

Desarrollo y caracterización de un prototipo polimérico biocompatible, con las propiedades mecánicas y morfológicas necesarias para ser usado como sustituto de menisco usando la técnica de electrotejido

G. A. Molina¹, A. L. Rodríguez², A. R. Hernández-Martínez², M. Estevez²

¹Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, C.P. 76230, Querétaro, México

²Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, C.P. 76230, Querétaro, México

Resumen— A pesar de los grandes avances en la ingeniería de tejidos, el desarrollo de meniscos de rodilla que puedan replicar la estructura y forma de su matriz de colágeno, no es una tarea sencilla. En este proyecto se desarrolló un prototipo de menisco, mimetizando su morfología diferenciada de fibro cartilago, usando la técnica de electrotejido. El prototipo está hecho a base de colágeno, policaprolactona, poliácido láctico y polimetil metacrilato en diferentes proporciones. El material se caracterizó por medio de pruebas mecánicas (compresión y tensión), microscopía electrónica de barrido (SEM) y pruebas de vascularización, los resultados obtenidos muestran que el prototipo desarrollado, tiene potenciales aplicaciones como sustituto o andamio de regeneración de la matriz del menisco de rodilla.

Palabras clave—Menisco, colágeno, electrotejido

I. INTRODUCCIÓN

Los meniscos son tejidos fibrocartilaginosos en forma de media luna (Fig 1) y que tienen una función mecánica importante como: amortiguar impactos, estabilización corporal, distribución de carga en las rodillas, etc [1,2]; debido a esto, el menisco está sometido a cargas mecánicas de compresión y tensión del orden de 50 a 250MPa [3-5].

Los daños en los meniscos se dan principalmente por dos factores: exposición prolongada a un peso superior (sobrepeso), lo cual lo compacta produciendo choque mecánico entre la tibia y el fémur provocando artrosis; o una falla mecánica en la articulación [6]. Los daños en los meniscos, son lesiones muy serias y generalmente su tratamiento es ineficiente o prácticamente imposible [7-9].

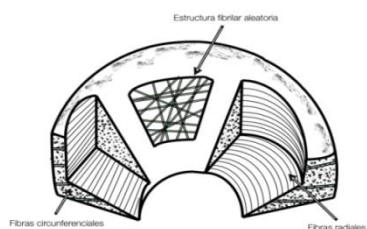


Fig 1. Estructura y organización de las fibras de colágeno en un menisco

Como alternativa existe la artroscopia parcial o total de menisco, sin embargo, esta aumenta el riesgo de padecer osteoporosis [10].

Hasta ahora se han realizados avances, con diversas estrategias en ingeniería de tejidos para obtener sustitutos de meniscos [11-12], pero ninguno ha podido recrear la compleja estructura y organización de la matriz de colágeno del mismo. La estructura de los meniscos es de suma importancia, ya que la adhesión y diferenciación celular depende principalmente de cómo se encuentren alineadas las fibras, el tamaño de poro y la rigidez de los materiales que conformen la antes mencionada matriz [13].

En el presente trabajo se propone el uso de diferentes polímeros biocompatibles como poli(ácido-láctico), poli(ϵ -caprolactona), poli(metilmetacrilato) y colágeno; cada uno en diferentes proporciones; para lograr obtener un prototipo para ser usado como sustituto y/o regenerador de meniscos, que tenga la resistencia mecánica, biocompatibilidad y control de la velocidad de biodegradación, que nos permita replicar usando la técnica de electrotejido, las diversas estructuras que presenta el menisco en sus diferentes regiones.

II. METODOLOGÍA

A. Material

Se sintetizó poli (ácido-láctico) (PLA) por condensación sin catalizador de bajo peso molecular, poli(metilmetacrilato) (PMMA) por radicales libres (peso molecular~300kDa).

Se realizó la extracción de colágeno hidrolizado en polvo, del tendón de la cola de ratas tipo Wistar en condiciones alcalinas.

Se usó ácido acético (99.7%), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (~2000kDa) y dimetil sulfoxido (DMSO) que fueron comprados a Sigma Aldrich México.

B. Manufactura del andamio por electrotejido

Para realizar el prototipo del menisco, se estableció una propuesta de diferentes formulaciones; se dejaron fijas las cantidades de dos polímeros y las otras dos se variaban. Finalmente se eligieron sólo a las formulaciones donde no existía segregación de fases y se podían formar películas con buena resistencia mecánica,

las formulaciones elegidas se muestran en la tabla 1. Para la obtención de las muestras, el colágeno, se disolvió en ácido acético, posteriormente el PLA y la PCL en DMSO y finalmente se agregó PMMA. De cada formulación se obtuvieron películas y cilindros por re-evaporación del solvente, las formulaciones que presentaron las mejores propiedades mecánicas, fueron las que se utilizaron para obtener las fibras, usando la técnica de electrotejido.

TABLA 1
 Formulaciones propuestas

Muestra	PMMA (g)	PCL (g)	PLA (g)	Colágeno (g)
FM1	3.7	0.3	0.2	0.8
FM2	3.7	0.3	0.3	0.7
FM3	3.7	0.3	0.4	0.6
FM4	3.7	0.3	0.5	0.5
FM5	3.7	0.3	0.7	0.3

Las fibras se obtuvieron colocando cada una de las formulaciones en una jeringa de cristal de 10mL con una aguja de diámetro 18G, conectado a una bomba (KDS510, KD Scientific), trabajando a una velocidad de 2mL/h. La aguja se conectó a una fuente de alto voltaje (13kV) con una distancia de 220mm con respecto al colector. Las fibras se fueron depositando en un colector modificado, como se muestra en la Fig 2, para lograr mimetizar no sólo la forma del menisco, sino también el arreglo de las fibras en dicha estructura.

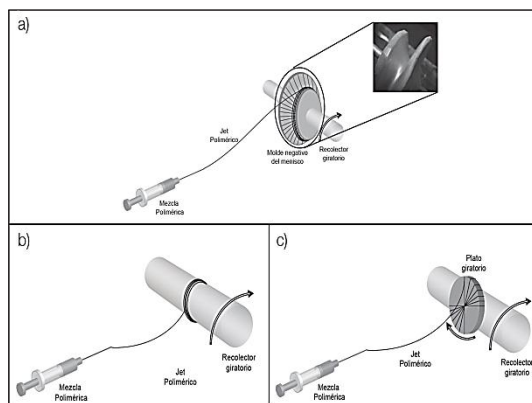


Fig 2. Algunos ensambles del equipo de electrotejido. a) molde prefabricado con la forma del menisco usado como colector; b) ensamble para depósito de fibras alineadas y c) ensamble para el depósito de fibras radiales.

C. Estudio de la morfología y alineación de las fibras

El estudio de la morfología y alineación de las fibras se realizó, usando un microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-6060LV. Las muestras se prepararon colocando un pedazo del prototipo obtenido, sobre un

pequeño cilindro de aluminio, el cual fue recubierto con una capa de oro. Las imágenes obtenidas fueron usando un voltaje de 20kV a alto vacío y su análisis se realizó con el software ImageJ.

D. Pruebas mecánicas

Para llevar a cabo las pruebas mecánicas, se hicieron películas (20mm de largo x 10mm de ancho x ~3mm de grosor) para pruebas de tensión y cilindros (20mm de diámetro x 10mm de altura) para las pruebas de compresión de cada una de las formulaciones y así seleccionar la muestra que presentó el mejor desempeño, en ambas pruebas. La caracterización se realizó usando un equipo Zwick/Roell Z005; las pruebas de tensión se llevaron a cabo de acuerdo a la norma ASTM D 882-02 y las de compresión de acuerdo a la norma ASTM D 695-02.

E. Ensayo de vascularización

Se realizó un ensayo de xenotransplante en la capsula renal (Fig 3), para observar la aceptación de la formulación seleccionada por el huésped y su viabilidad de vascularización. Se utilizó una rata Wistar como control y tres adicionales que fueron identificadas como: R0 (control), R1 (muestra con un peso de 0.2 g), R2 (muestra con un peso de 0.3g) y R3 (muestra con un peso de 0.4g); todas las ratas utilizadas fueron hembras. El peso de cada muestra se estableció tomando en cuenta el peso mínimo y máximo que se podría implantar en la cápsula renal de las ratas de acuerdo a su tamaño y peso.

Los animales se mantuvieron de acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999, el agua y el alimento se dejaron en condiciones ad libitum durante la duración del experimento.

Los animales se estuvieron monitoreando diariamente, para observar signos de inflamación o infección; R1 y R3 se matuvieron durante una semana, mientras que R0 y R2 por cuatro. Posterior al experimento, los animales fueron sacrificados y los riñones fueron recolectados, para posteriormente ser fijados y embebidos en formalina para su análisis histológico.



Fig 3. Cápsula renal expuesta con la inserción de la mezcla polimérica seleccionada (marcada en el círculo punteado).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Rendimiento mecánico

El prototipo obtenido debe de tener las propiedades mecánicas necesarias para poder soportar los esfuerzos a los que será sometido si es utilizado como sustituto de menisco. Se realizaron cinco mediciones para las pruebas de tensión y compresión; el promedio de los resultados obtenidos se muestra en la Fig 4.

Para las pruebas de tensión (Fig 4a), se puede observar que la muestra FM3 es la que tiene el mayor valor de tensión (8.3MPa) y la que posee la menor deformación (0.032), con un módulo de Young de 255.05MPa; estos valores se ajustan perfectamente a los requeridos para su uso como sustituto de cartilago de menisco [14-15]. Para las pruebas de compresión se observaron diversos comportamiento (Fig 4b); las muestras FM4 y FM1 presentan una ligera mejoría en la resistencia a la fuerza de compresión (0.07MPa en ambos casos) con respecto a las muestras FM5y FM3 (0.06MPa en ambos casos), sin embargo en la prueba de deformación, las muestras FM1, FM4 y FM5 (0.004MPa, 0.004MPa y 0.003MPa respectivamente), presentaron menor deformación que FM3 (0.04MPa).

Una característica importante para el buen desempeño del prototipo, es la resistencia a la fuerza de tensión, y es por esta razón que la muestra FM3, fue seleccionada para realizar el prototipo usando la técnica de electrotejido, a pesar de no presentar el mejor desempeño en las pruebas de compresión.

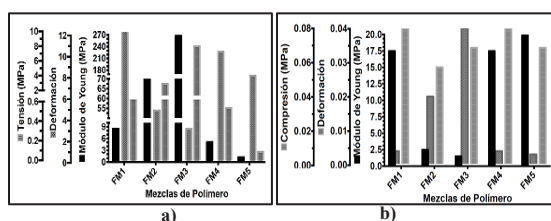


Fig 4. Rendimiento mecánico de las mezclas de polímero. a) Pruebas de tensión para películas y b) pruebas de compresión para cilindros

B. Desarrollo de la arquitectura completa del menisco

Para el desarrollo del prototipo, se debe tener la capacidad de poder formar tres estructuras básicas; fibras con ordenamiento aleatorio, fibras completamente alineadas y fibras radiales. La Fig 5 muestra todos los arreglos de las fibras obtenidas usando la técnica de electrotejido, de acuerdo a la configuración que se le dé al equipo. La viscosidad de las muestras es de suma importancia ya que en valores de ($1500-3000 \cdot 10^{-3} \text{Pa} \cdot \text{s}^2$) se pueden obtener fibras interconectadas, cuando se tiene una alta viscosidad ($>3000 \cdot 10^{-3} \text{Pa} \cdot \text{s}^2$) se obtienen fibras sin interconexiones. Para lograr un arreglo de fibras alineadas, se utilizó la formulación seleccionada de alta

viscosidad y una velocidad del colector de $1.25 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, adicionalmente se pudo obtener un arreglo de fibras perpendiculares, girando el depósito 90° , respecto a su posición original (Fig. 5b). Para las fibras radiales se utilizó un eje giratorio adicional con una velocidad de 20:1 entre el colector y el plato giratorio (Fig 5c y 5d). Bajo estas condiciones y con el molde prefabricado (Fig 2a) se realizó el prototipo final del menisco como se puede mostrar en la Fig 6.

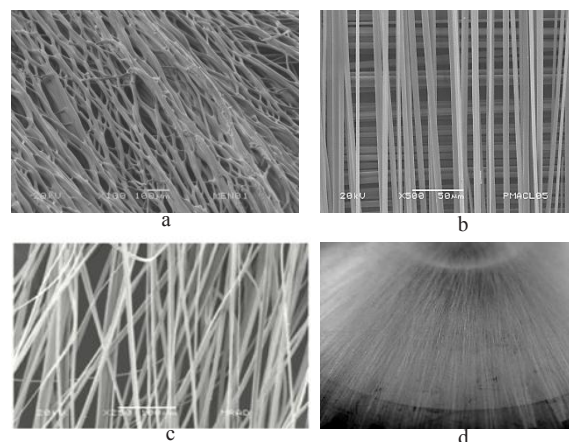


Fig 5. Imágenes de microscopia de los arreglos obtenidos de las fibras para la muestra FM3 a) Arreglo aleatorio de fibras b) Fibras perpendiculares c) y d) Fibras radiales

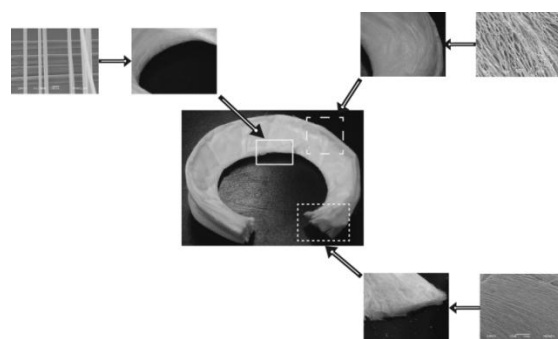


Fig 6. Integración de los diferentes electrotejidos para formar un prototipo de menisco completo

C. Análisis de vascularización

Realizando un análisis macroscópico a las ratas, no se mostró ningún signo de inflamación abdominal o acumulación de líquidos como resultado de alguna infección. El material se mantuvo en su posición original, sin ningún signo de fractura o laceración. Adicionalmente, se pudo observar signos de neovascularización (Fig 7a), los cuales fueron confirmados mediante un análisis histológico de hematoxilina y eosina, presentando también una reacción granulomatosa (Fig 7b y 7c), que sugiere que el material

es biocompatible y adecuado para replicar la matriz del menisco. Estos resultados, son consistentes con las reacciones normales del tejido al implantar un material ajeno.

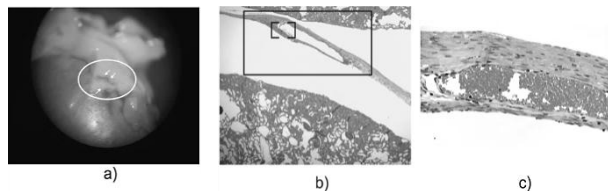


Fig 7. Presencia de vascularización de la mezcla polimérica en la capsula renal. a) tejido embebido en formalina que muestra signos de vascularización de la muestra FM3; b) vascularización de la muestra FM3 y c) respuesta granulomatosa originada por la inserción del material polimérico

V. CONCLUSIONES

Se logró realizar un prototipo de menisco usando la técnica de electrotejido, que mimetiza la estructura compleja de la matriz de colágeno presente en los meniscos de rodilla. Además el prototipo mostró que tiene las propiedades mecánicas de tensión y compresión necesarias para un buen desempeño. La propuesta de usar diferentes polímeros biocompatibles permitió que se lograra obtener un material con las propiedades de resistencia mecánica, y biocompatibilidad consiguiendo reproducir las condiciones necesarias para la vascularización y aceptación del material sin producir infección o inflamación dentro del huésped.

RECONOCIMIENTOS

Al Mtro. Gerardo Fonseca por su apoyo en las pruebas mecánicas, a la Mtra. Alicia del Real por las imágenes de SEM, al Ing. Bernardino Rodríguez Morales y al D.I. Adrián Oskam Vordum por su apoyo técnico en el diseño y adecuación del equipo de electrotejido. El autor M.E. agradece a CONCYTEQ por el apoyo económico recibido para el desarrollo del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S.K.S. Almeida, A.S.R. de Moraes, T. Tashiro, S.E. Neves, A.E. Toscano, R.M.R. Abreu, "Morphometric study of menisci of the knee joint", *Int. J. Morphol.* vol. 22, no. 3, pp. 181-184, 2004.
- [2] A.M. Ahmed, "The load-bearing role of the knee meniscus", en *Meniscus: Basic and Clinical Foundations*, V.C. Mow, S.P. Arnoczky, NY: Raven Press, Ltd., 1992, pp. 59-73.
- [3] D.C. Fithian, M.A. Kelly, V.C. Mow, "Propiedades del material y las relaciones estructura-función en los meniscos", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, pp. 19-31, 1990.
- [4] M. Tissakht, A.M. Ahmed, "Tensile stress-strain characteristics of the human meniscal material", *J. Biomech.*, vol. 28, pp. 411-422, 1995.
- [5] M.A. Sweigart, C.F. Zhu, D.M. Burt, P. D. Deholl, C.M. Agrawal, T.O. Clanton, "Intraspecies and interspecies comparison of the compressive properties of the medial meniscus", *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 32, pp. 1569-1579, 2004.
- [6] W. E. Teo and S. Ramakrishna, "A review on electrospinning design and nanofibre assemblies", *Nanotechnology*, vol. 17, pp. R89-R106, 2006.
- [7] P.E. Greis, D.D. Bardana, M.C. Holmstrom, R.T. Burks, "Meniscal injury I: Basic science and evaluation", *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, vol. 10, pp. 168-176, 2002.
- [8] M.B. Fisher, E.A. Henning, N. Söegaard, J.L. Esterhai, R.L. Mauck, "Organized nanofibrous scaffolds that mimic the macroscopic and microscopic architecture of the knee meniscus", *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4496-4504, Ene. 2013.
- [9] M. Elattar, A. Dhollander, R. Verdonk, K.F. Almqvist, P. Verdonk, "Twenty-six years of meniscal allograft transplantation: is it still experimental? A meta-analysis of 44 trials", *Knee Surg. Sport Traumatol. Arthrosc.*, vol. 19, pp. 147-157, 2011.
- [10] W.E. Garrett Jr., et al., "American board of orthopaedic surgery practice of the orthopaedic surgeon: part-II, certification examination case mix", *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 88, pp. 660-667, 2006.
- [11] J.J. Ballyns, L.J. Bonassar, "Dynamic compressive loading of image-guided tissue engineered meniscal constructs", *J. Biomech.*, vol. 44, pp. 509-516, 2011.
- [12] B.B. Mandal, S.H. Park, E.S. Gil, D.L. Kaplan, "Multilayered silk scaffolds for meniscus tissue engineering", *Biomaterials*, vol. 32, pp. 639-651.
- [13] Q. Zhang, H. Lu, N. Kawazoe, G. Chen, "Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration", *Acta Biomater.*, vol. 10, pp. 2005-2013, 2014.
- [14] A.C. Abraham, J.T. Moyer, D.F. Villegas, G.M. Odegard, T.L.H. Donahue, "Hyperelastic properties of human meniscal attachments", *J. Biomech.*, vol. 44 no. 3, pp. 413-418, Feb. 2011.
- [15] I.D. McDermott, S.D. Masouros, A.A. Amis, "Biomechanics of the menisci of the knee", *Curr. Orthop.*, vol. 22 no. 3, pp. 193-201, Jun. 2008.