186/s41232-018-0075-8>.

- [103] N. Tsumaki, M. Okada, A. Yamashita, iPS cell technologies and cartilage regeneration, *Bone*. 70 (2015) 48–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.011>.
- [104] M. Turner, S. Leslie, N.G. Martin, M. Peschanski, M. Rao, C.J. Taylor, A. Trounson, D. Turner, S. Yamanaka, I. Wilmut, Toward the Development of a Global Induced Pluripotent Stem Cell Library, *Cell Stem Cell*. 13 (2013) 382–384. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.08.003>.
- [105] A. Yamashita, S. Liu, K. Woltjen, B. Thomas, G. Meng, A. Hotta, K. Takahashi, J. Ellis, S. Yamanaka, D.E. Rancourt, Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells., *Sci. Rep.* 3 (2013) 1978. <https://doi.org/10.1038/srep01978>.
- [106] F. Djouad, C. Bouffi, S. Ghannam, D. Noël, C. Jorgensen, Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases, *Nat. Rev. Rheumatol.* 5 (2009) 392–399. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.104>.
- [107] P. Kangari, T. Talaie-Khozani, I. Razeghian-Jahromi, M. Razmkhah, Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects, *Stem Cell Res. Ther.* 11 (2020) 492. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02001-1>.
- [108] H. Le, W. Xu, X. Zhuang, F. Chang, Y. Wang, J. Ding, Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration, *J. Tissue Eng.* 11 (2020) 2041731420943839. <https://doi.org/10.1177/2041731420943839>.
- [109] N.K. Tripathi, A. Shrivastava, Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>.
- [110] H. Rogan, F. Ilagan, X. Tong, C.R. Chu, F. Yang, Microribbon-hydrogel composite scaffold accelerates cartilage regeneration in vivo with enhanced mechanical properties using mixed stem cells and chondrocytes, *Biomaterials*. 228 (2020) 119579. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119579>.
- [111] E. V Medvedeva, E.A. Grebenik, S.N. Gornostaeva, V.I. Telpuhov, A. V Lychagin, P.S. Timashev, A.S. Chagin, Repair of Damaged Articular Cartilage: Current Approaches and Future Directions., *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19082366>.
- [112] K. Atesok, M.N. Doral, J. Karlsson, K.A. Egol, L.M. Jazrawi, P.G. Coelho, A. Martinez, T. Matsumoto, B.D. Owens, M. Ochi, S.R. Hurwitz, A. Atala, F.H. Fu, H.H. Lu, S.A. Rodeo, Multilayer scaffolds in orthopaedic tissue engineering, *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 24 (2016) 2365–2373. <https://doi.org/10.1007/s00167-014-3453-z>.
- [113] K. Rajagopal, S. Ramesh, N.M. Walter, A. Arora, D.S. Katti, V. Madhuri, In vivo cartilage regeneration in a multi-layered articular cartilage architecture mimicking scaffold., *Bone Joint Res.* 9 (2020) 601–612. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.99.BJR-2019-0210.R2>.
- [114] K. Gupta, K. Meena, Artificial bone scaffolds and bone joints by additive manufacturing: A review, *Bioprinting*. 31 (2023) e00268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00268>.
- [115] A. Goyanes, M. Scarpa, M. Kamlow, S. Gaisford, A.W. Basit, M. Orlu, Patient acceptability of 3D printed medicines, *Int. J. Pharm.* 530 (2017) 71–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.064>.
- [116] F. Pati, J. Jang, J.W. Lee, D.W. Cho, Extrusion bioprinting, Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800972-7.00007-4>.
- [117] M. Amin, M. Singh, K.R. Ravi, Fabrication of superhydrophobic PLA surfaces by tailoring FDM 3D printing and chemical etching process, *Appl. Surf. Sci.* 626 (2023) 157217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2023.157217>.

-
- [118] S.M.S. Gruber, S. Murab, P. Ghosh, P.W. Whitlock, C.Y.J. Lin, Direct 3D printing of decellularized matrix embedded composite polycaprolactone scaffolds for cartilage regeneration, *Biomater. Adv.* 140 (2022) 213052. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213052>.
 - [119] A. Haryńska, I. Carayon, P. Kosmela, K. Szeliski, M. Łapiński, M. Pokrywczyńska, J. Kucińska-Lipka, H. Janik, A comprehensive evaluation of flexible FDM/FFF 3D printing filament as a potential material in medical application, *Eur. Polym. J.* 138 (2020) 109958. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109958>.
 - [120] E.D. Boland, J.A. Matthews, K.J. Pawlowski, D.G. Simpson, G.E. Wnek, G.L. Bowlin, Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering, *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 85 (2004) A7. [https://doi.org/10.1016/s0003-9993\(04\)01183-9](https://doi.org/10.1016/s0003-9993(04)01183-9).
 - [121] M. Qasim, D.S. Chae, N. Lee, Advancements and frontiers in nano-based 3d and 4d scaffolds for bone and cartilage tissue engineering, *Int. J. Nanomedicine.* 14 (2019) 4333–4351. <https://doi.org/10.2147/IJN.S209431>.
 - [122] AZoNano, The Difference Between ElectroSpinning and Electrospraying, (n.d.). <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=5060> (accessed August 13, 2023).
 - [123] J. Guo, H. Zhou, M.Y. Akram, X. Mu, J. Nie, G. Ma, Characterization and application of chondroitin sulfate/polyvinyl alcohol nanofibres prepared by electrospinning, *Carbohydr. Polym.* 143 (2016) 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.013>.
 - [124] L. Rogers, S.S. Said, K. Mequanint, The effects of fabrication strategies on 3D scaffold morphology, porosity, and vascular smooth muscle cell response, *J. Biomater. Tissue Eng.* 3 (2013) 300–311. <https://doi.org/10.1166/jbt.2013.1088>.
 - [125] A. Prasad, M.R. Sankar, V. Katiyar, State of Art on Solvent Casting Particulate Leaching Method for Orthopedic ScaffoldsFabrication, *Mater. Today Proc.* 4 (2017) 898–907. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.01.101>.
 - [126] A.F. Kanaan, A.C. Pinho, A.P. Piedade, Electroactive Polymers Obtained by Conventional and Non-Conventional Technologies, *Polymers* (Basel). 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13162713>.
 - [127] C. Jiao, D. Xie, Z. He, H. Liang, L. Shen, Y. Yang, Z. Tian, G. Wu, C. Wang, Additive manufacturing of Bio-inspired ceramic bone Scaffolds: Structural Design, mechanical properties and biocompatibility, *Mater. Des.* 217 (2022) 110610. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.110610>.
 - [128] M. Tschon, S. Brogini, A. Parrilli, S. Bertoldi, A. Silini, O. Parolini, S. Faré, L. Martini, F. Veronesi, M. Fini, G. Giavaresi, Assessment of the in vivo biofunctionality of a biomimetic hybrid scaffold for osteochondral tissue regeneration, *Biotechnol. Bioeng.* 118 (2021) 465–480. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.27584>.
 - [129] R. Revati, M.S. Abdul Majid, M.J.M. Ridzuan, M. Normahira, N.F. Mohd Nasir, M.N. Rahman Y., A.G. Gibson, Mechanical, thermal and morphological characterisation of 3D porous Pennisetum purpureum/PLA biocomposites scaffold, *Mater. Sci. Eng. C.* 75 (2017) 752–759. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.127>.
 - [130] D. Seliktar, Designing Cell-Compatible Hydrogels for Biomedical Applications, *Science* (80-.). 336 (2012) 1124–1128. <https://doi.org/10.1126/science.1214804>.
 - [131] R.A. Batista, P.J.P. Espitia, J. de S.S. Quintans, M.M. Freitas, M.Â. Cerqueira, J.A. Teixeira, J.C. Cardoso, Hydrogel as an alternative structure for food packaging systems, *Carbohydr. Polym.* 205 (2019) 106–116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.006>.
 - [132] V.S. Ghorpade, Preparation of hydrogels based on natural polymers via chemical reaction and

cross-linking, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00004-5>.

- [133] P.J. Flory, Principles of polymer chemistry, Cornell University Press, Ithaca, N.Y. SE -, 1953. <https://doi.org/LK> - <https://worldcat.org/title/542497>.
- [134] B.H. Pogostin, S. Linse, U. Olsson, Fibril Charge Affects α -Synuclein Hydrogel Rheological Properties, *Langmuir*. 35 (2019) 16536–16544. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02516>.
- [135] C.-C. Tsai, S.-H. Kuo, T.-Y. Lu, N.-C. Cheng, M.-Y. Shie, J. Yu, Enzyme-Cross-linked Gelatin Hydrogel Enriched with an Articular Cartilage Extracellular Matrix and Human Adipose-Derived Stem Cells for Hyaline Cartilage Regeneration of Rabbits, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020) 5110–5119. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01756>.
- [136] S. Tang, L. Zhao, J. Yuan, Y. Chen, Y. Leng, Physical hydrogels based on natural polymers, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00003-3>.
- [137] D. Qureshi, S.K. Nayak, A. Anis, S.S. Ray, D. Kim, T.T. Hanh Nguyen, K. Pal, Introduction of biopolymers: Food and biomedical applications, Elsevier Inc., 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00001-1>.
- [138] R. Ramachandran, D. Jung, A.M. Spokoyny, Cross-linking dots on metal oxides, *NPG Asia Mater.* 11 (2019) 19. <https://doi.org/10.1038/s41427-019-0119-9>.
- [139] X. Shen, J.L. Shamshina, P. Berton, G. Gurau, R.D. Rogers, Hydrogels based on cellulose and chitin: fabrication{,} properties{,} and applications, *Green Chem.* 18 (2016) 53–75. <https://doi.org/10.1039/C5GC02396C>.
- [140] J.G. Speight, Chapter 14 - Monomers, polymers, and plastics, in: J.G.B.T.-H. of I.H.P. (Second E. Speight (Ed.), Gulf Professional Publishing, Boston, 2020: pp. 597–649. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809923-0.00014-X>.
- [141] H.M.C. Azeredo, K.W. Waldron, Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review, *Trends Food Sci. Technol.* 52 (2016) 109–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.008>.
- [142] G. He, Z. Wang, H. Zheng, Y. Yin, X. Xiong, R. Lin, Preparation, characterization and properties of aminoethyl chitin hydrogels, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1614–1619. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.040>.
- [143] C. Menzel, E. Olsson, T.S. Plivelic, R. Andersson, C. Johansson, R. Kuktaite, L. Järnström, K. Koch, Molecular structure of citric acid cross-linked starch films, *Carbohydr. Polym.* 96 (2013) 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.044>.
- [144] D. Mazouzi, R. Grissa, M. Paris, Z. Karkar, L. Huet, D. Guyomard, L. Roué, T. Devic, B. Lestriez, CMC-citric acid Cu(II) cross-linked binder approach to improve the electrochemical performance of Si-based electrodes, *Electrochim. Acta.* 304 (2019) 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.03.026>.
- [145] H.M.C. Azeredo, C. Kontou-Vrettou, G.K. Moates, N. Wellner, K. Cross, P.H.F. Pereira, K.W. Waldron, Wheat straw hemicellulose films as affected by citric acid, *Food Hydrocoll.* 50 (2015) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.005>.
- [146] D.L. Taylor, M. in het Panhuis, Self-Healing Hydrogels, *Adv. Mater.* 28 (2016) 9060–9093. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201601613>.
- [147] M. Tako, S. Nakamura, Gelation mechanism of agarose, *Carbohydr. Res.* 180 (1988) 277–284. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80084-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80084-3).
- [148] J.N. Hunt, K.E. Feldman, N.A. Lynd, J. Deek, L.M. Campos, J.M. Spruell, B.M. Hernandez, E.J. Kramer, C.J. Hawker, Tunable, High Modulus Hydrogels Driven by Ionic Coacervation, *Adv. Mater.* 23

-
- (2011) 2327–2331. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201004230>.
- [149] J. Maitra, V.K. Shukla, Cross-linking in Hydrogels - A Review, *Am. J. Polym. Sci.* 4 (2014) 25–31. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20140402.01>.
- [150] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 13–36. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00240-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00240-X).
- [151] L. Zhao, H.J. Gwon, Y.M. Lim, Y.C. Nho, S.Y. Kim, Hyaluronic acid/chondroitin sulfate-based hydrogel prepared by gamma irradiation technique, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.048>.
- [152] M.L. Bedell, A.M. Navara, Y. Du, S. Zhang, A.G. Mikos, Polymeric Systems for Bioprinting, *Chem. Rev.* 120 (2020) 10744–10792. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00834>.
- [153] E. Jain, L. Hill, E. Canning, S.A. Sell, S.P. Zustiak, Control of gelation, degradation and physical properties of polyethylene glycol hydrogels through the chemical and physical identity of the crosslinker, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 2679–2691. <https://doi.org/10.1039/C6TB03050E>.
- [154] M.C.G. Pellá, M.K. Lima-Tenório, E.T. Tenório-Neto, M.R. Guilherme, E.C. Muniz, A.F. Rubira, Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 196 (2018) 233–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>.
- [155] K. Kaushik, R.B. Sharma, S. Agarwal, Natural polymers and their applications, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 37 (2016) 30–36.
- [156] K. Numata, D.L. Kaplan, 20 - Biologically derived scaffolds, in: D.B.T.-A.W.R.T. Farrar (Ed.), *Woodhead Publ. Ser. Biomater.*, Woodhead Publishing, 2011: pp. 524–551. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857093301.4.524>.
- [157] B.N. Singh, A. Nallakumarasamy, S. Sinha, A. Rastogi, S.P. Mallick, S. Divakar, P. Srivastava, Generation of hybrid tissue engineered construct through embedding autologous chondrocyte loaded platelet rich plasma/alginate based hydrogel in porous scaffold for cartilage regeneration, *Int. J. Biol. Macromol.* 203 (2022) 389–405. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.054>.
- [158] W. Bonani, W. Singhatanadgige, A. Pornanong, A. Motta, Natural Origin Materials for Osteochondral Tissue Engineering, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1058 (2018) 3–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76711-6_1.
- [159] S. Mohan, O.S. Oluwafemi, N. Kalarikkal, S. Thomas, S.P. Songca, Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology, in: F.K. Perveen (Ed.), *IntechOpen, Rijeka*, 2016: p. Ch. 3. <https://doi.org/10.5772/62225>.
- [160] D. Mudgil, Chapter 3 - The Interaction Between Insoluble and Soluble Fiber, in: R.A.B.T.-D.F. for the P. of C.D. Samaan (Ed.), *Academic Press*, 2017: pp. 35–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805130-6.00003-3>.
- [161] A.H. Bhat, Y.K. Dasan, I. Khan, H. Soleimani, A. Usmani, 9 - Application of nanocrystalline cellulose: Processing and biomedical applications, in: M. Jawaaid, S. Boufi, A.K.B.T.-C.-R.N.C. H.P.S. (Eds.), *Woodhead Publ. Ser. Compos. Sci. Eng.*, Woodhead Publishing, 2017: pp. 215–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00009-7>.
- [162] C. Chang, L. Zhang, Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 40–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.023>.
- [163] D. Şolpan, M. Torun, O. Güven, The usability of (sodium alginate/acrylamide) semi-interpenetrating polymer networks on removal of some textile dyes, *J. Appl. Polym. Sci.* 108 (2008) 3787–3795.

-
- [164] B. Kaczmarek, K. Nadolna, A. Owczarek, The physical and chemical properties of hydrogels based on natural polymers, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00006-9>.
- [165] D.E. Ciolacu, D.M. Suflet, 11 - Cellulose-Based Hydrogels for Medical/Pharmaceutical Applications, in: V. Popa, I.B.T.-B. as R.R.M. to O.B. of H.-T.V. Volf (Eds.), Elsevier, 2018: pp. 401–439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63774-1.00011-9>.
- [166] M.L.H. Rozali, N.H. Ahmad, M.I.N. Isa, Effect of Adipic Acid Composition on Structural and Conductivity Solid Biopolymer Electrolytes Based on Carboxy Methylcellulose Studies, *Am. J. Sustain. Agric.* 9 (2015) 39–45.
- [167] S. Mallakpour, M. Tukhani, C.M. Hussain, Recent advancements in 3D bioprinting technology of carboxymethyl cellulose-based hydrogels: Utilization in tissue engineering, *Adv. Colloid Interface Sci.* 292 (2021) 102415. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102415>.
- [168] A.S. Prasad, J. Wilson, L.V. Thomas, Designer injectable matrices of photocrosslinkable carboxymethyl cellulose methacrylate based hydrogels as cell carriers for gel type autologous chondrocyte implantation (GACI), *Int. J. Biol. Macromol.* 224 (2023) 465–482. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.137>.
- [169] S. Gupta, A.K. Yadav, Emerging trend of chondroitin sulfate in nanoparticles preparation, targeting, and pharmaceutical applications, First Edit, Elsevier Ltd., 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822351-2.00020-6>.
- [170] N. Volpi, Chondroitin sulfate safety and quality, *Molecules.* 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24081447>.
- [171] X. Liu, S. Liu, R. Yang, P. Wang, W. Zhang, X. Tan, Y. Ren, B. Chi, Gradient chondroitin sulfate/poly (γ -glutamic acid) hydrogels inducing differentiation of stem cells for cartilage tissue engineering, *Carbohydr. Polym.* 270 (2021) 118330. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118330>.
- [172] A. Sadeghi, M.J. Fatemi, M. Zandi, T. Bagheri, T. Ghadimi, M. Tamimi, M. Pezeshki-Modaress, Multilayered 3-D nanofibrous scaffold with chondroitin sulfate sustained release as dermal substitute, *Int. J. Biol. Macromol.* 206 (2022) 718–729. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.061>.
- [173] W.D. Callister, D.G. Rethwisch, *Ciencia e ingeniería de materiales: Introducción*, 2010.
- [174] M.S. Safavi, M.A. Surmeneva, R.A. Surmenev, J. Khalil-Allafi, RF-magnetron sputter deposited hydroxyapatite-based composite & multilayer coatings: A systematic review from mechanical, corrosion, and biological points of view, *Ceram. Int.* 47 (2021) 3031–3053. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.09.274>.
- [175] Y. Cheng, M.R. Morovvati, M. Huang, M. Shahali, S. Saber-Samandari, S. Niazi Angili, M. Ghadiri Nejad, M. Shakibaie, D. Toghraie, A multilayer biomimetic chitosan-gelatin-fluorohydroxyapatite cartilage scaffold using for regenerative medicine application, *J. Mater. Res. Technol.* 14 (2021) 1761–1777. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.07.052>.
- [176] A. Iulian, L. Dan, T. Camelia, M. Claudia, G. Sebastian, Synthetic Materials for Osteochondral Tissue Engineering, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1058 (2018) 31–52. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76711-6_2.
- [177] M.G.A. Vieira, M.A. da Silva, L.O. dos Santos, M.M. Beppu, Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review, *Eur. Polym. J.* 47 (2011) 254–263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>.
- [178] C.S. Moura, J.C. Silva, S. Faria, P.R. Fernandes, C.L. da Silva, J.M.S. Cabral, R. Linhardt, P.J. Bártolo, F.C. Ferreira, Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem/stromal cells on 3D porous poly

-
- (ϵ -caprolactone) scaffolds: Effects of material alkaline treatment and chondroitin sulfate supplementation, *J. Biosci. Bioeng.* 129 (2020) 756–764. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.01.004>.
- [179] R.P. Pawar, S.U. Tekale, S.U. Shisodia, J.T. Totre, A.J. Domb, Biomedical Applications of Poly(Lactic Acid), *Rec. Pat. Regen. Med.* 4 (2014) 40–51.
- [180] H.A. Owida, R. Yang, L. Cen, N.J. Kuiper, Y. Yang, Induction of zonal-specific cellular morphology and matrix synthesis for biomimetic cartilage regeneration using hybrid scaffolds., *J. R. Soc. Interface.* 15 (2018). <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0310>.
- [181] S. Camarero-Espinosa, B. Rothen-Rutishauser, C. Weder, E.J. Foster, Directed cell growth in multi-zonal scaffolds for cartilage tissue engineering, *Biomaterials.* 74 (2016) 42–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.033>.
- [182] K.A. Athanasiou, E.M. Darling, J.C. Hu, Hyaline Articular Cartilage BT - Articular Cartilage Tissue Engineering, in: K.A. Athanasiou, E.M. Darling, J.C. Hu (Eds.), Springer International Publishing, Cham, 2010: pp. 1–13. https://doi.org/10.1007/978-3-031-02578-5_1.
- [183] Y. Zhang, L. Ye, J. Cui, B. Yang, H. Sun, J. Li, F. Yao, A Biomimetic Poly(vinyl alcohol)–Carrageenan Composite Scaffold with Oriented Microarchitecture, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2 (2016) 544–557. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00535>.
- [184] J. León, G. Estrada, R. Olayo, R. Olayo, Acido Poliláctico cargadas con Curcumina . Core / shell fibers of Carboxymethylcellulose / Poly (lactic acid) loaded with Curcumin, *Cienc. En Desarro.* 11 (2020).
- [185] M. Gutiérrez Sánchez, V.A. Escobar Barrios, A.P. Guillén, D.M. Escobar-García, Influence of RGD Peptide on Morphology and Biocompatibility of 3D Scaffolds Based on PLA/Hydroxyapatite, *ChemistrySelect.* 4 (2019) 12656–12661. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/slct.201903397>.
- [186] N. Sharmin, J.T. Rosnes, L. Prabhu, U. Böcker, M. Sivertsvik, Effect of Citric Acid Cross Linking on the Mechanical, Rheological and Barrier Properties of Chitosan., *Molecules.* 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27165118>.
- [187] American Society for Testing and Materials, Standard Test Method for Tensile Properties of Organic Coatings, 2021. <https://doi.org/10.1520/D2370-16R21.2>.
- [188] International Organization for Standardization, ISO 10993-12, 2021. <https://www.iso.org/standard/75769.html>.
- [189] J.F. Su, Z. Huang, X.Y. Yuan, X.Y. Wang, M. Li, Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.035>.
- [190] A.M. Omer, T.M. Tamer, M.E. Hassan, R.E. Khalifa, E.M. Abd El-Monaem, A.S. Eltaweil, M.S. Mohy Eldin, Fabrication of Grafted Carboxymethyl Cellulose Superabsorbent Hydrogel for Water Retention and Sustained Release of Ethepon in Sandy Soil, *Arab. J. Sci. Eng.* 48 (2023) 561–572. <https://doi.org/10.1007/s13369-022-07352-w>.
- [191] S.J. Huang, 21 - Biodegradation, in: G. Allen, J.C.B.T.-C.P.S. and S. Bevington (Eds.), *Compr. Polym. Sci. Suppl.*, Pergamon, Amsterdam, 1989: pp. 597–606. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096701-1.00201-9>.
- [192] S. Castillejos, J. Cerna, F. Meléndez, M.E. Castro, R. Aguilar, C. Márquez-Beltrán, M. González, Bulk modification of poly(lactide) (PLA) via copolymerization with poly(propylene glycol) diglycidylether (PPGDGE), *Polymers* (Basel). 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/polym10111184>.

-
- [193] S.R. Ryu, I. Noda, Y.M. Jung, What is the origin of positional fluctuation of spectral features: true frequency shift or relative intensity changes of two overlapped bands?, *Appl. Spectrosc.* 64 (2010) 1017–1021. <https://doi.org/10.1366/000370210792434396>.
- [194] A.M. Omer, T.M. Tamer, M.E. Hassan, R.E. Khalifa, E.M. Abd El-Monaem, A.S. Eltaweil, M.S. Mohy Eldin, Fabrication of Grafted Carboxymethyl Cellulose Superabsorbent Hydrogel for Water Retention and Sustained Release of Ethephon in Sandy Soil, *Arab. J. Sci. Eng.* 48 (2023) 561–572. <https://doi.org/10.1007/s13369-022-07352-w>.
- [195] M. Przybysz-Romatowska, J. Haponiuk, K. Formela, Poly(ϵ -caprolactone)/poly(lactic acid) blends compatibilized by peroxide initiators: Comparison of two strategies, *Polymers (Basel)*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/polym12010228>.
- [196] M.K. Khairunnisa-Atiqah, K.M. Salleh, A.H. Ainul Hafiza, N.S.N. Mazlan, M. Mostapha, S. Zakaria, Impact of Drying Regimes and Different Coating Layers on Carboxymethyl Cellulose Cross-Linked with Citric Acid on Cotton Thread Fibers for Wound Dressing Modification, *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14061217>.
- [197] S. Liu, Y. Li, H. Sun, S. Zhang, X. Zeng, P. Zong, Y. Wan, G. Zuo, Preparation and characterisation of a lamellar hydroxyapatite/poly(lactic acid) composite, *Plast. Rubber Compos.* 48 (2019) 66–73. <https://doi.org/10.1080/14658011.2018.1548191>.
- [198] R. Gonzalez-McQuire, J.-Y. Chane-Ching, E. Vignaud, A. Lebugle, S. Mann, Synthesis and characterization of amino acid-functionalized hydroxyapatite nanorods, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2277–2281. <https://doi.org/10.1039/B400317A>.
- [199] D. Mazouzi, B. Lestriez, L. Roué, D. Guyomard, Silicon composite electrode with high capacity and long cycle life, *Electrochem. Solid-State Lett.* 12 (2009). <https://doi.org/10.1149/1.3212894>.
- [200] K.K. Mali, S.C. Dhawale, R.J. Dias, N.S. Dhane, V.S. Ghorpade, Citric acid crosslinked carboxymethyl cellulose-based composite hydrogel films for drug delivery, *Indian J. Pharm. Sci.* 80 (2018) 657–667. <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000405>.
- [201] W.H. Wan Ishak, N.A. Rosli, I. Ahmad, Influence of amorphous cellulose on mechanical, thermal, and hydrolytic degradation of poly(lactic acid) biocomposites, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68274-x>.
- [202] Y. Koga, P. Westh, K. Nishikawa, S. Subramanian, Is a Methyl Group Always Hydrophobic? Hydrophilicity of Trimethylamine-N-oxide, Tetramethyl Urea and Tetramethylammonium Ion, *J. Phys. Chem. B*. 115 (2011) 2995–3002. <https://doi.org/10.1021/jp108347b>.
- [203] H. Ismail, M. Irani, Z. Ahmad, Starch-Based Hydrogels: Present Status and Applications, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 62 (2013) 411–420. <https://doi.org/10.1080/00914037.2012.719141>.
- [204] T. Liao, P. Huang, H. Song, J. Guo, X. Fu, X. Yu, L. Peng, B. Han, Y. Zhu, Y. Zhang, La(OH)₃-modified magnetic sodium carboxymethyl cellulose for sequential removal of pollutants: adsorption of phosphate and subsequent photocatalytical reduction of Cr(VI), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (2020) 40346–40354. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09904-9>.
- [205] X. Xia, P. Sun, X. Sun, Y. Wang, S. Yang, Y. Jia, B. Peng, C. Nie, Hyper-crosslinked polymers with controlled multiscale porosity for effective removal of benzene from cigarette smoke, 22 (2022) 19–29. <https://doi.org/doi:10.1515/epoly-2022-0006>.
- [206] N.N. Mikheeva, V.I. Zaikovskii, G. V Mamontov, Synthesis of ceria nanoparticles in pores of SBA-15: Pore size effect and influence of citric acid addition, *Microporous Mesoporous Mater.* 277 (2019) 10–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.10.013>.
- [207] K.-S. Han, J.E. Song, N. Tripathy, H. Kim, B.M. Moon, C.H. Park, G. Khang, Effect of pore sizes of silk

-
- scaffolds for cartilage tissue engineering, *Macromol. Res.* 23 (2015) 1091–1097. <https://doi.org/10.1007/s13233-015-3156-4>.
- [208] C. Arnoult, J. Di Martino, D. Ruch, Prediction and limitation of polymer degradation in Environmental SEM, *Ultramicroscopy.* 122 (2012) 32–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2012.07.027>.
- [209] M.N.A. Wahid, S.I. Abd Razak, M.R. Abdul Kadir, R. Hassan, N.H.M. Nayan, K.A. Mat Amin, Influence of citric acid on the physical and biomineralization ability of freeze/thaw poly(vinyl alcohol) hydrogel, *J. Biomater. Appl.* 33 (2018) 94–102. <https://doi.org/10.1177/0885328218771195>.
- [210] Z. Zhuang, H. Yamamoto, M. Aizawa, Synthesis of plate-shaped hydroxyapatite via an enzyme reaction of urea with urease and its characterization, *Powder Technol.* 222 (2012) 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2012.02.046>.
- [211] Z. Zhuang, T.J. Fujimi, M. Nakamura, T. Konishi, H. Yoshimura, M. Aizawa, Development of a,b-plane-oriented hydroxyapatite ceramics as models for living bones and their cell adhesion behavior, *Acta Biomater.* 9 (2013) 6732–6740. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.001>.
- [212] N. Horiuchi, K. Shibata, H. Saito, Y. Iwabuchi, N. Wada, K. Nozaki, K. Hashimoto, Y. Tanaka, A. Nagai, K. Yamashita, Size Control Synthesis of Hydroxyapatite Plates and Their Application in the Preparation of Highly Oriented Films, *Cryst. Growth Des.* 18 (2018) 5038–5044. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00480>.
- [213] M. Baladi, M. Amiri, P. Mohammadi, K. Salih Mahdi, Z. Golshani, R. Razavi, M. Salavati-Niasari, Green sol–gel synthesis of hydroxyapatite nanoparticles using lemon extract as capping agent and investigation of its anticancer activity against human cancer cell lines (T98, and SHSY5), *Arab. J. Chem.* 16 (2023) 104646. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104646>.
- [214] S. Dacrory, H. Abou-Yousef, R.E. Abou-Zeid, S. Kamel, M.S. Abdel-Aziz, M. Elbadry, Preparation and Characterization of Eco-friendly Carboxymethyl Cellulose Antimicrobial Nanocomposite Hydrogels, *J. Renew. Mater.* 6 (2018). <https://doi.org/10.7569/JRM.2017.634190>.
- [215] D. Shao, D. Rao, A. Wu, X. Luo, How the Sodium Cations in Anode Affect the Performance of a Lithium-ion Battery, *Batteries.* 8 (2022). <https://doi.org/10.3390/batteries8080078>.
- [216] C. Menzel, E. Olsson, T.S. Plivelic, R. Andersson, C. Johansson, R. Kuktaite, L. Järnström, K. Koch, Molecular structure of citric acid cross-linked starch films, *Carbohydr. Polym.* 96 (2013) 270–276. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.044>.
- [217] H. Wu, Y. Lei, J. Lu, R. Zhu, D. Xiao, C. Jiao, R. Xia, Z. Zhang, G. Shen, Y. Liu, S. Li, M. Li, Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films, *Food Hydrocoll.* 97 (2019) 105208. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105208>.
- [218] S. Roy, S. Nagabooshanam, N. Chauhan, A. Mathur, S. Wadhwa, U. Jain, J. Davis, Chapter 8 - Recent advances in bioelectroanalytical sensors based on molecularly imprinted polymeric surfaces, in: L. Singh, D. Mahapatra, S.B.T.-M.B.T. Kumar (Eds.), *Bioelectrochemical Syst. W. Forw.*, Academic Press, 2023: pp. 111–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90807-8.00009-9>.
- [219] R. Ianchis, R.L. Alexa, I.C. Gifu, M.M. Marin, E. Alexandrescu, R. Constantinescu, A. Serafim, C.L. Nistor, C. Petcu, Novel Green Crosslinked Salecan Hydrogels and Preliminary Investigation of Their Use in 3D Printing, *Pharmaceutics.* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020373>.
- [220] V.S. Ghorpade, A.V. Yadav, R.J. Dias, Citric acid crosslinked cyclodextrin/hydroxypropylmethylcellulose hydrogel films for hydrophobic drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.072>.

-
- [221] S.A. El-Lakany, A.I. Abd-Elhamid, E.A. Kamoun, E.M. El-Fakharany, W.M. Samy, N.A. Elgindy, α -Bisabolol-loaded cross-linked zein nanofibrous 3D-scaffolds for accelerating wound healing and tissue regeneration in rats, *Int. J. Nanomedicine*. 14 (2019) 8251–8270. <https://doi.org/10.2147/IJN.S224315>.
- [222] Z. Pan, L. Brassart, Constitutive modelling of hydrolytic degradation in hydrogels, *J. Mech. Phys. Solids*. 167 (2022) 105016. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmps.2022.105016>.
- [223] H. Nasution, H. Harahap, N.F. Dalimunthe, M.H.S. Ginting, M. Jaafar, O.O.H. Tan, H.K. Aruan, A.L. Herfananda, Hydrogel and Effects of Crosslinking Agent on Cellulose-Based Hydrogels: A Review., *Gels* (Basel, Switzerland). 8 (2022). <https://doi.org/10.3390/gels8090568>.
- [224] P.N. Dave, A. Gor, Chapter 3 - Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials: Recent Trends and Their Applications, in: C.B.T.-H. of N. for I.A. Mustansar Hussain (Ed.), *Micro Nano Technol.*, Elsevier, 2018: pp. 36–66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00003-1>.
- [225] N. Annabi, A. Fathi, S.M. Mithieux, P. Martens, A.S. Weiss, F. Dehghani, The effect of elastin on chondrocyte adhesion and proliferation on poly (ϵ -caprolactone)/elastin composites, *Biomaterials*. 32 (2011) 1517–1525. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.024>.
- [226] S. Shafei, J. Foroughi, Z. Chen, C.S. Wong, M. Naebe, Short Oxygen Plasma Treatment Leading to Long-Term Hydrophilicity of Conductive PCL-PPy Nanofiber Scaffolds, *Polymers* (Basel). 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/polym9110614>.
- [227] K. Wilpiszewska, A.K. Antosik, M. Zdanowicz, The Effect of Citric Acid on Physicochemical Properties of Hydrophilic Carboxymethyl Starch-Based Films, *J. Polym. Environ*. 27 (2019) 1379–1387. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01436-9>.
- [228] G. Priya, U. Narendrakumar, I. Manjubala, Thermal behavior of carboxymethyl cellulose in the presence of polycarboxylic acid crosslinkers, *J. Therm. Anal. Calorim*. 138 (2019) 89–95. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08171-2>.
- [229] Y. Ren, X. Sun, L. Chen, Y. Li, M. Sun, X. Duan, W. Liang, Structures and impact strength variation of chemically crosslinked high-density polyethylene: effect of crosslinking density, *RSC Adv*. 11 (2021) 6791–6797. <https://doi.org/10.1039/D0RA10365A>.
- [230] P.W. Atkins, L. Jones, *Chemical Principles: The Quest for Insight*, W.H. Freeman, 2008. <https://books.google.it/books?id=NncBTweACAAJ>.
- [231] J.-G. Gwon, H.-J. Cho, S.-J. Chun, S. Lee, Q. Wu, S.-Y. Lee, Physicochemical, optical and mechanical properties of poly(lactic acid) nanocomposites filled with toluene diisocyanate grafted cellulose nanocrystals, *RSC Adv*. 6 (2016) 9438–9445. <https://doi.org/10.1039/C5RA26337A>.
- [232] P.S.M. Cardoso, M.M. Ueki, J.D. V Barbosa, F.C. Garcia Filho, B.S. Lazarus, J.B. Azevedo, The Effect of Dialkyl Peroxide Crosslinking on the Properties of LLDPE and UHMWPE, *Polymers* (Basel). 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13183062>.
- [233] S. El-Sayed, K.H. Mahmoud, A.A. Fatah, A. Hassen, DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends, *Phys. B Condens. Matter*. 406 (2011) 4068–4076. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physb.2011.07.050>.
- [234] D. Mazouzi, B. Lestriez, L. Roué, D. Guyomard, Silicon Composite Electrode with High Capacity and Long Cycle Life, *Electrochem. Solid-State Lett*. 12 (2009) A215. <https://doi.org/10.1149/1.3212894>.
- [235] J.S. Bridel, T. Azaïs, M. Morcrette, J.M. Tarascon, D. Larcher, Key parameters governing the reversibility of Si/carbon/CMC electrodes for Li-ion batteries, *Chem. Mater*. 22 (2010) 1229–

1241. <https://doi.org/10.1021/cm902688w>.

- [236] A. Srikanth, C.F. Abrams, Effect of molecular packing and hydrogen bonding on the properties of epoxy-amido amine systems, *Comput. Mater. Sci.* 169 (2019) 109082. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.commatsci.2019.109082>.
- [237] A. Sadeghianmaryan, S. Naghieh, Z. Yazdanpanah, H. Alizadeh Sardroud, N.K. Sharma, L.D. Wilson, X. Chen, Fabrication of chitosan/alginate/hydroxyapatite hybrid scaffolds using 3D printing and impregnating techniques for potential cartilage regeneration, *Int. J. Biol. Macromol.* 204 (2022) 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.201>.
- [238] H. Jeong, J. Rho, J.-Y. Shin, D.Y. Lee, T. Hwang, K.J. Kim, Mechanical properties and cytotoxicity of PLA/PCL films., *Biomed. Eng. Lett.* 8 (2018) 267–272. <https://doi.org/10.1007/s13534-018-0065-4>.
- [239] M.G. Raucci, C. Demitri, D. Giugliano, V. De Benedictis, A. Sannino, L. Ambrosio, Effect of citric acid crosslinking cellulose-based hydrogels on osteogenic differentiation, (2014) 2045–2056. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35343>.
- [240] X. Farto-Vaamonde, L. Diaz-Gomez, A. Parga, A. Otero, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Perimeter and carvacrol-loading regulate angiogenesis and biofilm growth in 3D printed PLA scaffolds, *J. Control. Release.* 352 (2022) 776–792. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.10.060>.
- [241] M. Gutiérrez-Sánchez, V.A. Escobar-Barrios, A. Pozos-Guillén, D.M. Escobar-García, RGD-functionalization of PLA/starch scaffolds obtained by electrospinning and evaluated in vitro for potential bone regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.* 96 (2019) 798–806. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.003>.
- [242] P. Pagés, Characterization of polymer materials using FT-IR and DSC techniques, in: *Charact. Polym. Mater. Using FT-IR DSC Tech.*, 2005: p. 20. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:136677904>.
- [243] K. Yuniarto, Y.A. Purwanto, S. Purwanto, B.A. Welt, H.K. Purwadaria, T.C. Sunarti, Infrared and Raman studies on polylactide acid and polyethylene glycol-400 blend, *AIP Conf. Proc.* 1725 (2016) 20101. <https://doi.org/10.1063/1.4945555>.
- [244] L. Nikolic, I. Ristic, B. Adnadjevic, V. Nikolic, J. Jovanovic, M. Stankovic, Novel Microwave-Assisted Synthesis of Poly(D,L-lactide): The Influence of Monomer/Initiator Molar Ratio on the Product Properties, *Sensors.* 10 (2010) 5063–5073. <https://doi.org/10.3390/s100505063>.
- [245] S.K. Singh, P. Anthony, A. Chowdhury, High molecular weight poly(lactic acid) synthesized with apposite catalytic combination and longer time, *Orient. J. Chem.* 34 (2018) 1984–1990. <https://doi.org/10.13005/ojc/3404036>.
- [246] A.S. Martín del Campo, J.R. Robledo-Ortíz, M. Arellano, M. Rabelero, A.A. Pérez-Fonseca, Accelerated Weathering of Polylactic Acid/Agave Fiber Biocomposites and the Effect of Fiber–Matrix Adhesion, *J. Polym. Environ.* 29 (2021) 937–947. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01936-z>.
- [247] K. Lim, W.S. Chow, S.Y. Pung, Accelerated Weathering and UV Protection-Ability of Poly(lactic acid) Nanocomposites Containing Zinc Oxide Treated Halloysite Nanotube, *J. Polym. Environ.* 27 (2019) 1746–1759. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01464-5>.
- [248] T. protease-activated near-infrared fluorescent polymeric nanoparticles for imaging and therapy of cancer Yildiz, R. Gu, S. Zauscher, T. Betancourt, Doxorubicin-loaded protease-activated near-infrared fluorescent polymeric nanoparticles for imaging and therapy of cancer, *Int. J. Nanomedicine.* 13 (2018) 6961–6986. <https://doi.org/10.2147/IJN.S174068>.

-
- [249] Z. Chu, T. Zhao, L. Li, J. Fan, Y. Qin, Characterization of Antimicrobial Poly (Lactic Acid)/Nano-Composite Films with Silver and Zinc Oxide Nanoparticles, *Materials* (Basel). 10 (2017). <https://doi.org/10.3390/ma10060659>.
- [250] W. Yu, G. Shen, Y. Zhang, D. Li, H. Zhou, Molecular configuration evolution model and simulation for polymer melts using a non-equilibrium irreversible thermodynamics method, *Appl. Math. Model.* 89 (2021) 1357–1372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apm.2020.07.017>.
- [251] Y. Kann, M. Shurgalin, R.K. Krishnaswamy, FTIR spectroscopy for analysis of crystallinity of poly(3-hydroxybutyrate-co-4 -hydroxybutyrate) polymers and its utilization in evaluation of aging, orientation and composition, *Polym. Test.* 40 (2014) 218–224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2014.09.009>.
- [252] D. Cohn, H. Younes, Biodegradable PEO/PLA block copolymers, *J. Biomed. Mater. Res.* 22 (1988) 993–1009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.820221104>.
- [253] H. Zhao, H. Chi, Electrospun Bead-on-String Fibers: Useless or Something of Value?, in: T. Lin (Ed.), *IntechOpen*, Rijeka, 2018: p. Ch. 5. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74661>.
- [254] D. Li, M. Wang, W.-L. Song, D.-G. Yu, S.W.A. Bligh, Electrospun Janus Beads-On-A-String Structures for Different Types of Controlled Release Profiles of Double Drugs., *Biomolecules.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/biom11050635>.
- [255] X. Wang, L. Xu, G. Zheng, J. Jiang, D. Sun, W. Li, Formation of suspending beads-on-a-string structure in electrohydrodynamic printing process, *Mater. Des.* 204 (2021) 109692. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109692>.
- [256] R. Huang, Y. Dai, J. Ahmed, M. Edirisinghe, Facile One-Step Synthesis of PVDF Bead-on-String Fibers by Pressurized Gyration for Reusable Face Masks, *Polymers* (Basel). 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14214498>.
- [257] Darrell H Reneker, Iksoo Chun, Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, *Nanotechnology.* 7 (1996) 216. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/7/3/009>.
- [258] X. Gu, N. Li, J. Luo, X. Xia, H. Gu, J. Xiong, Electrospun polyurethane microporous membranes for waterproof and breathable application: the effects of solvent properties on membrane performance, *Polym. Bull.* 75 (2018) 3539–3553. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2223-8>.
- [259] S. Nedjari, F. Awaja, G. Altankov, Three Dimensional Honeycomb Patterned Fibrinogen Based Nanofibers Induce Substantial Osteogenic Response of Mesenchymal Stem Cells, *Sci. Rep.* 7 (2017) 15947. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15956-8>.
- [260] W. Tian, X. Liu, X. Zhang, T. Bai, B. Wu, Self-Assembly of Ultrafine Fibers with Micropores via Cryogenic Electrospinning and Its Potential Application in Esophagus Repair, *Polymers* (Basel). 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14091924>.
- [261] M. Lay, N.L.N. Thajudin, Z.A.A. Hamid, A. Rusli, M.K. Abdullah, R.K. Shuib, Comparison of physical and mechanical properties of PLA, ABS and nylon 6 fabricated using fused deposition modeling and injection molding, *Compos. Part B Eng.* 176 (2019) 107341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107341>.
- [262] X. Chen, G. Chen, G. Wang, P. Zhu, C. Gao, Recent Progress on 3D-Printed Polylactic Acid and Its Applications in Bone Repair, *Adv. Eng. Mater.* 22 (2020) 1901065. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adem.201901065>.
- [263] SpecialChem S.A., Shrinkage, (2023) 1. <https://omnexus.specialchem.com/polymer-properties/properties/shrinkage> (accessed September 16, 2023).
- [264] Y. Tao, P. Li, L. Pan, Improving tensile properties of polylactic acid parts by adjusting printing parameters of open source 3D printers, *Medziagotyra.* 26 (2020) 83–87.

<https://doi.org/10.5755/j01.ms.26.1.20952>.

- [265] A.Y. Al-Maharma, S.P. Patil, B. Markert, Effects of porosity on the mechanical properties of additively manufactured components: a critical review, *Mater. Res. Express*. 7 (2020) 122001. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abcc5d>.
- [266] K. Cea, M. Donoso, G. Sérandour, G. Martínez, L. Alegría, Evaluation of Parameters in PLA and PCL Scaffolds to be Used in Cartilaginous Tissues, *Rev. Mex. Ing. Biomédica*. 42 (2021) 149–159. <https://doi.org/dx.doi.org/10.17488/RMIB.42.2.12>.
- [267] I. Buj-Corral, A. Bagheri, A. Domínguez-Fernández, R. Casado-López, Influence of infill and nozzle diameter on porosity of FDM printed parts with rectilinear grid pattern, *Procedia Manuf.* 41 (2019) 288–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.promfg.2019.09.011>.
- [268] J.-A. Kim, J. Lim, R. Naren, H. Yun, E.K. Park, Effect of the biodegradation rate controlled by pore structures in magnesium phosphate ceramic scaffolds on bone tissue regeneration in vivo, *Acta Biomater.* 44 (2016) 155–167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.039>.
- [269] Z. Abidin, I.G. Fadhlurrahman, I. Akbar, R.U. Putra, A.T. Prakoso, M.Z. Kadir, A. Astuti, A. Syahrom, M.I. Ammarullah, J. Jamari, H. Basri, Numerical Investigation of the Mechanical Properties of 3D Printed PLA Scaffold, in: 5th FIRST T1 T2 2021 Int. Conf. (FIRST-T1-T2 2021), Atlantis Press, 2022: pp. 83–89. <https://doi.org/10.2991/ahe.k.220205.015>.
- [270] N. Raja, S.H. Han, M. Cho, Y.-J. Choi, Y.-Z. Jin, H. Park, J.H. Lee, H. Yun, Effect of porosity and phase composition in 3D printed calcium phosphate scaffolds on bone tissue regeneration in vivo, *Mater. Des.* 219 (2022) 110819. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.110819>.
- [271] R. Aziz, V. Niasar, H. Erfani, P.J. Martínez-Ferrer, Impact of pore morphology on two-phase flow dynamics under wettability alteration, *Fuel*. 268 (2020) 117315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117315>.
- [272] E.H. Tümer, H.Y. Erbil, N. Akdoğan, Wetting of Superhydrophobic Polylactic Acid Micropillared Patterns, *Langmuir*. 38 (2022) 10052–10064. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c01708>.
- [273] S. Galindo, F. Ureña-Núñez, Enhanced surface hydrophobicity of poly(lactic acid) by Co60 gamma ray irradiation, *Rev. Mex. Fis.* 64 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.31349/revmexfis.64.1>.
- [274] I. Sas, R.E. Gorga, J.A. Joines, K.A. Thoney, Literature review on superhydrophobic self-cleaning surfaces produced by electrospinning, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 50 (2012) 824–845. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/polb.23070>.
- [275] N. Nuraje, W.S. Khan, Y. Lei, M. Ceylan, R. Asmatulu, Superhydrophobic electrospun nanofibers, *J. Mater. Chem. A*. 1 (2013) 1929–1946. <https://doi.org/10.1039/C2TA00189F>.
- [276] R. Karoui, Chapter 15 - Food Authenticity and Fraud, in: Y.B.T.-C.A. of F.T. and A. Picó (Ed.), *Chem. Anal. Food Tech. Appl.*, Academic Press, Boston, 2012: pp. 499–517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00015-7>.
- [277] V. Hevilla, Á. Sonseca, E. Gimenez, C. Echeverría, A. Muñoz-Bonilla, M. Fernández-García, The Incorporation of Low-Molecular Weight Poly(Mannitol Sebacate)s on PLA Electrospun Fibers: Effects on the Mechanical Properties and Surface Chemistry, *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14163342>.
- [278] L.-T. Lim, R. Auras, M. Rubino, Processing technologies for poly(lactic acid), *Prog. Polym. Sci.* 33 (2008) 820–852. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004>.
- [279] X. Xie, Y. Chen, X. Wang, X. Xu, Y. Shen, A. ur R. Khan, A. Aldalbahi, A.E. Fetiz, G.L. Bowlin, M. El-Newehy, X. Mo, Electrospinning nanofiber scaffolds for soft and hard tissue regeneration, *J. Mater. Sci. Technol.* 59 (2020) 243–261. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.04.037>.

-
- [280] M. Rahmani, R. Faridi-Majidi, M.-M. Khani, A. Mashaghi, F. Noorizadeh, H. Ghanbari, Cross-linked PMS/PLA nanofibers with tunable mechanical properties and degradation rate for biomedical applications, *Eur. Polym. J.* 130 (2020) 109633. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109633>.
- [281] E.Y. Gómez-Pachón, R. Vera-Graziano, R.M. Campos, Structure of poly(lactic-acid) PLA nanofibers scaffolds prepared by electrospinning, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 59 (2014) 12003. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/59/1/012003>.
- [282] Y. Kobayashi, Av. of hyaluronic acid with different molecular weigh Okamoto, K. Nishinari, Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights., *Biorheology.* 31 (1994) 235–244. <https://doi.org/10.3233/bir-1994-31302>.
- [283] C. Roldán, G. Jaime, Q. Martínez, A. Gómez, L. María, R. Vinasco, L. Fernando, H. Palacio, L. Marcela, Influence of the molecular weight of polymer, solvents and operational condition in the electrospinning of polycaprolactone, *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia.* 84 (2017) 35–45. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302017000300035&nrm=iso.
- [284] F. Huang, Q. Wei, J. Wang, Y. Cai, Y. Huang, Effect of temperature on structure, morphology and crystallinity of PVDF nanofibers via electrospinning, *E-Polymers.* 8 (2008) 152. <https://doi.org/doi:10.1515/epoly.2008.8.1.1758>.
- [285] P. Pan, W. Kai, B. Zhu, T. Dong, Y. Inoue, Polymorphous Crystallization and Multiple Melting Behavior of Poly(l-lactide): Molecular Weight Dependence, *Macromolecules.* 40 (2007) 6898–6905. <https://doi.org/10.1021/ma071258d>.
- [286] Y.-T. Hsieh, S. Nozaki, M. Kido, K. Kamitani, K. Kojio, A. Takahara, Crystal polymorphism of polylactide and its composites by X-ray diffraction study, *Polym. J.* 52 (2020) 755–763. <https://doi.org/10.1038/s41428-020-0343-8>.
- [287] J. Zhang, K. Tashiro, H. Tsuji, A.J. Domb, Disorder-to-Order Phase Transition and Multiple Melting Behavior of Poly(l-lactide) Investigated by Simultaneous Measurements of WAXD and DSC, *Macromolecules.* 41 (2008) 1352–1357. <https://doi.org/10.1021/ma0706071>.
- [288] H.M. de Oca, I.M. Ward, Structure and mechanical properties of poly(L-lactic acid) crystals and fibers, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 45 (2007) 892–902. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/polb.21131>.
- [289] R.E. Abhari, P.-A. Mouthuy, N. Zargar, C. Brown, A. Carr, Effect of annealing on the mechanical properties and the degradation of electrospun polydioxanone filaments, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 67 (2017) 127–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.11.023>.
- [290] T. Tábi, I.E. Sajó, F. Szabó, A.S. Luyt, J.G. Kovács, Crystalline structure of annealed polylactic acid and its relation to processing, *Express Polym. Lett.* 4 (2010) 659–668. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2010.80>.
- [291] Y. Zhou, J. Wang, Y. Xiao, T. Wang, X. Huang, The Effects of Polymorphism on Physicochemical Properties and Pharmacodynamics of Solid Drugs., *Curr. Pharm. Des.* 24 (2018) 2375–2382. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180515155425>.
- [292] M.S. Nidhu, V.R. Sniktha, L. Benny, J. Thomas, A. Ajay, K.P. Ramaswamy, Degradation kinetics of alkali-activated mortar in aggressive citric acid environment, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 989 (2020) 12007. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/989/1/012007>.
- [293] R. Donate, M. Monzón, M.E. Alemán-Domínguez, Z. Ortega, Enzymatic degradation study of PLA-based composite scaffolds, *Rev. Adv. Mater. Sci.* 59 (2020) 170–175. <https://doi.org/doi:10.1515/rams-2020-0005>.

-
- [294] N. Contessi Negrini, M. Bonnetier, G. Giatsidis, D.P. Orgill, S. Farè, B. Marelli, Tissue-mimicking gelatin scaffolds by alginate sacrificial templates for adipose tissue engineering, *Acta Biomater.* 87 (2019) 61–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.018>.
- [295] International Organization for Standardization, ISO 10993-5, 2009. <https://www.iso.org/standard/36406.html>.
- [296] H.M. Fahmy, M.M.G. Fouda, Crosslinking of alginic acid/chitosan matrices using polycarboxylic acids and their utilization for sodium diclofenac release, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 606–611. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.024>.
- [297] J.M. ANDERSON, G. VOSKERICIAN, 14 - The challenge of biocompatibility evaluation of biocomposites, in: L.B.T.-B.C. Ambrosio (Ed.), *Woodhead Publ. Ser. Biomater.*, Woodhead Publishing, 2010: pp. 325–353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845697372.3.325>.
- [298] A. Galus, J.-M. Mallet, D. Lembo, V. Cagno, M. Djabourov, H. Lortat-Jacob, K. Bouchemal, Hexagonal-shaped chondroitin sulfate self-assemblies have exalted anti-HSV-2 activity, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 113–120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.054>.
- [299] I.Y. Tóth, E. Illés, M. Szekeres, I. Zupkó, R. Turcu, E. Tombácz, Chondroitin-Sulfate-A-Coated Magnetite Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Testing to Predict Their Colloidal Behavior in Biological Milieu, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20174096>.
- [300] H.W. Siesler, 2.09 - Vibrational Spectroscopy, in: K. Matyjaszewski, M.B.T.-P.S.A.C.R. Möller (Eds.), *Polym. Sci. A Compr. Ref.*, Elsevier, Amsterdam, 2012: pp. 255–300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00026-1>.
- [301] S. Mehra, P. Chadha, Alterations in structure of biomolecules using ATR-FTIR and histopathological variations in brain tissue of *Channa punctatus* exposed to 2Naphthalene sulfonate, *Toxicol. Res. (Camb)*. 9 (2020) 530–536. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa052>.
- [302] F.M. Santos, P.C. Barbosa, R.F.P. Pereira, M.M. Silva, H.M.R. Gonçalves, S.C. Nunes, F.L. Figueiredo, A.J.M. Valente, V. de Zea Bermudez, Proton conducting electrolytes composed of chondroitin sulfate polysaccharide and citric acid, *Eur. Polym. J.* 124 (2020) 109453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109453>.
- [303] F.M. Santos, P.C. Barbosa, R.F.P. Pereira, M.M. Silva, H.M.R. Gonçalves, S.C. Nunes, F.L. Figueiredo, A.J.M. Valente, V. de Zea Bermudez, Proton conducting electrolytes composed of chondroitin sulfate polysaccharide and citric acid, *Eur. Polym. J.* 124 (2020) 109453. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109453>.
- [304] M. Igarashi, K. Takeuchi, S. Sugiyama, Roles of CSGalNAcT1, a key enzyme in regulation of CS synthesis, in neuronal regeneration and plasticity, *Neurochem. Int.* 119 (2018) 77–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.001>.
- [305] R. Benito-Arenas, S.G. Zárate, J. Revuelta, A. Bastida, Chondroitin Sulfate-Degrading Enzymes as Tools for the Development of New Pharmaceuticals, *Catalysts*. 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/catal9040322>.
- [306] D. Hegemann, E. Körner, S. Chen, J. Benedikt, A. von Keudell, Functional plasma polymers deposited in capacitively and inductively coupled plasmas, *Appl. Phys. Lett.* 100 (2012) 51601. <https://doi.org/10.1063/1.3681382>.
- [307] E.A. Aisenbrey, S.J. Bryant, The role of chondroitin sulfate in regulating hypertrophy during MSC chondrogenesis in a cartilage mimetic hydrogel under dynamic loading, *Biomaterials*. 190–191 (2019) 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.028>.
- [308] N.S. Kasalkova, P. Slepicka, Z.K. and V. Svorcik, Wettability and Other Surface Properties of

-
- Modified Polymers, in: M. Aliofkhazraei (Ed.), *Wetting and Wettability*, IntechOpen, Rijeka, 2015: p. Ch. 12. <https://doi.org/10.5772/60824>.
- [309] G. Agrawal, Y.S. Negi, S. Pradhan, M. Dash, S.K. Samal, Wettability and contact angle of polymeric biomaterials, in: M.C. Tanzi, S.B.T.-C. of P.B. Farè (Eds.), *Charact. Polym. Biomater.*, Woodhead Publishing, 2017: pp. 57–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100737-2.00003-0>.
- [310] J.F. Piai, M.A. da Silva, A. Martins, A.B. Torres, S. Faria, R.L. Reis, E.C. Muniz, N.M. Neves, Chondroitin sulfate immobilization at the surface of electrospun nanofiber meshes for cartilage tissue regeneration approaches, *Appl. Surf. Sci.* 403 (2017) 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.12.135>.
- [311] C. Liu, Y. Yuan, M. Ma, S. Zhang, S. Wang, H. Li, Y. Xu, D. Wang, Self-assembled composite nanoparticles based on zein as delivery vehicles of curcumin: Role of chondroitin sulfate, *Food Funct.* 11 (2020) 5377–5388. <https://doi.org/10.1039/d0fo00964d>.
- [312] Y. Xiao, E.A. Friis, S.H. Gehrke, M.S. Detamore, Mechanical Testing of Hydrogels in Cartilage Tissue Engineering: Beyond the Compressive Modulus, *Tissue Eng. Part B Rev.* 19 (2013) 403–412. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0461>.
- [313] Z. Sun, S.-H. Lee, B.D. Gepner, J. Rigby, J.J. Hallman, J.R. Kerrigan, Comparison of porcine and human adipose tissue loading responses under dynamic compression and shear: A pilot study, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 113 (2021) 104112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104112>.
- [314] G. Sommer, M. Eder, L. Kovacs, H. Pathak, L. Bonitz, C. Mueller, P. Regitnig, G.A. Holzapfel, Multiaxial mechanical properties and constitutive modeling of human adipose tissue: A basis for preoperative simulations in plastic and reconstructive surgery, *Acta Biomater.* 9 (2013) 9036–9048. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.011>.
- [315] F. Lanzl, F. Duddeck, S. Willuweit, S. Peldschus, Experimental characterisation of porcine subcutaneous adipose tissue under blunt impact up to irreversible deformation, *Int. J. Legal Med.* 136 (2022) 897–910. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02755-0>.
- [316] R.K. Das, V. Gocheva, R. Hammink, O.F. Zouani, A.E. Rowan, Stress-stiffening-mediated stem-cell commitment switch in soft responsive hydrogels, *Nat. Mater.* 15 (2016) 318–325. <https://doi.org/10.1038/nmat4483>.
- [317] K. Cheng, Y. Zhu, D. Wang, Y. Li, X. Xu, H. Cai, H. Chu, J. Li, D. Zhang, Biomimetic synthesis of chondroitin sulfate-analogue hydrogels for regulating osteogenic and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, *Mater. Sci. Eng. C.* 117 (2020) 111368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111368>.
- [318] J.-F. Wang, S.-P. Fu, S.-N. Li, Z.-Q. Yang, W.-J. Xue, Z.-Q. Li, W. Wang, J.-X. Liu, Establishment and characterization of dairy cow growth hormone secreting anterior pituitary cell model, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 50 (2014) 103–110. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9664-7>.
- [319] M.A. Rahman, Sahabjada, J. Akhtar, Evaluation of anticancer activity of *Cordia dichotoma* leaves against a human prostate carcinoma cell line, PC3, *J. Tradit. Complement. Med.* 7 (2017) 315–321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.11.002>.
- [320] P. Prasun, Chapter 15 - Disorders of Pyruvate Metabolism and Tricarboxylic Acid Cycle, in: P.B.T.-M.M. Prasun (Ed.), *Academic Press*, 2019: pp. 83–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817006-9.00015-0>.
- [321] Z.E. Stine, B.J. Altman, A.L. Hsieh, A.M. Gouw, C. V Dang, Deregulation of the Cellular Energetics of Cancer Cells, in: L.M. McManus, R.N.B.T.-P. of H.D. Mitchell (Eds.), *Pathobiol. Hum. Dis.*, Academic Press, San Diego, 2014: pp. 444–455. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12->

-
- [322] U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, GRAS Notice 000666: Chondroitin sodium sulfate, 2016. <https://www.fda.gov/media/100238/download>.
 - [323] C.J. Little, W.M. Kulyk, X. Chen, The Effect of Chondroitin Sulphate and Hyaluronic Acid on Chondrocytes Cultured within a Fibrin-Alginate Hydrogel, *J. Funct. Biomater.* 5 (2014) 197–210. <https://doi.org/10.3390/jfb5030197>.
 - [324] H. Ernst, M.K.B. Zanin, D. Everman, S. Hoffman, Receptor-mediated adhesive and anti-adhesive functions of chondroitin sulfate proteoglycan preparations from embryonic chicken brain, *J. Cell Sci.* 108 (1995) 3807–3816. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.12.3807>.
 - [325] D. Pal, S. Saha, Chondroitin: a natural biomarker with immense biomedical applications, *RSC Adv.* 9 (2019) 28061–28077. <https://doi.org/10.1039/C9RA05546K>.
 - [326] A. Pudełko, G. Wisowski, K. Olczyk, E.M. Koźma, The dual role of the glycosaminoglycan chondroitin-6-sulfate in the development, progression and metastasis of cancer, *FEBS J.* 286 (2019) 1815–1837. <https://doi.org/10.1111/febs.14748>.
 - [327] H. Tian, Y. Chen, C. Ding, G. Li, Interaction study in homogeneous collagen/chondroitin sulfate blends by two-dimensional infrared spectroscopy, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.042>.
 - [328] Y. Alinejad, A. Adoungotchodo, E. Hui, F. Zehtabi, S. Lerouge, An injectable chitosan/chondroitin sulfate hydrogel with tunable mechanical properties for cell therapy/tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 113 (2018) 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.069>.
 - [329] B. Jayachandran, T.N. Parvin, M.M. Alam, K. Chanda, B. Mm, Insights on Chemical Crosslinking Strategies for Proteins., *Molecules.* 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27238124>.
 - [330] S.S. Lee, X. Du, I. Kim, S.J. Ferguson, Scaffolds for bone-tissue engineering, *Matter.* 5 (2022) 2722–2759. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.06.003>.
 - [331] N. Meyer, D. V Bax, J. Beck, R.E. Cameron, S.M. Best, Adjusting the physico-chemical properties of collagen scaffolds to accommodate primary osteoblasts and endothelial cells., *Regen. Biomater.* 10 (2023) rbad015. <https://doi.org/10.1093/rb/rbad015>.
 - [332] F.R. Veregue, H.H.C. de Lima, S.C. Ribeiro, M.S. Almeida, C.T.P. da Silva, M.R. Guilherme, A.W. Rinaldi, MCM-41/chondroitin sulfate hybrid hydrogels with remarkable mechanical properties and superabsorption of methylene blue, *Carbohydr. Polym.* 247 (2020) 116558. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116558>.
 - [333] A. Sintov, N. Di-Capua, A. Rubinstein, Cross-linked chondroitin sulphate: characterization for drug delivery purposes, *Biomaterials.* 16 (1995) 473–478. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)98820-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)98820-5).
 - [334] Invitrogen Corporation, alamarBlue® Assay, 1995. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_TI_alamarBlue_Rev_1.1.pdf.
 - [335] G. Benítez-arvizu, T.P. Castro-jácome, E. Tovar-pérez, L.E. Alcántara-quintana, Actividades antiproliferativas, apoptóticas y antimigratorias de las kafrinas en líneas celulares derivadas de cáncer cervical, *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 61 (2022) 4–11.
 - [336] Roche, TriPure Isolation Reagent, 2021.
 - [337] F. Zhou, X. Zhang, D. Cai, J. Li, Q. Mu, W. Zhang, S. Zhu, Y. Jiang, W. Shen, S. Zhang, H.W. Ouyang, Silk fibroin-chondroitin sulfate scaffold with immuno-inhibition property for articular cartilage

-
- repair, *Acta Biomater.* 63 (2017) 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.005>.
- [338] D. Hu, N.M. Young, X. Li, Y. Xu, B. Hallgrímsson, R.S. Marcucio, A dynamic Shh expression pattern, regulated by SHH and BMP signaling, coordinates fusion of primordia in the amniote face, *Development*. 142 (2015) 567–574. <https://doi.org/10.1242/dev.114835>.
- [339] S. Zhong, X. He, Y. Li, X. Lou, Conditioned Medium Enhances Osteogenic Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Tissue Eng. Regen. Med.* 16 (2019) 141–150. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0173-3>.
- [340] ThermoFisher Scientific, SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit, 2016. www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html.
- [341] Invitrogen, SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit with ROX, 2010. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/superscript_onestep_sybr_man.pdf.
- [342] Y. Kim, D. Jeong, K.H. Park, J.-H. Yu, S. Jung, Efficient Adsorption on Benzoyl and Stearoyl Cellulose to Remove Phenanthrene and Pyrene from Aqueous Solution, *Polymers (Basel)*. 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/polym10091042>.
- [343] A.D. Štiglic, F. Gürer, F. Lackner, D. Bračič, A. Winter, L. Gradišnik, D. Makuc, R. Kargl, I. Duarte, J. Plavec, U. Maver, M. Beaumont, K.S. Kleinschek, T. Mohan, Organic acid cross-linked 3D printed cellulose nanocomposite bioscaffolds with controlled porosity, mechanical strength, and biocompatibility, *IScience*. 25 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104263>.
- [344] S. Wang, M.J. Yaszemski, J.A. Gruetzmacher, L. Lu, Photo-crosslinked poly(ε-caprolactone fumarate) networks: Roles of crystallinity and crosslinking density in determining mechanical properties, *Polymer (Guildf)*. 49 (2008) 5692–5699. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.10.021>.
- [345] M.A. Cuiffo, J. Snyder, A.M. Elliott, N. Romero, S. Kannan, G.P. Halada, Impact of the Fused Deposition (FDM) Printing Process on Polylactic Acid (PLA) Chemistry and Structure, *Appl. Sci.* 7 (2017). <https://doi.org/10.3390/app7060579>.
- [346] C. Zhou, H. Guo, J. Li, S. Huang, H. Li, Y. Meng, D. Yu, J. de Claville Christiansen, S. Jiang, Temperature dependence of poly(lactic acid) mechanical properties, *RSC Adv.* 6 (2016) 113762–113772. <https://doi.org/10.1039/C6RA23610C>.
- [347] K.L. Bierbrauer, R. V Alasino, M.C. Strumia, D.M. Beltramo, Cationic cellulose and its interaction with chondroitin sulfate. Rheological properties of the polyelectrolyte complex, *Eur. Polym. J.* 50 (2014) 142–149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.10.018>.
- [348] I. Eiroboyi, S.S. Ikiensikimama, Thermal Stability of Bio-Polymers and their Blends, *Niger. J. Technol. Dev.* 19 (2022) 9–15.
- [349] A.R. Fajardo, J.F. Piai, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 934–943. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.009>.
- [350] A.X.G. Acasigua, M. de G. Olyveira, M.M.L. Costa, I.D. Braghirolli, C.M.A. Fossati, C.A. Guastaldi, P. Pranke, de C.G. Daltro, P. Basmaji, Novel Chemically Modified Bacterial Cellulose Nanocomposite as Potential Biomaterial for Stem Cell Therapy Applications, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 9 (2014) 117–123. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1574888X08666131124135654>.
- [351] S.M. El-hoseny, P. Basmaji, G.M. De Olyveira, L. Maria, M. Costa, A.M. Alwahedi, J. Domingos, G.B. Francozo, Natural ECM-Bacterial Cellulose Wound Healing, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 6 (2015) 237–246.
- [352] X. Wang, Q. Shen, C. Zhang, W. Jia, L. Han, Q. Yu, Chicken leg bone as a source of chondroitin sulfate,

-
- Carbohydr. Polym. 207 (2019) 191–199.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.086>.
- [353] R.H. Ellerbrock, H.H. Gerke, FTIR spectral band shifts explained by OM–cation interactions, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 184 (2021) 388–397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jpln.202100056>.
- [354] V.P. Gupta, 12 - Characterization of Chemical Reactions, in: V.P.B.T.-P. and A. of Q.C. Gupta (Ed.), *Princ. Appl. Quantum Chem.*, Academic Press, Boston, 2016: pp. 385–433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803478-1.00012-1>.
- [355] Z. Luo, Z. Yang, Z. Fei, K. Li, Effect of crosslinking rate on the glass transition temperature of polyimide cross-linked silica aerogels, *J. Polym. Res.* 27 (2020) 255. <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02082-9>.
- [356] H. Zhou, T.B. Green, Y.L. Joo, The thermal effects on electrospinning of polylactic acid melts, *Polymer (Guildf)*. 47 (2006) 7497–7505. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.08.042>.
- [357] Y. Zare, K.Y. Rhee, Following the morphological and thermal properties of PLA/PEO blends containing carbon nanotubes (CNTs) during hydrolytic degradation, *Compos. Part B Eng.* 175 (2019) 107132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107132>.
- [358] T. Farid, V.N. Herrera, O. Kristiina, Investigation of crystalline structure of plasticized poly (lactic acid)/Banana nanofibers composites, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 369 (2018). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/369/1/012031>.
- [359] W. Limsukon, M. Rubino, M. Rabnawaz, L.-T. Lim, R. Auras, Hydrolytic degradation of poly(lactic acid): Unraveling correlations between temperature and the three phase structures, *Polym. Degrad. Stab.* 217 (2023) 110537. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2023.110537>.
- [360] R. Shi, J. Bi, Z. Zhang, A. Zhu, D. Chen, X. Zhou, L. Zhang, W. Tian, The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature, *Carbohydr. Polym.* 74 (2008) 763–770. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.045>.
- [361] K. Jirakittidul, D. Limthin, S. Mahithithummamthorn, S. Phaewchiphlee, Effects of Annealing Temperature and Time on Properties of Thermoplastic Polyurethane Based on Different Soft Segments/Multi-Walled Carbon Nanotube Nanocomposites, *Polymers (Basel)*. 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/polym15020364>.
- [362] M.N. Rodrigues, M.B. Oliveira, R.R. Costa, J.F. Mano, Chitosan/Chondroitin Sulfate Membranes Produced by Polyelectrolyte Complexation for Cartilage Engineering, *Biomacromolecules*. 17 (2016) 2178–2188. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00399>.
- [363] A.R. Fajardo, L.C. Lopes, A.G.B. Pereira, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Polyelectrolyte complexes based on pectin–NH₂ and chondroitin sulfate, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1950–1955. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.096>.
- [364] Y. Farrag, L. Barral, O. Gualillo, D. Moncada, B. Montero, M. Rico, R. Bouza, Effect of Different Plasticizers on Thermal, Crystalline, and Permeability Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Films., *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14173503>.
- [365] K. Kawakami, Chapter 15 - Pharmaceutical Applications of Thermal Analysis, in: S. Vyazovkin, N. Koga, C.B.T.-H. of T.A. and C. Schick (Eds.), *Handb. Therm. Anal. Calorim.*, Elsevier Science B.V., 2018: pp. 613–641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64062-8.00009-7>.
- [366] Z. NILCHIAN, M.R. EHSANI, Z. PIRAVI-VANAK, H. BAKHODA, Comparative analysis of butter

thermal behavior in combination with bovine tallow, *Food Sci. Technol.* 40 (2020).

- [367] F. Wurm, B. Rietzler, T. Pham, T. Bechtold, Multivalent Ions as Reactive Crosslinkers for Biopolymers—A Review, *Molecules*. 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25081840>.
- [368] A. Gomez Toledo, J. Nilsson, F. Noborn, C. Sihlbom, G. Larson, Positive Mode LC-MS/MS Analysis of Chondroitin Sulfate Modified Glycopeptides Derived from Light and Heavy Chains of The Human Inter- α -Trypsin Inhibitor Complex., *Mol. Cell. Proteomics*. 14 (2015) 3118–3131. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.051136>.
- [369] A. Venkateshaiah, V.V.T. Padil, M. Nagalakshmaiah, S. Waclawek, M. Černík, R.S. Varma, Microscopic Techniques for the Analysis of Micro and Nanostructures of Biopolymers and Their Derivatives., *Polymers (Basel)*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/polym12030512>.
- [370] R. Longley, A.M. Ferreira, P. Gentile, Recent Approaches to the Manufacturing of Biomimetic Multi-Phasic Scaffolds for Osteochondral Regeneration., *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19061755>.
- [371] M. Wong, P. Wuethrich, P. Egli, E. Hunziker, Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography., *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 14 (1996) 424–432. <https://doi.org/10.1002/jor.1100140313>.
- [372] J.A.M. Steele, S.D. McCullen, A. Callanan, H. Autefage, M.A. Accardi, D. Dini, M.M. Stevens, Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2065–2075. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.030>.
- [373] H. Kang, Y. Zeng, S. Varghese, Functionally graded multilayer scaffolds for in vivo osteochondral tissue engineering, *Acta Biomater.* 78 (2018) 365–377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.039>.
- [374] P. Nooeaid, J.A. Roether, E. Weber, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, Technologies for Multilayered Scaffolds Suitable for Interface Tissue Engineering, *Adv. Eng. Mater.* 16 (2014) 319–327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adem.201300072>.
- [375] Q.L. Loh, C. Choong, Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size., *Tissue Eng. Part B. Rev.* 19 (2013) 485–502. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0437>.
- [376] H. van der Linden, J. Westerweel, Temperature-Sensitive Hydrogels, in: D. Li (Ed.), *Encycl. Microfluid. Nanofluidics*, Springer US, Boston, MA, 2008: pp. 2006–2009. https://doi.org/10.1007/978-0-387-48998-8_1538.
- [377] B. Majhy, P. Priyadarshini, A.K. Sen, Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth - facile surface modification for enhanced cell culture., *RSC Adv.* 11 (2021) 15467–15476. <https://doi.org/10.1039/d1ra02402g>.
- [378] J. Jeong, J.H. Kim, J.H. Shim, N.S. Hwang, C.Y. Heo, Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration, *Biomater. Res.* 23 (2019) 4. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>.
- [379] F. Gul-E-Noor, C. Singh, A. Papaioannou, N. Sinha, G.S. Boutis, The Behavior of Water in Collagen and Hydroxyapatite Sites of Cortical Bone: Fracture, Mechanical Wear, and Load Bearing Studies., *J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces.* 119 (2015) 21528–21537. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b06285>.
- [380] A. Mocanu, O. Cadar, P.T. Frangopol, I. Petean, G. Tomoaia, G.-A. Paltinean, C.P. Racz, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, Ion release from hydroxyapatite and substituted hydroxyapatites in different immersion liquids: in vitro experiments and theoretical modelling study, *R. Soc. Open Sci.* 8

-
- (2021) 201785. <https://doi.org/10.1098/rsos.201785>.
- [381] M. Golmohamadi, K.J. Wilkinson, Diffusion of ions in a calcium alginate hydrogel-structure is the primary factor controlling diffusion, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 82–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.046>.
 - [382] K. Stuart, A. Panitch, Influence of chondroitin sulfate on collagen gel structure and mechanical properties at physiologically relevant levels, *Biopolymers.* 89 (2008) 841–851. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bip.21024>.
 - [383] S. Farah, D.G. Anderson, R. Langer, Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107 (2016) 367–392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>.
 - [384] P.A. Eutionnat-Diffo, Y. Chen, J. Guan, A. Cayla, C. Campagne, X. Zeng, V. Nierstrasz, Stress, strain and deformation of poly-lactic acid filament deposited onto polyethylene terephthalate woven fabric through 3D printing process, *Sci. Rep.* 9 (2019) 14333. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50832-7>.
 - [385] C. Ishee, 5 - Hot weather concreting, in: S.B.T.-D. in the F. and R. of C. Mindess (Ed.), *Woodhead Publ. Ser. Civ. Struct. Eng.*, Woodhead Publishing, 2008: pp. 114–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845694685.114>.
 - [386] Q. Chen, K. Osada, M. Pennisi, S. Uchida, T.A. Tockary, A. Dirisala, Y. Li, K.M. Takeda, S. Oniyanagi, K. Itaka, K. Kataoka, A tadpole-shaped gene carrier with distinct phase segregation in a ternary polymeric micelle, *Soft Matter.* 11 (2015) 2718–2722. <https://doi.org/10.1039/C4SM02850C>.
 - [387] U. Szałaj, A. Chodara, S. Gierlotka, J. Wojnarowicz, W. Łojkowski, Enhanced Release of Calcium Ions from Hydroxyapatite Nanoparticles with an Increase in Their Specific Surface Area, *Materials (Basel).* 16 (2023). <https://doi.org/10.3390/ma16196397>.
 - [388] J. Venkatesan, R. Pallela, I. Bhatnagar, S.-K. Kim, Chitosan–amylopectin/hydroxyapatite and chitosan–chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 1033–1042. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.020>.
 - [389] A.-M. Oprea, M.-T. Nistor, M.I. Popa, C.E. Lupusoru, C. Vasile, In vitro and in vivo theophylline release from cellulose/chondroitin sulfate hydrogels, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 127–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.004>.
 - [390] G. Kudaibergen, M. Zhunussova, E.A. Mun, A. Arinova, V. Ogay, Studying the Effect of Chondroitin Sulfate on the Physicochemical Properties of Novel Gelatin/Chitosan Biopolymer-Based Cryogels, *Appl. Sci.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/app112110056>.
 - [391] J. Loskot, D. Jezbera, R. Loskot, D. Bušovský, A. Barylski, K. Glowka, P. Duda, K. Aniołek, K. Voglová, M. Zubko, Influence of print speed on the microstructure, morphology, and mechanical properties of 3D-printed PETG products, *Polym. Test.* 123 (2023) 108055. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2023.108055>.
 - [392] Y. Liu, S. Wang, D. Sun, Y. Liu, Y. Liu, Y. Wang, C. Liu, H. Wu, Y. Lv, Y. Ren, X. Guo, G. Sun, X. Ma, Development of a Biomimetic Chondroitin Sulfate-modified Hydrogel to Enhance the Metastasis of Tumor Cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 29858. <https://doi.org/10.1038/srep29858>.
 - [393] P.M.M. Pereira, A.S. Moita, G.A. Monteiro, D.M.F. Prazeres, Characterization of the topography and wettability of English weed leaves and biomimetic replicas, *J. Bionic Eng.* 11 (2014) 346–359. [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(14\)60048-2](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(14)60048-2).
 - [394] M.F. C, An inexpensive contact angle measurement system, *Rev. Mex. Física.* 68 (2022) 1–8.
 - [395] K.L. Menzies, L. Jones, The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials., *Optom.*

-
- Vis. Sci. Off. Publ. Am. Acad. Optom. 87 (2010) 387–399. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e>.
- [396] D. Murakami, H. Jinnai, A. Takahara, Wetting Transition from the Cassie–Baxter State to the Wenzel State on Textured Polymer Surfaces, *Langmuir*. 30 (2014) 2061–2067. <https://doi.org/10.1021/la4049067>.
- [397] K.-Y. Park, D.-Y. Kim, W.-S. Shin, Roles of chondroitin sulfate in oil-in-water emulsions formulated using bovine serum albumin, *Food Sci. Biotechnol.* 24 (2015) 1583–1589. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0204-y>.
- [398] G.P. Szekeres, S. Krekic, R.L. Miller, M. Mero, K. Pagel, Z. Heiner, The interaction of chondroitin sulfate with a lipid monolayer observed by using nonlinear vibrational spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 23 (2021) 13389–13395. <https://doi.org/10.1039/D1CP01975A>.
- [399] S. Martino, F. D’Angelo, I. Armentano, J.M. Kenny, A. Orlacchio, Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 338–351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.015>.
- [400] L. Tao, L. Zhonglong, X. Ming, Y. Zezheng, L. Zhiyuan, Z. Xiaojun, W. Jinwu, In vitro and in vivo studies of a gelatin/carboxymethyl chitosan/LAPONITE® composite scaffold for bone tissue engineering, *RSC Adv.* 7 (2017) 54100–54110. <https://doi.org/10.1039/C7RA06913H>.
- [401] T. Sweijen, E. Nikoöee, S.M. Hassanizadeh, B. Chareyre, The Effects of Swelling and Porosity Change on Capillarity: DEM Coupled with a Pore-Unit Assembly Method., *Transp. Porous Media*. 113 (2016) 207–226. <https://doi.org/10.1007/s11242-016-0689-8>.
- [402] A. Jung, M.B. Endres, O. Weichold, Influence of Environmental Factors on the Swelling Capacities of Superabsorbent Polymers Used in Concrete., *Polymers (Basel)*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/polym12102185>.
- [403] R. Foudazi, R. Zowada, I. Manas-Zloczower, D.L. Feke, Porous Hydrogels: Present Challenges and Future Opportunities, *Langmuir*. 39 (2023) 2092–2111. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02253>.
- [404] P. Bełdowski, S. Yuvan, A. Dédinaité, P.M. Claesson, T. Pöschel, Interactions of a short hyaluronan chain with a phospholipid membrane, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 184 (2019) 110539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110539>.
- [405] Y. Liu, Y. Chen, Y. Zhao, Z. Tong, S. Chen, Superabsorbent Sponge and Membrane Prepared by Polyelectrolyte Complexation of Carboxymethyl Cellulose/Hydroxyethyl Cellulose-Al³⁺, *BioResources*. 10 (2015) 6479–6495. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.6479-6495>.
- [406] T.K. QI, PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CITRIC ACID CROSS-LINKED CARBOXYMETHYLCELLULOSE HYDROGEL, UNIVERSITI SAINS MALAYSIA, 2021. [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(01\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(01)00112-1).
- [407] C.C.L. Schuurmans, A. Abbadessa, M.A. Bengtson, G. Pletikapic, H.B. Eral, G. Koenderink, R. Masereeuw, W.E. Hennink, T. Vermonden, Complex coacervation-based loading and tunable release of a cationic protein from monodisperse glycosaminoglycan microgels, *Soft Matter*. 14 (2018) 6327–6341. <https://doi.org/10.1039/c8sm00686e>.
- [408] V. Guarnizo-Herrero, C. Torrado-Salmerón, N.S. Torres Pabón, G. Torrado Durán, J. Morales, S. Torrado-Santiago, Study of Different Chitosan/Sodium Carboxymethyl Cellulose Proportions in the Development of Polyelectrolyte Complexes for the Sustained Release of Clarithromycin from Matrix Tablets., *Polymers (Basel)*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13162813>.
- [409] R. Barbucci, and C.D. Magnani, AgneseSwelling Behavior of Carboxymethylcellulose Hydrogels in Relation to Cross-Linking, pH, M. Consumi, Swelling Behavior of Carboxymethylcellulose

-
- Hydrogels in Relation to Cross-Linking, pH, and Charge Density, *Macromolecules*. 33 (2000) 7475–7480. <https://doi.org/10.1021/ma0007029>.
- [410] I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, M. Vert, Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence., *Biomaterials*. 16 (1995) 305–311. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)93258-f](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93258-f).
- [411] R. Vaid, E. Yildirim, M.A. Pasquinelli, M.W. King, Hydrolytic Degradation of Polylactic Acid Fibers as a Function of pH and Exposure Time., *Molecules*. 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26247554>.
- [412] Q. Zhang, Y. Jiang, Y. Zhang, Z. Ye, W. Tan, M. Lang, Effect of porosity on long-term degradation of poly(ϵ -caprolactone) scaffolds and their cellular response, *Polym. Degrad. Stab.* 98 (2013) 209–218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.10.008>.
- [413] R.K. Roeder, Chapter 3 - Mechanical Characterization of Biomaterials, in: A. Bandyopadhyay, S.B.T.-C. of B. Bose (Eds.), *Charact. Biomater.*, Academic Press, Oxford, 2013: pp. 49–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415800-9.00003-6>.
- [414] A.A. Zadpoor, *Mechanics of Biological Tissues and Biomaterials: Current Trends.*, Mater. (Basel, Switzerland). 8 (2015) 4505–4511. <https://doi.org/10.3390/ma8074505>.
- [415] S. Promnil, C. Ruksakulpiwat, P.-O. Numpaisal, Y. Ruksakulpiwat, Electrospun Poly(lactic acid) and Silk Fibroin Based Nanofibrous Scaffold for Meniscus Tissue Engineering., *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14122435>.
- [416] R. Fairag, D.H. Rosenzweig, J.L. Ramirez-Garcialuna, M.H. Weber, L. Haglund, Three-Dimensional Printed Polylactic Acid Scaffolds Promote Bone-like Matrix Deposition in Vitro, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 11 (2019) 15306–15315. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b02502>.
- [417] M.M. Hassan, N. Tucker, M.J. Le Guen, Thermal, mechanical and viscoelastic properties of citric acid-crosslinked starch/cellulose composite foams, *Carbohydr. Polym.* 230 (2020) 115675. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115675>.
- [418] I.H. Sahputra, A. Alexiadis, M.J. Adams, Effects of Moisture on the Mechanical Properties of Microcrystalline Cellulose and the Mobility of the Water Molecules as Studied by the Hybrid Molecular Mechanics–Molecular Dynamics Simulation Method, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 57 (2019) 454–464. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/polb.24801>.
- [419] E.C. Dogliotti, W.E.C. Yelland, Effect of strain rate on the viscoelastic properties of high polymeric fibrous materials, *J. Appl. Polym. Sci.* 8 (1964) 211–235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.1964.070080114>.
- [420] S. Sánchez-González, N. Diban, A. Urtiaga, Hydrolytic Degradation and Mechanical Stability of Poly(ϵ -Caprolactone)/Reduced Graphene Oxide Membranes as Scaffolds for In Vitro Neural Tissue Regeneration, *Membranes (Basel)*. 8 (2018). <https://doi.org/10.3390/membranes8010012>.
- [421] N.K. Nga, L.T. Thanh Tam, N.T. Ha, P. Hung Viet, T.Q. Huy, Enhanced biomineralization and protein adsorption capacity of 3D chitosan/hydroxyapatite biomimetic scaffolds applied for bone-tissue engineering, *RSC Adv.* 10 (2020) 43045–43057. <https://doi.org/10.1039/D0RA09432C>.
- [422] L. Bacakova, K. Novotna, D. Hadraba, J. Musilkova, P. Slepicka, M. Beran, Influence of Biomimetically Mineralized Collagen Scaffolds on Bone Cell Proliferation and Immune Activation., *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14030602>.
- [423] A.R. Fajardo, L.C. Lopes, A.J.M. Valente, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Effect of stoichiometry and pH on the structure and properties of Chitosan/Chondroitin sulfate complexes, *Colloid Polym. Sci.* 289 (2011) 1739–1748. <https://doi.org/10.1007/s00396-011-2497-6>.

-
- [424] S. Sharma, K.L. Swetha, A. Roy, Chitosan-Chondroitin sulfate based polyelectrolyte complex for effective management of chronic wounds, *Int. J. Biol. Macromol.* 132 (2019) 97–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.186>.
- [425] N. Abbasi, S. Hamlet, R.M. Love, N.-T. Nguyen, Porous scaffolds for bone regeneration, *J. Sci. Adv. Mater. Devices.* 5 (2020) 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>.
- [426] N.F. Cherif, Dopage de la polyaniline par l'acide lactique et étude des mélanges polyaniline/poly(acide lactique), 2020. https://www.researchgate.net/publication/344453743_Dopage_de_la_polyaniline_par_l'acide_lactique_et_etude_des_melanges_polyanilinepoly_acide_lactique.
- [427] M. Alexopoulou, E. Mystiridou, D. Mouzakis, S. Zaoutsos, D.G. Fatouros, N. Bouropoulos, Preparation, characterization and in vitro assessment of ibuprofen loaded calcium phosphate/gypsum bone cements, *Cryst. Res. Technol.* 51 (2016) 41–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/crat.201500143>.
- [428] S. Nanaki, P. Barmpalexis, A. Iatrou, E. Christodoulou, M. Kostoglou, D.N. Bikiaris, Risperidone Controlled Release Microspheres Based on Poly(Lactic Acid)-Poly(Propylene Adipate) Novel Polymer Blends Appropriate for Long Acting Injectable Formulations, *Pharmaceutics.* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030130>.
- [429] J. Hao, Q. Wan, Z. Mu, J. Gu, W. Yu, W. Qin, Y. Li, C. Wang, Y. Ma, K. Jiao, F. Tay, L. Niu, A seminal perspective on the role of chondroitin sulfate in biomineralization, *Carbohydr. Polym.* 310 (2023) 120738. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120738>.
- [430] G.K. Hunter, B.L. Allen, M.D. Grynblas, P.T. Cheng, Inhibition of hydroxyapatite formation in collagen gels by chondroitin sulphate, *Biochem. J.* 228 (1985) 463–469. <https://doi.org/10.1042/bj2280463>.
- [431] G.K. Hunter, S.K. Szigety, Effects of Proteoglycan on Hydroxyapatite Formation Under Non-Steady-State and Pseudo-Steady-State Conditions, *Matrix.* 12 (1992) 362–368. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0934-8832\(11\)80032-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0934-8832(11)80032-6).
- [432] L. Su, J. Zou, S. Dong, N. Hao, H. Xu, Influence of different β -nucleation agents on poly(l-lactic acid): structure, morphology, and dynamic mechanical behavior, *RSC Adv.* 7 (2017) 55364–55370. <https://doi.org/10.1039/C7RA10550A>.
- [433] F. Wang, X. Cai, Y. Shen, L. Meng, Cell–scaffold interactions in tissue engineering for oral and craniofacial reconstruction, *Bioact. Mater.* 23 (2023) 16–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.10.029>.
- [434] F.-M. Chen, X. Liu, Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering., *Prog. Polym. Sci.* 53 (2016) 86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>.
- [435] A. Sadeghi, M. Zandi, M. Pezeshki-Modaress, S. Rajabi, Tough, hybrid chondroitin sulfate nanofibers as a promising scaffold for skin tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 132 (2019) 63–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.208>.
- [436] I. Bružauskaitė, D. Bironaitė, E. Bagdonas, E. Bernotienė, Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects., *Cytotechnology.* 68 (2016) 355–369. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9895-4>.
- [437] J. Jin, S. Tilve, Z. Huang, L. Zhou, H.M. Geller, P. Yu, Effect of chondroitin sulfate proteoglycans on neuronal cell adhesion, spreading and neurite growth in culture., *Neural Regen. Res.* 13 (2018) 289–297. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.226398>.
- [438] M. Sahiner, S.S. Suner, A.S. Yilmaz, N. Sahiner, Polyelectrolyte Chondroitin Sulfate Microgels as a Carrier Material for Rosmarinic Acid and Their Antioxidant Ability., *Polymers (Basel).* 14 (2022).

<https://doi.org/10.3390/polym14204324>.

- [439] U.S. FDA Center for Devices and Radiological Health, Poly Lactic-co-Glycolic Acid [P(L/G)A] Safety Profile, 2020. <https://www.fda.gov/media/155400/download>.
- [440] X. Guo, H. Li, H. Xu, S. Woo, H. Dong, F. Lu, A.J. Lange, C. Wu, Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis, *Acta Pharm. Sin. B.* 2 (2012) 358–367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.06.002>.
- [441] S. Cohen, T. Yoshioka, M. Lucarelli, L.H. Hwang, R. Langer, Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly(Lactic/Glycolic Acid) Microspheres, *Pharm. Res.* 8 (1991) 713–720. <https://doi.org/10.1023/A:1015841715384>.
- [442] Y. Huang, X. Yu, L. He, X. Liao, S. Wang, Z. Qian, L. Shen, 3D porous acellular cartilage matrix scaffold with surface mediated sustainable release of TGF- β 3 for cartilage engineering, *Chinese Chem. Lett.* 31 (2020) 1797–1800. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cclet.2020.01.039>.
- [443] Y. Han, M. Lian, B. Sun, B. Jia, Q. Wu, Z. Qiao, K. Dai, Preparation of high precision multilayer scaffolds based on Melt Electro-Writing to repair cartilage injury., *Theranostics.* 10 (2020) 10214–10230. <https://doi.org/10.7150/thno.47909>.
- [444] J. Iida, A.M.L. Meijne, T.R. Oegema Jr., T.A. Yednock, N.L. Kovach, L.T. Furcht, J.B. McCarthy, A Role of Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan Binding Site in $\alpha_5\beta_1$; $\alpha_4\beta_2$; α_1 Integrin-mediated Melanoma Cell Adhesion *, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5955–5962. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5955>.
- [445] E. Fthenou, A. Zafiropoulos, A. Tsatsakis, A. Stathopoulos, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, Chondroitin sulfate A chains enhance platelet derived growth factor-mediated signalling in fibrosarcoma cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (2006) 2141–2150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.06.006>.
- [446] M.C. Goude, T.C. McDevitt, J.S. Temenoff, Chondroitin Sulfate Microparticles Modulate Transforming Growth Factor- β 1-Induced Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cell Spheroids, *Cells Tissues Organs.* 199 (2014) 117–130. <https://doi.org/10.1159/000365966>.
- [447] J.J. Lim, J.S. Temenoff, The effect of desulfation of chondroitin sulfate on interactions with positively charged growth factors and upregulation of cartilaginous markers in encapsulated MSCs, *Biomaterials.* 34 (2013) 5007–5018. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.037>.
- [448] Y. Katayama, M. Naitoh, H. Kubota, S. Yamawaki, R. Aya, T. Ishiko, N. Morimoto, Chondroitin Sulfate Promotes the Proliferation of Keloid Fibroblasts Through Activation of the Integrin and Protein Kinase B Pathways., *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21061955>.
- [449] B.S. Yoon, D.A. Ovchinnikov, I. Yoshii, Y. Mishina, R.R. Behringer, K.M. Lyons, Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 5062–5067. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500031102>.
- [450] B.F. Eames, P.T. Sharpe, J.A. Helms, Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2, *Dev. Biol.* 274 (2004) 188–200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.006>.
- [451] MERCK, RT-PCR / RT-qPCR Troubleshooting, (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/troubleshooting> (accessed November 11, 2023).
- [452] R. Mjelle, S.A. Hegre, P.A. Aas, G. Slupphaug, F. Drabløs, P. Sætrum, H.E. Krokan, Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes, *DNA Repair (Amst).* 30 (2015) 53–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.03.007>.
- [453] K.A. Becker, J.L. Stein, J.B. Lian, A.J. van Wijnen, G.S. Stein, Establishment of histone gene regulation

-
- and cell cycle checkpoint control in human embryonic stem cells, *J. Cell. Physiol.* 210 (2007) 517–526. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.20903>.
- [454] R. Guo, J. Li, C. Chen, M. Xiao, M. Liao, Y. Hu, Y. Liu, D. Li, J. Zou, D. Sun, V. Torre, Q. Zhang, R. Chai, M. Tang, Biomimetic 3D bacterial cellulose-graphene foam hybrid scaffold regulates neural stem cell proliferation and differentiation, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 200 (2021) 111590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111590>.
- [455] T. Aigner, J. Stöve, Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 1569–1593. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.009>.
- [456] S.H. Choi, K. Lee, H. Han, H. Mo, H. Jung, Y. Ryu, Y. Nam, Y.A. Rim, J.H. Ju, Prochondrogenic effect of decellularized extracellular matrix secreted from human induced pluripotent stem cell-derived chondrocytes, *Acta Biomater.* 167 (2023) 234–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.05.052>.
- [457] Y. Jiang, D. Wang, A. Blocki, R.S. Tuan, Chapter 49 - Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering, in: R. Lanza, R. Langer, J.P. Vacanti, A.B.T.-P. of T.E. (Fifth E. Atala (Eds.), *Princ. Tissue Eng.* (Fifth Ed., Academic Press, 2020: pp. 883–915. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00051-4>.
- [458] H. Akiyama, Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9., *Mod. Rheumatol.* 18 (2008) 213–219. <https://doi.org/10.1007/s10165-008-0048-x>.
- [459] M. Ahmed, T.A. da S. Ramos, F. Damanik, B. Quang Le, P. Wieringa, M. Bennink, C. van Blitterswijk, J. de Boer, L. Moroni, A combinatorial approach towards the design of nanofibrous scaffolds for chondrogenesis, *Sci. Rep.* 5 (2015) 14804. <https://doi.org/10.1038/srep14804>.
- [460] C.J. O’Conor, N. Case, F. Guilak, Mechanical regulation of chondrogenesis., *Stem Cell Res. Ther.* 4 (2013) 61. <https://doi.org/10.1186/scrt211>.
- [461] C. Ai, L. Liu, K. Wong, X.H. Tan, J.C.H. Goh, The effect of chondroitin sulfate concentration and matrix stiffness on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Biomater. Sci.* 11 (2023) 4557–4573. <https://doi.org/10.1039/D2BM01980A>.
- [462] M.B. Goldring, Chapter 4 - Update on the Chondrocyte Lineage and Implications for Cell Therapy in Osteoarthritis, in: L. Sharma, F.B.T.-O. Berenbaum (Eds.), *Osteoarthritis*, Mosby, Philadelphia, 2007: pp. 53–76. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323039291500094>.
- [463] J. Dudhia, Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage, *Cell. Mol. Life Sci. C.* 62 (2005) 2241–2256. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5217-x>.
- [464] C. KIANI, L. CHEN, Y.J. WU, A.J. YEE, B.B. YANG, Structure and function of aggrecan, *Cell Res.* 12 (2002) 19–32. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290106>.
- [465] S. Boeuf, F. Graf, J. Fischer, B. Moradi, C.B. Little, W. Richter, Regulation of aggrecanases from the ADAMTS family and aggrecan neoepitope formation during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells., *Eur. Cell. Mater.* 23 (2012) 320–332. <https://doi.org/10.22203/ecm.v023a25>.
- [466] S. Mizumoto, S. Yamada, K. Sugahara, Molecular interactions between chondroitin–dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 34 (2015) 35–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.06.004>.
- [467] B. Zhang, L. Chi, Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate-Protein Interactions and Their Biological Functions in Human Diseases: Implications and Analytical Tools, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.693563>.

-
- [468] M. Tajadini, M. Panjehpour, S.H. Javanmard, Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes., *Adv. Biomed. Res.* 3 (2014) 85. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.127998>.
- [469] R. Bansal, P. Mittapelly, Y. Chen, P. Mamidala, C. Zhao, A. Michel, Quantitative RT-PCR Gene Evaluation and RNA Interference in the Brown Marmorated Stink Bug., *PLoS One.* 11 (2016) e0152730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152730>.
- [470] S. Chen, W. Chen, Y. Chen, X. Mo, C. Fan, Chondroitin sulfate modified 3D porous electrospun nanofiber scaffolds promote cartilage regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.* 118 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111312>.
- [471] H. Rashid, H. Chen, A. Javed, Runx2 is required for hypertrophic chondrocyte mediated degradation of cartilage matrix during endochondral ossification., *Matrix Biol. Plus.* 12 (2021) 100088. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2021.100088>.
- [472] L. Zeng, H. Kempf, L.C. Murtaugh, M.E. Sato, A.B. Lassar, Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis., *Genes Dev.* 16 (2002) 1990–2005. <https://doi.org/10.1101/gad.1008002>.
- [473] H. Cheng, X. Gao, M. Huard, A. Lu, J.J. Ruzbarsky, S. Amra, B. Wang, J. Huard, Bone morphogenetic protein 4 rescues the bone regenerative potential of old muscle-derived stem cells via regulation of cell cycle inhibitors, *Stem Cell Res. Ther.* 13 (2022) 385. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03047-z>.
- [474] L.-J. Ng, S. Wheatley, G.E.O. Muscat, J. Conway-Campbell, J. Bowles, E. Wright, D.M. Bell, P.P.L. Tam, K.S.E. Cheah, P. Koopman, SOX9 Binds DNA, Activates Transcription, and Coexpresses with Type II Collagen during Chondrogenesis in the Mouse, *Dev. Biol.* 183 (1997) 108–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/dbio.1996.8487>.
- [475] L. Zhongxing, W. Shaohong, L. Jinlong, Z. Limin, W. Yuanzheng, G. Haipeng, C. Jian, Three-dimensional printed hydroxyapatite bone tissue engineering scaffold with antibacterial and osteogenic ability, *J. Biol. Eng.* 15 (2021) 21. <https://doi.org/10.1186/s13036-021-00273-6>.
- [476] X. Ren, Q. Tuo, K. Tian, G. Huang, J. Li, T. Xu, X. Lv, J. Wu, Z. Chen, J. Weng, Q. Wang, Y. Mu, Enhancement of osteogenesis using a novel porous hydroxyapatite scaffold in vivo and vitro, *Ceram. Int.* 44 (2018) 21656–21665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.08.249>.
- [477] J. Li, Z. Zhao, J. Yang, J. Liu, J. Wang, X. Li, Y. Liu, p38 MAPK mediated in compressive stress-induced chondrogenesis of rat bone marrow MSCs in 3D alginate scaffolds, *J. Cell. Physiol.* 221 (2009) 609–617. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.21890>.
- [478] B. Farrugia, A.J. Hayes, J. Melrose, Use of Chondroitin Sulphate to Aid In Vitro Stem Cell Differentiation BT - Proteoglycans in Stem Cells: From Development to Cancer, in: M. Götte, K. Forsberg-Nilsson (Eds.), Springer International Publishing, Cham, 2021: pp. 53–93. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73453-4_4.
- [479] C. Klecker, L.S. Nair, Chapter 13 - Matrix Chemistry Controlling Stem Cell Behavior, in: A. Vishwakarma, J.M.B.T.-B. and E. of S.C.N. Karp (Eds.), *Biol. Eng. Stem Cell Niches*, Academic Press, Boston, 2017: pp. 195–213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802734-9.00013-5>.
- [480] E.A. Aisenbrey, S.J. Bryant, Mechanical loading inhibits hypertrophy in chondrogenically differentiating hMSCs within a biomimetic hydrogel, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 3562–3574. <https://doi.org/10.1039/c6tb00006a>.
- [481] E.A. Aisenbrey, S.J. Bryant, The role of chondroitin sulfate in regulating hypertrophy during MSC chondrogenesis in a cartilage mimetic hydrogel under dynamic loading., *Biomaterials.* 190–191

(2019) 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.028>.