



Universidad
Zaragoza



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza

PROYECTO FIN DE CARRERA

**CARACTERIZACION DE BIOMATERIALES
COMPUESTOS PARA SU USO EN
INGENIERIA DE TEJIDOS**

Presentado por

CARLOS PELEGAY SALAS

Autorizado por los directores

IGNACIO OCHOA GARRIDO

MOHAMED HAMDY DOWEIDAR

Escuela de Ingeniería y Arquitectura (EINA)

Universidad de Zaragoza

Zaragoza, Diciembre de 2012

Agradecimientos

Me gustaría expresar, en primer lugar, mi mayor agradecimiento a los Directores de este proyecto, Ignacio Ochoa Garrido y Mohamed Hamdy Doweidar por su apoyo y por su inagotable paciencia. De igual manera, a Sara Manzano Martínez por su dedicación y sus consejos en el desarrollo del mismo.

Así mismo, quiero dar las gracias a todas aquellas personas que, en mayor o menor medida, han contribuido al desarrollo de este proyecto. Especialmente a Lucía Herrero por su amistad y compañía y por hacerme pasar tan buenos momentos durante todos estos meses. A Gloria Gallego y a José Antonio Gómez por su amabilidad durante la visita a la Universidad Politécnica de Valencia.

Gracias a todos mis compañeros de la carrera por haber podido compartir todos estos años juntos, y a todas aquellas amistades creadas durante mi Erasmus en Viena que hicieron de aquella experiencia algo único e inolvidable.

Finalmente, no puedo olvidarme de mi familia y amigos por su apoyo constante y por darme fuerzas día a día para luchar por mis sueños y aspiraciones.

CARACTERIZACION DE BIOMATERIALES COMPUESTOS PARA SU USO EN INGENIERIA DE TEJIDOS

RESUMEN

La artrosis es una enfermedad degenerativa de las articulaciones que produce el desgaste del cartílago originando dolor, rigidez e incapacidad funcional. En la actualidad, los tratamientos aplicados se centran en paliar sus efectos. Sin embargo no existen recursos eficaces para evitar su aparición, ni métodos para detener el proceso degenerativo. Las investigaciones actuales se encaminan al desarrollo de técnicas capaces de regenerar la estructura y el funcionamiento del tejido lesionado. Una de las ideas que está adquiriendo mayor importancia es el uso de implantes de células madre mesenquimales embebidas en matrices o andamios tridimensionales. Dichos andamios tienen como objetivo principal aportar el soporte estructural y facilitar la adhesión, proliferación y migración de las células, logrando así la regeneración tisular.

Los hidrogeles son biomateriales que, debido a su elevada capacidad de absorción de agua y la gran similitud con el microambiente celular están demostrando ser particularmente útiles en el diseño y fabricación de andamios. Permiten la difusión de nutrientes y oxígeno a las células, así como la eliminación del dióxido de carbono y productos de desecho del interior del andamiaje. Sin embargo, quedan por estudiar aspectos fundamentales relacionados en gran medida con las propiedades macroscópicas de los mismos. En particular estudios de las cargas que soportan, las velocidades de los flujos a través del material poroso, la permeabilidad, etc. Por lo tanto, es necesario conocer en profundidad cómo afectan dichas variables al comportamiento del hidrogel.

Como objetivo principal de este proyecto se propuso caracterizar mecánicamente un nuevo material fabricado a base de hidrogel. Este biomaterial pretende mimetizar al cartílago articular humano para poder ser utilizado en un biorreactor en Ingeniería de Tejidos. Para ello se realizó el estudio de varias familias de andamios estructurales compuestos, en diferentes proporciones, a base de poly(ethyl acrylate) (PEA) que actúa como red de refuerzo y poly(hydroxyethyl acrylate) (PHEA) que es propiamente el hidrogel. Se analizó en detalle el proceso de síntesis, se caracterizó mecánicamente el material a nivel macro y micro-estructural y se determinó qué familia de material presentaba un comportamiento más semejante al del cartílago articular humano.

Índice general

Índice general	7
Índice de figuras	9
Índice de tablas	13
1. INTRODUCCION	15
1.1 Motivación.....	15
1.2 Objetivos.....	15
1.3 Descripción del proyecto.....	17
2. CARTILAGO ARTICULAR HUMANO	19
2.1 Composición, estructura y función.....	19
2.2 Lesiones condrales – Artrosis	22
2.3 Terapias actuales para la reparación de lesiones condrales	23
2.3.1 Sustitución de la articulación.....	23
2.3.2 Estimulación de la auto-reparación por parte del organismo.....	23
2.3.3 Trasplantes e implantes de tejido cartilaginoso.....	23
3. INGENIERIA DE TEJIDOS	27
3.1 Introducción	27
3.2 Biorreactores	27
3.3 Biomateriales.....	29
3.3.1 Hidrogeles.....	31
4. PROCESO DE SINTESIS DE REDES POLIMERICAS INTERPENETRADAS (IPN)	35
4.1 Introducción	35

4.2 Redes poliméricas interpenetradas (IPN).....	35
4.3 Proceso de síntesis	38
5. CARACTERIZACION MECANICA Y MICRO-ESTRUCTURAL DEL MATERIAL	43
5.1 Caracterización mecánica.....	43
5.1.1 Ensayos de compresión uniaxial monotónica	43
5.1.2 Ensayos de compresión de carga-relajación	45
5.1.3 Método experimental.....	45
5.1.4 Ensayo de fatiga.....	53
5.2 Caracterización micro-estructural.....	55
5.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	55
6. RESULTADOS Y DISCUSION	59
6.1 Comparativa de las familias de material	59
6.1.1 Ensayos de compresión uniaxial monotónica	59
6.1.2 Ensayos de compresión de carga-relajación	61
6.1.3 Ensayo de fatiga.....	63
6.1.4 Herramienta de trabajo.....	64
6.2 Comparativa de las familias de material con el cartílago articular	65
6.2.1 Ensayos de compresión uniaxial monotónica	66
6.2.2 Ensayos de compresión de carga-relajación	67
6.3 Comportamiento micro-estructural del material.....	68
6.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	69
6.4 Conclusión	71
7. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	73
7.1 Conclusiones.....	73
7.2 Trabajo futuro	73
Bibliografía	75
ANEXOS	79

Índice de figuras

<i>Figura 1. Estructura y esquema de los diferentes tipos de cartílago [11, 12]. (a) Estructura de la matriz extracelular, (b) Cartílago hialino, (c) Cartílago elástico y (d) Fibrocartílago</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2. Vista de la estructura y zonas del cartílago articular en la que se observa la zona superficial, transicional, medial y calcificada [11,12]</i>	<i>22</i>
<i>Figura 3. La microfractura, la mosaicoplastia y el implante autólogo de condrocitos son algunas de las terapias actuales aplicadas en la reparación de lesiones condrales [1]</i>	<i>24</i>
<i>Figura 4. Técnica de implantación de células madre en andamios estructurales. Las células introducidas en el andamio son estimuladas mediante factores de crecimiento y otros factores externos antes de ser implantadas en el cartílago dañado [24]</i>	<i>25</i>
<i>Figura 5. Los elementos principales involucrados en la Ingeniería de Tejidos son las células madre y progenitoras, los biomateriales y los estímulos aplicados sobre los andamios</i>	<i>27</i>
<i>Figura 6. Ejemplo de biorreactor empleado en la actualidad en Ingeniería de Tejidos. En él los diferentes estímulos mecánicos se aplican directamente sobre la muestra [27]</i>	<i>28</i>
<i>Figura 7. Vista esquemática del biorreactor con el material mimético al cartílago humano en su base, el defecto donde situar el andamio estructural y el rodillo que imita el movimiento articular y mediante el cual se aplican estímulos mecánicos</i>	<i>29</i>
<i>Figura 8. Estructura de la red de un hidrogel donde se muestran los diferentes tipos de enlace, físicos y químicos (no todos los enlaces están necesariamente presentes en un mismo hidrogel) [30]</i>	<i>32</i>
<i>Figura 9. Relación entre la estructura interna, el método de fabricación y las propiedades de un hidrogel. Cada una de ellas influye de manera directa en las demás</i>	<i>33</i>
<i>Figura 10. (a) Polímero con entrecruzamientos simples entre sus monómeros. (b) Polímero con entrecruzamiento doble, entre sus monómeros y entre otros polímeros, por efecto de un agente entrecruzador [31]</i>	<i>36</i>
<i>Figura 11. Proceso de fabricación de una red polimérica interpenetrada. En primer lugar se crea la red A y el segundo lugar la red B en el seno de la primera [32]</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12. Estructura de la molécula de PEA y vista tridimensional de la misma [34]</i>	<i>37</i>
<i>Figura 13. Estructura de la molécula de PHEA y recreación tridimensional de la misma [35].</i>	<i>37</i>

Figura 14. Elementos a partir de los cuales se sintetiza la primera red de PEA: monómero de EA, agente entrecruzador y fotoiniciador y etanol en diferentes proporciones.....	38
Figura 15. Elementos a partir de los cuales se sintetiza la segunda red de PHEA en el seno de la primera: monómero de HEA, agente entrecruzador y fotoiniciador y etanol	39
Figura 16. Instrumental empleado para la síntesis del material. (a) Instrumental donde tiene lugar la polimerización. (b) Instrumental para hervir las muestras. (c) Dispositivo de secado de muestras.....	40
Figura 17. Estructura del material obtenido formado por las dos redes poliméricas interpenetradas y vista real del material sintetizado	40
Figura 18. Relación entre el porcentaje en peso de etanol (%EtOH) empleado en la síntesis de cada familia y el porcentaje en peso de PHEA (%PHEA) resultante para cada una de ellas.....	41
Figura 19. Configuraciones y restricciones de movimiento para los ensayos de compresión uniaxial aplicados a la caracterización del material. (a) Ensayo confinado y (b) Ensayo no confinado [37].....	44
Figura 20. Vista de la muestra de material en el interior del utillaje empleado en un ensayo de compresión confinada.....	44
Figura 21. Configuraciones para las pruebas confinadas y no confinadas y utillaje real utilizado en la caracterización del material	46
Figura 22. (a) Máquina Instron MicroTester 5548 empleada en los diferentes ensayos. (b) Estufa utilizada para calentar en vacío las muestras y eliminar el agua contenida en su interior	47
Figura 23. Vista de los ensayos de compresión uniaxial monotónica. (a) Ensayo no confinado y (b) Ensayo Confinado.....	48
Figura 24. (a) Curva de datos registrada por la máquina durante el ensayo, (b) Curva típica de tensión vs. deformación obtenida después de un ensayo de compresión uniaxial monotónica en condiciones de no confinamiento y selección del rango lineal y (c) Selección y ajuste lineal por mínimos cuadrados para el cálculo del Módulo de Young	49
Figura 25. (a) Curva típica de tensión vs. deformación obtenida después de un ensayo de compresión uniaxial monotónica en condiciones de confinamiento y selección del rango lineal y (b) Selección y ajuste lineal por mínimos cuadrados para el cálculo del Módulo Agregado.....	50
Figura 26. Ejemplo de rampa de carga-relajación implementada en los ensayos. En ella se observan las 7 rampas controladas por extensión y los valores de carga obtenidos para cada una de ellas	51
Figura 27. Curva típica obtenida después de un ensayo de compresión uniaxial confinado con un protocolo de carga-relajación y definición del ajuste lineal por mínimos cuadrados sobre los siete puntos de máxima relajación (línea roja)	52
Figura 28. Ejemplo de tratamiento de datos en un ensayo de compresión uniaxial confinado con un protocolo de carga-relajación. (a) Curva típica de fuerza vs. tiempo para una rampa de carga-relajación y (b) Selección y ajuste exponencial para el cálculo de la permeabilidad a partir de una curva de relajación	52
Figura 29. Campana de flujo laminar con todos los componentes del ensayo en su interior ya esterilizados y preparados para el montaje del instrumental.....	53
Figura 30. (a) Dispositivo BOSE ElectroForce 5210 BioDynamic empleado para los ensayos de fatiga [40] y (b) Vista de una de las cámaras de ensayo donde se sitúan las muestras	54

<i>Figura 31. Vista general del montaje utilizado en los ensayos de fatiga con la maquina empleada, los depósitos, el baño de agua caliente y el ordenador para la toma de datos</i>	<i>55</i>
<i>Figura 32. Vista de los microscopios electrónicos de barrido empleados en la caracterización micro-estructural del material. (a) SEM Inspect F50 y (b) ESEM Quanta 250 FEG</i>	<i>56</i>
<i>Figura 33. (a) Proceso de pulverización catódica de oro sobre las muestras y (b) Liofilizador utilizado para eliminar el agua presente en las muestras.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 34. Vista del microscopio electrónico de barrido Dual Beam Nova Nanolab 200.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 35. Valores medios con error típico del Módulo de Young (Es) y del Módulo Agregado (Ha) para los ensayos de compresión uniaxial no confinados y confinados, respectivamente, de las distintas familias.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 36. Valores del Coeficiente de Poisson para cada familia calculados a partir de los datos de Es y Ha obtenidos previamente durante la caracterización mecánica del material.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 37. Valores de permeabilidad para cada familia obtenidos a partir de los ensayos uniaxiales de carga-relajación en condiciones de confinamiento.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 38. Porcentaje en peso de agua absorbida en cada familia de material durante el proceso de hidratación</i>	<i>62</i>
<i>Figura 39. Ejemplo de datos de entrada (extensión, en azul) y de salida (fuerza registrada por las células de carga de cada familia) a lo largo del tiempo en un ensayo de fatiga</i>	<i>63</i>
<i>Figura 40. Evolución del comportamiento mecánico de las familias a lo largo de los ciclos durante el ensayo de fatiga.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 41. Valores de Módulo de Young para diferentes porcentajes de PHEA y ajuste lineal de los datos obtenidos de cada familia</i>	<i>64</i>
<i>Figura 42. Comparativa del porcentaje en peso de agua de las distintas familias con el valor relativo al del cartílago articular humano.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 43. Comparativa del Módulo de Young de las distintas familias con el valor relativo al del cartílago articular humano.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 44. Comparativa del Módulo Agregado de las distintas familias con el valor relativo al del cartílago articular humano.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 45. Comparativa de la permeabilidad de las distintas familias con el valor relativo al del cartílago articular humano.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 46. Comportamiento de la permeabilidad en función de la deformación impuesta para la familia 3. Se observa una disminución de la permeabilidad al aumentar la deformación</i>	<i>68</i>
<i>Figura 47. Porcentaje en volumen de la porosidad presente en cada familia de material calculada a partir de las mediciones previas a la realización de los ensayos</i>	<i>69</i>
<i>Figura 48. Imágenes obtenidas con microscopia electrónica tras la crio-fractura con (a) SEM Inspect F50 donde no se observan estructuras porosas y con (b) ESEM Quanta 250 FEG donde no se alcanza una resolución del orden de nanómetros</i>	<i>69</i>
<i>Figura 49. Imágenes obtenidas en el SEM Dual Beam Nova Nanolab 200. (a) Vista general de la estructura porosa del material. (b) Detalle de los nanoporos presentes en el material.....</i>	<i>70</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Grupos de materiales empleados en Ingeniería con sus ventajas, desventajas y posibles aplicaciones [28].....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 2. Ejemplos de hidrogeles y su función en Ingeniería de Tejidos. En la última fila se muestra el caso de estudio en este proyecto [30]</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 3. Porcentaje en peso de etanol en la polimerización de la primera red (etOH-red-I) y la segunda red polimérica (etOH-red-II) y porcentaje en peso de PHEA (%PHEA) en las redes poliméricas interpenetradas resultantes</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 4. Medición del Módulo Agregado del material sin fluido en su interior obtenido mediante los ensayos uniaxiales de carga-relajación en condiciones de confinamiento</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 5. Medición de las propiedades mecánicas del material hidratado (Módulo de Young, Módulo Agregado, coeficiente de Poisson, permeabilidad, porcentaje en peso de agua y porcentaje de porosidad)</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 6. Propiedades mecánicas del cartílago articular humano y valores promedio tomados como referencia para este estudio</i>	<i>65</i>

Capítulo 1

INTRODUCCION

1.1 Motivación

La artrosis es una enfermedad degenerativa de las articulaciones que produce el desgaste del cartílago originando dolor, rigidez e incapacidad funcional. Esta dolencia afecta al 80% de la población mayor de 65 años en países industrializados y, según previsiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2020 se convertirá en la cuarta causa de discapacidad [1]. En España, la Sociedad Española de Reumatología señala que más del 15% de la población, casi 7 millones de personas, padecen artrosis de rodilla, mano o columna [2]. Además de la evidente repercusión en la calidad de vida de los afectados, la artrosis supone unos costes elevados para el sistema sanitario español. Este mismo organismo dio a conocer que esta enfermedad es, junto al cáncer, la segunda patología que genera más gastos sanitarios, sólo por detrás de las enfermedades cardiovasculares. El tratamiento de la artrosis de cadera y rodilla supone para España un coste de 4.700 millones de euros anuales, un gasto medio de unos 1.500 euros al año por paciente [2].

Las razones anteriormente expuestas justifican el estudio de esta patología con el objetivo de buscar nuevos tratamientos los cuales supondrían una gran mejora en la calidad de vida de miles de pacientes.

En la actualidad, los tratamientos aplicados se centran en paliar sus efectos. Sin embargo, no existen recursos eficaces para evitar su aparición, ni métodos para detener el proceso degenerativo. Las investigaciones en el tema, se encaminan al desarrollo de técnicas capaces de regenerar la estructura y el funcionamiento del tejido lesionado [3]. Una de las ideas que está adquiriendo mayor importancia es el uso de implantes de células madre mesenquimales embebidas en matrices tridimensionales (andamios). Dichos andamios tienen como objetivo principal aportar el soporte estructural y facilitar la adhesión, proliferación y migración de las células, logrando así la regeneración tisular [4].

1.2 Objetivos

Los hidrogeles son biomateriales que, debido a su elevada capacidad de absorción de agua y la gran similitud con el microambiente celular están demostrando ser particularmente útiles en el diseño y fabricación de andamios estructurales. Permiten la difusión de nutrientes y oxígeno

a las células, así como la eliminación del dióxido de carbono y productos de desecho del interior del andamiaje. Sin embargo, quedan por estudiar aspectos fundamentales relacionados en gran medida con las propiedades macroscópicas de los mismos. En particular, estudios de las cargas que soportan, velocidades de los flujos a través del material poroso, la permeabilidad, etc. Por lo tanto, es necesario conocer en profundidad cómo afectan dichas variables al comportamiento del hidrogel como material para asegurar una adaptación adecuada de las células.

Como objetivo principal de este proyecto se plantea caracterizar mecánicamente, tanto a nivel macroscópico como microscópico, un nuevo material constituido a base de hidrogel. Este biomaterial pretende mimetizar al cartílago articular humano para poder ser utilizado en Ingeniería de Tejidos. Para ello se dispone de varias familias de material compuestas, en diferentes proporciones, a base de poly(ethyl acrylate) (PEA) que actúa como red de refuerzo y poly(hydroxyethyl acrylate) (PHEA) que es propiamente el hidrogel. Se determinará qué familia presenta un comportamiento más semejante al del cartílago articular para ser utilizado como material base en la fabricación de un biorreactor donde realizar ensayos con diferentes andamios estructurales con células implantadas. De esta manera se pretende conseguir una imitación del tejido huésped y un método de ensayo más preciso y ético para estudiar la regeneración tisular que evitaría los complejos ensayos sobre animales y su posterior sacrificio.

Para ello se han desarrollado los siguientes pasos,

- Análisis y estudio del proceso de fabricación del material.
- Análisis del material mediante microscopía electrónica de barrido que permita establecer una relación entre la composición y la micro-estructura.
- Ensayos de compresión uniaxial monotónica en condiciones de contorno de compresión confinada y no confinada para determinar el módulo de Young y el módulo Agregado respectivamente. A partir de estos datos se obtendrá el coeficiente de Poisson.
- Ensayos de compresión uniaxial de carga-relajación en condiciones de contorno de compresión confinada para determinar la permeabilidad del material.
- Ensayos de fatiga para estudiar la evolución del material en el tiempo.

Una vez realizada la parte experimental, se pretende

- Analizar con suficiente exactitud el comportamiento mecánico del biomaterial, establecer una correlación entre la micro y la macro-estructura y la adecuación para su uso en Ingeniería de Tejidos.
- Determinar qué familia de material presenta un comportamiento similar al del cartílago humano y cómo afecta su composición a sus propiedades mecánicas.
- Creación de una herramienta que permita estimar la composición aproximada que debe presentar este nuevo material para ofrecer unas propiedades mecánicas determinadas. Puesto que no todas las articulaciones a estudiar presentan el mismo comportamiento mecánico, se trataría de una herramienta de referencia a la hora de diseñar nuevas muestras de este material destinadas a imitar tejidos con funciones específicas.

1.3 Descripción del proyecto

El presente documento se divide en 7 capítulos principales. El Capítulo 1 describe la motivación y los objetivos del proyecto.

El Capítulo 2 aborda la estructura, composición y función del cartílago humano. Además, hace referencia a las lesiones y las terapias de reparación actuales del cartílago articular.

En el Capítulo 3 se realiza una introducción general sobre la Ingeniería de Tejidos, seguida de una descripción de los biorreactores y biomateriales empleados. Finalmente, se incluye una descripción más detallada de los hidrogeles como material para su uso como andamio estructural en Ingeniería de Tejidos.

El Capítulo 4 recoge toda la información relativa al proceso de fabricación del material.

En el Capítulo 5 se detallan los protocolos y los experimentos realizados para obtener la caracterización mecánica del biomaterial tanto a nivel macroscópico como micro-estructural.

El Capítulo 6 analiza los resultados obtenidos y establece una correlación entre la composición y la micro y la macro-estructura del material. Además, con el objetivo de determinar qué familia de hidrogel presenta un comportamiento más similar al del cartílago humano, se realiza la comparativa y discusión de los resultados obtenidos con datos propios del cartílago articular humano. Finalmente, se propone una herramienta que sirva como valor de referencia para la fabricación de nuevos materiales con propiedades mecánicas específicas.

Por último, en el Capítulo 7 se presentan las conclusiones generales del proyecto así como las líneas futuras de investigación.

Capítulo 2

CARTILAGO ARTICULAR HUMANO

Dado que el objeto principal de estudio de este proyecto es la búsqueda de un nuevo material capaz de presentar un comportamiento mecánico similar al del cartílago humano, se presentan a continuación aquellos aspectos esenciales relativos a su composición, estructura y a las posibles lesiones y terapias aplicadas hoy en día.

2.1 Composición, estructura y función

El cartílago es un tejido conjuntivo especializado en el que predomina el material intercelular (matriz), segregado por sus células y con espacios intercelulares amplios [5]. El cartílago está constituido principalmente por agua y condrocitos distribuidos de forma diferente en las diversas capas que componen la matriz extracelular (ECM). Los condrocitos son el tipo de células fijas que se relacionan con el cartílago y son los componentes más importantes de este tejido (Figura 1a). Se sitúan en lagunas o cavidades rodeadas de su propia ECM, sin formar contacto intercelular y su función es mantener la integridad del tejido mediante actividades sintéticas y catabólicas. Estas células son metabólicamente activas y responsables de la síntesis, incorporación, organización y degradación de los componentes de la ECM [6, 7].

La estructura del cartílago es densa y con ausencia de vasos sanguíneos, linfáticos e inervación. Los condrocitos se nutren mediante difusión a través de la fase acuosa de la matriz. La ECM se compone de proteoglicanos, íntimamente asociados con las fibras de colágeno embebidas en la matriz (Figura 1a). Las fibras de colágeno resisten fuerzas a tracción y su organización puede adoptar distintos patrones, que darán lugar a sus correspondientes propiedades mecánicas. En el caso del cartílago predomina el colágeno tipo II [6, 8, 9].

Adicionalmente, los proteoglicanos (PGs) están formados por una proteína central, a la que se unen covalentemente los glicosaminoglicanos (GAGs), generando macromoléculas gigantes denominadas agregados de agregano. Los GAGs son polisacáridos heterogéneos formados por unidades repetitivas de al menos dos monómeros distintos y cuyo carácter aniónico le permite atraer y retener agua en el seno de la ECM. Además de resistir las fuerzas a compresión, le confieren junto con el colágeno sus propiedades viscoelásticas. Generalmente, los tejidos especializados en la resistencia a las fuerzas de compresión son ricos en PGs. La flexibilidad y la resistencia del cartílago a compresión determinan en gran medida la capacidad del tejido para amortiguar los impactos, mientras que su superficie lisa permite reducir la fricción en los movimientos de las articulaciones [10].

El agua es el componente más abundante del cartílago, llegando al 65-80% del peso húmedo del tejido. Un pequeño porcentaje de agua se encuentra en el espacio intracelular, un 30% se

asocia con el espacio interfibrilar dentro del colágeno, y el resto se encuentra en el espacio vacante conferido por los poros de la ECM. En el cartílago articular el contenido de agua no está distribuido de forma homogénea, disminuye su concentración desde aproximadamente un 80% en la superficie a un 65% en la zona profunda. La mayor parte del agua puede desplazarse en el interior del tejido o fluir al exterior, aplicando un gradiente de presión o comprimiendo la matriz sólida. La resistencia friccional realizada por los poros de la ECM contra el flujo del fluido es muy elevada, por lo tanto la permeabilidad de este tipo de tejido es muy baja. Esta resistencia y la presurización del agua dentro de la ECM, son los dos mecanismos básicos por los que el cartílago es capaz de soportar cargas muy elevadas. El flujo de agua a través del tejido y de la superficie articular favorece también el transporte de nutrientes y proporciona una fuente de lubricación para la articulación.

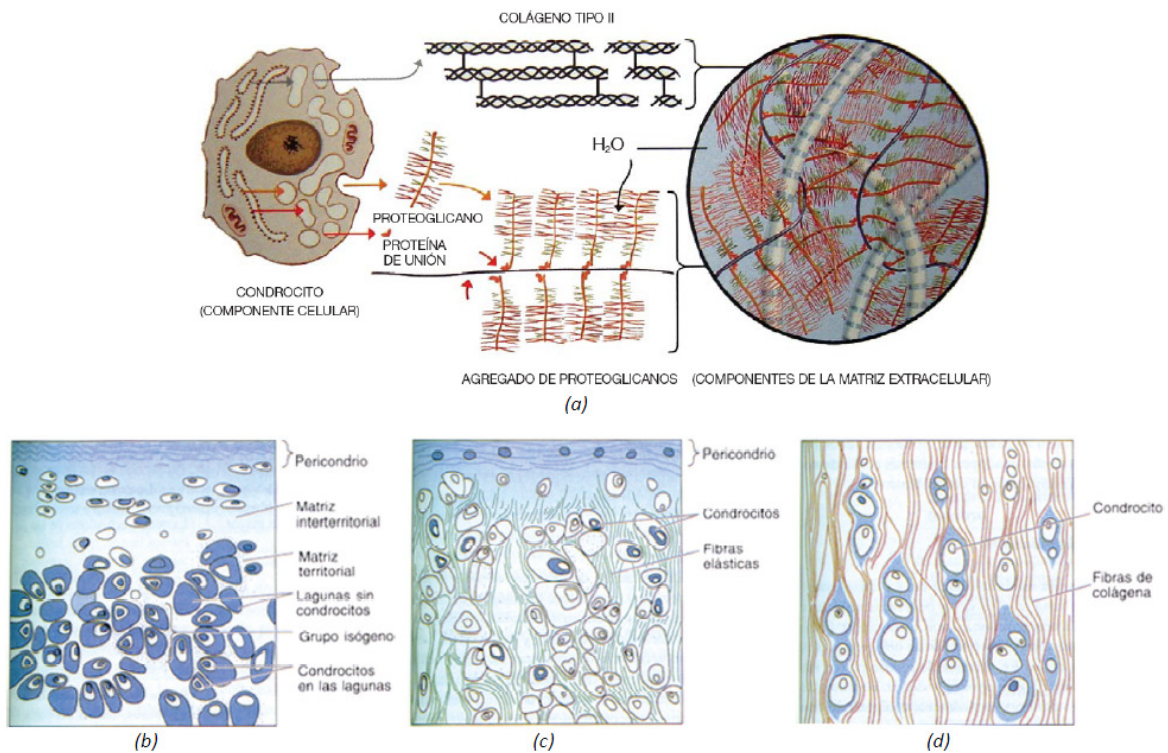


Figura 1. Estructura y esquema de los diferentes tipos de cartílago [11, 12]. (a) Estructura de la matriz extracelular, (b) Cartílago hialino, (c) Cartílago elástico y (d) Fibrocartílago.

Según las fibras que se encuentran en la ECM se pueden encontrar tres tipos de cartílago [13]:

- El cartílago hialino, que contiene fibras de colágeno tipo II en su matriz. Es el más abundante en el cuerpo humano y desempeña diversidad de funciones. Es una sustancia flexible y semitranslúcida de color gris azulado. Se encuentra en la nariz y la laringe, los extremos ventrales de las costillas donde conectan con el esternón, y en los anillos traqueales y bronquiales. Se encuentra también en las superficies articulares de las articulaciones móviles. Constituye el modelo cartilaginoso de muchos de los huesos durante el desarrollo embrionario y las placas epifisarias de los huesos en crecimiento (Figura 1b).
- El cartílago elástico contiene colágeno tipo II y abundantes fibras elásticas, diseminadas por toda la matriz, por lo que es el más flexible. Las fibras elásticas están

compuestas por elastina y microfibrillas que alcanzan hasta un 150% de su longitud en reposo sin romperse. Se encuentra en las orejas, los conductos auditivos externo e interno, la epiglotis y la laringe (Figura 1c).

- El fibrocartílago posee fibras de colágeno densas y gruesas de tipo I en su matriz, lo que le permite soportar fuerzas intensas a tracción (Figura 1d). El cartílago fibroso o fibrocartílago, es una forma de transición entre el tejido conjuntivo denso y el cartílago hialino, puesto que está formado por una combinación de fibras de colágeno y células cartilaginosas ubicadas en lagunas rodeadas por cantidades variables de matriz hialina. Los discos intervertebrales, los discos articulares, los meniscos y la sínfisis del pubis están compuesto fundamentalmente por cartílago fibroso.

El presente estudio centra su interés en el cartílago hialino, por ser el que está presente en las superficies articulares humanas. Estructuralmente, el cartílago hialino articular se divide en capas con diversas propiedades que caracterizan el comportamiento mecánico global de la matriz extracelular [14, 15] (Figura 2):

- Zona superficial: Es la más delgada de todas las capas, representa un 20% del espesor total. Está compuesta por células elipsoides aplanadas que se disponen paralelamente a la superficie y son cubiertas por una fina capa de líquido sinovial. Esta zona es responsable de proporcionar una última superficie de deslizamiento a los cartílagos articulares. En esta zona los condrocitos sintetizan una alta concentración de colágeno y baja concentración de proteoglicanos, generando que sea la zona con el contenido de agua más alto (aproximadamente un 85 %). La disposición de las fibras de colágeno en paralelo, es la responsable de proporcionar una mayor resistencia a tracción y a las fuerzas de cizallamiento. Es la capa más blanda y elástica, permitiéndole resistir y distribuir las cargas aplicadas. Cualquier alteración sobre esta zona, incide directamente en las propiedades mecánicas del tejido y por lo tanto contribuye al desarrollo de la osteoartritis.
- Zona transicional: Es la de mayor espesor (50%). La densidad celular en esta zona es más baja, con células de forma predominantemente esferoide e incrustadas en una abundante matriz extracelular. Las fibras de colágeno de mayor diámetro se organizan aleatoriamente, y son menos numerosas, al igual que la cantidad de agua presente. La concentración de proteoglicanos es superior en esta región.
- Zona medial (radial): Con un 30% del espesor, las células en forma de esferas se encuentran dispuestas perpendicularmente a la superficie. Sin embargo, la densidad celular es la más baja. Esta zona contiene las fibras de colágeno de mayor diámetro, que proveen la resistencia a compresión contribuyendo a la cohesión del tejido, conteniendo las grandes moléculas de proteoglicanos. Presenta la mayor concentración de proteoglicanos y es la más baja en contenido de agua.
- Zona calcificada: Delgada capa que separa el hueso subcondral del cartílago articular. Esta zona mineralizada contiene un pequeño volumen de células incrustadas en una matriz calcificada, con una muy baja actividad metabólica. No hay presencia de proteoglicanos, pero sí abundantes cristales de hidroxapatita. Esta zona proporciona una importante transición al hueso subcondral.

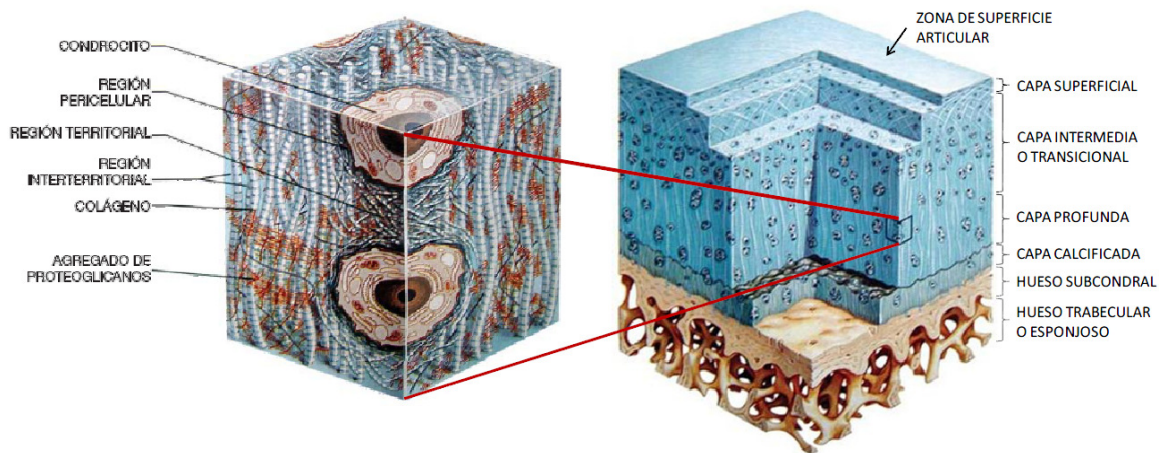


Figura 2. Vista de la estructura y zonas del cartílago articular en la que se observa la zona superficial, transicional, medial y calcificada [11,12].

2.2 Lesiones condrales – Artrosis

En el cartílago articular, los condrocitos se encuentran continuamente sintetizando y degradando las proteínas que componen la ECM consiguiendo un equilibrio que permite el mantenimiento de la misma. Las condiciones que promueven una disfunción en el comportamiento de los condrocitos pueden desequilibrar este balance a favor de la degradación del cartílago. Este proceso puede generar con el tiempo la aparición de patologías de tipo artrósico. La artrosis provoca cambios de morfología, estructurales, biomecánicos o bioquímicos que modifican el comportamiento y las propiedades de la matriz provocando ablandamiento, fibrilación, ulceración y finalmente la pérdida de la matriz y la degeneración del tejido [16].

La artrosis se encuentra generalmente relacionada con el envejecimiento ya que es una enfermedad que afecta principalmente a la gente mayor de 50 años. Otro caso como la artrosis de rodilla se produce como resultado de una lesión o de anomalía previa de la articulación. Es lo que se conoce como artrosis de rodilla secundaria.

En los procesos degenerativos se observa una degradación progresiva del cartílago produciendo como consecuencia una liberación de sus componentes. Esto conlleva principalmente la pérdida de la capacidad para retener agua y un deterioro del funcionamiento articular. El punto final del proceso de degeneración es una pérdida total de cartílago articular en la que se expone el hueso subcondral subyacente. Mecánicamente, la degeneración del cartílago se caracteriza por un aumento en el espesor, disminución de la rigidez, aumento de la permeabilidad y un incremento en el contenido de agua [17].

Una consecuencia de la falta de irrigación vascular es la limitada capacidad de reparación que tiene el cartílago. Los condrocitos próximos a la zona de la lesión pueden responder aumentando su índice de proliferación. Sin embargo, la densa matriz que los rodea impide su migración al área afectada. Por esta razón las lesiones en el cartílago tienden a extenderse progresivamente. Cuando la lesión incluye la capa de hueso subyacente, con vasos y células mesenquimales, se puede producir una respuesta reparadora originada por la migración de células de la médula ósea a la zona condral que generarán un tejido de relleno en la zona lesionada. Este tejido será similar al cartílago durante unos 6 u 8 meses, pero el contenido en colágeno de tipo I se incrementará generando fibrocartílago, y será incapaz de suplir las funciones mecánicas del cartílago articular [18, 19].

Son estas las razones por las que existe un gran interés en el desarrollo de procedimientos que permitan la regeneración o reconstrucción de este complejo estructural. El objetivo de la reparación del complejo articular es evitar la sustitución final de la articulación. En este contexto, las técnicas de Ingeniería de Tejidos ofrecen una alternativa para la regeneración de cartílago articular [20].

2.3 Terapias actuales para la reparación de lesiones condrales

En la actualidad no existen métodos eficaces para evitar las patologías artrósicas ni para detener la normal tendencia al daño una vez generada una lesión sobre el tejido articular. Esto se debe a la limitada capacidad de regeneración que caracteriza a este tipo de tejido [12]. Por ello, hay un gran interés en el desarrollo de procedimientos que permitan la regeneración o reconstrucción de este complejo estructural. A continuación se describen brevemente las técnicas más empleadas en la actualidad, desde las opciones más drásticas hasta las más innovadoras y prometedoras.

2.3.1 Sustitución de la articulación

- **Artroplastia.** Se trata de la opción final en caso de no poder reparar la articulación mediante ninguna otra técnica y consiste en sustituir la articulación por una prótesis artificial. La razón más común para esta operación es la artrosis severa, que causa dolor incesante, deformidad de las articulaciones y problemas de movilidad. Los implantes están fabricados de aleaciones de metales, materiales cerámicos o piezas de plástico, y se pueden unir al hueso con cemento acrílico. Sin embargo, se trata de una intervención traumática y no exenta de complicaciones. Además, las prótesis no siempre son una solución definitiva. La mayoría de personas de edad pueden esperar que la prótesis no deba ser recambiada durante el resto de su vida. En personas jóvenes y activas es probable que se precise una re-intervención para el recambio protésico [21].

2.3.2 Estimulación de la auto-reparación por parte del organismo

- **Abrasión y microfractura.** Se pretende estimular el hueso subcondral para que produzca fibrocartílago y cartílago hialino. Con la abrasión del extremo óseo se penetra entre 1 y 3 mm de profundidad y se destruyen vasos y cortical, llegando a hueso subcondral (Figura 3). Mientras que con las perforaciones el agujero practicado se rellenará de tejido fibroso o fibrocartílago, nunca lo hará de cartílago hialino. Los resultados son impredecibles. Parte de la mejoría que experimentan estos pacientes se debe a la limpieza de los fragmentos del cartílago inestables, a la limpieza de cuerpos sueltos y a la extracción de líquido sinovial. A pesar de que este método es técnicamente más fácil y menos invasivo, se ha encontrado que la superficie del cartílago formado es biomecánicamente inferior en comparación con el cartílago hialino [22].

2.3.3 Trasplantes e implantes de tejido cartilaginoso

- **Autoinjerto osteocondral (Mosaicoplastia).** La mosaicoplastia es el trasplante de pequeños cilindros osteocondrales autólogos procedentes de regiones de la articulación no sometidas a carga, hacia una lesión condral u osteocondral en zona de

carga (Figura 3). Su implantación se asemeja a la forma de un "mosaico" y puede rellenar de un 60% a un 80% de la superficie de la lesión. Clínicamente los resultados son similares a los del trasplante autólogo de condrocitos, pero parece ser que son más prometedores desde el punto de vista histológico [22].

- **Implante de condrocitos o células mesenquimales autólogas cultivadas (ICA).** Este tratamiento supone una nueva perspectiva en la reparación del cartílago articular. Hasta el momento actual, este tipo de tratamiento basado en el aislamiento, cultivo y posterior implantación de condrocitos autólogos, permite reparar con éxito, pequeños defectos articulares (Figura 3). Existen series que tienen unos resultados positivos del 90%, y además, las biopsias tomadas de estos pacientes después de la cirugía muestran un cartílago hialino similar al articular normal, sin embargo las lesiones que asientan en el cartílago rotuliano son las que han demostrado una menor respuesta clínica a este tipo de tratamiento, obteniendo los niveles más bajos de satisfacción clínica. En realidad, se estarían cultivando condrocitos que son implantados en la articulación, pero realmente no se estaría reproduciendo la estructura columnar del cartílago, no se sabe la calidad ni el nivel de actividad y además no habría zonas de transición biomecánica. Probablemente crezca un tejido de baja resistencia biomecánica y por tanto se están creando áreas de dudosa longevidad real. Si bien esta técnica se realiza actualmente en humanos, la necesidad de realizar dos cirugías supone un inconveniente [22].

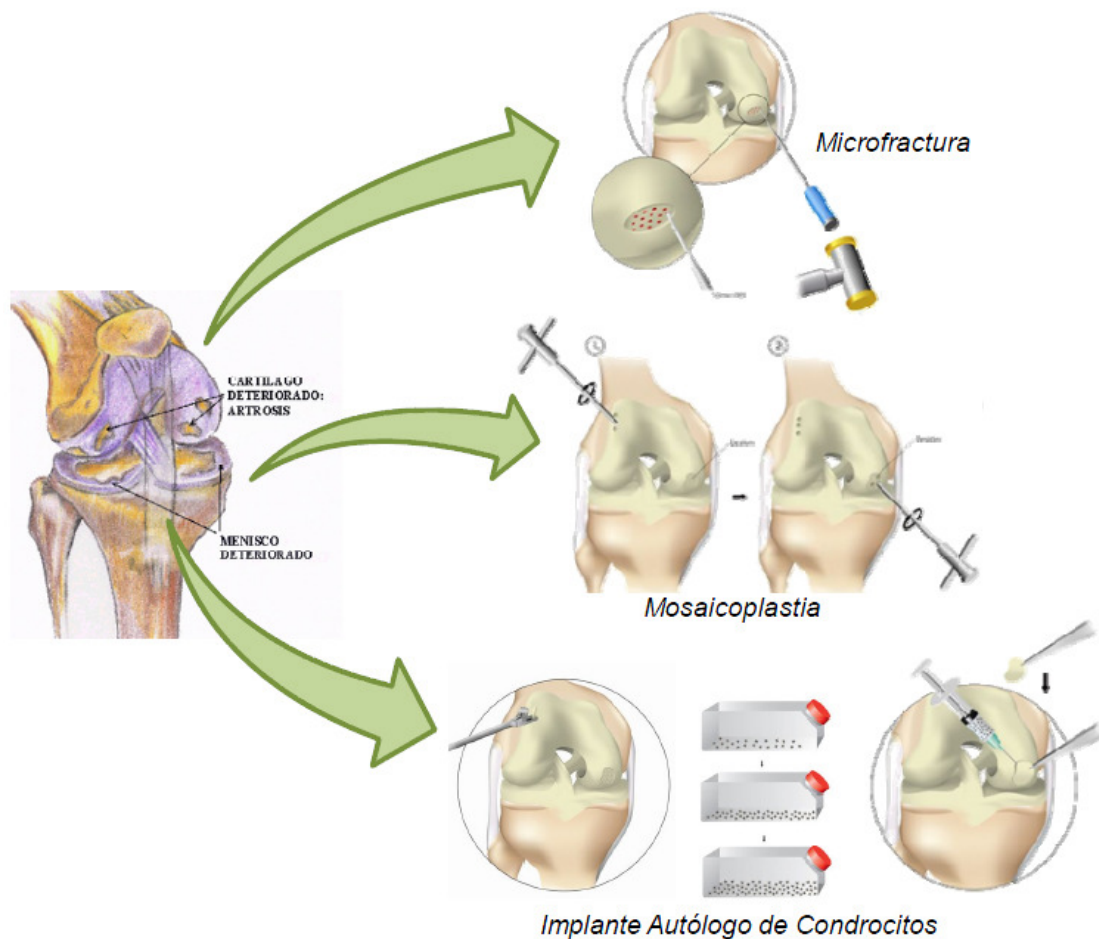


Figura 3. La microfractura, la mosaicoplastia y el implante autólogo de condrocitos son algunas de las terapias actuales aplicadas en la reparación de lesiones condrales [1].

- Implante de condrocitos en andamios estructurales (MACI).** Diversas modificaciones y diferentes técnicas de implantación de condrocitos se están estudiando actualmente. Muchas de estas técnicas se centran especialmente en la cirugía mínimamente invasiva y la combinación de ICA con andamios tridimensionales y factores de crecimiento con el objetivo de conseguir un entorno en el que el condrocito no pierda su fenotipo. La Ingeniería de Tejidos es la base sobre la cual se fundamenta esta nueva técnica (Figura 4). En ella, matrices tridimensionales proporcionan un entramado que aporta el soporte estructural y facilitan la adhesión, proliferación y migración de las células favoreciendo la creación de nuevo tejido cartilaginoso. Estos andamios están fabricados a partir de biomateriales que pueden estar formados por colágeno, fibras de carbono, hidrogeles y otros materiales. Pero en muchas ocasiones la estructura interna de estos andamios no es suficiente para provocar la activación celular, sino que es necesario la aplicación de estímulos sobre los andamios. Estos estímulos pueden ser de tipo térmico, químico, eléctrico, luminoso, mecánico o de presión osmótica entre otros. Se ha comprobado que los estímulos mecánicos en las células son uno de los factores relacionados con la actividad celular. La ventaja que ofrece esta técnica es que, al ser soportadas las células por una estructura 3D que actúa como sustituto a la matriz extracelular, se permite un mejor control de los estímulos mecánicos que sufren las células. Parámetros como la porosidad, el tamaño de poro y morfología del andamio juegan un papel importante en las propiedades mecánicas, la conducción de nutrientes, así como en la magnitud de los estímulos provocados en biorreactores. Una vez desarrolladas las células, el andamio es implantado en la zona de lesión. Esta técnica está demostrando obtener resultados muy prometedores que parecen paliar los inconvenientes de las técnicas restantes [22, 23].

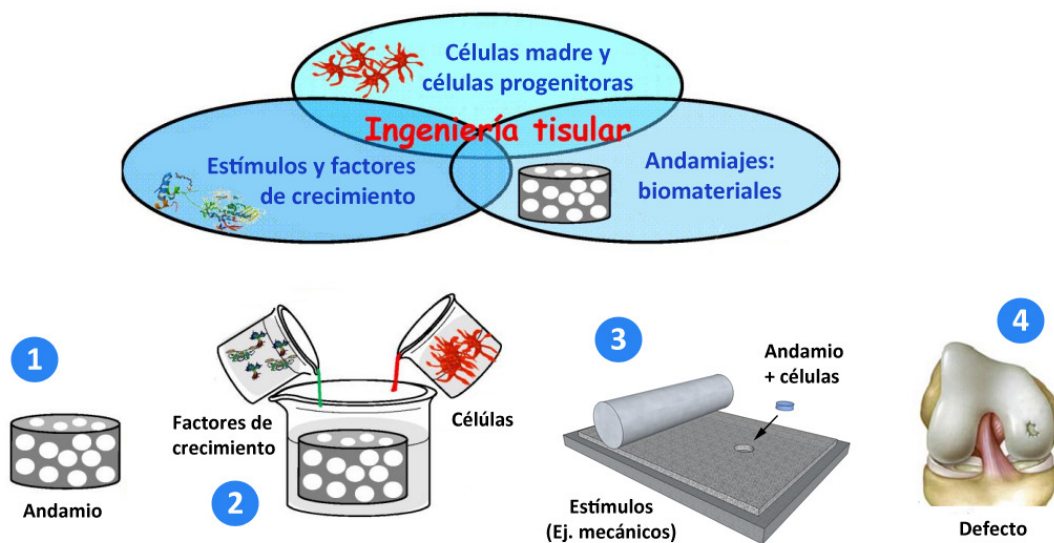


Figura 4. Técnica de implantación de células madre en andamios estructurales. Las células introducidas en el andamio son estimuladas mediante factores de crecimiento y otros factores externos antes de ser implantadas en el cartílago dañado [24].

Esta última técnica, la implantación de células madre mesenquimales en matrices tridimensionales, todavía presenta grandes posibilidades de estudio e investigación. Es por ello que este proyecto pretende ahondar más detalladamente en la rama de la Ingeniería de Tejidos, prestando especial atención a los materiales empleados para la fabricación de andamios estructurales, los biomateriales, pero también a los biorreactores empleados para

provocar la estimulación mecánica y por ende la activación celular. Al fin y al cabo, el material de estudio pretende ser la base de un nuevo biorreactor donde se introducirán andamios cultivados con células y sobre el que se aplicarán estímulos mecánicos.

Capítulo 3

INGENIERIA DE TEJIDOS

3.1 Introducción

La Ingeniería de Tejidos constituye una disciplina relativamente nueva y un campo de investigación y desarrollo interdisciplinario que aplica los conocimientos de la bioingeniería, ciencias de la vida, química, física y biología, para resolver problemas clínicos y quirúrgicos asociados a la pérdida de tejidos o al fallo funcional de órganos. Los factores normalmente implicados en la Ingeniería de Tejidos son las células, así como los componentes que forman su matriz extracelular. También participan en este desarrollo dispositivos (biorreactores) que permitan y estimulen o favorezcan la reparación o restauración de un órgano o tejido dañado (Figura 5). La gran mayoría de los andamios desarrollados para aplicaciones en el campo de la Ingeniería de Tejidos está constituida por estructuras elaboradas a partir de los llamados biomateriales, y muchos de ellos son ensayados en los llamados biorreactores [25].

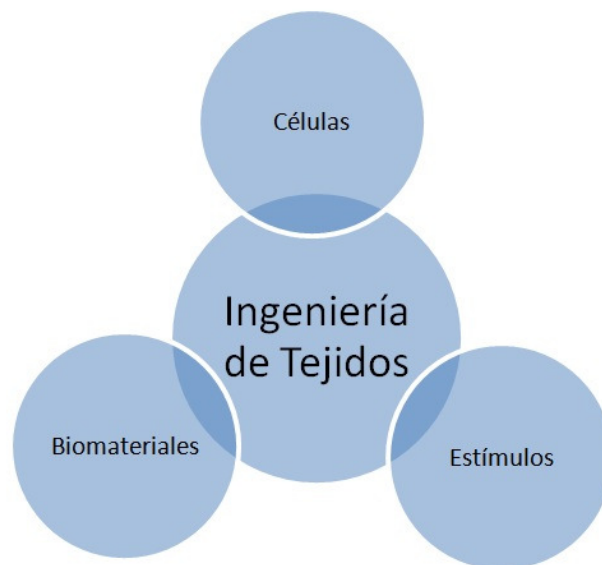


Figura 5. Los elementos principales involucrados en la Ingeniería de Tejidos son las células madre y progenitoras, los biomateriales y los estímulos aplicados sobre los andamios.

3.2 Biorreactores

A pesar de los prometedores resultados de la Terapia Celular, los investigadores han tenido que hacer frente a importantes desafíos en la regeneración de tejidos que cumplan una función

predominantemente mecánica. Las aproximaciones actuales investigan los llamados tejidos funcionales, en los que se emplean células cultivadas *in-vitro* en el seno de una matriz tridimensional y que estimulados de forma adecuada logran la funcionalización del tejido antes de ser implantado. Estudios recientes han demostrado que la estimulación mecánica tiene un efecto directo sobre la actividad celular en una cierta variedad de células. El hecho de que estímulos mecánicos puedan modular la funcionalidad celular ha motivado el desarrollo de sistemas de estimulación que ayuden a regenerar tejidos *in-vitro* ayudados por medio de estímulos externos.

El término biorreactor hace referencia a un sistema en el que sus condiciones se encuentran estrictamente controladas para permitir o inducir ciertos comportamientos en células o tejidos vivos. Esta tecnología puede ser utilizada para generar tejidos o incrementar el número de células previas a un trasplante y también para estudios controlados *in-vitro* acerca del efecto de los factores biomecánicos en el desarrollo de células y tejidos. El objetivo fundamental de los biorreactores es lograr una distribución uniforme de células en matrices o andamios tridimensionales, manteniendo concentraciones adecuadas de nutrientes y gases, para poder aplicar sobre estas células los estímulos mecánicos adecuados para el desarrollo del tejido. Además, los biorreactores permiten aplicar un método de ensayo más preciso y ético para estudiar la regeneración tisular, evitando los complejos ensayos sobre animales y su posterior sacrificio [26].

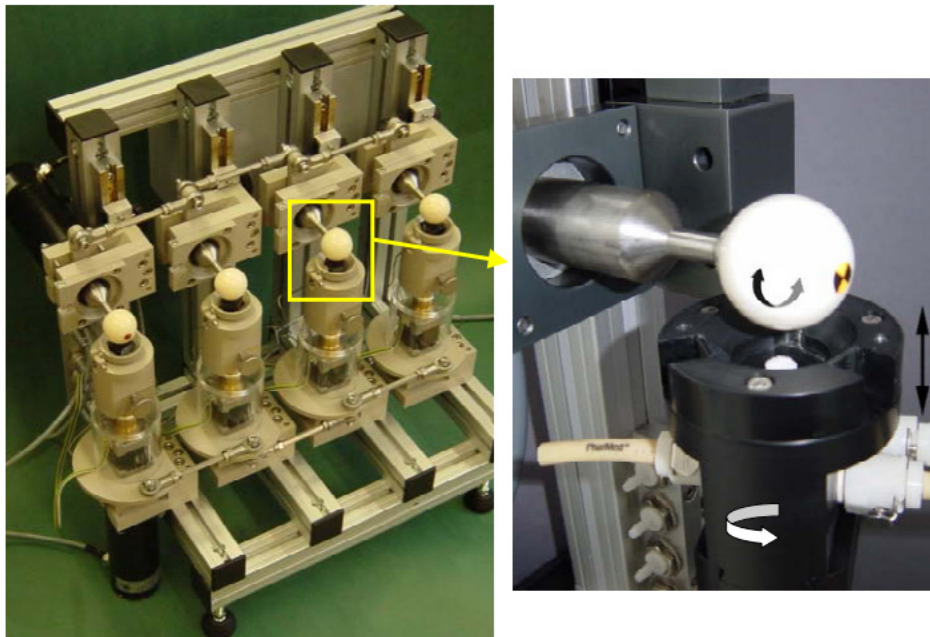


Figura 6. Ejemplo de biorreactor empleado en la actualidad en Ingeniería de Tejidos. En él los diferentes estímulos mecánicos se aplican directamente sobre la muestra [27].

Existen diferentes tipos de biorreactores basados en distintos principios de funcionamiento, dependiendo del estímulo a aplicar. Estos estímulos pueden ser de tipo térmico, químico, eléctrico, luminoso, mecánico o de presión entre otros. En este proyecto se pretende abordar la importancia de los estímulos mecánicos en la regeneración tisular. Los biorreactores

empleados en la actualidad aplican fuerzas de compresión, cizalladura o rotación, entre otras, directamente sobre los andamios estructurales cultivados con células (Figura 6). Sin embargo, con este tipo de máquinas no se está simulando de una manera fiel ni el entorno ni el comportamiento real del tejido al que el andamio pretende sustituir [27].

Una situación más realista se muestra en la Figura 7, donde el andamio estructural se encuentra confinado en el interior de otro material que imita el entorno de trabajo en que será implantado. Este material, se conoce como tejido huésped y a de simular de la forma más precisa posible el tejido que se pretende reparar, el cartílago articular en nuestro caso. Como ya se ha ido señalando, este estudio busca caracterizar un material que sirva de base para un nuevo modelo de biorreactor. Con este innovador tipo de biorreactor, se tiene en cuenta la influencia que el tejido circundante tiene sobre el andamio y por ende sobre las células y su actividad. Esta máquina es capaz de simular el movimiento de las articulaciones y las deformaciones que sufren los tejidos, la difusión de nutrientes y oxígeno a las células, así como la eliminación del dióxido de carbono y productos de desecho del interior del andamiaje. Solo estimulando el andamio de la forma correcta, podremos obtener una respuesta celular adecuada por parte del mismo.

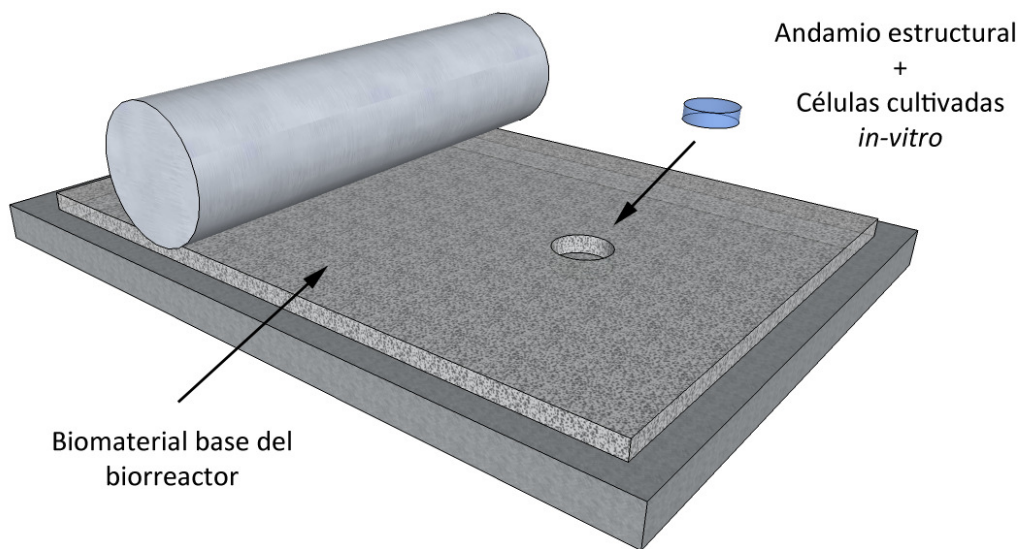


Figura 7. Vista esquemática del biorreactor con el material mimético al cartílago humano en su base, el defecto donde situar el andamio estructural y el rodillo que imita el movimiento articular y mediante el cual se aplican estímulos mecánicos.

3.3 Biomateriales

Los biomateriales son materiales farmacológicamente inertes (aunque pueden contener drogas asociadas), utilizados para ser incorporados o implantados dentro de un sistema vivo para reemplazar o restaurar alguna función permaneciendo en contacto permanente o intermitente con fluidos corporales.

Los principales problemas de los biomateriales guardan relación con su biocompatibilidad, propiedades mecánicas y adaptabilidad. Los progresos actuales en la ciencia de los materiales están posibilitando la mejora de las aplicaciones clásicas de los biomateriales así como el diseño de nuevas y prometedoras aplicaciones. En general, en el desarrollo de los biomateriales se pueden diferenciar tres grandes generaciones. Hacia los años 60 la primera generación tenía como objetivo la sustitución de tejidos por materiales inertes con propiedades similares. La segunda generación surge hacia los años 80 cuyo objetivo principal era inducir una reacción, lo más controlada posible, por parte del tejido vivo. Los materiales más representativos de esta generación son los materiales bioactivos y los biodegradables. Actualmente, se están desarrollando e investigando los llamados biomateriales de tercera generación, enfocados en la auto-regeneración del tejido mediante estímulos a nivel celular y molecular. Estos materiales son capaces de liberar fármacos de manera controlada, son integrativos, reabsorbibles y favorecen la regeneración funcional de los tejidos que sustituyen. La utilización de esta metodología implicaría la disminución de muchos de los problemas relacionados con otras técnicas como son: intervenciones costosas y dolorosas para la extracción del tejido en el caso de los autoinjertos; la disponibilidad de donantes y las reacciones de rechazo, en el caso de los aloinjertos, y el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas en el caso de los xenoinjertos [1, 25].

Los requisitos básicos que debe cumplir un biomaterial son [28]:

1. Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo, no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante la presencia del biomaterial.
2. No ser tóxico, ni carcinógeno.
3. Ser químicamente estable e inerte.
4. Tener una resistencia mecánica adecuada.
5. Tener un tiempo de fatiga adecuado.
6. Tener densidad y peso adecuados.
7. Tener un diseño de ingeniería perfecto; esto es, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados.
8. Ser relativamente barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala.

Dentro del mundo de los biomateriales existen diversos criterios para su clasificación. Atendiendo a su biocompatibilidad se puede hablar de materiales bioinertes, bioreabsorbibles o biodegradables y bioactivos. Desde el punto de vista de la forma de contacto que se establece con el organismo, los biomateriales se suelen clasificar como de uso temporal o permanente y de localización intra o extracorpórea. Sin embargo, para este proyecto interesa realizar una distinción atendiendo a su función. De esta manera, existen biomateriales destinados a su uso como implantes, otros empleados como andamios estructurales donde realizar cultivos celulares y unos terceros enfocados también a la recreación de un entorno biomimético que permita a las células identificarse con el tejido de interés. El objetivo de estos últimos biomateriales es la elaboración de tejidos huésped que imiten las propiedades de tejidos particulares para ser utilizados en herramientas de investigación, como los biorreactores. Esta última función es la que pretende desempeñar el material de estudio y la que debe tomarse como referencia en este análisis [29].

Además, dependiendo de estas aplicaciones, los biomateriales presentarán propiedades particulares. Mientras que los andamios estructurales con células que van a ser implantados en seres humanos deben ser biocompatibles, reabsorbibles, con una tasa de degradación adecuada y con productos de degradación fácilmente eliminables y no tóxicos, los empleados

en biorreactores no deben degradarse con el tiempo ya que su función principal es la de soporte.

La composición química de los biomateriales también juega un papel esencial. Atendiendo a este criterio los dispositivos biomédicos se fabrican con cuatro materiales convencionales: metales, polímeros, cerámicas y materiales compuestos. De acuerdo con su origen se clasifican, en naturales y sintéticos y por su estructura, en sólidos y porosos. En la Tabla 1 se enumeran algunas de las ventajas, desventajas y aplicaciones para los cuatro grupos de materiales [28].

Materiales	Ventajas	Desventajas	Ejemplos
Polímeros	Elásticos, fácil fabricación, baja densidad	Baja resistencia mecánica, degradabilidad	Suturas, arterias, dientes, tendones
Metales	Resistencia a impactos y al desgaste	Baja biocompatibilidad, corrosión, alta densidad	Fijación ortopédica, tornillos, clavos
Cerámicas	Biocompatibles, inertes, resistencia a la corrosión	Frágiles, alta densidad, baja resistencia mecánica, difícil fabricación, inelásticos	Prótesis de cadera, dientes
Compuestos	Buena compatibilidad, inertes, resistencia a esfuerzos y a la corrosión	Poca consistencia en la fabricación del material	Válvulas cardíacas, marcapasos

Tabla 1. Grupos de materiales empleados en Ingeniería con sus ventajas, desventajas y posibles aplicaciones [28].

A la vista de lo citado anteriormente, queda claro que los biomateriales deben establecer un compromiso entre su biocompatibilidad, propiedades mecánicas y adaptabilidad, por lo que es esencial entender las relaciones existentes entre las propiedades, funciones, composición y la estructura de los mismos. Así mismo, deben poseer características mecánicas específicas y similares si se les compara con las que posee el tejido al que pretende imitar.

3.3.1 Hidrogeles

Los hidrogeles son biomateriales y los componentes básicos del material que se pretende caracterizar en este estudio. Antes de profundizar en el método de fabricación y las propiedades del material, es necesario conocer más en detalle qué son y cómo se comportan los hidrogeles. Los hidrogeles son materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional de origen natural o sintético, que se hinchan en contacto con el agua formando materiales blandos y elásticos, y que retienen una fracción significativa de agua en su estructura sin disolverse.

Los sólidos poliméricos son especialmente aptos para formar geles gracias a su estructura de largas cadenas. La flexibilidad de estas cadenas hace posible que se deformen para permitir la entrada de moléculas de disolvente dentro de su estructura tridimensional. Los geles se pueden clasificar en dos tipos, en función de la naturaleza de las uniones de la red tridimensional que los constituyen (Figura 8) [25]:

- Geles físicos, presentan una red tridimensional formada por uniones que no son completamente estables. Generalmente, las uniones son del tipo de van der Waals, muchos más débiles que las uniones covalentes. Dan origen a las mallas no entrecruzadas.
- Geles químicos, que son aquellos en los que la red está formada a través de enlaces covalentes. Este tipo de enlace es muy fuerte y su ruptura conduce a la degradación del gel. Dan lugar a las mallas entrecruzadas.

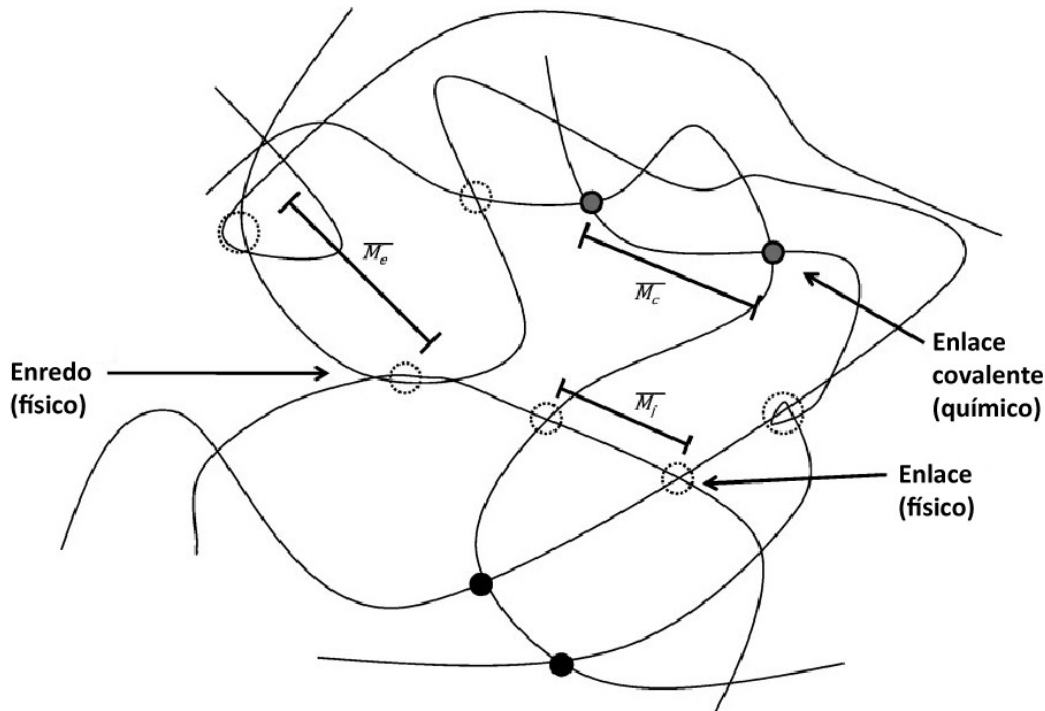


Figura 8. Estructura de la red de un hidrogel donde se muestran los diferentes tipos de enlace, físicos y químicos (no todos los enlaces están necesariamente presentes en un mismo hidrogel) [30].

Por lo que respecta al hinchamiento, la diferencia fundamental entre polímeros entrecruzados y no entrecruzados reside en que, en los primeros, la entrada de líquido no puede separar las cadenas por estar covalentemente unidas mientras que en los segundos, la entrada de líquido puede desenmarañar las cadenas, separándolas, debido a que las fuerzas que las mantienen unidas son de origen físico. La apariencia externa que tiene un gel depende de su proporción líquido / sólido. En el caso de los polímeros entrecruzados, los geles mantienen su aspecto de sólidos elásticos. Pero en el caso de polímeros no entrecruzados, a medida que aumenta la proporción de líquido se va pasando desde dicho aspecto de sólido elástico al de líquido viscoso.

Los hidrogeles presentan una serie de características particulares como son [25]:

- Carácter hidrófilo: debido a la presencia en la estructura de grupos solubles en agua (-OH, -COOH, -CONH₂, -CONH, SO₃H).
- Insolubles en agua: debido a la existencia de una red polimérica tridimensional en su estructura.
- Presentan una consistencia suave y elástica la cual está determinada por el monómero hidrófilo de partida y la baja densidad de entrecruzamiento del polímero.

- Se hinchan en agua aumentando considerablemente su volumen hasta alcanzar un equilibrio químico-físico, pero sin perder su forma. La forma no hidratada se denomina xerogel.

Existe una relación directa entre las propiedades de un hidrogel y su estructura, de tal forma que ambas características no pueden considerarse de forma aislada, ya que el método de síntesis influye de manera decisiva sobre ellas (Figura 9). Por lo tanto, cuando se exponen las propiedades de los hidrogeles ha de hacerse referencia a los parámetros estructurales que las condicionan.



Figura 9. Relación entre la estructura interna, el método de fabricación y las propiedades de un hidrogel. Cada una de ellas influye de manera directa en las demás.

Derivadas de la situación de hinchamiento del hidrogel, existen una serie de propiedades muy importantes que se describen en los siguientes apartados [25].

Contenido de agua en equilibrio

Esta propiedad afecta a otras, como por ejemplo, la permeabilidad, las propiedades mecánicas y superficiales y la biocompatibilidad. El contenido de agua en el equilibrio de un hidrogel se ve afectado, fundamentalmente, por la naturaleza del monómero o monómeros hidrófilos que lo forman, por el tipo y densidad de entrecruzamiento y por otros factores como son, la temperatura, la fuerza iónica y el pH del medio de hidratación.

Estabilidad dimensional

Cualquier fenómeno que dé lugar a cambios en el contenido de agua absorbida, dará lugar a cambios dimensionales. Teniendo en cuenta que el contenido de agua absorbida depende de la estructura del material, la composición del hidrogel tendrá un marcado efecto sobre la estabilidad del mismo.

Propiedades mecánicas

La resistencia mecánica representa la capacidad de un material para soportar la acción de una fuerza sin romperse y generalmente se caracteriza por el esfuerzo que induce dicha ruptura. La respuesta de un material a la acción de una fuerza puede oscilar entre dos comportamientos extremos:

- Viscoso: Toda la fuerza aplicada al cuerpo, lo deforma, y al dejar de actuar, permanece la deformación. La energía suministrada se pierde en forma de calor.

- Elástico: Una vez que cesa la aplicación de la fuerza, desaparece la deformación inducida, recuperándose el trabajo correspondiente.

Entre ambos modelos ideales nos encontramos con el comportamiento real de los materiales, el viscoelástico. Definiéndose en términos mecánicos como combinación de ambos comportamientos, no pudiendo desprejiciarse una componente frente a otra, o debiendo considerarse ambas, en función de la naturaleza intrínseca del material, del nivel de tensión aplicada y de la temperatura.

Biocompatibilidad

En el campo de los polímeros el término biocompatibilidad se refiere a dos aspectos diferentes pero que se encuentran directamente relacionados:

- La elevada tolerancia que han de mostrar los tejidos ante ese agente extraño, fundamentalmente cuando el polímero va a ser implantado.
- La estabilidad química y, especialmente, física del material polimérico durante todo el tiempo en el que se encuentre en contacto con el organismo.

Desde que los hidrogeles se introdujeron en el campo de la Biomedicina, ha quedado demostrado que poseen un gran potencial como biomateriales, debido a su buena biocompatibilidad. Esta característica se debe a que las propiedades físicas de los hidrogeles se asemejan a las de los tejidos vivos más que cualquier otra clase de biomateriales sintéticos, particularmente, en lo referente a su contenido en agua relativamente alto, su consistencia blanda y elástica y su baja tensión superficial. Para el caso particular de los hidrogeles, en la Tabla 2 se muestran algunos de los tipos más comúnmente utilizados y su función en el mundo de la Ingeniería de Tejidos (ver Anexo I) [30].

Tejido de estudio	Células involucradas	Hidrogel	Función
Hueso	Osteoblastos	PEG-PLA	Liberación fármacos
Ojo	-	PHEMA	Andamiaje
Piel	Fibroblastos	HA	Andamiaje
Cartílago	Condrocitos	PLLA, gelatina	Andamiaje
Cartílago	Condrocitos	PHEA	Soporte

Tabla 2. Ejemplos de hidrogeles y su función en Ingeniería de Tejidos. En la última fila se muestra el caso de estudio en este proyecto [30].

Por todo lo mencionado anteriormente, se entiende que los hidrogeles estén demostrando ser particularmente adecuados como andamiajes dentro de la Ingeniería de Tejidos pues son capaces de imitar el entorno tridimensional de las células en tejidos blandos. Sin embargo, los problemas relacionados con los hidrogeles son varios e importantes, y están relacionados en gran medida con las propiedades macroscópicas del andamiaje, en particular con las asociadas a la rigidez, resistencia, permeabilidad, velocidad de degradación y del sistema de anclaje. Un adecuado diseño de todas estas variables es necesario para lograr una recuperación más rápida y una mejor calidad del tejido regenerado. A todo esto hay que añadir que el método de síntesis del hidrogel juega un papel decisivo en la definición de las propiedades y estructura del material.

Capítulo 4

PROCESO DE SINTESIS DE REDES POLIMERICAS INTERPENETRADAS (IPN)

4.1 Introducción

Una de las características de los biomateriales empleados en la Ingeniería de Tejidos y a la que se le da mayor importancia es la arquitectura o estructura interna. En esta disciplina, los biomateriales se fabrican de tal manera que reúnan las propiedades idóneas para desempeñar la función para la cual han sido diseñados. De esta forma, los biomateriales empleados para cultivo celular deben facilitar la regeneración tridimensional del tejido dañado favoreciendo el comportamiento de las células en términos de adhesión, proliferación, diferenciación y proporcionando a las células un ambiente mecánico adecuado. Sin embargo, los andamios que se estudian en este proyecto y que deben simular el cartílago articular humano han de facilitar el intercambio de nutrientes y la eliminación de productos de desecho por procesos difusivos. También deben tener una porosidad interconectada con una distribución de tamaño de poro adecuada que promueva el tráfico de metabolitos y unas propiedades mecánicas acordes a los esfuerzos que debe soportar [25].

El proceso de fabricación empleado para obtener el andamio tiene una influencia decisiva en el cumplimiento o no de esta lista de requisitos. Esto se debe a que cada técnica de elaboración le confiere al andamio final características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio. Algunas de las técnicas utilizadas hoy en día para la fabricación de andamios porosos son el “*Gel Casting*”, la liofilización o la saturación con gas. Sin embargo, para la aplicación que se persigue se ha hecho uso de una técnica diferente, las redes poliméricas interpenetradas o “*Interpenetrating Polymer Networks*” (IPNs).

4.2 Redes poliméricas interpenetradas (IPN)

“*Interpenetrating Polymer Network*” o IPN hace referencia a una red de polímeros interpenetrados donde las cadenas poliméricas además de poseer un alto contenido de ligaciones cruzadas (*crosslink* o entrecruzamientos), se entrecruzan entre sí en forma de red, resultando un polímero de altísimo peso molecular y alta estabilidad química (Figura 10).

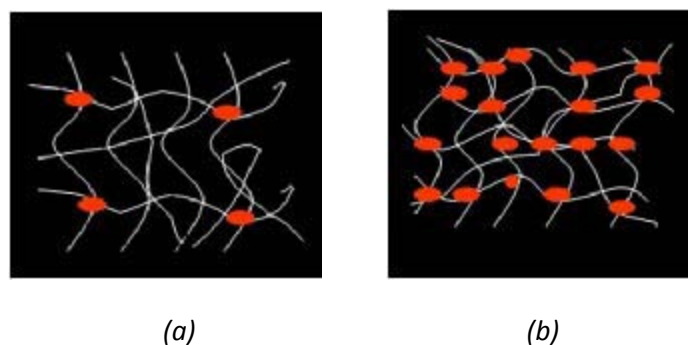


Figura 10. (a) Polímero con entrecruzamientos simples entre sus monómero. (b) Polímero con entrecruzamiento doble, entre sus monómeros y entre otros polímeros, por efecto de un agente entrecruzador [31].

Este nuevo concepto de cadenas poliméricas de alto poder de entrecruzamiento, brinda mayor resistencia y mejores propiedades mecánicas al andamio estructural. Se trata de un complejo proceso secuencial en el que en una primera fase se crea la red A y posteriormente se introduce la segunda fase, creando así una segunda red B en el seno de la primera de manera que ambas quedan interpenetradas (Figura 11) [31,32].

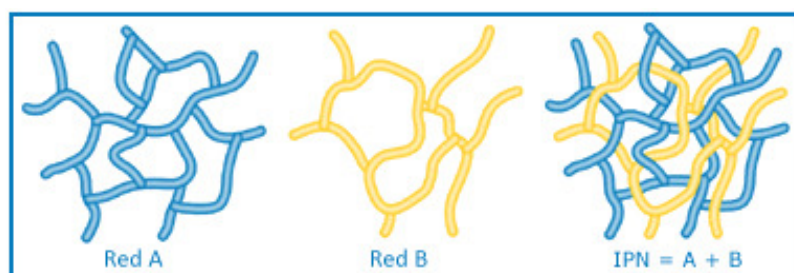


Figura 11. Proceso de fabricación de una red polimérica interpenetrada. En primer lugar se crea la red A y el segundo lugar la red B en el seno de la primera [32].

De esta manera, se observa que son necesarias dos fases distintas para la creación de una red interpenetrada. Para este proyecto, en el Centro de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos de la Universidad Politécnica de Valencia (CBIT), se fabricó un compuesto a base de poly(ethyl acrylate) o PEA que actúa como red de refuerzo y poly(hydroxyethyl acrylate) o PHEA que es el componente hidrófilo, el hidrogel. Dada la gran influencia que presenta el método de síntesis sobre la estructura y propiedades finales del hidrogel, y con el objetivo de tener una visión más global del proyecto, se realizó una colaboración con el CBIT llevando a cabo una visita a sus instalaciones en Valencia. Durante esta estancia se pudo conocer en detalle los componentes empleados, los laboratorios y los protocolos y herramientas utilizadas para la síntesis del material. Sin embargo, antes de profundizar en el proceso de fabricación de este material compuesto, es necesario conocer con más detalle la estructura y propiedades de las dos fases que lo constituyen y porqué se optó por ellas para esta aplicación.

Por un lado el poly(ethyl acrylate) es un polímero sintético que presenta las siguientes propiedades (Figura 12) [33]:

- No biodegradable.
- Biocompatible y bioestable.
- Naturaleza hidrófoba.
- Rigidez y resistencia mecánica.

Además, el PEA es un componente de la misma familia que la segunda fase que se empleará en la fabricación, lo que asegura su compatibilidad. El objetivo del PEA dentro del material es aportar una red de refuerzo en la que se integrará esta segunda fase. Para la síntesis del material se utilizó monómero de ethyl acrylate (EA) al 99% de pureza.

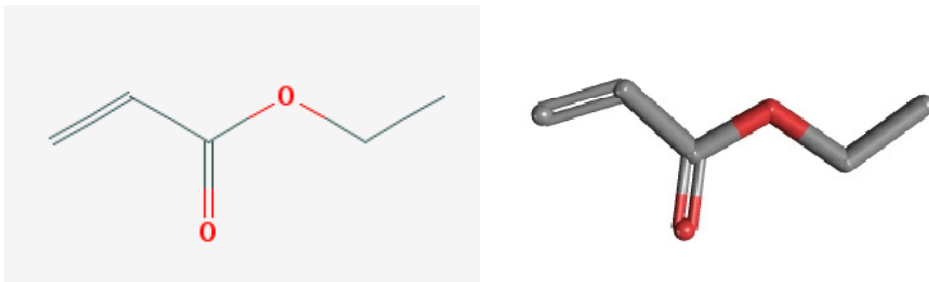


Figura 12. Estructura de la molécula de PEA y vista tridimensional de la misma [34].

Por otro lado el poly(hydroxyethyl acrylate) constituye la segunda fase de la IPN. Se trata de un hidrogel sintético que aporta la componente hidrófila. Este material presenta las siguientes propiedades (Figura 13) [33]:

- No biodegradable.
- Biocompatible y bioestable.
- Gran capacidad de absorción de oxígeno (empleado con éxito en la fabricación de lentes de contacto). Esta propiedad lo destaca como buen candidato para facilitar el intercambio de oxígeno, nutrientes y desechos.
- Naturaleza hidrofílica (capacidad para absorber agua).

Para la fabricación del material se empleó monómero de 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) al 99% de pureza.

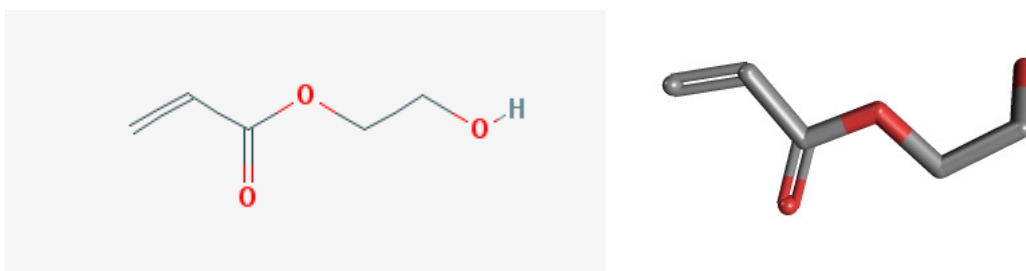


Figura 13. Estructura de la molécula de PHEA y recreación tridimensional de la misma [35].

La elección de estos dos componentes para fabricar un nuevo andamio estructural se debe a las óptimas propiedades que presentan, pero también a la experiencia y bibliografía disponible sobre su combinación. Ya fueron empleados para la síntesis de prótesis de tendones pero su aplicación para la fabricación de cartílago artificial se realiza por primera vez en este estudio [33,36].

4.3 Proceso de síntesis

Tal y como se ha indicado, el material de trabajo en este estudio se ha fabricado mediante una técnica conocida como IPN. Se trata de un complejo proceso secuencial en el que en una primera fase se crea la red de PEA y posteriormente se introduce el PHEA, creando así una segunda red en el seno de la primera quedando ambas interpenetradas. Siguiendo este método, diferentes series de redes poliméricas interpenetradas a base de compuestos hidrofóbicos (PEA) e hidrofílicos (PHEA) fueron sintetizadas de forma secuencial. El instrumental empleado en la síntesis del material se muestra en la Figura 16.

La primera red hidrofóbica de PEA fue sintetizada mediante la polimerización de monómero de EA con un 5% de trietilen-glicol-dimetacrilato (TEGDMA) como agente entrecruzador, un 0,5% de benzoina como agente fotoiniciador (relativo al peso del monómero) y diferentes cantidades de etanol como diluyente: 40, 50 y 60 % con respecto a la mezcla de solvente (Figura 14). El efecto del etanol durante la polimerización provoca su segregación dentro la red, quedando aislado y generando poros. La polimerización tuvo lugar entre dos placas de cristal a temperatura ambiente bajo radiación ultravioleta, con una longitud de onda de 300-460 nm y durante 24 horas (Figura 16a). Posteriormente, se realizó una post-polimerización a 90°C durante otras 24 horas. Aquellas partículas de bajo peso molecular procedentes de las redes porosas resultantes fueron eliminadas haciéndolas hervir en etanol durante 24 horas, este proceso fue repetido dos veces (Figura 16b). Por último, estas primeras redes fueron secadas en vacío a 40°C hasta alcanzar un peso constante (Figura 16c).

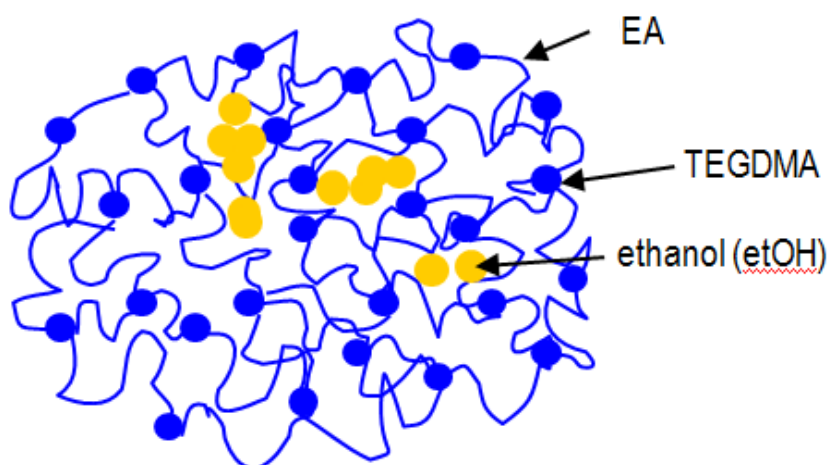


Figura 14. Elementos a partir de los cuales se sintetiza la primera red de PEA: monómero de EA, agente entrecruzador y fotoiniciador y etanol en diferentes proporciones.

Para crear la segunda red polimérica de PHEA, las redes secas de PEA fueron sumergidas hasta alcanzar el equilibrio en soluciones de monómero de HEA (con la misma cantidad de agente entrecruzador e iniciador que para la primera red) y un 40% de etanol con respecto a la mezcla de solvente (Figura 15). A continuación, la formación de la segunda red hidrofílica tuvo lugar de nuevo entre las dos placas de cristal a temperatura ambiente y bajo radiación ultravioleta durante 24 horas. Como en la primera red, una post-polimerización fue realizada a 90°C durante otras 24 horas. Nuevamente, las sustancias de bajo peso molecular fueron eliminadas hirviendo en etanol el material durante dos días (con renovación del etanol). Finalmente, las IPNs resultantes fueron secadas en vacío a 40°C hasta alcanzar un peso constante. Los porcentajes en peso de PHEA en las IPNs fueron determinados por pesada y se muestran en la Tabla 3.

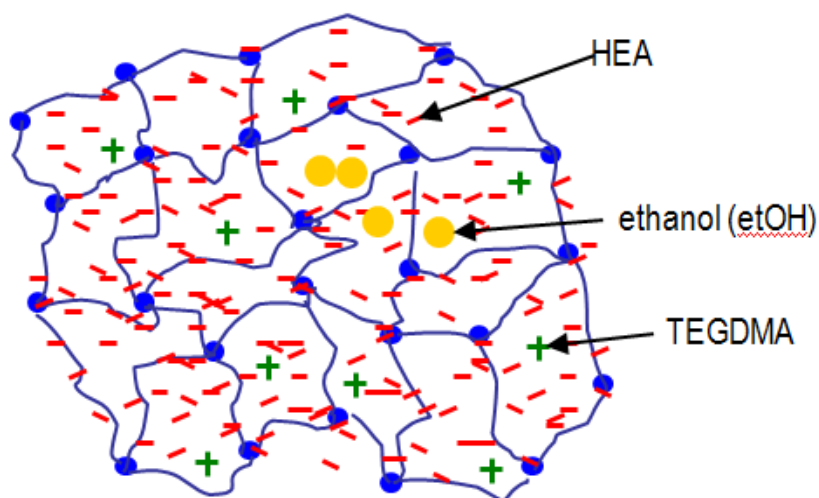
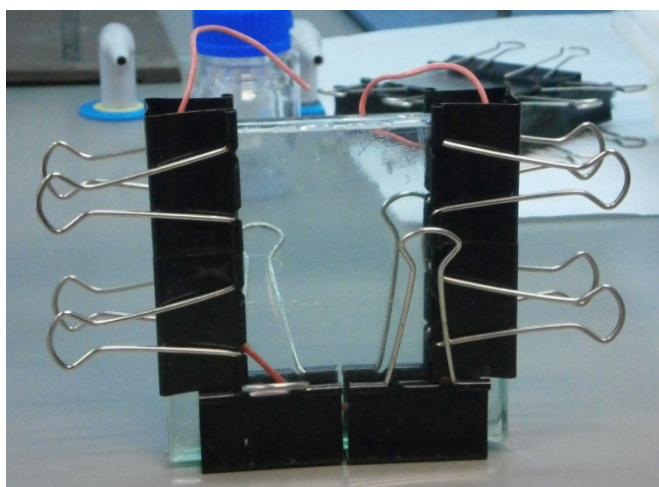
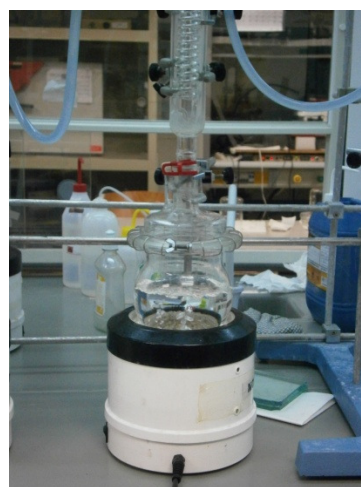


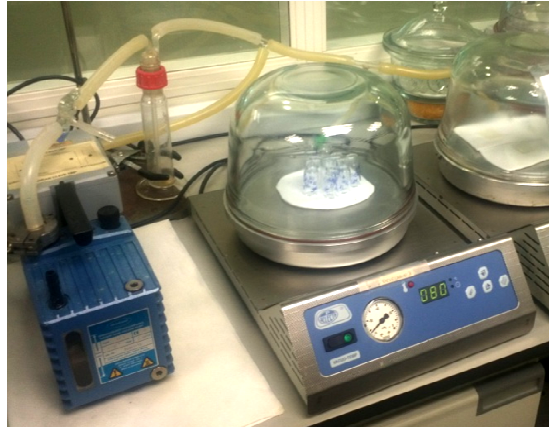
Figura 15. Elementos a partir de los cuales se sintetiza la segunda red de PHEA en el seno de la primera: monómero de HEA, agente entrecruzador y fotoiniciador y etanol.



(a)



(b)



(c)

Figura 16. Instrumental empleado para la síntesis del material. (a) Instrumental donde tiene lugar la polimerización. (b) Instrumental para hervir las muestras. (c) Dispositivo de secado de muestras.

El TEGDMA mencionado con anterioridad, se utiliza como agente entrecruzador a la hora de crear las redes poliméricas ya que abre los enlaces para facilitar la formación de uniones. Al aumentar la cantidad de TEGDMA, aumenta la cantidad de “nudos”, con lo que se obtendrá una red más entrecruzada. Sin embargo, para esta aplicación no es necesario que dicha cantidad sea muy elevada. El uso de trietilen-glicol-dimetacrilato en lugar de dietilen-glicol-dimetacrilato es debido a que el primero presenta una cadena más larga lo que proporciona una mayor flexibilidad a la red.

El hidrogel obtenido será entonces una combinación de PEA y PHEA, ya que el PHEA introducido posteriormente con la segunda red habrá rellenado los poros y los espacios libres existentes en la red de PEA. Estos poros se habían originado debido al etanol empleado durante la polimerización de la primera red. Resumiendo, se consigue crear una segunda red polimérica en el seno de la primera obteniendo así una red polimérica interpenetrada (Figura 17).

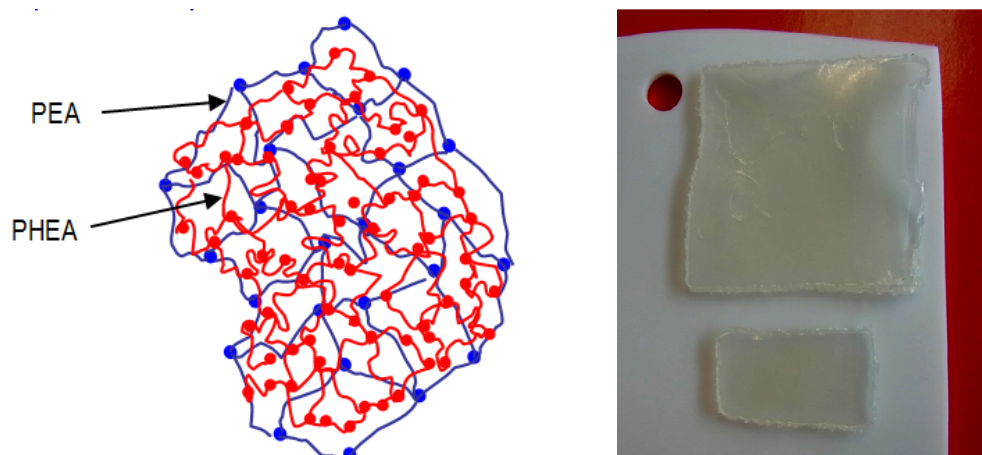


Figura 17. Estructura del material obtenido formado por las dos redes poliméricas interpenetradas y vista real del material sintetizado.

Para la síntesis de este nuevo material, también podría haberse pensado en un proceso más sencillo como es la copolimerización. Sin embargo, mediante este procedimiento se habría obtenido como resultado un material con dos fases separadas de PEA y PHEA, y no entremezcladas. Con el procedimiento empleado, obtenemos un continuo de ambas fases (PEA y PHEA) de manera que éstas quedan entrecruzadas, mejorando así las propiedades del material y consiguiendo un comportamiento más similar al del cartílago humano.

Influencia de la cantidad de etanol

El proceso de fabricación del material es complejo y delicado, ya que unos factores del mismo influyen en otros, por lo que hay que tener especial cuidado con las cantidades introducidas de cada componente, ya que éstas afectarán a las propiedades del material obtenido finalmente. Concretamente, el etanol empleado durante la fabricación de la primera red polimérica condiciona la cantidad de PHEA que podrá introducirse para formar la segunda red, y con todo ello, la porosidad del hidrogel y por ende sus propiedades mecánicas. A mayor cantidad de etanol, mayor porosidad en la primera red y mayor cantidad de PHEA en el material resultante (Tabla 3 y Figura 18).

Familia	etOH-red-I	etOH-red-II	%PHEA
PEA 60/40-64%PHEA	40%	40%	64%
PEA 50/50-71%PHEA	50%	40%	71%
PEA 40/60-79%PHEA	60%	40%	79%

Tabla 3. Porcentaje en peso de etanol en la polimerización de la primera red (etOH-red-I) y la segunda red polimérica (etOH-red-II) y porcentaje en peso de PHEA (%PHEA) en las redes poliméricas interpenetradas resultantes.

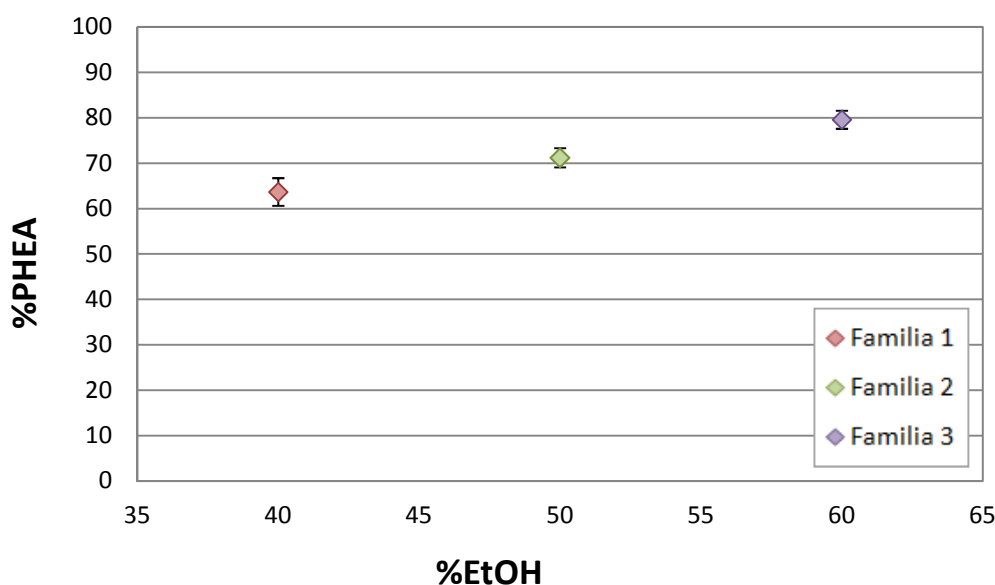


Figura 18. Relación entre el porcentaje en peso de etanol (%EtOH) empleado en la síntesis de cada familia y el porcentaje en peso de PHEA (%PHEA) resultante para cada una de ellas.

Tal y como se ha explicado, las familias de material de las que finalmente se dispone son las siguientes:

- Familia 1: PEA 60/40 – 64 % PHEA
- Familia 2: PEA 50/50 – 71 % PHEA
- Familia 3: PEA 40/60 – 79 % PHEA

La nomenclatura hace referencia a las cantidades de cada componente. Así para la familia 3: PEA 40/60 – 79 % PHEA. El 79 % corresponde a la parte de PHEA en peso que contiene el material, siendo el 21 % restante la parte de PEA. El 40/60 que se observa se corresponde con la composición de este 21% PEA restante, es decir, éste contiene: 40% de monómero de EA + TEGDMA + benzoina y 60% de etanol.

Capítulo 5

CARACTERIZACION MECANICA Y MICROESTRUCTURAL DEL MATERIAL

Las propiedades mecánicas describen las características intrínsecas de un material y dependen de su composición y de su estructura tanto a nivel macroscópico como microscópico. Medir las propiedades mecánicas del material, requiere del diseño y desarrollo de protocolos experimentales que involucren aquellas variables que inciden en el comportamiento del mismo, a partir de las cuales se determina un modelo teórico conocido como la relación constitutiva del material.

5.1 Caracterización mecánica

Una opción teórico-experimental es la de caracterizar la respuesta mecánica que experimenta un determinado material a partir de la relación entre la tensión σ y la deformación ϵ y entre la tensión y la velocidad de deformación. Estas medidas se correlacionan en curvas de tensión-deformación $\sigma - \epsilon$, en las que se describe el comportamiento de los materiales bajo diferentes condiciones de carga y velocidades de deformación. A partir de las curvas se obtienen las propiedades que los caracterizan mecánicamente, como el Módulo de Young (E_s), el Módulo Agregado (H_a), el coeficiente de Poisson (ν) y la permeabilidad (k). Para su obtención y dependiendo del problema a considerar, se establecen unos ensayos mecánicos determinados.

5.1.1 Ensayos de compresión uniaxial monotónica

En este estudio, por simplicidad, se supone que el material es homogéneo e isótropo sin variaciones de las propiedades mecánicas a través de la profundidad del material. Se supone que no existe flujo de fluido fuera del material en estado de equilibrio, y se introduce un modelo bifásico que tiene en cuenta una fase sólida elástica y una fase líquida incompresible. Para estos ensayos se considera una compresión uniaxial monotónica, es decir, la carga se va aplicando de una forma lineal y uniforme. Por medio de estos ensayos podemos obtener parámetros como E_s , H_a y ν .

Los métodos experimentales implementados con mayor frecuencia para caracterizar las propiedades mecánicas de los hidrogeles son ensayos como la compresión no confinada (NC) y la compresión confinada (CC). Las principales diferencias entre los ensayos NC y CC se deben a las diferentes restricciones de movimiento que impone cada uno de ellos (Figura 19 y 21).

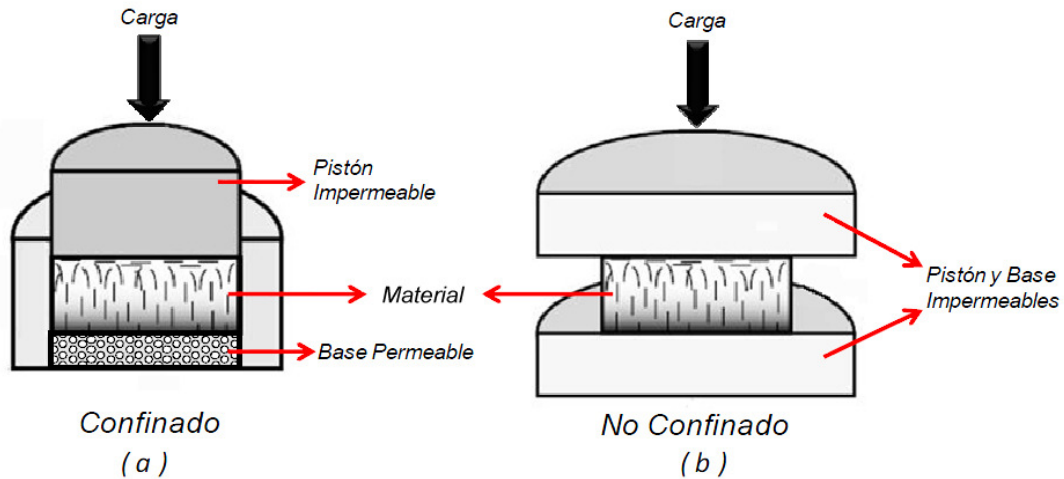


Figura 19. Configuraciones y restricciones de movimiento para los ensayos de compresión uniaxial aplicados a la caracterización del material. (a) Ensayo confinado y (b) Ensayo no confinado [37].

En un ensayo de compresión confinada se impide la deformación lateral del material al ubicar la muestra en un habitáculo cilíndrico rígido e impermeable. La deformación solo se produce en la dirección axial, por lo que las dimensiones de la muestra solo cambian con respecto al espesor. La pared interna de la cámara ejerce una fuerza de compresión sobre la superficie lateral del material aumentando su rigidez. Adicionalmente, se debe tener en cuenta el comportamiento y limitaciones que presenta el flujo interno si se considera que el ensayo experimental se realiza en estado de inmersión. Para un ensayo CC el flujo del fluido se ve forzado a salir por la superficie inferior del material, hacia un filtro permeable y lo suficientemente rígido para servir de soporte al material (Figura 19a y 20). Es decir, las condiciones de contorno se plantean de la siguiente manera: una base de superficie permeable ($z=0$) donde el desplazamiento es 0 y el flujo del fluido $\neq 0$ y una superficie opuesta ($z=h$) compuesta por un utillaje de superficie impermeable que aplica la deformación sobre la muestra. Este tipo de ensayo nos permite obtener el Módulo Agregado del material.



Figura 20. Vista de la muestra de material en el interior del utillaje empleado en un ensayo de compresión confinada.

Para el caso de compresión no confinada se miden un conjunto distinto de propiedades, ya que bajo una compresión uniaxial, al material se le permite generar una deformación lateral a medida que la carga o el desplazamiento van siendo impuestos. El material tiene la posibilidad de acomodarse progresivamente, otorgando la rigidez de la estructura, hasta que la arquitectura colapse finalmente. En un ensayo NC el flujo del fluido puede moverse libremente por las paredes laterales del andamio a medida que la carga va siendo impuesta. Al final del ensayo se obtendrá una matriz con mayores dimensiones con respecto al diámetro inicial y menor con relación al espesor. En este tipo de ensayo el espécimen se ubica entre una base y un plato impermeables. Se supone que la fricción entre el andamio y el utillaje es despreciable (Figura 19b). Este tipo de ensayo nos permite obtener el Módulo de Young del material.

5.1.2 Ensayos de compresión de carga-relajación

Este tipo de ensayos se basan en el mismo principio que el explicado para los ensayos de compresión confinada monotónica y bajo los mismos supuestos para el material. La diferencia radica en que el tipo de carga aplicada en este caso es una rampa de carga-relajación. Por medio de estos ensayos podemos estudiar el comportamiento del fluido en el interior del material, ya que nos permiten obtener valores de permeabilidad.

En un ensayo CC con una rampa de carga-relajación se puede medir la fuerza de reacción en función del tiempo requerido para alcanzar el equilibrio en cada ciclo de relajación. La Ecuación 1 es una función exponencial del tiempo donde F es la fuerza aplicada, F_{inf} es la fuerza a máxima relajación ($t=\infty$) y se supone que es igual a cero, F_0 es la fuerza a máxima tensión ($t=0$) y $\tau' \neq 0$.

$$F(t) = F_{inf} + F_0 e^{\left(\frac{-t}{\tau'}\right)} \quad (1)$$

Por lo tanto se utiliza un ajuste exponencial por mínimos cuadrados en cada curva de relajación para obtener el tiempo de relajación τ' . Este tiempo, junto con el espesor h de la muestra y el Módulo Agregado determinado sobre el mismo ensayo, permite determinar usando la Ecuación 2 el promedio de las permeabilidades del material a diferentes niveles de deformación, k_z . Por tanto, basándonos en las hipótesis de partida, la respuesta del ensayo de CC queda definida por las constantes H_a y k_z .

$$\tau' = \frac{h^2}{\pi^2 H_a k_z} \quad (2)$$

5.1.3 Método experimental

A la hora de caracterizar mecánicamente un andamio es importante tener como punto de partida la aplicación que él mismo va a desarrollar. Considerando que este estudio está centrado en el diseño de andamios aplicados en la Ingeniería de Tejidos y enfocados en el tratamiento de patologías asociadas a la degeneración del cartílago articular, éste debe ser lo suficientemente resistente para soportar y redistribuir las cargas aplicadas manteniendo un entorno mecánico adecuado. La resistencia del andamio y su rango de recuperación deben estar dentro del rango elástico de la estructura. Por tanto, el protocolo experimental para el estudio de un material destinado a desempeñar funciones de andamio estructural debe

considerar las variables que permitan aproximar, de la mejor manera, las condiciones fisiológicas y mecánicas del tejido que va a reemplazar.

Herramientas y utillajes para los ensayos

Los ensayos se realizaron en una máquina Instron MicroTester 5548 con una célula de carga de 50 N. La precisión del equipo es 0,0001 N en fuerza y de 0,001 mm en posición (Figura 22a). Tanto para la ejecución de los ensayos de compresión monotónica como los de carga-relajación se hizo uso del utillaje disponible, fabricado en acero inoxidable y que asegura la correcta realización de las diferentes configuraciones y restricciones de movimiento (Figura 21 y Anexo II).

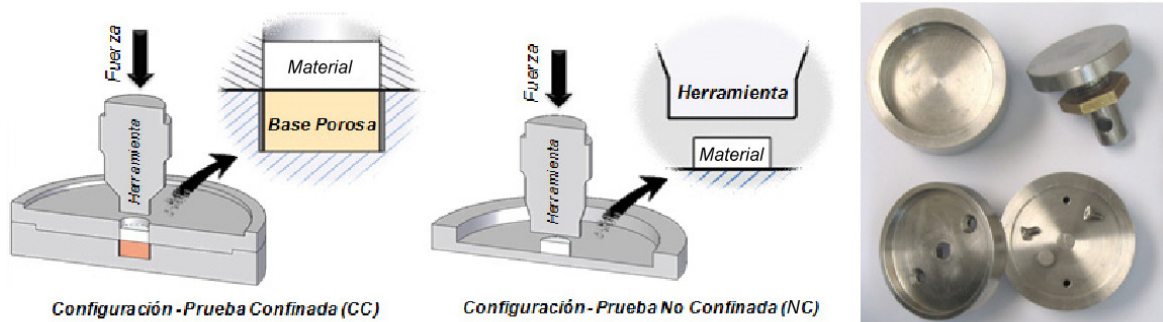


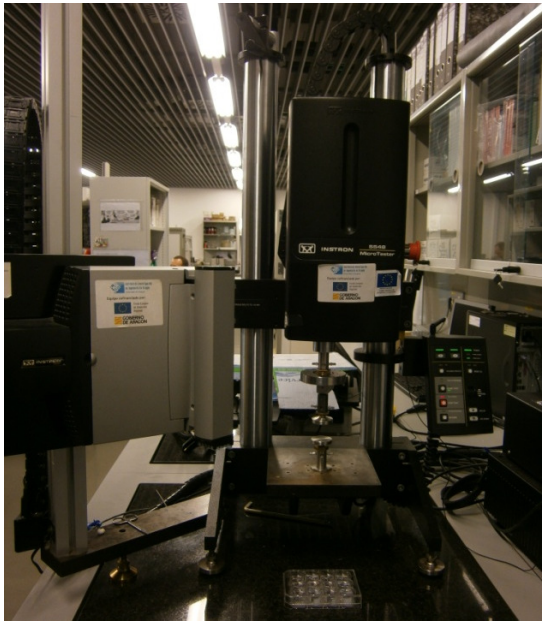
Figura 21. Configuraciones para las pruebas confinadas y no confinadas y utillaje real utilizado en la caracterización del material.

Preparación de las muestras

Antes de la realización de cualquiera de los ensayos de compresión monotónica o de carga-relajación, se llevó a cabo una preparación previa de las muestras que iban a ser ensayadas. Este proceso se realizó sobre todas las muestras y consistía en:

1. Troquelado de las muestras mediante un sacabocados con un diámetro de 6 mm.
2. Medida del diámetro y espesor de las muestras con un calibre digital.
3. Pesado de las muestras mediante una balanza digital.
4. Secado de las muestras en una estufa a 80°C en condiciones de vacío durante 24 horas para eliminar el agua presente en las mismas (Figura 22b) [38].
5. Medida del diámetro, espesor y peso de las muestras para comprobar los cambios sufridos tras el proceso de secado.
6. Hidratación de las muestras mediante inmersión durante 24 horas en solución Tampón Fosfato Salino o "Phosphate Buffered Saline" (PBS). Durante este periodo, y hasta la realización de los ensayos, las muestras permanecieron almacenadas a una temperatura de 37°C.
7. Medida del diámetro y espesor de las muestras con un calibre digital para comprobar el hinchamiento sufrido tras el proceso de hidratación.
8. Pesado de las muestras mediante una balanza digital para comprobar la cantidad de líquido absorbido por las muestras.
9. Aquellas muestras sobre las que se iban a realizar ensayos de compresión confinada fueron nuevamente troqueladas hasta un diámetro de 6 mm. Esto se debe a que tras el proceso de hidratación las muestras experimentan cambios dimensionales y no pueden ser introducidas directamente en el utillaje. Las muestras troqueladas fueron pesadas de nuevo antes de la realización del ensayo.

Tras este conjunto de pasos, las muestras ya están preparadas para la realización de los ensayos de compresión, tanto confinados como no confinados. En total, hubo que preparar 33 muestras de material de las 3 familias disponibles.



(a)



(b)

Figura 22. (a) Máquina Instron MicroTester 5548 empleada en los diferentes ensayos. (b) Estufa utilizada para calentar en vacío las muestras y eliminar el agua contenida en su interior.

Condiciones de precontacto

Para evitar la no linealidad entre la superficie de las muestras y el utillaje, se precisa realizar un precontacto con el objetivo de generar un óptimo acercamiento y un punto inicial de referencia antes de ejecutar el protocolo experimental. Para ello, se realizó una precarga sin toma de datos hasta alcanzar los 0,01 N.

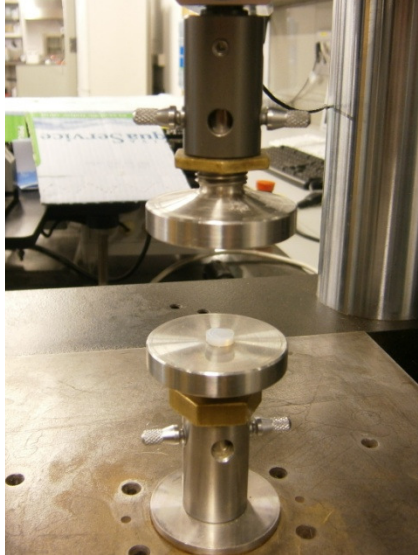
Ensayos de compresión uniaxial monótonica

Tanto para ensayos bajo condiciones de compresión confinada como no confinada, el protocolo de compresión uniaxial monótonica consiste en generar una deformación constante hasta llegar al límite impuesto por la una célula de carga de 50 N. La única diferencia entre ensayos NC y CC radica en el utillaje empleado y las restricciones de movimiento que este impone, sin embargo, la ejecución del ensayo como tal, así como los parámetros de operación introducidos en la máquina son idénticos (Figura 23).

Los ensayos se programan a una velocidad de 1 mm/min en la máquina Instron MicroTester 5548. Aunque la maquina cuenta con una célula de carga de 50 N, se establece el límite del ensayo en 49 N. De esta forma se evita una posible distorsión de los datos al alcanzar el límite de la célula de carga. Una vez que la máquina está preparada para su puesta en funcionamiento, todavía es necesario realizar algunos ajustes antes de iniciar el ensayo:

1. Ajuste a cero de la extensión entre platos aproximándolos hasta su contacto en NC. Para el caso CC este ajuste a cero se realiza aproximando el plato superior al bulón hasta que este hace contacto con el filtro permeable situado en el plato inferior.

2. Introducción de la muestra en el utillaje (CC o NC) y aproximación de los platos hasta alcanzar el espesor de la muestra en NC o el bulón del utillaje en CC. De esta forma aseguramos en ensayos CC que el bulón está alineado con el plato y el soporte.
3. Balanceo de la carga para ponerla a cero.
4. Inicio del ensayo.



(a)



(b)

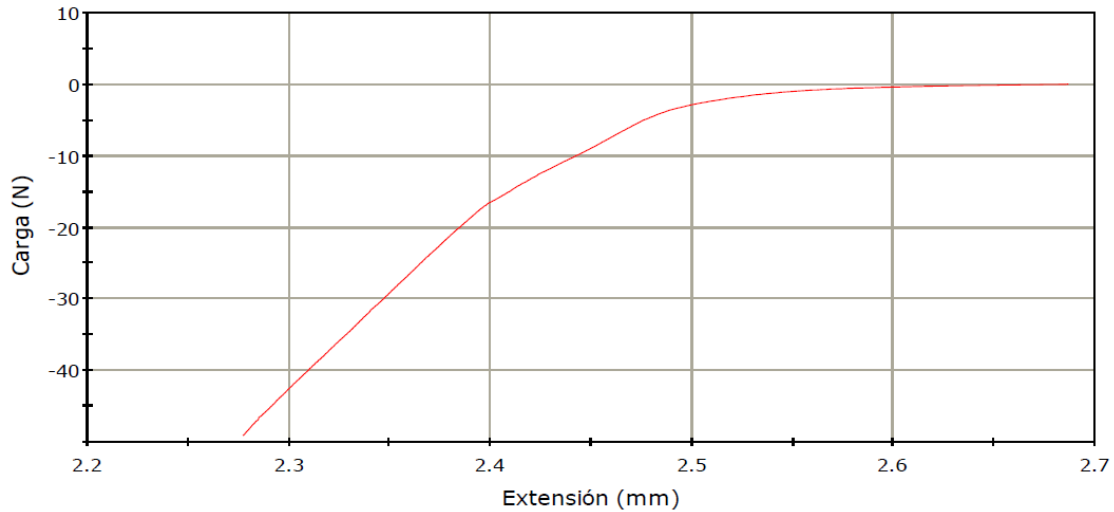
Figura 23. Vista de los ensayos de compresión uniaxial monotónica. (a) Ensayo no confinado y (b) Ensayo Confinado.

Se realizaron un total de 24 ensayos destructivos, siempre sobre probetas distintas de las diferentes familias de material. Con estos ensayos destructivos se abarca todo el rango de comportamiento del material, permitiendo obtener información para futuros estudios como el Módulo Tangente o el Módulo Secante. El número de ensayos realizados para cada familia fue el siguiente:

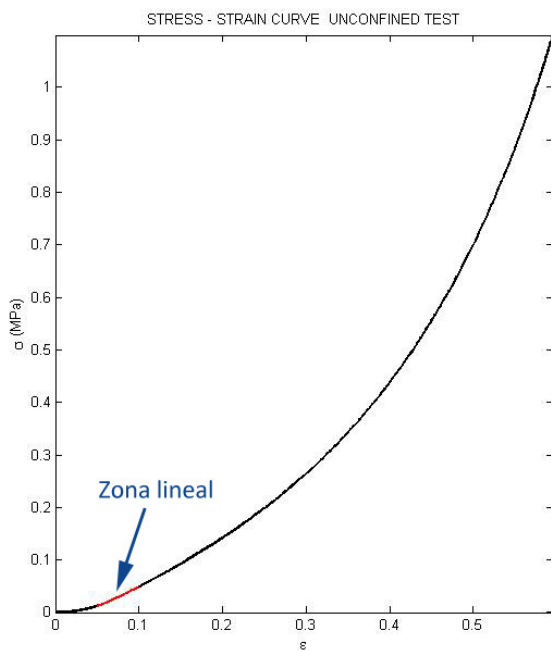
- Familia 1: 3 ensayos NC y 3 ensayos CC
- Familia 2: 6 ensayos NC y 6 ensayos CC
- Familia 3: 3 ensayos NC y 3 ensayos CC

Cada ensayo tiene una duración aproximada de dos minutos en el caso NC y de aproximadamente un minuto en CC y ambos finalizan cuando la máquina alcanza el límite establecido de 49 N.

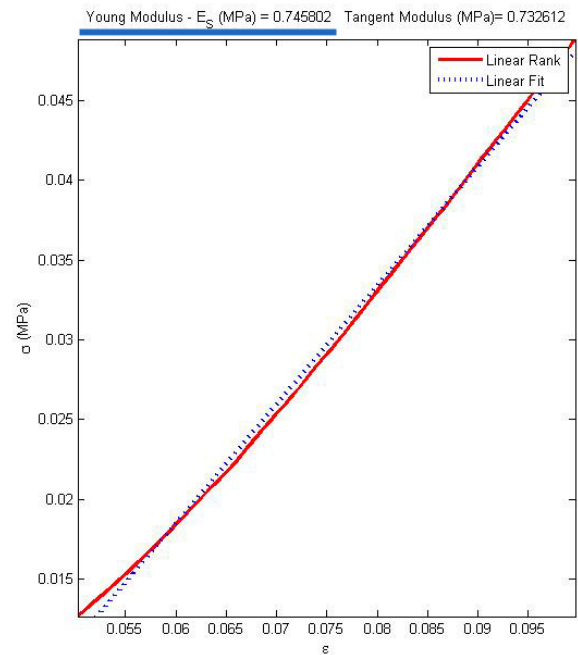
Independientemente del tipo de ensayo realizado, se determina la curva tensión-deformación procesando los datos experimentales (Figura 24a) con un ejecutable hecho en MatLab® (ver Anexo III). El comportamiento elástico del andamio se estima sobre la primera zona de la curva. Se selecciona el rango con mayor aproximación lineal una vez logrado el contacto entre la muestra y el utillaje (Figura 24b y 25a) y, para cada caso, las propiedades mecánicas E_s y H_a de la matriz con el fluido se determinan a partir de un ajuste lineal por mínimos cuadrados (Figura 24c y 25b).



(a)



(b)



(c)

Figura 24. (a) Curva de datos registrada por la máquina durante el ensayo, (b) Curva típica de tensión vs. deformación obtenida después de un ensayo de compresión uniaxial monótonica en condiciones de no confinamiento y selección del rango lineal y (c) Ajuste lineal por mínimos cuadrados para el cálculo del Módulo de Young.

Es importante aclarar que de cada uno de los experimentos realizados se obtiene un Módulo Emedido y debido a las restricciones de movimiento ejercidas por los utillajes utilizados este Módulo tiene connotaciones diferentes. Así, para un ensayo NC el Emedido=Es y en un ensayo CC el Emedido=Ha. Un ejemplo de tratamiento de datos para un ensayo NC y CC se muestra en las Figuras 24 y 25 respectivamente.

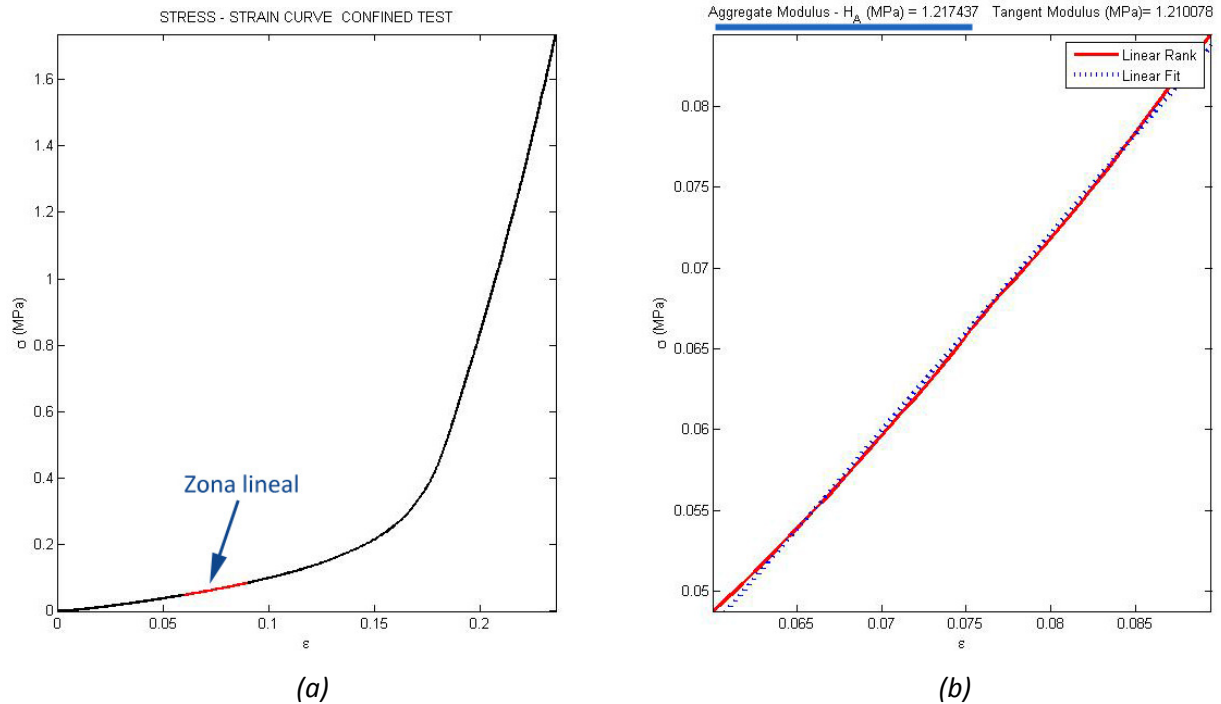


Figura 25. (a) Curva típica de tensión vs. deformación obtenida después de un ensayo de compresión uniaxial monótonica en condiciones de confinamiento y selección del rango lineal y (b) Ajuste lineal por mínimos cuadrados para el cálculo del Módulo Agregado.

El coeficiente de Poisson se obtiene mediante la combinación de E_s y H_a para cada muestra por medio de la Ecuación 3:

$$H_a = E(1 - \nu) / [(1 + \nu)(1 - 2\nu)] \quad (3)$$

Finalmente, para los diferentes tipos de ensayos se obtienen sus respectivos resultados y promedios, las desviaciones estándares como medida de dispersión de la media de distancias que tienen los datos respecto de su media aritmética, y los errores típicos que determinan la inexactitud en el pronóstico del valor experimental. Los resultados se presentan como la media \pm el error típico.

Ensayos de compresión de carga-relajación

El protocolo experimental que se va emplear en este tipo ensayos de compresión es una rampa de carga-relajación bajo condiciones de confinamiento. Estos ensayos consisten en aplicar una rampa realizando n cargas controladas por desplazamiento (extensión) y separadas por una relajación de 15 minutos entre ellas. En el protocolo implementado la rampa consta de 7 cargas con sus respectivas relajaciones (Figura 26).

Se realizaron un total de 9 ensayos destructivos siempre sobre probetas distintas con las diferentes familias de material.

- Familia 1: 3 ensayos CC
- Familia 2: 3 ensayos CC
- Familia 3: 3 ensayos CC

Los ensayos se programan a una velocidad de 0,001 mm/s en la máquina Instron MicroTester 5548. Aunque la máquina cuenta con una célula de carga de 50 N, se establece el límite del ensayo en 49 N. De esta forma se evita una posible distorsión de los datos al alcanzar el límite de la célula de carga. Una vez que la máquina está preparada para su puesta en funcionamiento, todavía es necesario tener en cuenta ciertas consideraciones a la hora de realizar los ensayos:

- **Pre-contacto:** Tras introducir en la máquina el diámetro y espesor de la muestra, se procede a realizar una rampa inicial de extensión igual al 5% del espesor de la muestra con el objetivo de estabilizar la muestra. A continuación se realizan las 6 rampas restantes con una extensión de 0,09 mm cada una (Figura 26).
- **Entorno:** Durante la ejecución de la prueba de carga-relajación, la muestra permanece inmersa en PBS para simular de manera más realista el comportamiento fisiológico.

Cada ensayo tiene una duración aproximada de dos horas y finalizan cuando se completa la rampa de carga-relajación o si por algún motivo la máquina alcanza el límite establecido de 49 N.

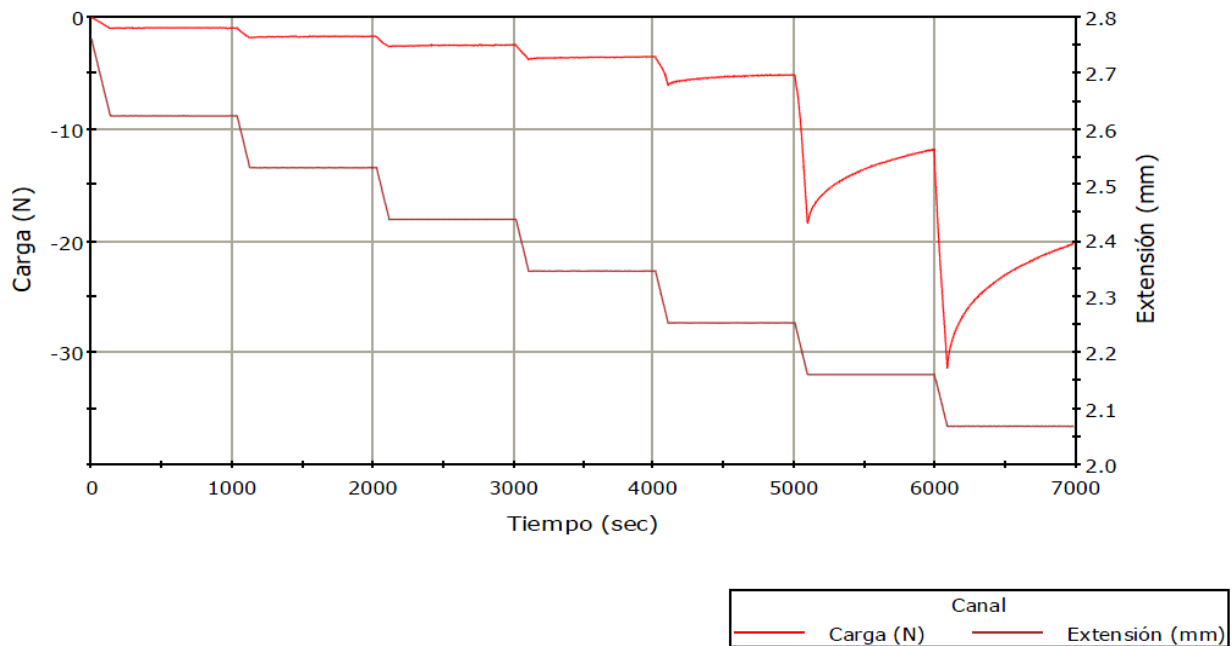


Figura 26. Ejemplo de rampa de carga-relajación implementada en los ensayos. En ella se observan las 7 rampas controladas por extensión y los valores de carga obtenidos para cada una de ellas.

Los resultados experimentales arrojados en cada ensayo se analizan mediante la implementación de un ejecutable desarrollado en MatLab® (ver Anexo IV). A partir del mismo se genera la curva de tensión-deformación $\sigma - \epsilon$ en equilibrio y dentro del rango elástico lineal del material. En la curva se identifican los siete puntos de máxima relajación de la rampa impuesta, y sobre los mismos se realiza un ajuste lineal por mínimos cuadrados para finalmente determinar el valor del Modulo Agregado del material (Figura 27).

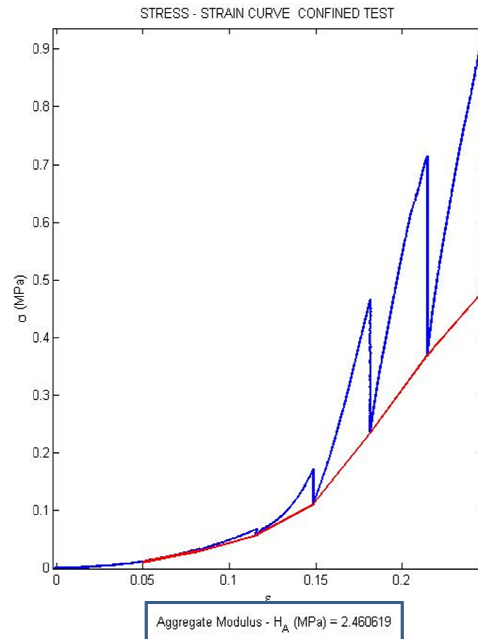


Figura 27. Curva típica obtenida después de un ensayo de compresión uniaxial confinado con un protocolo de carga-relajación y definición del ajuste lineal por mínimos cuadrados sobre los siete puntos de máxima relajación (línea roja).

Adicionalmente, en el ensayo CC se miden la fuerza de reacción y el tiempo que tarda en alcanzar el equilibrio cada uno de los siete ciclos de relajación en la rampa impuesta (Figura 28a). Con estos datos experimentales, con el Módulo Agregado determinado en cada ensayo y mediante de un ejecutable de MatLab® (ver Anexo V), se obtiene la permeabilidad del material. Un ejemplo del tratamiento de datos realizado se presenta en la Figura 28b.

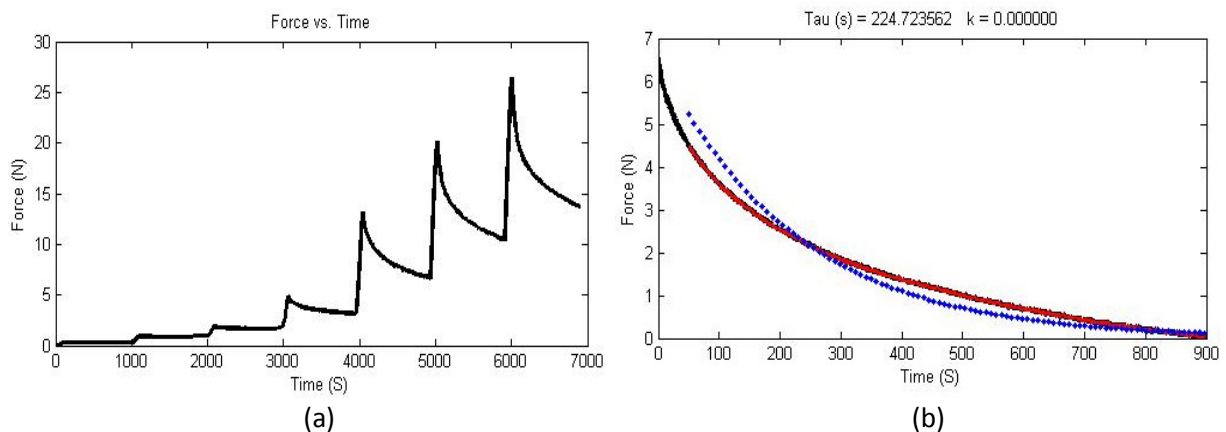


Figura 28. Ejemplo de tratamiento de datos en un ensayo de compresión uniaxial confinado con un protocolo de carga-relajación. (a) Curva típica de fuerza vs. tiempo para una rampa de carga-relajación y (b) Selección y ajuste exponencial para el cálculo de la permeabilidad a partir de una curva de relajación.

Finalmente se obtienen los respectivos promedios, las desviaciones estándares y los errores típicos. Los resultados se presentan con la media \pm el error típico.

5.1.4 Ensayo de fatiga

La fatiga ha sido identificada como uno de los principales problemas asociados con los fallos en los implantes de diferentes dispositivos médicos. Es por ello que los ensayos de fatiga constituyen un método decisivo para determinar el comportamiento de los materiales bajo cargas fluctuantes y poder predecir su actuación a largo plazo [39].

Para este proyecto se desarrollaron ensayos de fatiga para cada una de las familias de material. Estos ensayos se realizaron simultáneamente y prestando especial atención en todo momento a la esterilidad de las muestras, tanto durante su preparación como durante la ejecución del ensayo, ya que se realizaron simulando las condiciones fisiológicas del tejido de interés.

Preparación de las muestras

Cada una de las muestras ensayadas fue previamente preparada para el ensayo siguiendo las indicaciones descritas a continuación:

1. Troquelado de las muestras mediante un sacabocados con un diámetro de 6 mm.
2. Esterilizado de las muestras en alcohol al 70%, introducción de las mismas en la campana de flujo laminar (TELSTAR BIO IIA) y exposición a luz ultravioleta durante 12h.
3. Esterilización en una autoclave de todos los componentes del ensayo (tornillos, tubos, tapa, etc.) antes de ser introducidos en la campana de flujo laminar.
4. Montaje del instrumental dentro de la campana de flujo laminar para asegurar la esterilidad del proceso (Figura 29). Tanta atención se presta a la limpieza de los componentes que, por ejemplo, las válvulas de paso son introducidas previamente en isopropanol y luego bañadas en PBS.
5. Adición de antibióticos y antifúngicos en el PBS que se empleará durante el ensayo para evitar la formación de hongos que puedan afectar al correcto desarrollo del mismo.

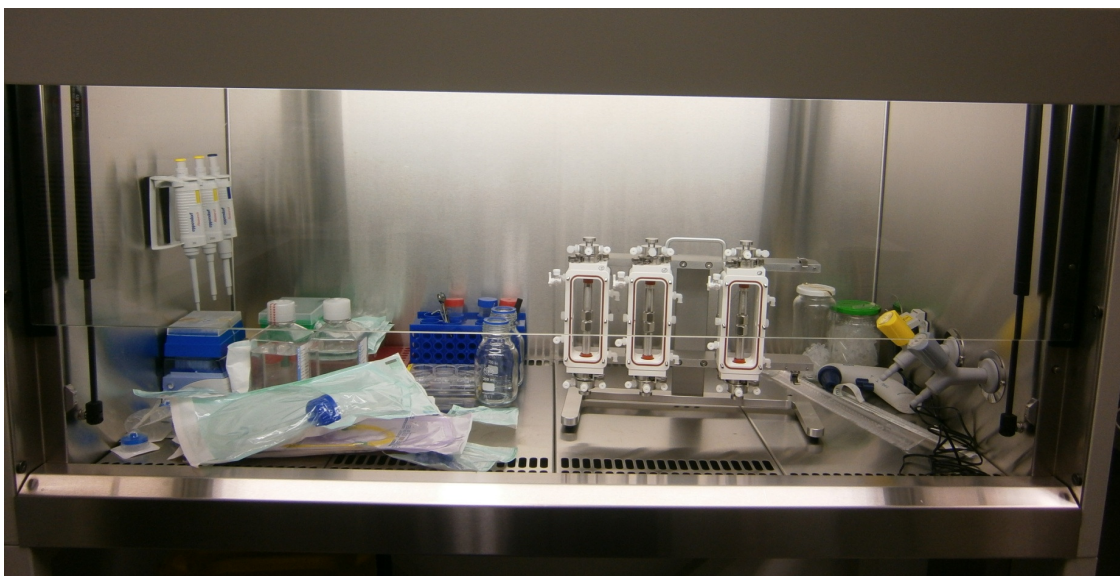


Figura 29. Campana de flujo laminar con todos los componentes del ensayo en su interior ya esterilizados y preparados para el montaje del instrumental.

Herramientas y utillajes para los ensayos

Los ensayos se realizaron en una máquina BOSE ElectroForce 5210 BioDynamic con capacidad para 4 cámaras de ensayo en las que aplicar una fuerza de hasta 200 N o un desplazamiento del $\pm 6,35$ mm. Además, cada cámara dispone de un motor para generar el movimiento y de una célula de carga para registrar la reacción de cada espécimen (Figura 30a) [40].

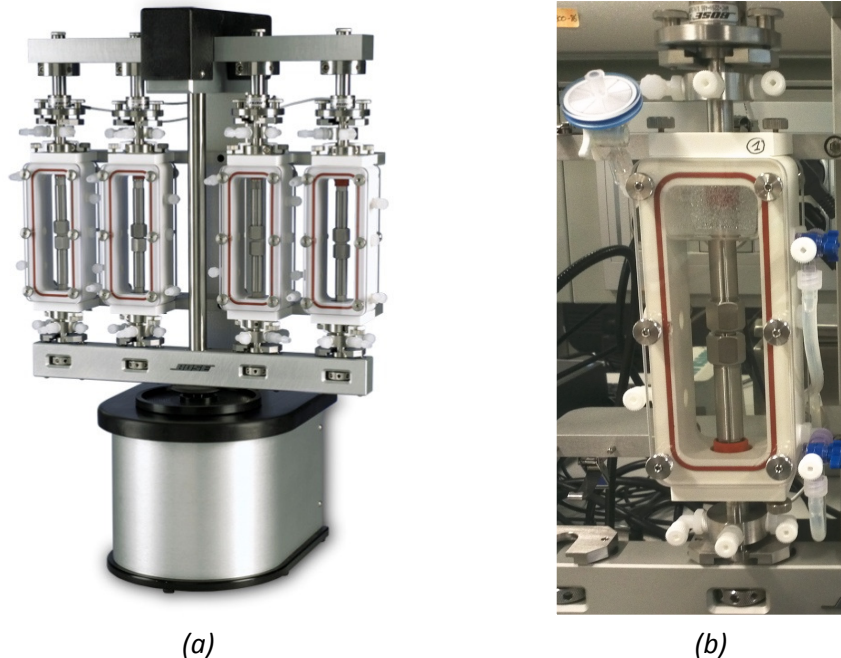


Figura 30. (a) Dispositivo BOSE ElectroForce 5210 BioDynamic empleado para los ensayos de fatiga [40] y (b) Vista de una de las cámaras de ensayo donde se sitúan las muestras.

El montaje de toda la instalación necesaria para el ensayo se llevó a cabo tal y como se describe a continuación (Figura 31). Hay que señalar que tan solo fue necesario preparar 3 cámaras de ensayo, una para cada familia de material (Figura 30b).

1. Colocación de la muestra de material en el interior del utillaje de la cámara. Concretamente sobre un disco de titanio dispuesto en el émbolo inferior. Este disco es necesario para asegurar el contacto entre la muestra y el émbolo superior ya que cada émbolo presenta una oquedad de 1 mm y la muestra es de tan solo 2 mm de espesor. El contacto con la muestra es ajustado por medio de un tornillo, de esta forma la muestra permanece fija en la posición de ensayo.
2. Llenado de las cámaras con las muestras en su interior con PBS, el cual ya contiene los aditivos antibióticos y antifúngicos. Cierre de las cámaras con unas tapas sujetas mediante tornillos y provistas de una junta tórica que asegura un ajuste hermético.
3. Preparación de los depósitos para la circulación del PBS y conexión de los tubos que conforman el sistema de circulación entre las cámaras de ensayo, la bomba y estos depósitos.
4. Introducción de los depósitos en un baño caliente para mantener el PBS a 37°C, un ambiente fisiológicamente similar al del interior del cuerpo humano.
5. Sujeción de las cámaras al dispositivo del ensayo de fatiga y conexión de éste al ordenador que registra los datos.
6. Puesta a cero de las células de carga de la máquina y ajuste del precontacto de las muestras hasta alcanzar los 0,3 N. Esto se realiza para evitar la no linealidad entre la

superficie de las muestras y el utillaje, asegurando así un óptimo acercamiento y un punto inicial de referencia antes de ejecutar el protocolo experimental.

7. Inicio del ensayo durante 7 días lo que equivale aproximadamente a 300.000 ciclos. Los parámetros de entrada consisten en una onda sinusoidal de frecuencia 0,5 Hz y amplitud del 10% del espesor de la muestra.

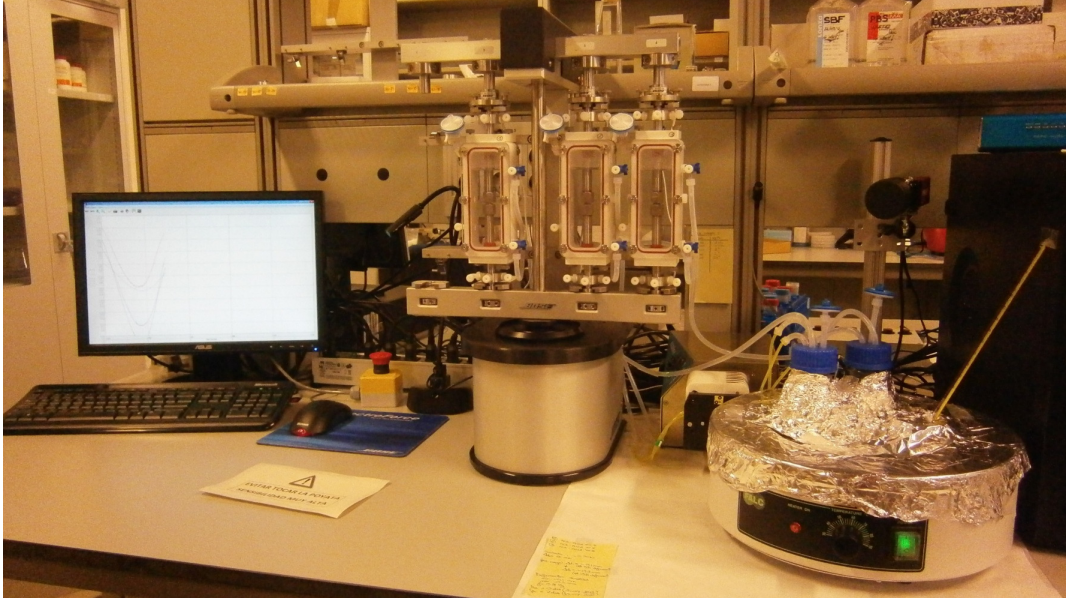


Figura 31. Vista general del montaje utilizado en los ensayos de fatiga con la maquina empleada, los depósitos, el baño de agua caliente y el ordenador para la toma de datos.

Se realizaron un total de 11 tomas de datos, una cada 30.000 ciclos y recogidas a la misma hora del día. Cada fichero cuenta de 100 registros en los que se incluyen datos como el tiempo, el número de ciclos o la respuesta en Newtons de cada célula de carga ante las condiciones impuestas. Las células de carga del dispositivo del ensayo registran los valores de carga para cada una de las 3 muestras a lo largo del tiempo de ensayo para una extensión determinada. Cabe destacar que durante los últimos días de ensayo se añadió al PBS un nuevo aditivo antibacteriano para asegurar la esterilidad del ensayo. Se trata del producto “Aquaclean – Microbiocidal additive for water baths for use in research laboratories – WAK Chemie Medical GmbH”.

5.2 Caracterización micro-estructural

5.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El desarrollo de las técnicas de microscopía electrónica ha permitido que, en la actualidad, hayan llegado a ser herramientas indispensables para la investigación en numerosos y diversos campos de la ciencia como la biología, el desarrollo de nuevos materiales, medicina, arqueología, etc [41].

El fundamento de funcionamiento de este conjunto de técnicas es la interacción de los electrones con la materia y la obtención de información tanto estructural como de caracterización de defectos. En muchos sentidos, el microscopio electrónico ofrece una solución ideal a los problemas que presentan los microscopios ópticos que no pueden obtener resolución atómica ya que la longitud de onda de la radiación incidente es demasiado grande. En cambio, la microscopía electrónica permite establecer una relación entre la composición y la micro-estructura del material [42].

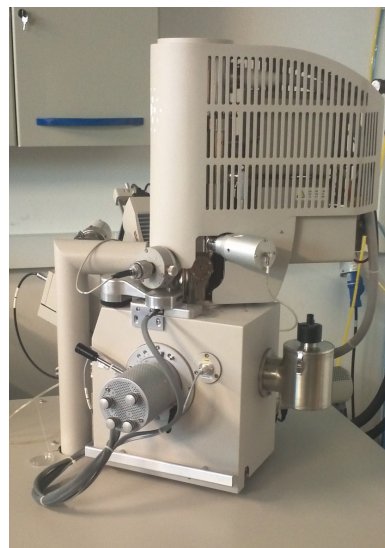
El Laboratorio de Microscopía Avanzada del Instituto de Nanociencias de la Universidad de Zaragoza dispone de un equipamiento completo compuesto por varios microscopios electrónicos de barrido. Además, la sección cuenta con una plantilla de personal cualificado que aporta apoyo técnico a los usuarios ofreciendo una gran variedad de prestaciones al servicio de la comunidad científica.

Para este proyecto, se realizaron observaciones para cada una de las familias del nuevo material haciendo uso, en un primer momento, de 2 microscopios electrónicos de barrido (SEM) diferentes (Figura 32) y empleando varias técnicas de preparación de muestras:

- ESEM Quanta 250 FEG – Se trata de un SEM ambiental que trabaja a bajo vacío y en una atmosfera saturada de agua. Permite obtener imágenes de alta resolución de muestras conductoras o no conductoras, lo que reduce el tiempo de preparación de las mismas. Además, permite el estudio de muestras hidratadas y en un amplio rango de temperaturas [43]. Este fue el SEM con el que primero se trabajó ya que ofrece unas condiciones idóneas para la observación de hidrogeles y materiales con alto contenido en agua (Figura 32b).
- SEM Inspect F50 – Se trata de un SEM que trabaja a alto vacío y que permite obtener imágenes de alta resolución. Este microscopio requiere que las muestras a observar sean conductoras de la electricidad (Figura 32a) [43].



(a)



(b)

Figura 32. Vista de los microscopios electrónicos de barrido empleados en la caracterización micro-estructural del material. (a) SEM Inspect F50 y (b) ESEM Quanta 250 FEG.

Para el SEM ambiental las muestras fueron cortadas para su observación directamente mediante un bisturí. En el caso del SEM Inspect F50 fue necesario realizar un tratamiento posterior para asegurar la conductividad de las muestras, éste consistió en la pulverización catódica o “sputtering” de oro tal y como se describe a continuación (Figura 33a) [44]:

- Sujeción de las muestras en el porta-muestras e introducción en la máquina para su recubrimiento con oro.
- Bombardeo de la placa de oro presente en la máquina con iones argón procedentes de un plasma generado en la máquina.
- Depositado de los átomos de oro pulverizados generando una fina capa de oro (10-15 nm) sobre las muestras para conseguir la conductividad necesaria para su observación en el microscopio.

A la vista de los primeros resultados, se procedió a repetir el proceso realizando en esta ocasión el corte de las muestras mediante crio-fractura en nitrógeno líquido. Esta técnica de preparación de muestras genera una mejor superficie de corte, por lo que es de esperar una mejor visualización de la micro-estructura interna del material. La preparación de la crio-fractura siguió los siguientes pasos:

- Hidratado de las muestras durante 48 horas.
- Inmersión de las muestras en nitrógeno líquido.
- Fractura de las muestras para obtener un corte limpio.
- Introducción de las muestras cortadas durante 12 horas en un liofilizador a temperatura ambiente para retirar el agua presente en las muestras (Figura 33b).



(a)



(b)

Figura 33. (a) Proceso de pulverización catódica de oro sobre las muestras y (b) Liofilizador utilizado para eliminar el agua presente en las muestras.

Las muestras cortadas fueron observadas de nuevo en el ESEM Quanta 250 FEG y en el SEM Inspect F50, tras haber sido recubiertas de oro para este último.

Finalmente se recurrió a otro de los microscopios disponibles, el SEM Dual Beam Nova Nanolab 200 (Figura 34). La principal ventaja de este instrumento es que, a pesar aplicar condiciones de alto vacío, la estructura del material se mantiene inalterada ya que se trabaja a

temperaturas próximas a los -140°C , por lo que la muestra hidratada permanece congelada [43]. El único inconveniente es la posible expansión del líquido en el interior de las muestras debido al proceso de congelación. La preparación de las muestras para este caso requirió de un proceso totalmente diferente a los descritos hasta ahora.

- Hidratado de la muestra durante 24 horas.
- Corte y pegado de la muestra en el porta-muestras mediante resina a base de carbono.
- Introducción del porta-muestras en un reservorio con nitrógeno líquido a -220°C .
- Transporte en vacío del porta-muestras al interior de la precámara del microscopio a unos -180°C con el objetivo de no romper la cadena de frío.
- Incremento de la temperatura hasta los -90°C con el objetivo de provocar la sublimación de la escarcha que se haya podido depositar sobre la muestra.
- Enfriado de la muestra hasta los -150°C para poder partirla mediante una cuchilla situada en el interior de la precámara.
- Aumento de nuevo de la temperatura hasta los -90°C para provocar la sublimación del agua/escarcha que se haya podido formar tras el corte (ya que el material posee agua en su interior).
- Enfriado hasta los -130°C para aplicar una capa de platino sobre la muestra y hacerla así conductora, condición necesaria para poder ser observada al microscopio. Para realizar este recubrimiento se lleva a cabo un proceso de "sputtering" o pulverización catódica por el cual una placa de platino es bombardeada mediante iones de argón procedentes de un plasma generado en el equipo. Los átomos de platino pulverizados tienden a condensarse provocando la deposición del material pulverizado en todas las superficies de la cámara [44].
- Introducción de la muestra ya preparada para su observación en la cámara del microscopio a unos -140°C .

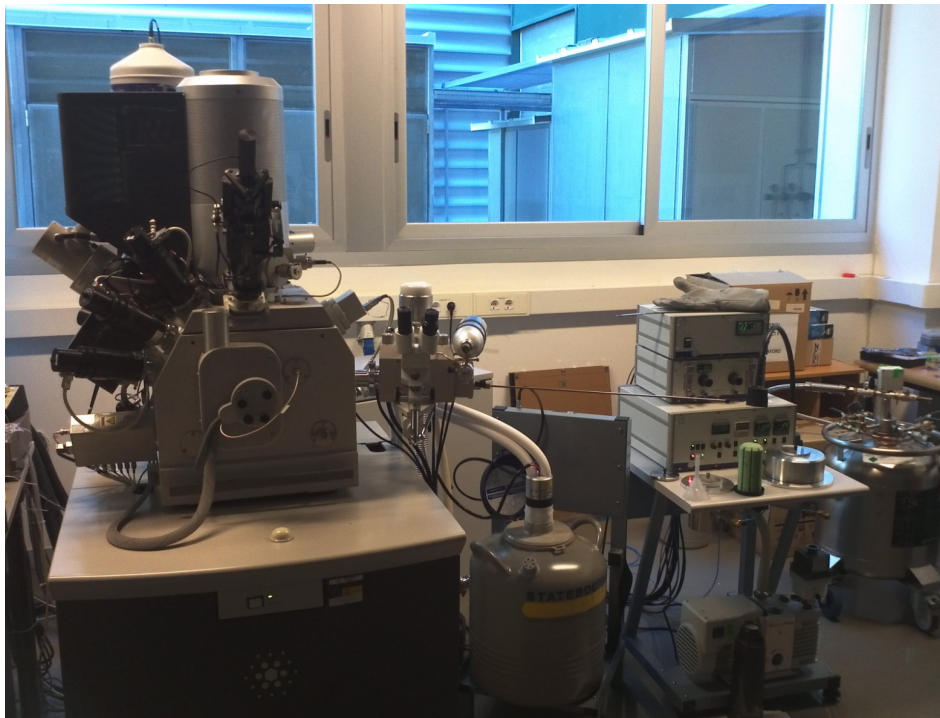


Figura 34. Vista del microscopio electrónico de barrido Dual Beam Nova Nanolab 200.

Capítulo 6

RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Comparativa de las familias de material

En los apartados siguientes se presentan los resultados obtenidos en los ensayos llevados a cabo para cada una de las familias de material (Ver Capítulo 5). La primera parte se centra en el comportamiento mecánico del material y en la parte final se presta especial atención a su organización micro-estructural. Con estos datos se pretende poner de manifiesto la dependencia de las propiedades mecánicas del material con el proceso de síntesis, la composición y la estructura interna de cada familia. Estas familias eran las siguientes:

- Familia 1: PEA 60/40 – 64 % PHEA
- Familia 2: PEA 50/50 – 71 % PHEA
- Familia 3: PEA 40/60 – 79 % PHEA

6.1.1 Ensayos de compresión uniaxial monotónica

Tal y como se ha explicado anteriormente, este tipo de ensayos permite obtener el Módulo de Young y Módulo Agregado del material hidratado (Figura 35) dependiendo de las configuraciones empleadas (confinado o no confinado). En las figuras siguientes se muestran para cada familia los resultados con valores medios y errores típicos.

En la Figura 35 se observa que el Modulo de Young y el Modulo Agregado disminuyen al aumentar la cantidad de etanol empleado en la fabricación de cada familia, es decir disminuyen al aumentar su porosidad. Esto responde al hecho de que el etanol tiene una incidencia directa sobre la porosidad final de las muestras, tal y como se ha explicado en el proceso de fabricación y como se verá más adelante en el análisis del comportamiento micro-estructural. Esto es lo mismo que decir que el material es menos rígido al disminuir la cantidad de PEA, lo cual es lógico al ser esta fase la que aporta la red de refuerzo. También se puede interpretar observando que a mayor cantidad de PHEA (hidrogel) en la composición del material, menor cantidad de PEA (red de refuerzo).

Se observa por tanto una fuerte dependencia de las propiedades mecánicas con la composición de cada familia. Concretamente las familias 1 y 2 presentan valores de E_s y H_a claramente mayores que para la familia 3.

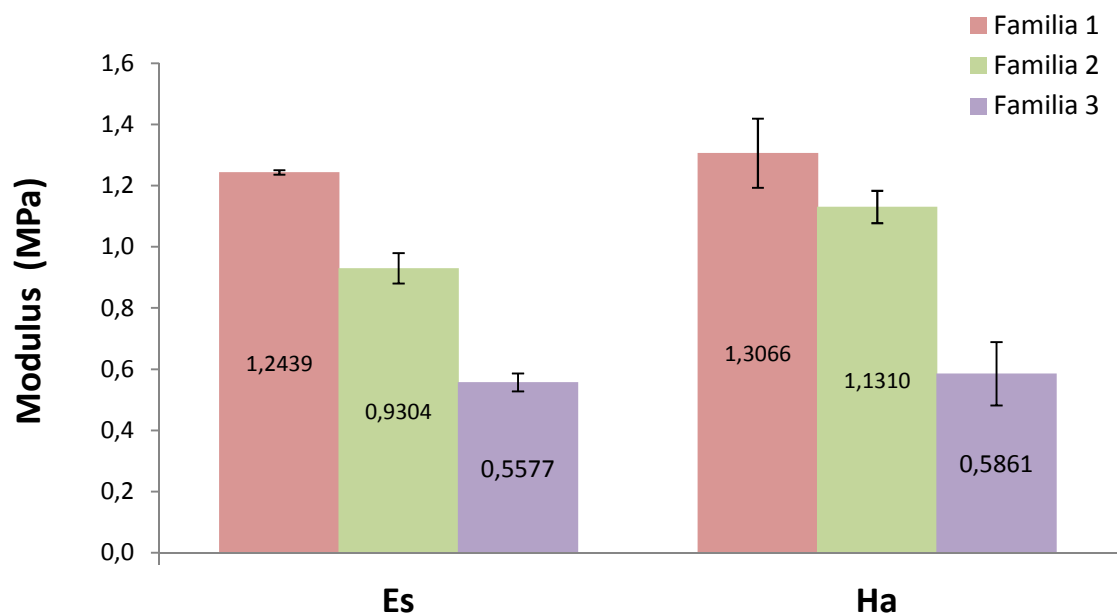


Figura 35. Valores medios con error típico del Módulo de Young (*Es*) y del Módulo Agregado (*Ha*) para los ensayos de compresión uniaxial no confinados y confinados, respectivamente, de las distintas familias.

A partir de los valores obtenidos de *Es* y *Ha* en los ensayos destructivos, se calcula para cada familia el valor del coeficiente de Poisson mediante la Ecuación 3, explicada anteriormente en el Capítulo 5. Los valores de ν son bastante bajos, esto puede achacarse a las pequeñas heterogeneidades en la fabricación del material (Figura 36).

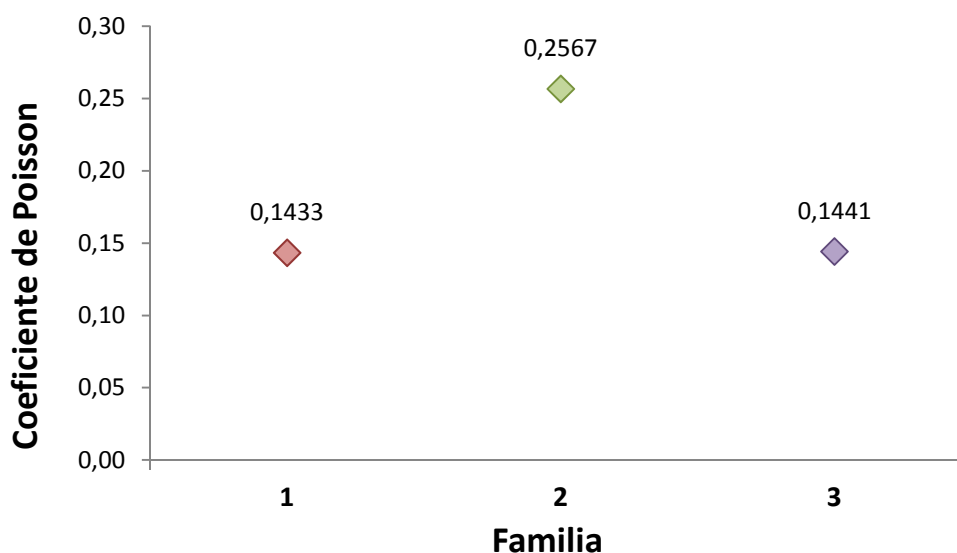


Figura 36. Valores del Coeficiente de Poisson para cada familia calculados a partir de los datos de *Es* y *Ha* obtenidos previamente durante la caracterización mecánica del material.

6.1.2 Ensayos de compresión de carga-relajación

A partir de estos ensayos, se obtiene el Módulo Agregado de la matriz del material sin fluido en su interior, y lo que es más interesante, la permeabilidad de cada familia. La permeabilidad hace referencia a la capacidad que tiene un material de permitirle a un líquido que lo atraviese sin alterar su estructura interna. De este modo se considera que un material es permeable si deja pasar a través de él una cantidad apreciable de fluido en un tiempo dado, e impermeable si la cantidad de fluido es despreciable [45].

En la Figura 37 se muestran las permeabilidades para cada familia de material. Se observa que ésta aumenta con la porosidad (con la cantidad de etanol en el proceso de síntesis), por ello la familia 3 presenta la mayor permeabilidad. Esto se debe a que para ser permeable, un material debe ser poroso, es decir, debe contener espacios vacíos o poros que le permitan absorber fluido. A su vez, tales espacios deben estar interconectados para que el fluido disponga de caminos para pasar a través del material.

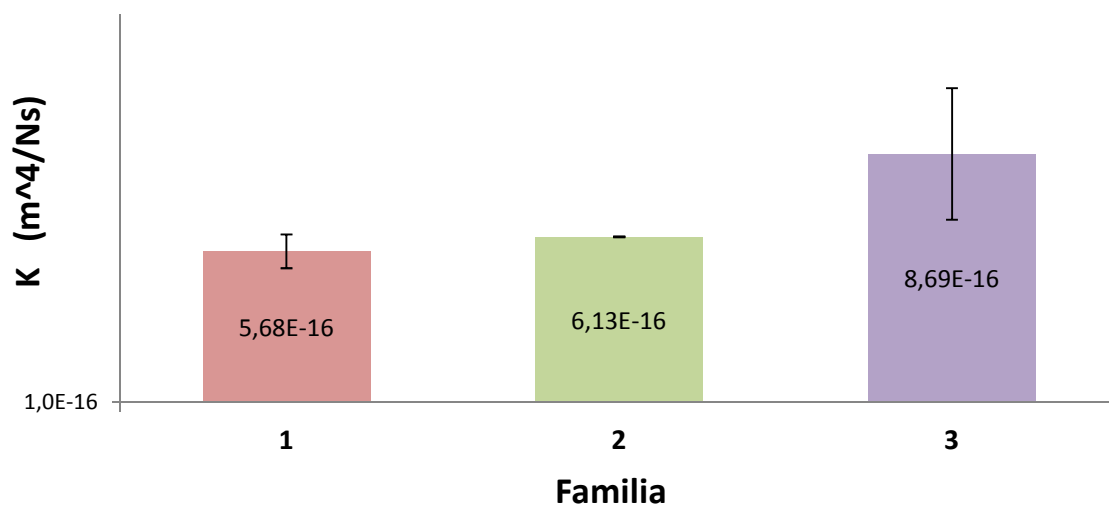


Figura 37. Valores de permeabilidad para cada familia obtenidos a partir de los ensayos uniaxiales de carga-relajación en condiciones de confinamiento.

Como se ha mencionado, este tipo de ensayos también permite obtener el valor de H_a del material libre de fluido. Los datos de este módulo para cada familia se muestran en la Tabla 4 con la media \pm el error típico. Se observa que la rigidez de la matriz disminuye al disminuir la cantidad de red de refuerzo (PEA) y al aumentar por tanto la cantidad de hidrogel (PHEA).

	Familia 1	Familia 2	Familia 3
Ha (MPa)	4,48 \pm 0,18	3,65 \pm 0,60	2,78 \pm 0,61

Tabla 4. Medición del Módulo Agregado del material sin fluido en su interior obtenido mediante los ensayos uniaxiales de carga-relajación en condiciones de confinamiento.

Finalmente, en la Tabla 5 se muestran a modo de resumen los resultados promedio y los errores típicos de todos los parámetros analizados. En esta tabla también aparecen datos

relativos a la porosidad, aunque ésta se estudiará más adelante en la caracterización microestructural.

Medición de las propiedades mecánicas del material hidratado			
	Familia 1	Familia 2	Familia 3
Es (MPa)	1,243 ± 0,007	0,930 ± 0,049	0,557 ± 0,029
Ha (MPa)	1,306 ± 0,113	1,130 ± 0,052	0,586 ± 0,103
ν	0,143	0,256	0,144
k (m ⁴ /Ns)	5,68E-16 ± 5,21E-17	6,13E-16 ± 1,02E-18	8,69E-16 ± 2,03E-16
Peso agua (%)	51,42 ± 1,17	58,77 ± 1,46	65,33 ± 0,76
Porosidad (%)	42,30 ± 2,78	49,33 ± 0,79	58,18 ± 0,33

Tabla 5. Medición de las propiedades mecánicas del material hidratado (Módulo de Young, Módulo Agregado, coeficiente de Poisson, permeabilidad, porcentaje en peso de agua y porcentaje de porosidad).

Adicionalmente, durante la fase de preparación de las muestras empleadas en los diferentes ensayos de compresión, se tomaron datos relativos a las dimensiones y pesos de las muestras antes y después de ser hidratadas con PBS. Fruto de estas mediciones se pudo determinar para cada familia de material el porcentaje de hinchamiento tras el proceso de hidratación (Figura 38 y Tabla 5).

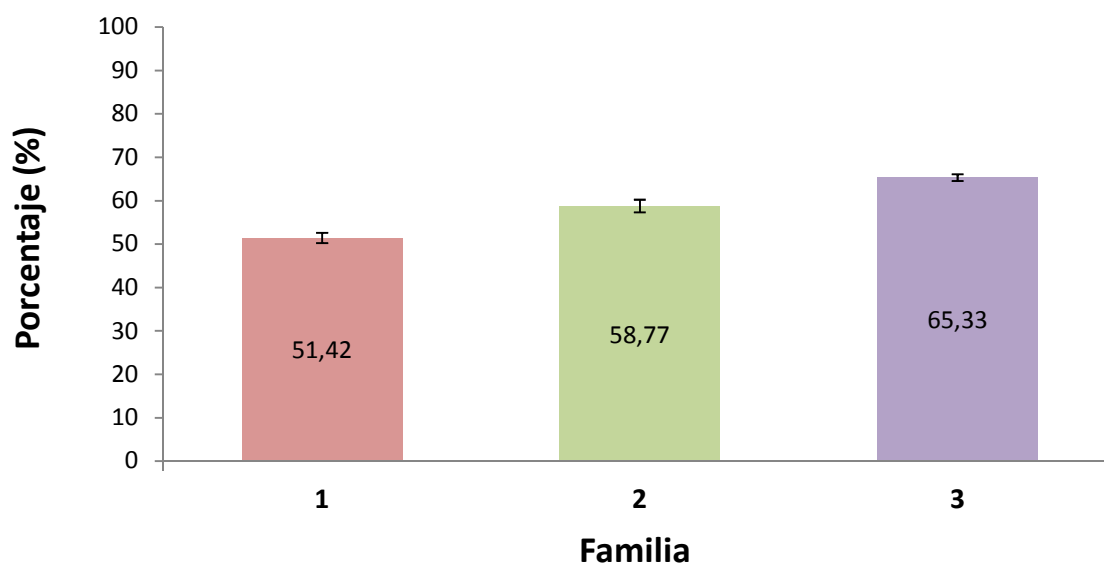


Figura 38. Porcentaje en peso de agua absorbida en cada familia de material durante el proceso de hidratación.

La figura 38 muestra que la cantidad de agua absorbida por las muestras durante el proceso de hidratación aumenta con la cantidad de PHEA en la composición de las familias. Esto responde al hecho de que el PHEA, el hidrogel, constituye el componente hidrófilo que tiene la capacidad de absorber agua. Por ello, la familia 3 que contiene un 79% en peso de PHEA es la que más agua puede retener.

6.1.3 Ensayo de fatiga

Durante el ensayo de fatiga con control en desplazamiento, las células de carga del dispositivo registran los valores de carga para cada una de las 3 muestras a lo largo del tiempo para la amplitud impuesta. En la Figura 39 se muestra un ejemplo con la onda sinusoidal impuesta y las salidas para cada una de las familias.

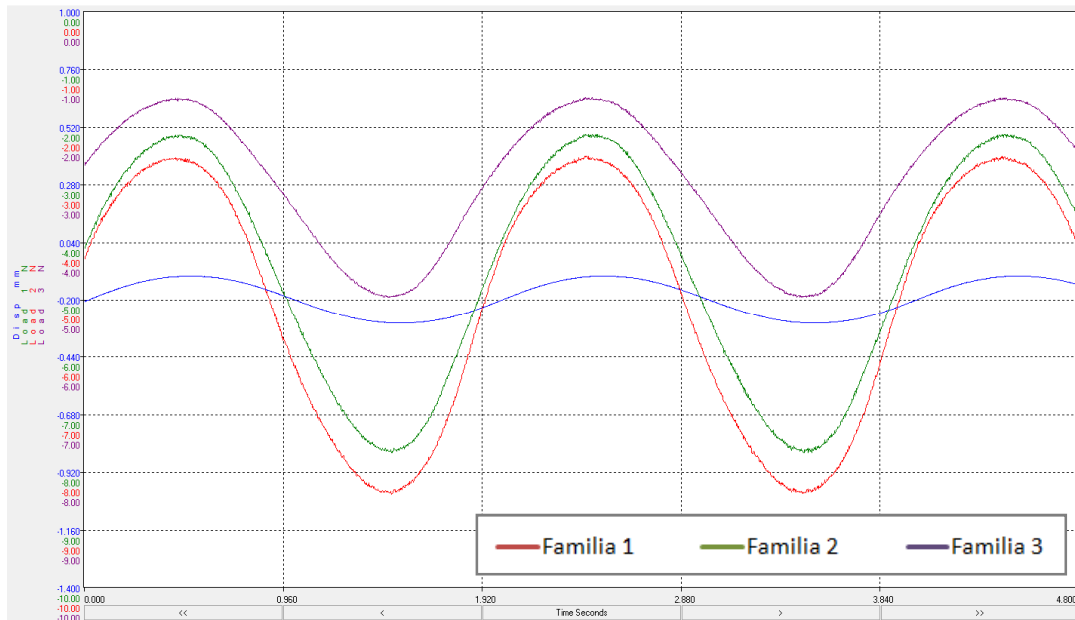


Figura 39. Ejemplo de datos de entrada (extensión, en azul) y de salida (fuerza registrada por las células de carga de cada familia) a lo largo del tiempo en un ensayo de fatiga.

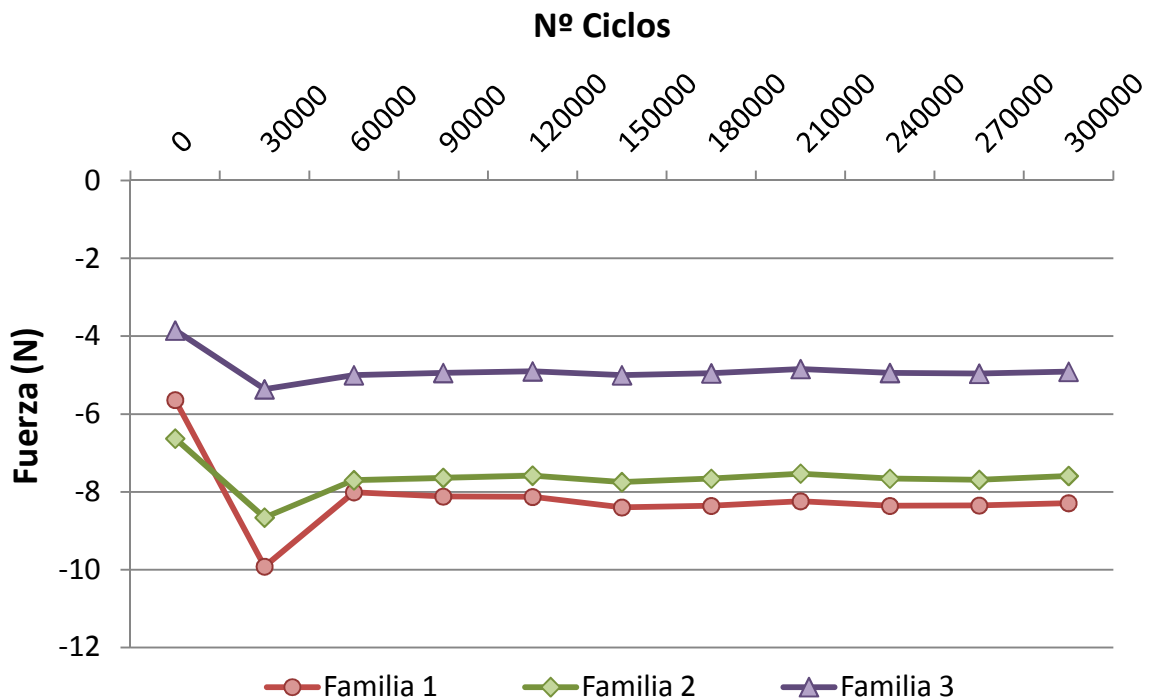


Figura 40. Evolución del comportamiento mecánico de las familias a lo largo de los ciclos durante el ensayo de fatiga.

Con un tratamiento posterior de los datos se puede apreciar mejor el comportamiento de cada familia ante el ensayo de fatiga, que tuvo una duración próxima a los 300.000 ciclos. En la Figura 40 se confirma, tal y como cabía esperar, que las células de carga registran fuerzas de compresión mayores para las familias más rígidas, las familias 1 y 2.

Además, se observa que para las tomas de datos relativas a los 0 y los 30.000 ciclos, el material muestra un comportamiento diferente al resto de tomas. En valor absoluto, las células de carga registran inicialmente un valor de fuerza menor hasta que posteriormente el nivel de fuerza se estabiliza a lo largo de los ciclos. Esto puede ser debido a la presencia de aire en las muestras hidratadas, el cual va siendo expulsado con las sucesivas compresiones de los ciclos de fatiga. La presencia de aire explicaría este valor de fuerza inferior al encontrarse algunos poros del material llenos de un fluido compresible como es el aire, y no de uno no incompresible como es el PBS.

Salvo este comportamiento inicial, se observa que las 3 familias se mantienen estables en el tiempo. Es decir, para este ensayo no se observaron indicios de fatiga o daño hasta los 300.000 ciclos del ensayo. Por disponibilidad de las instalaciones no se pudo ampliar el alcance del ensayo, a pesar de ello, para la aplicación que se persigue son unos resultados muy satisfactorios y prometedores.

6.1.4 Herramienta de trabajo

Finalmente, la caracterización mecánica de estas 3 familias de material ha permitido la creación de una herramienta que permita estimar la composición aproximada que debe presentar este nuevo material para ofrecer unas propiedades mecánicas determinadas. Realizando un ajuste mediante una línea de tendencia a los datos obtenidos, se puede estimar el comportamiento del material dentro del rango de datos disponibles.

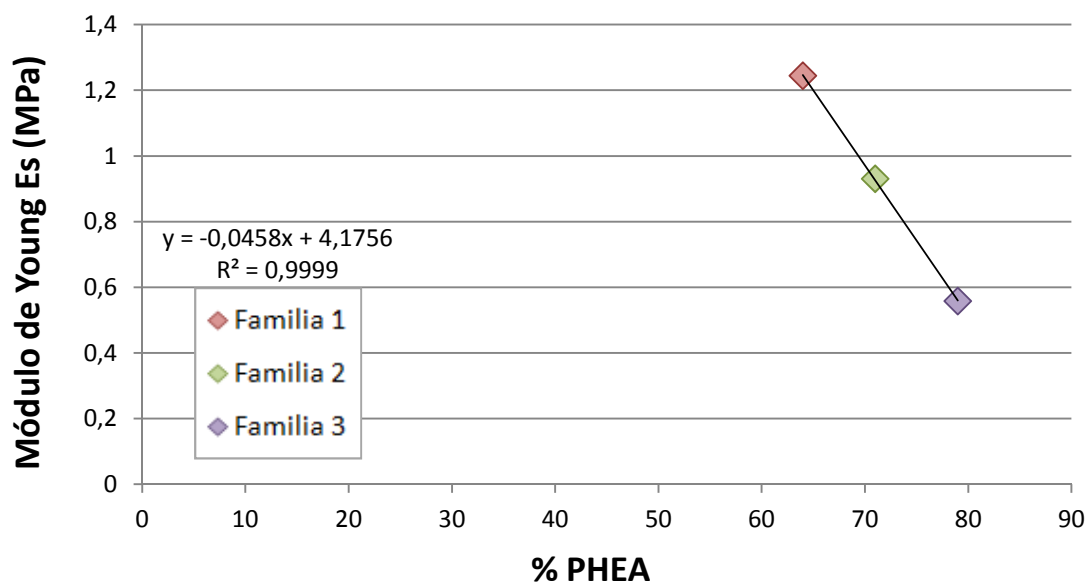


Figura 41. Valores de Módulo de Young para diferentes porcentajes de PHEA y ajuste lineal de los datos obtenidos de cada familia.

Un ejemplo de esta aplicación se muestra en la Figura 41, en ella se observa que para el Módulo de Young el material se ajusta a un comportamiento lineal. Puesto que no todas las articulaciones presentan el mismo comportamiento mecánico, por medio de este ajuste se podría estimar de manera aproximada la composición que debe presentar el material para alcanzar otro valor de E_s distinto dentro del rango estudiado.

Esta herramienta se puede aplicar a otros parámetros como el Módulo Agregado o la permeabilidad suponiendo un ahorro de tiempo y costes, ya que ofrece un punto de partida para la fabricación de nuevas familias de material. Para aumentar la precisión y fiabilidad de la herramienta todavía sería necesario fabricar y caracterizar nuevas familias de material que permitan abarcar todo el rango de composiciones. Por ejemplo, resultaría de interés caracterizar familias con composición 0% (PEA puro) y 100% de PHEA y otros valores intermedios.

Se trataría, por tanto, de una herramienta de referencia a la hora de diseñar nuevas muestras de este material destinadas a imitar tejidos con funciones específicas.

6.2 Comparativa de las familias de material con el cartílago articular

El objetivo principal de este proyecto es la identificación de un material que pueda simular de la forma más precisa posible el comportamiento real del cartílago articular humano. Una vez analizadas cada una de las familias de material, tan solo falta conocer los parámetros de trabajo del cartílago humano para proceder a su comparación. En la Tabla 6 se muestran los valores de los parámetros que caracterizan el comportamiento del cartílago humano, entre ellos el Módulo de Young, el Módulo Agregado o la permeabilidad. Los valores se presentan con la media \pm el error típico. Esta variabilidad en los datos del cartílago articular se debe a que este tejido se ve afectado por diferentes parámetros como la edad, el sexo o la articulación en la que se encuentra.

Propiedades mecánicas del cartílago articular humano								
Es (MPa)		Ha (MPa)		ν	k (m ⁴ /Ns)		Peso agua (%)	
Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Rango	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
0,45	0,8	0,5	0,8	<0,4	E-16	E-15	70	85
Valores promedio								
Es (MPa)		Ha (MPa)		ν	k (m ⁴ /Ns)		Peso agua (%)	
0,625		0,7		<0,4	5,5E-16		77,5	

Tabla 6. Propiedades mecánicas del cartílago articular humano y valores promedio tomados como referencia para este estudio.

El cartílago articular es un tejido muy rico en agua, de hecho, contiene entre el 70% y el 85% de su peso en agua. Durante la fase de preparación de muestras se obtuvieron los datos necesarios para poder estimar el porcentaje en peso de agua para cada familia. En la Figura 42 se observa que a mayor cantidad de fase hidrófila (PHEA) en la familia de material, mayor cantidad de agua absorbida. Por ello, es de esperar que la familia 3, la de mayor capacidad de retener agua, sea la que presente un comportamiento más similar al del cartílago articular.

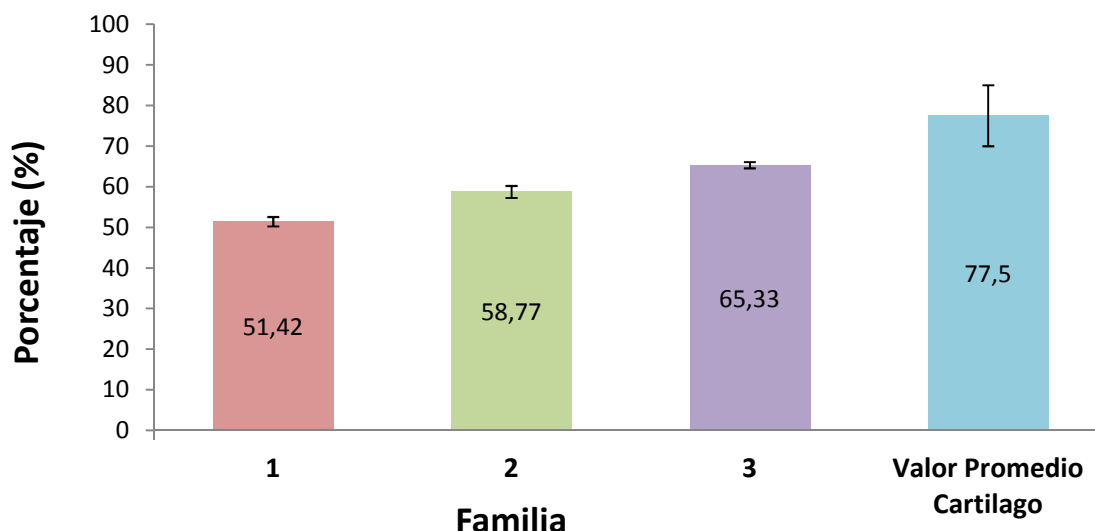


Figura 42. Comparativa del porcentaje en peso de agua de las distintas familias con el valor relativo al del cartílago articular humano.

A continuación, se muestra la comparativa de los datos obtenidos para cada uno de los ensayos realizados con las propiedades relativas al cartílago articular humano.

6.2.1 Ensayos de compresión uniaxial monotónica

En las figuras siguientes se muestra la comparativa del Módulo de Young y del Módulo Agregado de cada familia con el valor del cartílago articular en seres humanos (Figura 43 y 44). Se comprueba en la Figura 43 que tan solo una de las familias, la familia 3, se encuentra entre los valores admisibles para el cartílago articular. Si bien es cierto que podría considerarse que la familia 2 se encuentra en límite del valor máximo para el tejido real.

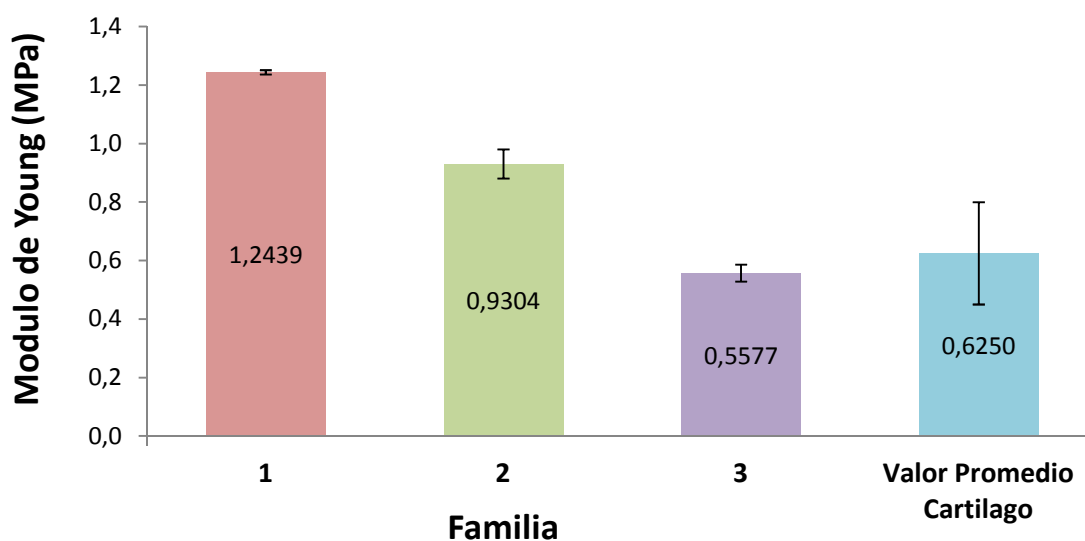


Figura 43. Comparativa del Módulo de Young de las distintas familias con el valor relativo al del cartílago articular humano.

En la Figura 44, se observa para el Módulo Agregado una tendencia muy similar a la descrita para el Módulo de Young. De nuevo tan solo la familia 3 se encuentra entre el rango de valores presentes en cartílago articular.

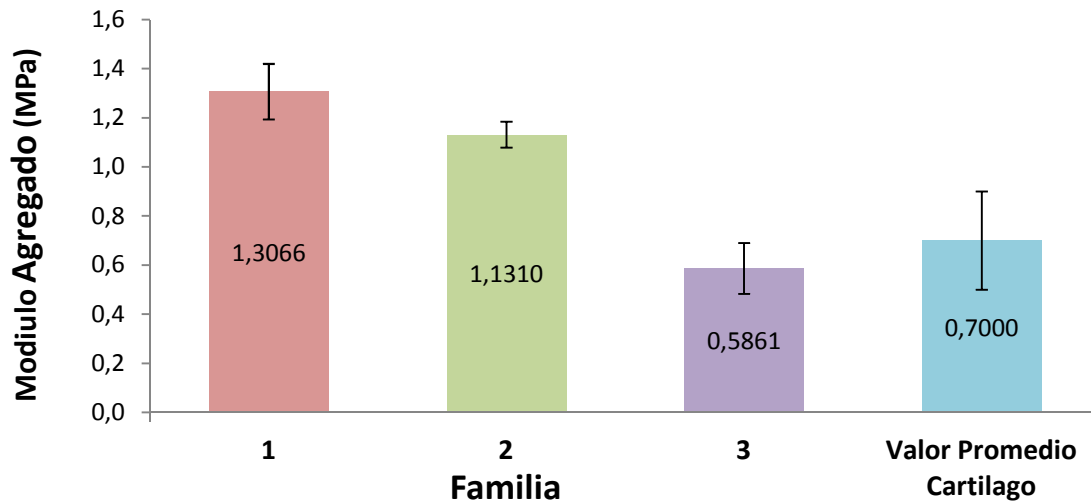


Figura 44. Comparativa del Módulo Agregado de las distintas familias con el valor relativo al del cartílago articular humano.

Como se ha explicado, a partir de estos dos parámetros se calcula el valor del coeficiente de Poisson para cada familia (Figura 36). Se observa que todos estos coeficientes se encuentran por debajo de 0,4, límite máximo que se considera para el cartílago articular (Tabla 6). Por ello, desde el punto de vista del coeficiente de Poisson todas las familias serían apropiadas.

6.2.2 Ensayos de compresión de carga-relajación

Por medio de los ensayos de compresión de carga-relajación se obtiene la permeabilidad, uno de los parámetros fundamentales para conocer los flujos a través del material poroso. En la Figura 45 se observa que los valores de k obtenidos para cada familia se encuentran dentro de los normales del cartílago articular, si bien para la familia 3 es algo mayor que para el resto.

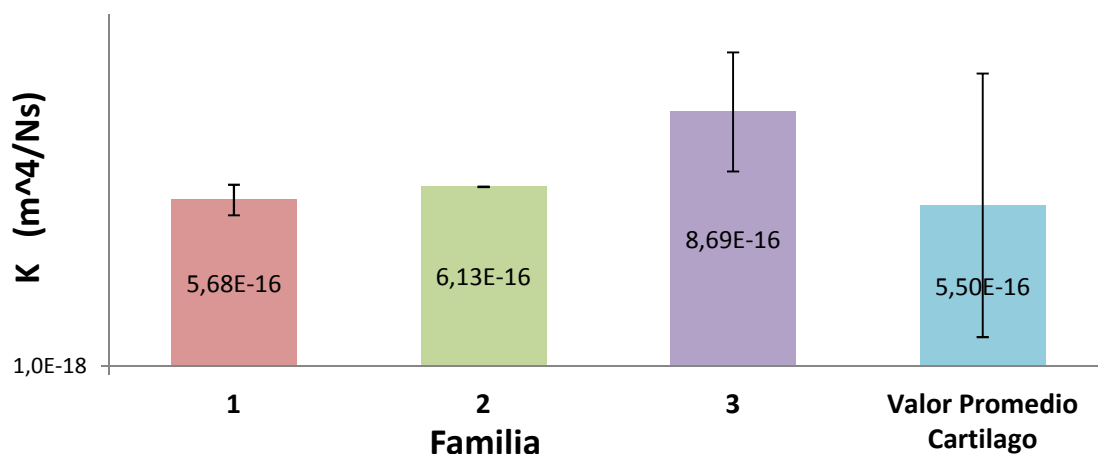


Figura 45. Comparativa de la permeabilidad de las distintas familias con el valor relativo al del cartílago articular humano.

Los ensayos realizados nos permiten obtener información adicional acerca del comportamiento del material que resulta de interés para la aplicación que se persigue. Para la familia 3, la que más parece asemejarse al cartílago articular, se pudo corroborar lo propuesto en la literatura [46]. Ésta determina una disminución en el comportamiento de la permeabilidad al producirse un aumento en la deformación por compresión sobre el tejido articular. Este comportamiento es lo que se observa precisamente en la Figura 46, lo que pone de manifiesto la idoneidad de la familia 3 para alcanzar el objetivo buscado, un material mimético al cartílago articular humano.

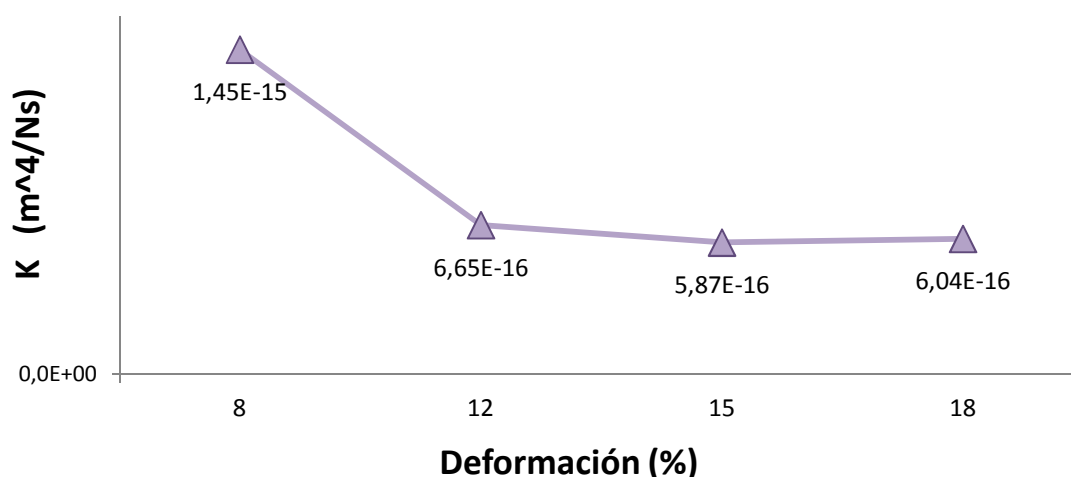


Figura 46. Comportamiento de la permeabilidad en función de la deformación impuesta para la familia 3. Se observa una disminución de la permeabilidad al aumentar la deformación.

6.3 Comportamiento micro-estructural del material

Tal y como se ha puesto de manifiesto, una de las características de los biomateriales empleados en Ingeniería de Tejidos y a la que se le da mayor importancia es la estructura interna. Por ello se consideró de interés el estudio micro-estructural del material. Con el mismo se pretende confirmar algunas de las de las suposiciones empleadas en la realización de los ensayos, como que el material de estudio es homogéneo e isótropo sin variaciones de las propiedades mecánicas a través de la profundidad del material. Así mismo, se buscaba demostrar que en el interior del material existe una distribución uniforme de poros con un tamaño medio determinado.

Durante la fase de preparación de las muestras se tomaron datos relativos a las dimensiones y pesos de las muestras antes y después de ser hidratadas con PBS que permiten realizar una primera aproximación de la porosidad presente en cada familia. Estos valores de porosidad se muestran en la Figura 47 y se recogen con su error típico en la Tabla 5.

Se observa que la porosidad en las muestras aumenta con la cantidad de etanol empleado en la síntesis de las diferentes familias. Por ello, la familia 3 presenta la mayor porosidad al emplearse la mayor cantidad de etanol en su fabricación, mientras que la familia 1 es la menos porosa. Esto responde al hecho de que el etanol tiene una incidencia directa sobre la porosidad final de las muestras, tal y como se ha explicado en el proceso de fabricación. Se ha podido comprobar cómo esta propiedad tiene una influencia decisiva en el resto de propiedades que se han analizado hasta ahora.

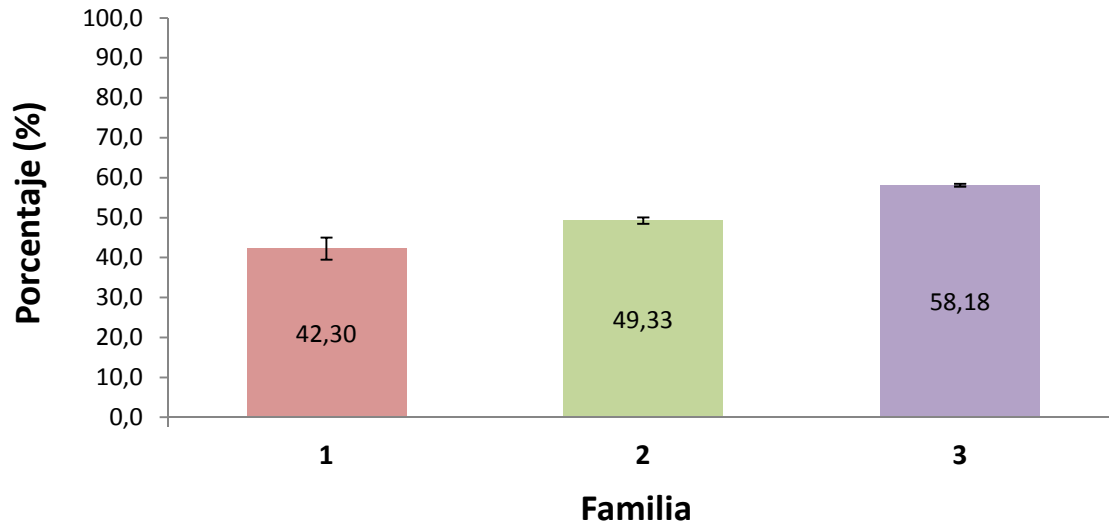


Figura 47. Porcentaje en volumen de la porosidad presente en cada familia de material calculada a partir de las mediciones previas a la realización de los ensayos.

6.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Por otro lado, y tal y como se ha descrito en Capítulo 5, se hizo uso de la microscopía electrónica para obtener más información de la micro-estructura del material. Sin embargo, en un inicio, la observación de las muestras en los 2 primeros microscopios electrónicos de barrido (SEM), el ESEM Quanta 250 FEG y el SEM Inspect F50, no produjo los resultados esperados. Esto se achacó a una inadecuada preparación de las muestras ya que éstas fueron cortadas directamente con un bisturí. Por ello se procedió a repetir el proceso realizando el corte de las muestras mediante crio-fractura en nitrógeno líquido.

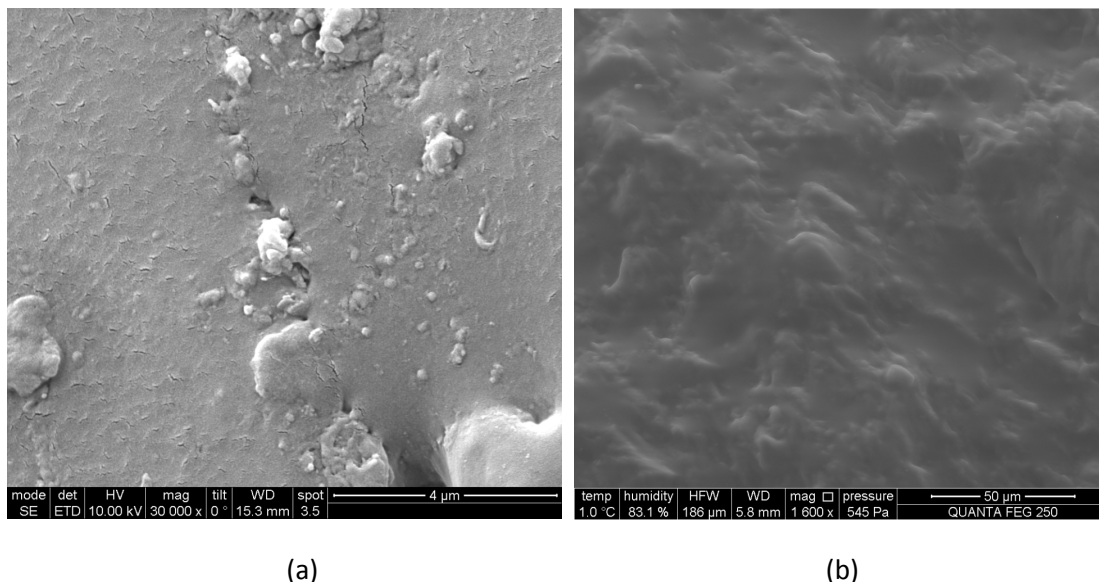
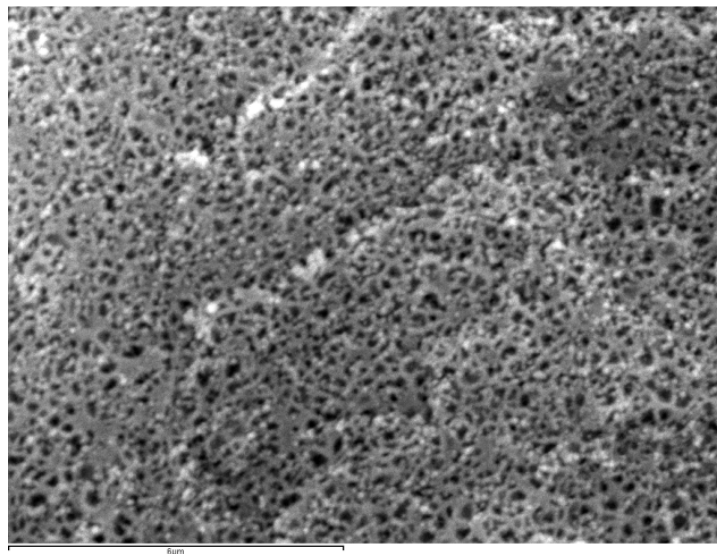


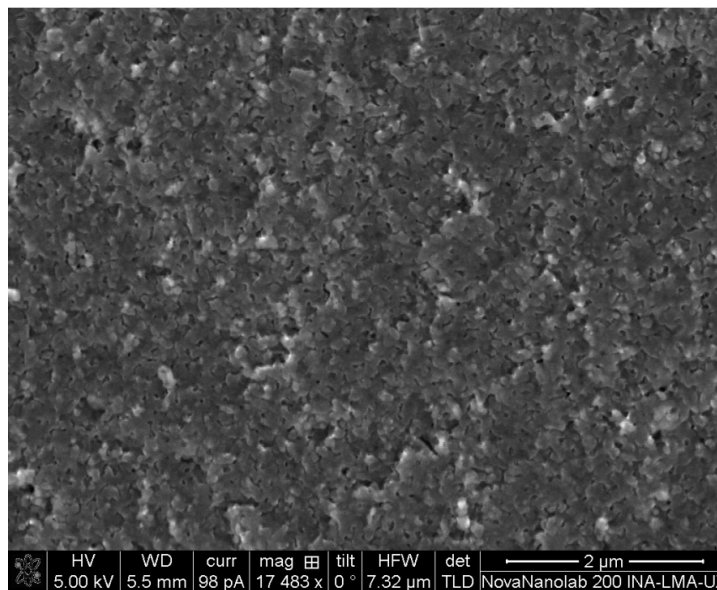
Figura 48. Imágenes obtenidas con microscopía electrónica tras la crio-fractura con (a) SEM Inspect F50 donde no se observan estructuras porosas y con (b) ESEM Quanta 250 FEG donde no se alcanza una resolución del orden de nanómetros.

Las muestras cortadas fueron observadas de nuevo en el ESEM Quanta 250 FEG y en el SEM Inspect F50. Nuevamente, los resultados no fueron los esperados, ya que no se observaron micro-estructuras propias de materiales porosos. Este nuevo fracaso se achacó al hecho de que, por un lado, el SEM Inspect F50 trabaja en condiciones de alto vacío, lo que podría hacer que los poros presentes en el material estuvieran colapsados (cerrados) (Figura 48a). Por otro lado, el ESEM Quanta 250 FEG a pesar de trabajar a bajas presiones, demostró no poder alcanzar una resolución del orden de nanómetros, el tamaño de poro esperado para este tipo de material (Figura 48b).

Finalmente, con el último microscopio, el SEM Dual Beam Nova Nanolab 200, sí se obtuvieron estructuras características de materiales porosos (Figura 49a). Tras el análisis de los datos obtenidos en los ensayos, se optó por estudiar en detalle la familia 3 al ser la que presenta un comportamiento más similar al del cartílago articular.



(a)



(b)

Figura 49. Imágenes obtenidas en el SEM Dual Beam Nova Nanolab 200. (a) Vista general de la estructura porosa del material. (b) Detalle de los nano-poros presentes en el material.

A la vista de los resultados, se comprueba que existe una estructura interna homogénea, sin tendencias de orientación preferencial y con una distribución uniforme de estructuras porosas. De esta forma, se corroboran los supuestos tenidos en cuenta en este estudio acerca del material. Además, se pudo realizar una estimación del tamaño medio de poro, parámetro influyente en el flujo de fluido a través del material. Las estructuras observadas, del orden de cientos de nanómetros, son también conocidas como nano-poros y ayudan a comprender mejor la micro-estructura y el comportamiento del material (Figura 49b).

6.4 Conclusión

A la vista de los resultados analizados, se puede concluir que la familia 3 es la que presenta un comportamiento más similar al del cartílago articular humano. Esta elección atiende a diferentes motivos entre los que destacan:

- A diferencia del resto de familias, la familia 3 presenta valores de Módulo de Young y Módulo Agregado dentro del rango esperado.
- La familia 3 cumple la condición exigida para el coeficiente de Poisson.
- A pesar de que todas las familias presentan valores de permeabilidad acordes a los del cartílago humano, se observa que la familia 3 muestra un valor ligeramente mayor (Figura 45). Este hecho puede considerarse como una ventaja desde el punto de vista del diseño de la aplicación. Una permeabilidad ligeramente superior asegura un funcionamiento más duradero dentro los márgenes admisibles en el biorreactor. Esto se debe a que con el uso del mismo, el material puede disminuir su permeabilidad al verse obstruido por el paso de nutrientes y desechos por su interior. Una desventaja de este aumento en la permeabilidad podría ser un aumento en la velocidad de flujo que llega a las células del andamio pudiendo causar un desplazamiento de las mismas.
- En la familia 3, la permeabilidad disminuye al incrementar la deformación, un comportamiento previamente observado en el cartílago real (Figura 46).
- Adicionalmente, se ha comprobado por medio del ensayo de fatiga que la familia 3 presenta una estabilidad mecánica adecuada con el paso de los ciclos.
- Finalmente, al estudiar esta familia mediante microscopía electrónica, se observa un material homogéneo, isótropo y nano-poroso.

Capítulo 7

CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

7.1 Conclusiones

Este proyecto ha permitido realizar un estudio riguroso del comportamiento mecánico del material, estableciendo una correlación entre la micro y la macro-estructura del mismo. Los resultados más relevantes se exponen a continuación.

- El proceso de síntesis es complejo y se ve muy afectado por diversas variables como la cantidad de etanol o de agente entrecruzador empleado.
- La composición del material obtenido durante el proceso de fabricación tiene una influencia directa sobre la estructura interna y las propiedades finales del material.
- Propiedades mecánicas como el Módulo de Young y el Módulo Agregado presentan un comportamiento lineal con el porcentaje en peso de hidrogel en el andamio, lo que ha permitido establecer una herramienta que ayude a estimar la composición aproximada que debe presentar este nuevo material para ofrecer unas propiedades mecánicas determinadas.
- El material fabricado presenta estabilidad mecánica al ser sometido a un ensayo de fatiga.
- La permeabilidad del material presenta una dependencia directa de la porosidad y se ha comprobado que sufre una disminución al aplicarse un aumento en la deformación por compresión sobre el material, fenómeno también observado en el cartílago articular humano.
- Por su micro-estructura, este material puede considerarse homogéneo e isótropo con una distribución uniforme de poros del orden de nanómetros.
- Con toda la información analizada, se ha podido determinar que la familia 3 de material presenta un comportamiento mimético al del cartílago articular humano.

Además, fruto de este proyecto se ha obtenido una publicación en Congreso Internacional [47], así como se está elaborando, en colaboración con la Universidad Politécnica de Valencia, un artículo para su futura publicación en revista científica.

7.2 Trabajo futuro

Con el objetivo de completar este proyecto y darle una dimensión mayor, se proponen diversas líneas de trabajo futuro entre las que se incluyen:

- La fabricación y caracterización de un rango de familias de material más amplio que permitan conocer mejor su comportamiento al variar la composición.

- El estudio del material en un caso real en el biorreactor, donde observar la interacción del mismo con las células cultivadas en un andamio estructural.
- Analizar la posibilidad de incluir una fase inorgánica, como el sílice, durante el proceso de síntesis con el objetivo de modificar el comportamiento mecánico del material, así como la integridad estructural del andamio. De esta forma podrían ajustarse todavía más los parámetros del material a los del cartílago articular humano.

Bibliografía

- [1] V.A. Acosta Santamaría, *Ingeniería de Tejidos del cartílago articular: caracterización y modelado del comportamiento mecánico*, Tesis doctoral, 2011.
- [2] Sociedad Española de Reumatología (SER), *Estudio ArtRoCad*, 2004.
- [3] M.B. Abhijit y B.R. James, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. British Medical Bulletin, 2008, 77-95.
- [4] U. Meyer y H.P. Wiesmann, *Bone and cartilage engineering*, 2006.
- [5] S. Fawcett, *Tratado de Histología*, 1992.
- [6] J.A. Buckwalter, *Integration of science into orthopaedic practice: Implications for solving the problem of articular cartilage repair*, Journal of Bone and Joint Surgery, 2003, 85: 1-7.
- [7] N.M. Bachrach, V.C. Mow y F. Guilak, *Incompressibility of the solid matrix of articular cartilage under high hydrostatic pressures*, Journal of Biomechanics, 1998, 31: 445-451.
- [8] M.E. Nimni, *Collagen: Chemistry, Biology and Biotechnology*, 1988.
- [9] M.E. Nimni, *Collagen: Biochemistry*, 1988, Vol. I.
- [10] R.J. Todhunter, S.L. Fubini, J.A. Wootton y G. Lust, *Effect of methylprednisolone acetate on proteoglycan and collagen metabolism of articular cartilage explants*, J Rheumatol., 1996, 7: 1207-1213.
- [11] M.R. Brinker, *Joints*, Review of orthopaedics, 2000.
- [12] J.A. Buckwalter y J. Martin, *Degenerative joint disease, Anatomy and physiology of synovial joints*, 1995.
- [13] F. Geneser, *Histología*, 1986.
- [14] S. Juncosa, C.J. Poveda, R.M. Zaragoza, R.J. García, S.I. Aguado y S.C. Canet, *Armas frente a la patología articular*, 24-26.
- [15] M.B. Abhijit y B.R. James, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*, British Medical Bulletin, 2008: 77-95.

- [16] J.A. Ghadially, R.G. y F.N. Ghadially, *Long term results of deep defects in articular cartilage*, Virchows Archiv B, 1977, 25: 125-136.
- [17] E.M. Hasler, W. Herzog, J.Z. Wu, W. Muller y U. Wyss, *Articular cartilage biomechanics: theoretical models, material properties, and biosynthesis response*, Clin Rev Biomech Eng, 1999, 27: 415-88.
- [18] J.A. Buckwalter, L.C. Rosenberg y E.B. Hunziker, *Articular cartilage: composition, structure, response to injury, and methods to facilitating repair, in articular cartilage and knee joint function*, Basic science and arthroscopy, 1990, 19–56.
- [19] H. Mankin, *The response of articular cartilage to mechanical injury*, Journal of Bone and Joint Surgery, 1982, 64: 460-466.
- [20] D.S. Musgrave, F.H. Fu y J. Huard, *Gene Therapy and Tissue Engineering in Orthopaedic Surgery*, Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2002, 10(1): 6-15.
- [21] <http://geosalud.com/ortopedia/protesisrodilla.htm>
- [22] http://cto-am.com/les_condrales.htm
- [23] E. Marsal Boyer, *Análisis de matrices 3D con arquitectura regular para ingeniería de tejidos*, Máster Tesis, 2009.
- [24] M. Vallet –Regí, *Biomateriales hacia la ingeniería tisular*, 2010.
- [25] Escuela de Ingenierías Industriales, *Los polímeros en medicina*, http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/ingenieria_de_tejidos.htm
- [26] S.A. Korossis, F. Bolland, J.N. Kearney, J. Fisher y E. Ingham, *Topics in Tissue Engineering*, 2005, Volume 2, Chapter 8.
- [27] C. Lee, S. Grad, M. Wimmer and M. Alini, *Topics in Tissue Engineering*, 2005, Volume 2, Chapter 1.
- [28] Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa, *Biblioteca Digital*, http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/37/htm/sec_14.htm
- [29] B. Valdez, M. Schorr, E. Valdez. y M. Carrillo, *Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano*, 2005.
- [30] Brandon V. Slaughter, Shahana S. Khurshid, Omar Z. Fisher, Ali Khademhosseini, y Nicholas A. Peppas, *Hydrogels in Regenerative Medicine*, 2009.
- [31] http://www.red-dental.com/O_N35701.HTM
- [32] Polymerics GmbH, *IPN Technology*, http://www.polymeric.de/technology/ipn_en.html
- [33] G. Gallego Ferrer, M. Monleón Pradas, J.L. Gómez Ribelles, F. Romero Colomer, I. Castilla-Cortázar y A. Vidaurre, *Influence of the nature of the porous confining network on the*

- sorption, diffusion and mechanical properties of hydrogel IPNs*, European Polymer Journal, 2009.
- [34] PUBCHEM, *ethyl acrylate - Compound Summary*.
- [35] PUBCHEM, *2-hydroxyethyl acrylate - Compound Summary*.
- [36] G. Gallego Ferrer, M. Salmerón Sánchez, J.L. Gómez Ribelles, F.J. Romero Colomer y M. Monleón Pradas, *Nanodomains in a hydrophilic–hydrophobic IPN based on poly(2-hydroxyethyl acrylate) and poly(ethyl acrylate)*, European Polymer Journal, 2007.
- [37] S. Knecht, B. Vanwanseele y E. Stüssi, *A review on the mechanical quality of articular cartilage - Implications for the diagnosis of osteoarthritis*, Clinical Biomechanics, 2006. 21: 999-1012.
- [38] L. Hartmann, A. Spanoudaki, A. Kyritsis, P. Pissis, R. Pelster, N. Shinyashiki, J. C. Rodríguez Hernández, J.L. Gómez Ribelles y M. Monleón Pradas, *Dielectric studies of molecular dynamics and hydration properties of poly (hydroxyl ethyl acrylate) – co – poly (ethyl acrylate) copolymers*.
- [39] S.H. Teoh, *Fatigue of biomaterials: a review*, International Journal of Fatigue 22, 2000, 825–837.
- [40] BOSE, *ElectroForce® 5200 BioDynamic® Test Instruments*, http://worldwide.bose.com/electroforce/en/web/5200_products/page.html
- [41] Universidad de Valencia, *Microscopía electrónica*, http://scsie.uv.es/scsie_new/web_cod/SCSIE/MIC/es/index.php
- [42] Universidad de Málaga, *Microscopía electrónica*, http://webdeptos.uma.es/qicm/Doc_docencia/Tema14_me.pdf
- [43] FEI, *Electron Microscopes*, <http://www.fei.com/products/>
- [44] R. Behrisch, *Sputtering by Particle bombardment*, 1981.
- [45] T. W. Lambe y R. V. Whitman, *Mecánica de suelos*, 1997.
- [46] M.H. Holmes, *A theoretical analysis for determining the nonlinear hydraulic permeability of a soft tissue from a permeation experiment*, Bulletin of Mathematical Biology, 1985, Vol. 47, 669-683.
- [47] S. Manzano, L. Herrero, C. Pelegay, C. E. Plazas, M. H. Doweidar, I. Ochoa, J. A. Gómez, J. E. Perilla, J.L. Gómez y M. Doblaré, *TOWARD A SYNTHETIC CARTILAGE-LIKE SCAFFOLD*, European Congress on Computational Methods in Applied Sciences and Engineering (ECCOMAS 2012), September 2012.

ANEXOS

Anexo I

EJEMPLOS DE HIDROGELES Y SU FUNCION EN INGENIERIA DE TEJIDOS

En la tabla siguiente se muestran diferentes ejemplos de hidrogeles empleados en Ingeniería de Tejidos para desempeñar funciones específicas. Se incluye además el tipo de tejido que se pretende tratar y las células involucradas en el proceso.

Table 1. Summary of selected hydrogel applications in tissue engineering.

Intended tissue	Cell type(s) studied	Hydrogel type(s)	Hydrogel function(s)
Bone	Osteoblasts	PEG-PLA [a]	Drug delivery, Encapsulation
Bone	Osteoblasts	Peptide amphiphile-Ti composite	Encapsulation, Implant
Bone	Fibroblasts	PEG	Scaffold
Cardiovascular	Bone marrow cells	Fibrin	Cell delivery, Scaffold
Cardiovascular	Embryonic carcinoma	PEG	Encapsulation
Cardiovascular	Cardiomyocyte, Endothelial, ESCs	SAP	Encapsulation, Scaffold
Cardiovascular	Hepatocytes	HA, Alginate, Carboxymethylcellulose	Scaffold
Cartilage	Chondrocytes	Fibrin	Cell delivery, Scaffold
Cartilage	Chondrocytes	PEO Semi-IPN	Drug delivery, Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	PEG	Drug delivery, Encapsulation
Cartilage	ESCs	PEG	Drug delivery, Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	PVA	Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	PEG	Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	PEG	Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	PEG	Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	PEG-PLA-PVA [a]	Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	Alginate	Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	Collagen	Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	Collagen, HA	Encapsulation
Cartilage	Chondrocytes	PEG-PLA [a]	Encapsulation, Scaffold
Cartilage	MSCs	PEG	Encapsulation, Scaffold
Cartilage	Chondrocytes, MSCs	PEG	Encapsulation, Scaffold
Cartilage	Chondrocytes	PLLA [b], Agar, Gelatin	Encapsulation, Scaffold
Cartilage	Chondrocytes	HA, Collagen	Encapsulation, Scaffold
Cartilage	Chondrocytes	Fibrin	Encapsulation, Scaffold
Cartilage	Chondrocytes	SAP	Encapsulation, Scaffold
Cartilage/Bone	-	Alginate, HA	Bioreactor, Scaffold
Connective Tissue	Fibroblasts	HA	Encapsulation, Scaffold
ECM	Fibroblasts	HA, Chondroitin Sulfate, Gelatin	Encapsulation, Scaffold
Eye	-	HA	Barrier, Scaffold
Eye	-	PHEMA	Scaffold
Facial	Chondrocytes	Alginate	Encapsulation, Implant
Facial	-	HA	Space-Filler
Intraperitoneal	-	HA	Barrier
Intraperitoneal	-	PEG, PEG/PLA [a]	Barrier, Drug delivery
Intraperitoneal	-	PEG	Drug delivery
Neural	-	Collagen	Drug delivery
Neural	Neuroprogenitors	SAP	Entrapment, Scaffold
Neural	-	PHEMA-MMA	Scaffold
Pancreatic	Islet of Langerhans	PEG	Encapsulation
Pancreatic	Islet of Langerhans	PEG-PLA [a]	Encapsulation
Skeletal Muscle	Myoblasts	PHEMA	Scaffold
Skin	-	Chondroitin sulfate, HA	Barrier
Skin	-	Collagen	Drug delivery
Skin	-	Fibrin	Glue
Skin	Fibroblasts	HA	Scaffold
Spinal cord	-	PHEMA	Drug delivery, Scaffold
Spinal cord	Astroglial cells	Collagen	Encapsulation
Vascular	-	PEG	Barrier
Vascular	-	PEGDA	Drug delivery
Vascular	-	Alginate	Drug delivery
Vascular	-	Gelatin	Drug delivery
Vascular	-	HA	Drug delivery
Vascular	-	PEG	Drug delivery, Scaffold
Vascular	hESCs	HA	Encapsulation
Vascular	MSCs, Primary smooth muscle	PEG	Encapsulation
Vascular	Endothelial cells	P(PF-co-EG)	Encapsulation
Vascular	hESCs	Dextran	Encapsulation, Drug delivery
Vascular	Smooth muscle cells	PEG	Scaffold
Vascular	Endothelial cells	PEG	Scaffold
Vocal Cord	-	HA-Gelatin	Scaffold
Vocal Cord	-	Collagen, Alginate	Scaffold

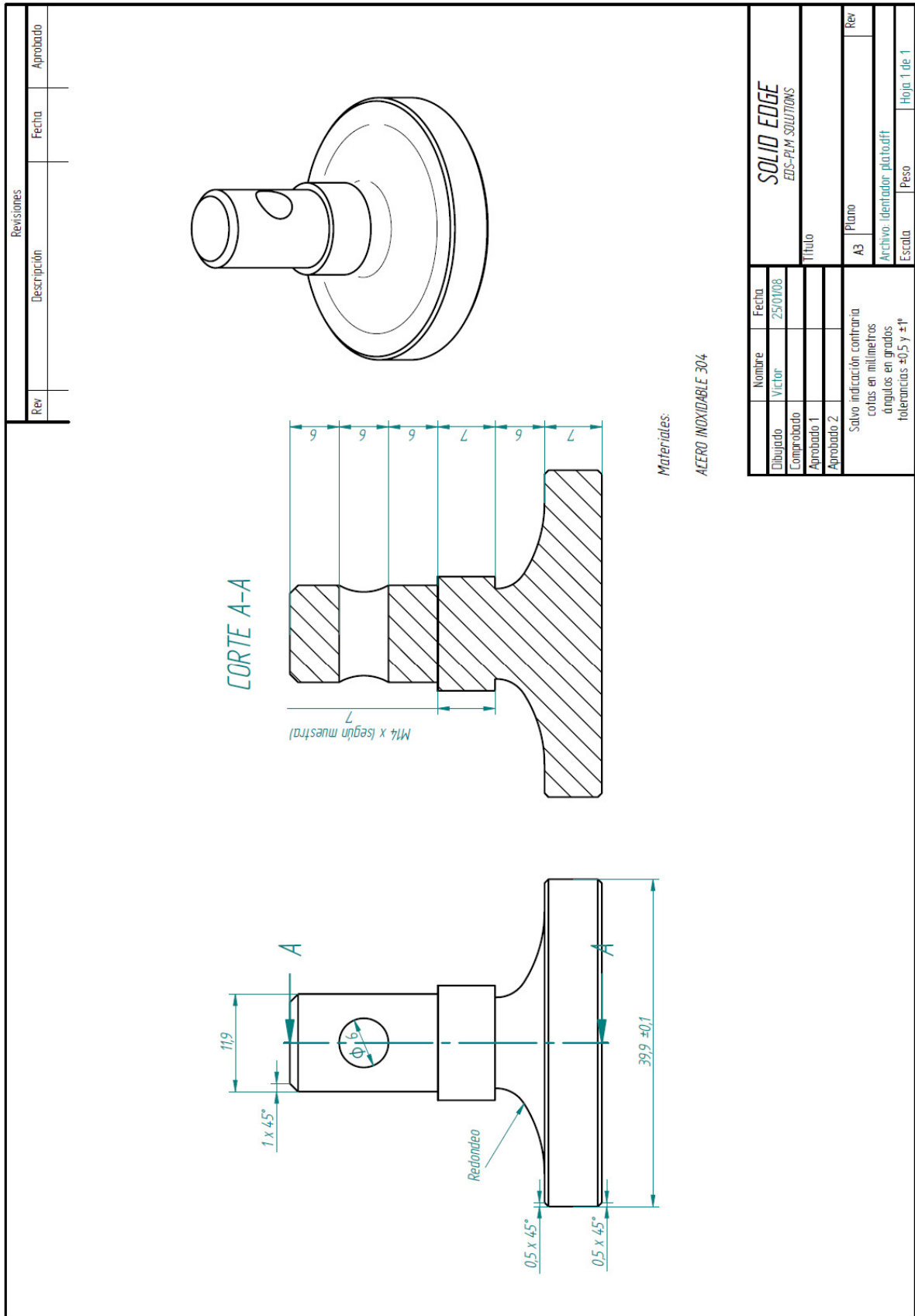
[a] PLA = poly(lactic acid). [b] PLLA = poly(L-lactic acid).

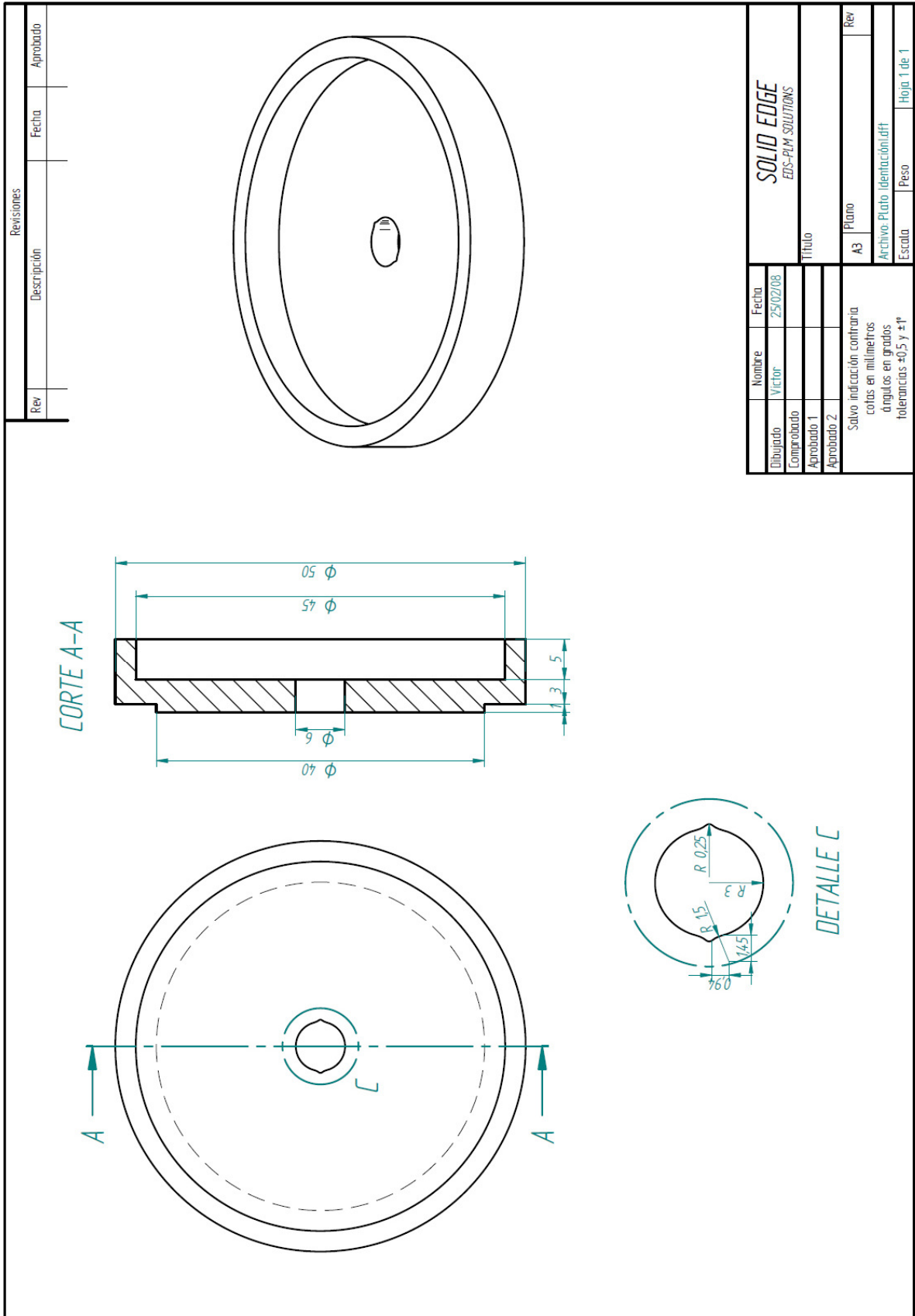
Anexo II

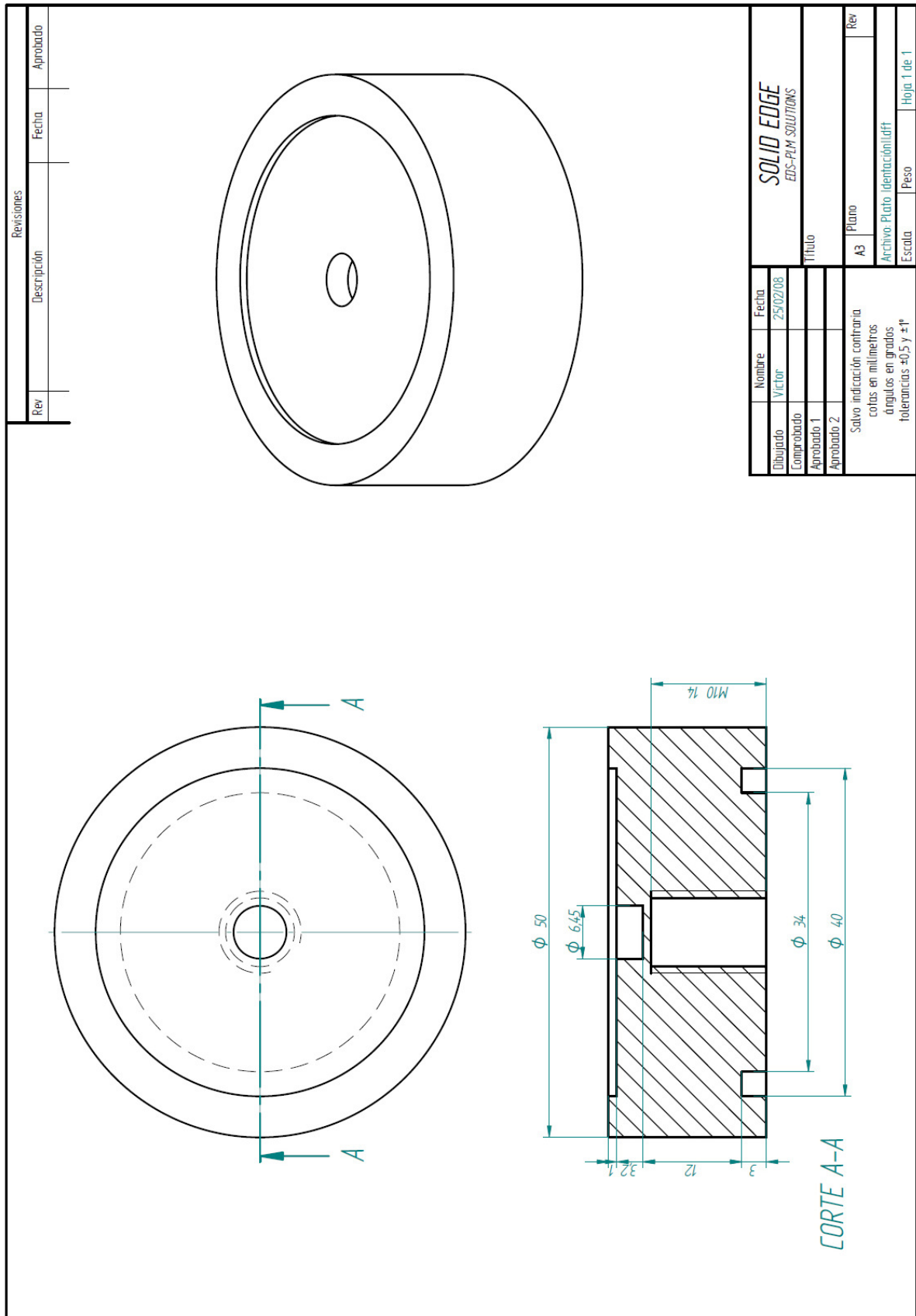
UTILLAJE EMPLEADO PARA LAS PRUEBAS DE COMPRESIÓN UNIAXIAL

A continuación se presentan los planos de diseño y fabricación del utillaje empleado en las pruebas de compresión uniaxial (confinada y no confinada) durante la fase experimental de los andamios estructurales:

1. Placa de compresión para ensayos de compresión no confinada.
2. Parte superior de la base para ensayos de compresión confinada en inmersión.
3. Parte inferior de la base para ensayos de compresión confinada en inmersión.







Anexo III

CODIGO DE MATLAB PARA EL PROCESAMIENTO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES DE LOS ENSAYOS DE COMPRESIÓN UNIAXIAL MONOTONICA

A continuación se presenta el ejecutable programado en MatLab® en el que de un archivo **xls* se leen los datos de salida proporcionados por la máquina de ensayos uniaxial, utilizada en la fase experimental del andamio estructural en pruebas de compresión uniaxial monotónica confinada y no confinada.

Los datos de salida para cada ensayo son el tiempo (s), el desplazamiento (mm) y la fuerza reportada por la célula de carga (N). Estos datos a su vez son la información de entrada del ejecutable.

El tratamiento de los datos determina la siguiente información de salida:

1. Tensiones σ (MPa).
2. Deformaciones ϵ .
3. La identificación del rango de mayor aproximación lineal sobre la primera sección de la curva de tensión-deformación.
4. El ajuste lineal por mínimos cuadrados para el rango identificado.
5. El cálculo de la pendiente sobre el ajuste lineal.
6. Los Módulos para cada uno de los diferentes tipos de ensayos valorados.
7. Gráficas ilustrativas de los resultados y un archivo **mat* en el que se guarda toda la información anteriormente expuesta.

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%CAPTURA DE DATOS DE LA INSTRON%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
%El programa lee el archivo (*.xls) generado a partir del archivo
%(*.csv) que entrega la Instron. De este, se seleccionan las columnas
%significativas de la toma de datos (Extensión y Carga). Sin embargo
%se pueden seleccionar las columnas que se requieran, Ej. Tiempo.
%
%Se eliminan datos erroneos, o que puedan causar ruido en el análisis
%de los mismos. Como resultado se obtienen unos datos depurados que se
%pueden considerar como el cero pieza de la muestra o probeta a
%valorar.
%Se debe incluir el nombre del archivo y su ruta de acceso en el PC
%Leer los datos del archivo como caracteres, y poner en la matriz
%(num) las columnas y filas seleccionadas del archivo de la Instron.

clc
clear all;
close all;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Nombres de los archivos y sus respectivas direcciones raiz%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
[num1,num1]=XLSREAD('GEL_0112_170112_CC_2.csv'); %CambiarDirección

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%PRIMERO%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%Reposicionar las columnas seleccionadas
for i=13:size(num1);
    EX1(i-12,1)=num1(i,2);
    CA1(i-12,1)=num1(i,4);
    TI1(i-12,1)=num1(i,1);
end

%Se convierten los caracteres en numeros
EXTENSION=str2double(EX1);
CARGA=str2double(CA1);
TIE1=str2double(TI1);

%Suavizado de datos
EXT1=smooth(EXTENSION,10,'rloess');
%Cambiar iteraciones para suavizar los valores de EXTENSION
CARGA1=smooth(CARGA,10,'rloess');
%Cambiar iteraciones para suavizar los valores de CARGA

%Determinar la diferencia de desplazamientos delta(L) "DESPLAZAMIENTO"
DESP1=EXT1(1,1)-EXT1;

%"DEFORMACION" a Compresion (epsilon)%
%al dividir, algunas veces hay que usar el comando ./
DEF1=DESP1/EXT1(1,1);

%Definicion de "LAMBDA" (lambda = espilon + 1)
LAM1=DEF1+1;

%Definicion de la "TENSION" (sigma = carga/area)
AREA=(str2double(num1(8,2)));
SIG1=CARGA1/AREA;

```



```

SM=SIG1;
EM=DEF1;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%Selección de la zona lineal y cálculo del Modulo Tangente%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
IY=find(EM>= 0.05 & EM<=0.1);
%Seleccionar Rango Lineal
EY=EM(IY);
SY=SM(IY);

Mt=(max(SY)-min(SY))/(max(EY)-min(EY))
%Módulo Tangente

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%Modulo Agregado a partir del ajuste lineal de datos obtenidos a
partir de la prueba de Compresión Confinada. "Ha"%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
ni=1;
%Ajuste Lineal por Mínimos Cuadrados
MC=polyfit(EY,SY,ni);
EQ=linspace(min(EY), max(EY), 10);
SQ=polyval(MC,EQ);

Ha=(SQ(8)-SQ(3))/(EQ(8)-EQ(3))
%Módulo Agregado (Ha)

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%Modelo NeoHookiano%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
SY1=SY-SY(1,1);
EY1=EY-EY(1,1);
RL=[EY, SY];
LM=EY1+1;
seed=[1];
stress=@(x) sum((x(1)*(2*LM-2./(LM.^2))-SY1).^2);
[C,Fval]=fminsearch(stress,seed);
sigma_fit=C*(2*LM-2./(LM.^2));
R=sigma_fit;

%Coeficiente de Correlación
CofC=corrcoef(SY1,sigma_fit);
CofR=CofC(1,2)

%Obtener "Nu" de la teoria de isotropia  $2C=E/(2(Nu+1))$ , con "E" valor
%experimental (pendiente)
Nu=(Ha/(4*C))-1

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%GRAFICAS%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
subplot(2,2,[1 3]);
plot(EM,SM,'k','LineWidth',2)
hold on
plot(EY,SY,'r','LineWidth',2)
xlabel('\epsilon'); ylabel('\sigma (MPa)');

```

```
title(sprintf('STRESS - STRAIN CURVE  CONFINED TEST'));
axis([min(EM) max(EM) min(SM) max(SM)])
hold off
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
subplot(2,2,[2 4]);
plot(EY,SY,'r','LineWidth',2.5)
hold on
plot(EQ,SQ,':','LineWidth',3)
xlabel('\epsilon'); ylabel('\sigma (MPa)');
legend('Linear Rank','Linear Fit');
title(sprintf('Aggregate Modulus - H_A (MPa) = %f   Tangent Modulus
(MPa)= %f',Ha,Mt));
axis([min(EY) max(EY) min(SY) max(SY)])
hold off
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%DATOS DE SALIDA%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
save GEL_0112_170112_CC_2 EM SM EY SY EQ SQ Ha Mt R Nu
%Cambiar numeracion DATOS CURVA #
```

Anexo IV

CODIGO DE MATLAB PARA EL PROCESAMIENTO DE DATOS EXPERIMENTALES DE LOS ENSAYOS DE COMPRESIÓN DE CARGA-RELAJACION

A continuación se presenta el ejecutable programado en MatLab® en el que de un archivo **xls* se leen los datos de salida proporcionados por la máquina de ensayos uniaxial, utilizada en la fase experimental del andamio estructural en pruebas de compresión confinada con una rampa carga-relajación.

Los datos de salida para cada ensayo son el tiempo (s), el desplazamiento (mm) y la fuerza reportada por la célula de carga (N). Estos datos a su vez son la información de entrada del ejecutable.

El tratamiento de los datos determina la siguiente información de salida:

1. Tensiones σ (MPa).
2. Deformaciones ϵ .
3. La identificación de los puntos de máxima relajación sobre la rampa impuesta en la curva de tensión-deformación.
4. El ajuste lineal por mínimos cuadrados para la curva formada por los puntos de máxima relajación.
5. El cálculo de la pendiente sobre el ajuste lineal.
6. Los Módulos para cada uno de los diferentes tipos de ensayos valorados.
7. Gráficas ilustrativas de los resultados y un archivo **mat* en el que se guarda toda la información anteriormente expuesta.

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%CAPTURA DE DATOS DE LA INSTRON%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
%El programa lee el archivo (*.xls) generado a partir del archivo
(*csv) que entrega la Instron. De este, se seleccionan las columnas
significativas de la toma de datos (Extensión y Carga). Sin embargo
se pueden seleccionar las columnas que se requieran, Ej. Tiempo.
%
%Se eliminan datos erroneos, o que puedan causar ruido en el análisis
de los mismos. Como resultado se obtienen unos datos depurados que se
pueden considerar como el cero pieza de la muestra o probeta a
valorar.
%Se debe incluir el nombre del archivo y su ruta de acceso en el PC
%Leer los datos del archivo como caracteres, y poner en la matriz
(num) las columnas y filas seleccionadas del archivo de la Instron.

clc
clear all;
close all;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Nombres de los archivos y sus respectivas direcciones raíz%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
[num1,num1]=XLSREAD('GEL_0112_130312_CC_3.csv'); %CambiarDirección
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%PRIMERO%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%Reposicionar las columnas seleccionadas
for i=13:size(num1);
    EX1(i-12,1)=num1(i,2);
    CA1(i-12,1)=num1(i,4);
    TI1(i-12,1)=num1(i,1);
end

%Se convierten los caracteres en numeros
EXTENSION=str2double(EX1);
CARGA=str2double(CA1);
TIE1=str2double(TI1);

%Suavizado de datos
EXT1=smooth(EXTENSION,5,'rloess');
%Cambiar iteraciones para suavizar los valores de EXTENSION
CARGA1=smooth(CARGA,5,'rloess');
%Cambiar iteraciones para suavizar los valores de CARGA

%Determinar la diferencia de desplazamientos delta(L) "DESPLAZAMIENTO"
DESP1=EXT1(1,1)-EXT1;

%"DEFORMACION" a Compresion (epsilon)%
%al dividir, algunas veces hay que usar el comando ./
DEF1=DESP1/EXT1(1,1);

%Definicion de "LAMBDA" (lambda = epsilon + 1)
LAM1=DEF1+1;

%Definicion de la "TENSION" (sigma = carga/area)
AREA=(str2double(num1(8,2)));
SIG1=CARGA1/AREA;

S1=[0;SIG1];

```

```

E1=[0;DEF1];

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Busqueda de Mínimos de Relajacion%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
CeroE=find((E1>=0.0511) & (E1<=0.0512));
% Rango del 0 minimo
EC=E1(CeroE);
SC=S1(CeroE);
DC=DESP1(CeroE);

Cero_Punto=min(SC);
Pos0=find(SC==Cero_Punto);
S_C=SC(Pos0);
E_C=EC(Pos0);
D_C=DC(Pos0);

IE=find((E1>=0.0852) & (E1<=0.08535));
% Rango del primer minimo
EI=E1(IE);
SI=S1(IE);

Primer_Punto=min(SI);
Pos1=find(SI==Primer_Punto);
S_I=SI(Pos1);
E_I=EI(Pos1);

IIE=find((E1>=0.1193) & (E1<=0.1195));
% Rango del segundo minimo
EII=E1(IIE);
SII=S1(IIE);

Segundo_Punto=min(SII);
Pos2=find(SII==Segundo_Punto);
S_II=SII(Pos2);
E_II=EII(Pos2);

IIIE=find((E1>=0.1535) & (E1<=0.1537));
% Rango del tercer minimo
EIII=E1(IIIE);
SIII=S1(IIIE);

Tercer_Punto=min(SIII);
Pos3=find(SIII==Tercer_Punto);
S_III=SIII(Pos3);
E_III=EIII(Pos3);

IVE=find((E1>=0.1876) & (E1<=0.1878));
% Rango del cuarto minimo
EIV=E1(IVE);
SIV=S1(IVE);

Cuarto_Punto=min(SIV);
Pos4=find(SIV==Cuarto_Punto);
S_IV=SIV(Pos4);
E_IV=EIV(Pos4);

```



```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Modelo NeoHookiano%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
SY1=SY-SY(1,1);
EY1=EY-EY(1,1);
RL=[EY, SY];
LM=EY1+1;
seed=[1];
stress=@(x) sum((x(1)*(2*LM-2./(LM.^2))-SY1).^2);
[C,Fval]=fminsearch(stress,seed);
sigma_fit=C*(2*LM-2./(LM.^2));
R=sigma_fit;

%Coeficiente de Correlación
CofC=corrcoef(SY1,sigma_fit);
CofR=CofC(1,2);
%Obtener "Nu" de la teoria de isotropia 2C=E/(2(Nu+1)), con "E" valor
%experimental (pendiente)
Nu=(Ha/(4*C))-1

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%GRAFICAS%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
subplot(2,2,[1 3]);
plot(E1,S1,'b','LineWidth',2)
hold on
plot(EM,SM,'r','LineWidth',2)
xlabel('\epsilon'); ylabel('\sigma (MPa)');
title(sprintf('STRESS - STRAIN CURVE CONFINED TEST'));
axis([min(E1) max(E1) min(S1) max(S1)])
hold off
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
subplot(2,2,2);
plot(EM,SM,'r','LineWidth',2.5)
hold on
plot(EY,SY,':','LineWidth',3)
xlabel('\epsilon'); ylabel('\sigma (MPa)');
legend('Linear Rank','Linear Fit');
title(sprintf('Aggregate Modulus - H_A (MPa) = %f',Ha));
axis([min(EM) max(EM) min(SM) max(SM)])
hold off
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
subplot(2,2,4);
plot(EM,SM,'r','LineWidth',2.5)
hold on
% plot(As,Bs,'g','LineWidth',2)
plot(At,Bt,'c','LineWidth',2)
xlabel('\epsilon'); ylabel('\sigma (MPa)');
legend('Linear Rank','Secant','Tangent');
% title(sprintf('Modulus _S_e_c = %f Modulus _T = %f',Msec, Mt));
axis([min(EM) max(EM) min(SM) max(SM)])
hold off
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%DATOS DE SALIDA%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%

```

```
save GEL_0112_130312_CC_3 E1 S1 EM SM EY SY Ha Mt R Nu First_Point  
Pre_Condition  
%Información que se debe guardar - Cambiar numeracion DATOS CURVA #
```


Anexo V

CODIGO DE MATLAB PARA EL PROCESAMIENTO DE DATOS EXPERIMENTALES DE PERMEABILIDAD PARA EL MATERIAL DE ESTUDIO

A continuación se presenta el ejecutable programado en MatLab® en el que de un archivo **xls* se leen los datos de salida proporcionados por la máquina de ensayos uniaxial, utilizada en la fase experimental del andamio estructural en pruebas de compresión confinada con una rampa carga-relajación.

Los datos de salida para cada ensayo son el tiempo (*s*) y la fuerza reportada por la célula de carga (*N*). Estos datos a su vez son la información de entrada para el ejecutable.

El tratamiento de los datos determina la siguiente información de salida:

1. La identificación de la curva de relajación correspondiente a los diferentes ciclos de la rampa impuesta, sobre la curva (fuerza – tiempo).
2. El ajuste exponencial por mínimos cuadrados para la curva de relajación identificada.
3. El cálculo del tiempo de relajación.
4. La permeabilidad.
5. Gráficas ilustrativas de los resultados y un archivo **mat* en el que se guarda toda la información anteriormente expuesta.

```

clc
clear all;
close all;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%Nombres de los archivos y sus respectivas direcciones raíz%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
[num1,num1]=XLSREAD('GEL_1012_150312_CC_2.csv'); %CambiarDirección

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%PRIMERO%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%Reposicionar las columnas seleccionadas
for i=13:size(num1);
    EX1(i-12,1)=num1(i,2);
    CA1(i-12,1)=num1(i,4);
    TI1(i-12,1)=num1(i,1);
end

%Se convierten los caracteres en numeros
EXTENSION=str2double(EX1);
CARGA=str2double(CA1);
TIE1=str2double(TI1);

%Suavizado de datos
EXT1=smooth(EXTENSION,2,'rloess');
CARGA1=smooth(CARGA,2,'rloess');
TIEM=smooth(TIE1,2,'rloess');

%Determinar la diferencia de desplazamientos delta(L) "DESPLAZAMIENTO"
DESP1=EXT1(1,1)-EXT1;

%"DEFORMACION" a Compresion (epsilon)%
DEF1=DESP1/EXT1(1,1);

%Definicion de la "TENSION" (sigma = carga/area)
AREA=(str2double(num1(8,2)));
SIG1=CARGA1/AREA;

S1=[SIG1];
E1=[DEF1];

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%Nombres de los archivo mat%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
EE=find((E1>=0.18) & (E1<=0.181));
%Cargar rango del ciclo de relajación
EF=E1(EE);
SF=S1(EE);
CF=CARGA1(EE);

MAX_C=max(CF);
%Máximo valor de carga
MIN_C=min(CF);
L=find(CARGA1==MAX_C);
Min=find(CARGA1==MIN_C);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%Zona de relajación%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
oo=1;
i=L;

while (i<=Min),
    TCARGA(oo,1)=CARGA1(i,1);
    oo=oo+1;
    i=i+1;
end

i=L;
kk=1;
while (i<=Min),
    TT(kk,1)=TIEM(i,1)-TIEM(L,1);
    kk=kk+1;
    i=i+1;
end

vv=1;
g=length(TCARGA);
for i=1:size(TCARGA);
    FF(vv,1)=TCARGA(i,1)-TCARGA(g,1);
    vv=vv+1;
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Rango de Equilibrio%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
TTT=find((TT>=0) & (TT<=1000));
RT=TT(TTT);
Fo=max(FF);

j=1;
h=1;
g=1;
v=1;
Fi=0;

for i=1:size(TT);
    if TT(i,1)<RT;
        F(j,1)=0;
        j=j+1;
    else TT(i,1)>=RT ;
        TT1(v,1)=TT(i,1);
        FF1(v,1)=FF(i,1);
        v=v+1;
    end
end

p=length(FF1);
FF1(p,1)=0.00001

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Ajuste exponencial%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
x=[TT1'];
y=[FF1'];

```

```

n=length(y);
sg=1;xn=x;yn=y;
m=1;
yn=log(y);

    for i=1:m+1
        for j=1:m+1
            sx(i,j)=sum(xn.^(i+j-2));
        end
        sy(i)=sum(yn.*xn.^(i-1));
    end

c=sx\sy';
xx=linspace(min(x),max(x));
yy=Fo*exp(c(2)*xx);
ya=Fo*exp(c(2)*x);

Tau=(1/c(2))*-1

%Calculo coeficiente correlacion
st=sum((y-mean(y)).^2);
sr=sum((y-ya).^2);
r=sqrt((st-sr)/st);

fprintf('\n Coeficiente de correlacion: r = %g \n',r);

load GEL_1012_150312_CC_2b
%Cargar Ha
Ha
TH=EXT1(1);
kk=(TH^2)/(Tau*(3.14^2)*Ha);
k=kk*1.0e-12
%Permeabilidad K

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%GRAFICAS%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
subplot(2,2,[1 3]);
plot(E1,S1,'b','LineWidth',2)
hold on
plot(EM,SM,'r','LineWidth',2)
xlabel('\epsilon'); ylabel('\sigma (MPa)');
title(sprintf('STRESS - STRAIN CURVE CONFINED TEST'));
axis([min(E1) max(E1) min(S1) max(S1)])
hold off
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
subplot(2,2,2);
plot(TIEM,CARGA1,'k','LineWidth',2.5)
xlabel('Time (S)'); ylabel('Force (N)');
title(sprintf('Force vs. Time'));
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
subplot(2,2,4);
plot(TT,FF,'k','LineWidth',3)
hold on
plot(x,y,'r','LineWidth',2)
plot(xx,yy,'.b','LineWidth',2);

```

```
xlabel('Time (S)'); ylabel('Force (N)');
title(sprintf('Tau (s) = %f    k = %f',Tau, k));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%DATOS DE SALIDA%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
save DATOS_k Tau k
%Información que se debe guardar - Cambiar numeracion DATOS CURVA #
```

