



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**PROPUESTA TEÓRICA DE UNA MALLA
ELECTROHILADA DE POLI (ϵ -CAPROLACTONA) Y
POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) (PCL-PLGA)
REFORZADA CON NANOPARTÍCULAS PROTEICAS
PARA MODULAR LA REPARACIÓN QUIRÚRGICA DE
TENDONES EN UN MODELO MURINO**

FRANCO MEZA SEPÚLVEDA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile

FONDECYT N°1211345
SANTIAGO, CHILE
AÑO 2023



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**PROPUESTA TEÓRICA DE UNA MALLA
ELECTROHILADA DE POLI (ϵ -CAPROLACTONA) Y
POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) (PCL-PLGA)
REFORZADA CON NANOPARTÍCULAS PROTEICAS
PARA MODULAR LA REPARACIÓN QUIRÚRGICA DE
TENDONES EN UN MODELO MURINO**

FRANCO MEZA SEPÚLVEDA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

Nota Final.....

Profesor Guía	ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO	Firma.....
Profesor Corrector	ADOLFO GODOY PINTO	Firma.....
Profesor Corrector	SERGIO BUCAREY VIVANCO	Firma.....

PROFESOR GUÍA: ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile

FONDECYT N°1211345
SANTIAGO, CHILE
AÑO 2023

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDOS	PÁGINAS
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISION BIBLIOGRAFICA	11
• TENDONES: LESIONES Y PROCESO RECUPERATIVO	11
• ELECTROSPINNING Y SUS APLICACIONES EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS	19
• ELECTROSPINNING: TENDONES	24
• BIOMATERIALES: PCL – PLGA	28
• SOYA: UN BIOPOLÍMERO NATURAL	34
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
RESULTADOS	49
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIÓN	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXO 1	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	11
Composición estructural y celular del tendón (Modificado de Lee, 2021).	
Figura 2	13
Estructura interna del tendón (Modificado de Liu <i>et al.</i> , 2008).	
Figura 3	13
Corte transversal del tendón. A) Cubierto con paratendón. B) Cubierto por una vaina (Modificado de Lee, 2021).	
Figura 4	15
Mecanismo de deformación mecánica del tendón (Modificado de Bianchi <i>et al.</i> , 2021).	
Figura 5	16
Etapas de regeneración del tendón (Modificado de Nichols <i>et al.</i> , 2019).	
Figura 6	17
Periodos y factores expresados en la curación del tendón (Modificado de Olivia <i>et al.</i> , 2011).	
Figura 7	19
Publicaciones anuales con “ELECTROSPINNING” como palabra clave entre los años 2000-2022 (Scopus, 2022).	
Figura 8	20
Equipo de electrospinning FLUIDNATEC® LE-10 (Laboratorio Polyforms – Universidad de Chile).	
Figura 9	20
A) SEM mallas aleatorias, B) SEM mallas alineadas. (A. Quian <i>et al.</i> , 2016; B. Bianchi <i>et al.</i> , 2022).	
Figura 10	22
Propiedades biológicas, mecánicas y fisicoquímicas de polímeros naturales y sintéticos (Modificado de Kai <i>et al.</i> , 2014).	
Figura 11	23
SEM de PCL al 5% disueltas en: A) ácido acético glacial, B) ácido acético al 90%, C) cloruro de metileno/DMF = 4/1. (Haider <i>et al.</i> , 2018).	
Figura 12	25
Características de un andamio para uso clínico en tendones (Modificado de Ruiz-Alonso <i>et al.</i> , 2021).	
Figura 13	27
Área de adhesión tendinosa (cm ²) 3 semanas después de la cirugía de tendón (Song <i>et al.</i> , 2015).	
Figura 14	28
Publicaciones anuales con “PCL” AND “POLYMER” como palabras claves entre los años 2000-2022. (Scopus, 2022).	
Figura 15	29
Estructura química de PCL (Pereira <i>et al.</i> , 2020).	
Figura 16	30

Proceso de degradación de un polímero reabsorbible como PCL. (Woodruff y Hutmacher, 2010).	
Figura 17	30
Degradación de PCL (Modificado de Woodruff y Hutmacher, 2010).	
Figura 18	31
Publicaciones anuales con “PLGA” AND “POLYMER” como palabras claves entre los años 2000-2022. (Scopus, 2022).	
Figura 19	33
Hidrolisis de PLGA (Modificado de Makadia y Siegel, 2011)	
Figura 20	35
Dimensiones y tipos de productos derivados de proteína de soya (Modificado de Jayakumar <i>et al.</i> , 2022).	
Figura 21	36
Imágenes SEM de PHB. A) y B) fibras sin reforzar; C) y D) fibras reforzadas con NPP de soya (Du <i>et al.</i> , 2021).	
Figura 22	42
Esquema de formación de mallas reforzada con NPP de soya (modificada de Du <i>et al.</i> , 2021).	
Figura 23	45
Ejemplo, Placa 1 (100PCL): 24 muestras de “Malla 1” (estrellas azules), 24 muestras de “Malla 4” (estrellas negras), 24 muestras de “Malla 7” (estrellas amarillas), 24 muestras de “Malla 10” (estrellas rojas) (Laboratorio Polyforms – Universidad de Chile).	
Figura 24 (G1-G3)	48
1° Tendón de Aquiles en condiciones normales, 2° Se genera la rotura del tendón por aplastamiento, 3° el tendón queda dividido en 2 segmentos, 4°se procede a implantar en entre las fibras rotas del tendón una malla electrohilada cargada con MSC diferenciadas, 5° una vez sobrepuesta la malla se procederá a fijar y unir ambas partes del tendón mediante una tenorrafia clásica, 6° otra malla del mismo grupo recubriendo la zona para evitar posibles adherencias. (Elaboración propia).	
Figura 25	50
Diagrama de Flujo PRISMA (modificado de Page <i>et al.</i> , 2021).	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	12
Comparación de los principales tipos de colágeno del tendón (Ross y Pawlina, 2013; Lim et al., 2019; Lee, 2021).	
Tabla 2	17
Función de los factores expresados durante la curación del tendón (Chan <i>et al.</i> , 1997; Batten <i>et al.</i> , 1996; Kovacevic y Rodeo, 2008; Erlacher <i>et al.</i> , 1998; Klein <i>et al.</i> , 2002; Trippel <i>et al.</i> , 1993; Bidder <i>et al.</i> , 2000).	
Tabla 3	21
Parámetros de electrohilado y sus efectos en la morfología de las fibras (Bhardwaj y Kundu, 2010; Hassan y Anke, 2020).	
Tabla 4	32
Variaciones en la estructura de PLGA según proporción y peso molecular (Stromberg <i>et al.</i> , 2021; Kapoor <i>et al.</i> , 2015).	
Tabla 5	34
Composición de los diferentes productos a partir de la proteína de soya (Tian <i>et al.</i> , 2018).	
Tabla 6	39
Fabricación de 12 mallas electrohiladas y su composición (Elaboración propia).	
Tabla 7	40
Parámetros solución y electrohilado (Modificado de Boncu <i>et al.</i> , 2020 y de Han <i>et al.</i> , 2022).	
Tabla 8	41
Mallas electrohiladas reforzadas y no reforzadas con NPP de soya (Elaboración propia).	
Tabla 9	46
Secuencias de cebadores qPCR (Chen <i>et al.</i> , 2015).	
Tabla 10	51
Factor de impacto de las revistas utilizadas (Scimago Journal & Country Rank, 2022).	
Tabla 11	54
Indicadores de impacto productivo de los autores referenciales (Scopus, 2022).	

RESUMEN

Las lesiones que implican roturas de tendones son hoy en día un problema para humanos y animales, quienes ven limitadas sus capacidades físicas a raíz de un ineficiente proceso recuperativo posterior a una cirugía reconstructiva clásica, con gran cantidad de recaídas de la lesión, es por esto, que nuevas áreas han intentado buscar una solución real a esta problemática, una de ellas es la ingeniería de tejidos basada en mallas electrohiladas poliméricas con resultados alentadores a nivel biológico pero, aún no concluyentes para una aplicación clínica masiva dado principalmente por los problemas mecánicos y estructurales que poseen las distintas mallas.

A partir de esta problemática, se ha propuesto realizar una revisión bibliográfica exhaustiva a partir de fuentes de información confiables, en búsqueda de aquellos materiales y técnicas que permitan fabricar una propuesta teórica de creación de mallas electrohiladas por la tecnología del electrospinning (ES), que puedan ser utilizadas en la resolución quirúrgica de tendones posterior a una cirugía reconstructiva.

De esta búsqueda se concluyó que la poli (ϵ - caprolactona) (PCL) y el poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) poseen características que permiten lograr este objetivo, pero aún con limitantes como, por ejemplo, su capacidad de hidratación y características mecánicas, es por esto que, aprovechando las propiedades de estos materiales se ha propuesto un refuerzo que pueda solucionar o mejorar estas condicionantes. Es en este sentido, las nanopartículas proteicas (NPP) de soya aparecen como una alternativa, ya que han demostrado poder adherirse a la superficie de las fibras mejorando sus propiedades físicas y biológicas.

Posterior al análisis de toda esta información se propone la creación de mallas electrohiladas en base a PCL-PLGA reforzadas con NPP de soya. Para lograr este objetivo de, modular las reparaciones quirúrgicas en tendones mediante el uso de mallas electrohiladas, se destaca la búsqueda de información referente al uso de pruebas morfológicas, moleculares, funcionales y biológicas a estas mallas, con protocolos *in vitro* e *in vivo* basado en un modelo murino, al cual se le induce una lesión por aplastamiento en su tendón calcáneo para el análisis de estas mallas, y así conocer de qué manera afectó su presencia.

Palabras clave: “*electrospinning*”, “*biomaterials*”, “*tendon*”, “*polycaprolactone*”, “*poly (lactic-co-glycolic acid)*”, “*nanoparticles*”, “*soy*”.

ABSTRACT

Injuries that involve tendon ruptures are today a problem for humans and animals, who see their physical capacities limited because of an inefficient recovery process after classic reconstructive surgery, with numerous relapses of the injury, for this reason, that new areas have tried to find a real solution to this problem, one of which is tissue engineering based on polymeric electrospun meshes with encouraging results at a biological level but still inconclusive for a massive clinical application, mainly due to the mechanical and structures that the different meshes have.

Based on this problem, it has been proposed to perform an exhaustive bibliographical review from reliable information sources, in search of those materials and techniques that allow the manufacture of a theoretical proposal for creating electrospun meshes, which can be used in the surgical resolution of tendons after reconstructive surgery.

From this search, it was concluded that poly (ϵ -caprolactone) (PCL) and poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) have the essential characteristics to achieve this goal, but still with limitations such as, for example, their hydration capacity and mechanical characteristics, which is why, taking advantage of the properties of these materials, a reinforcement has been proposed that can solve or improve these conditions. In this sense, soybean protein nanoparticles (NPP) appear as an alternative since they can adhere to the surface of fibers, improving their physical and biological properties.

After the analysis of all this information, the creation of electrospun meshes based on PCL-PLGA reinforced with soybean NPP is proposed. To achieve the objective of modulating surgical repairs in tendons by using electrospun meshes, the search for information regarding the use of morphological, molecular, functional and biological tests on these meshes is highlighted, with in vitro and in vivo protocols based on a murine model, which is induced a crush injury in its calcaneal tendon for the analysis of these meshes, and thus know how its presence affected.

Keywords: “*electrospinning*”, “*biomaterials*”, “*tendon*”, “*polycaprolactone*”, “*poly (lactic-co-glycolic acid)*”, “*nanoparticles*”, “*soy*”.

INTRODUCCIÓN

Los tendones son tejidos especializados capaces de comunicar músculo con hueso, transmitiendo la energía necesaria para permitir el desplazamiento de los animales. Como todos los tejidos, puede lesionarse, la diferencia es que el proceso de curación natural del tendón es en extremo ineficiente, esto está dado por su estructura interna, de gran matriz extracelular (MEC) provista en su mayoría de fibras de colágeno tipo I ordenadas y escasa celularidad (Ross y Pawlina, 2013), con una fisiología reconstructiva carente de este componente principal y reemplazándolo principalmente por colágeno tipo III, de estructura desordenada y menos laxa, limitando su funcionalidad y capacidad original (Oliva *et al.*, 2011).

Independientemente de la especie, las lesiones que resultan en una ruptura parcial o total de los tendones pueden ser causadas por un daño degenerativo en el tiempo o un esfuerzo que provoque un alargamiento excesivo por parte de los tendones. Actualmente no existe un tratamiento definitivo que puede hacer que un tendón dañado sea capaz de transferir fuerza, almacenar energía, junto con poseer la misma resistencia y elasticidad que un tendón sano (Russo *et al.*, 2022). Si bien enmascaran la presentación de la patología y alivian los síntomas, los tratamientos no curan la afección en su totalidad. Como resultado, la falta de tratamientos efectivos intensifica el enfoque en alternativas que impliquen la búsqueda de soluciones efectivas en este campo (Vigano *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2021; Izumi *et al.*, 2021; Dehghani y Rodeo, 2019).

Es en este sentido que técnicas de nanofabricación de materiales terapéuticos han alcanzado un gran interés como la técnica denominada electrospinning (ES). La ES es una técnica muy versátil que utiliza un campo eléctrico que permite fabricar fibras poliméricas electrohiladas, y que posee una gran variedad de aplicaciones como son encapsulación y liberación controlada de fármacos, procesos de filtración, almacenamiento de energía, usos biológicos, médicos, etc. Dependiendo de la aplicación y tipo de material, este proceso de electrohilado permite crear estructuras fibrilares unidimensionales (1D) o matrices (andamios) tridimensionales (3D), los cuales ofrecen una mayor superficie de contacto, porosidad y estabilidad (Badmus *et al.*, 2021). Con aplicaciones en ingeniería de tejidos, modulando respuestas en cicatrización de heridas (Guo *et al.*, 2022), cartílagos (Badmus *et al.*, 2021), tejido cardiovascular (Maleki *et al.*, 2022), tejido óseo (Sadeghzadeh *et al.*, 2022), tendones (Peters *et al.*, 2022), entre otros. Si bien, se han

utilizado andamios fibrilares 3D de origen natural y sintético como apoyo para la reparación de lesiones de los tendones con buenos resultados biológicos, estos no han logrado tener la resistencia y fuerza necesaria para ser una solución primaria real a estos problemas debido a que las fuerzas de tracción superan a las máximas de los andamios (Pien *et al.*, 2021). Lo anterior, principalmente porque cada polímero utilizado tiene sus propias propiedades físicas y mecánicas, ejemplo de algunos materiales poliméricos usados son quitosano, la poli (ϵ -caprolactona) (PCL), el poli (ácido l -láctico), el poli (ácido láctico-*co*-glicólico) (PLGA), el poliuretano o la seda, etc. Otro aspecto de importancia es la topografía de la malla fibrilar y los parámetros de electrohilado que irán variando según el objetivo de estudio (Bianchi *et al.*, 2021).

De acuerdo a estos antecedentes descritos, la presente Memoria de Título corresponde a una revisión bibliográfica actualizada sobre el uso de mallas electrohiladas en base a PCL y PLGA reforzadas con nanopartículas proteicas (NPP) de soja, en la reparación de lesiones tendinosas posterior a una cirugía reconstructiva, para esto se considerarán aspectos biomecánicos de los actuales andamios obtenidos mediante ES en tendones. Se describe un modelo de fabricación de mallas reforzadas junto con la descripción de técnicas que permitan conocer sus estructuras y morfología. Además, un modelo experimental *in vitro* que permita evaluar biológicamente la respuesta de las mallas fibrilares propuestas y un modelo *in vivo* para su evaluación clínica modulando reparaciones quirúrgicas de tendones utilizando un modelo murino.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

TENDONES: LESIONES Y PROCESO RECUPERATIVO

Conformación del tendón

El tendón es el tejido que comunica músculo y hueso, cuya conformación estructural y mecánica es esencial para los movimientos funcionales de los animales y humanos (Ross y Pawlina, 2013). Es un tejido conectivo conformado por fibroblastos especializados, llamados tenocitos, los cuales expresan genes marcadores tendinosos comunes como el factor de transcripción escleraxis (SCX) o la glicoproteína transmembrana tenomonulina (TNMD) (Nichols *et al.*, 2019) que se encuentran inmersas en este tejido, compuesto en un 80% por una MEC y un 20% células (Figura 1) (Lee, 2021). La MEC corresponde a la principal red de comunicación, nutrición, sostén mecánico y estructural de las células que conforman el tejido conjuntivo (Ross y Pawlina, 2013). La MEC del tendón está compuesta en su gran mayoría por colágeno tipo I, mientras que el colágeno tipo III, glucosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas, entre otros, conforman el resto de la estructura (**Tabla 1**) (Lee, 2021). Estos componentes contribuyen al mecanismo de movilidad del tejido influyendo en la transmisión de fuerza, hidratación y estabilidad del tejido (Lim *et al.*, 2019).

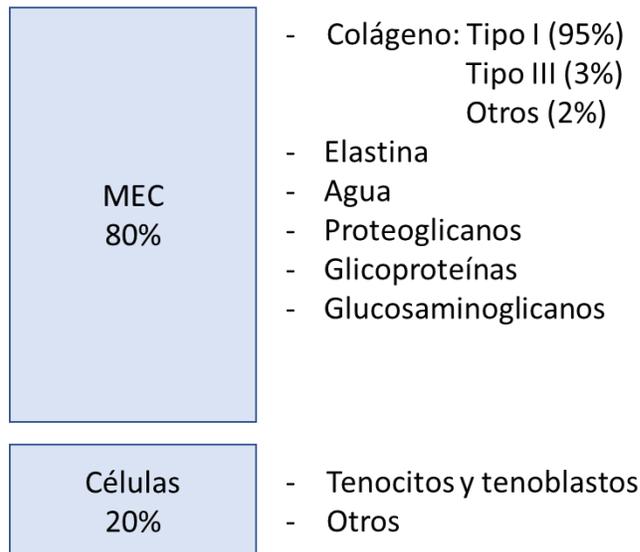


Figura 1: Composición estructural y celular del tendón
Fuente: Modificado de Lee, 2021.

Tabla 1: Comparación de los principales tipos de colágeno del tendón

Colágeno Tipo I	Colágeno Tipo III
Cantidad relativa	
95%	3%
Ubicación principal	
Piel, huesos, tendones, ligamentos, dentina y fascias orgánicas	Musculo liso, vasos sanguíneos, tejido conjuntivo laxo de útero, hígado, bazo, riñón, pulmón, etc.
Función especializada	
Provee resistencia al estiramiento, tensiones y fuerza a los tejidos	Provee de sostén estructural a células y resistencia al tejido conjuntivo laxo

Fuente: Ross y Pawlina, 2013; Lim *et al.*, 2019; Lee, 2021.

Las fibras de colágeno de los tendones poseen características anisotrópicas con diámetros de 1 – 20 μm , dispuestas de forma ordenada con una orientación paralela entre ellas (**Figura 2**), poseen capacidad de estirarse o reorientarse según sea la carga (Fratzl, 2008), precisamente la resistencia mecánica de los tendones se asocia esta disposición ordenada de las fibras de colágeno (Lim *et al.*, 2019). Una capa delgada de tejido conectivo conocida como endotendón conecta grupos de fibras en fascículos, lo que permite que estas se deslicen de forma independiente, creando una vía para que los vasos sanguíneos y los nervios penetren en el parénquima del tendón, proporcionando nutrición e inervación al tejido (Ross y Pawlina, 2013), dejando por fuera al epitendón y paratendón que es el tejido extrasinovial que se encarga de proteger al tendón y permite el movimiento deslizante total como lo es, por ejemplo, el tendón calcáneo (**Figura 3a**) (Lim *et al.*, 2019). Otros tendones con más roce como los flexores de la mano del humano, poseen una vaina que rodea al tendón con una función análoga al paratendón la cual posee una superficie visceral interna y parietal externa separadas por líquido sinovial (**Figura 3b**). La inervación está dada por una red periférica que parte en el paratendón y va irrigando internamente al tendón pasando por el epitendón y endotendón, dentro del endotendón pequeños vasos sanguíneos corren paralelos a los fascículos formando anastomosis entre ellos, permitiendo la nutrición por difusión hacia las zonas más internas del tendón (Lee, 2021).

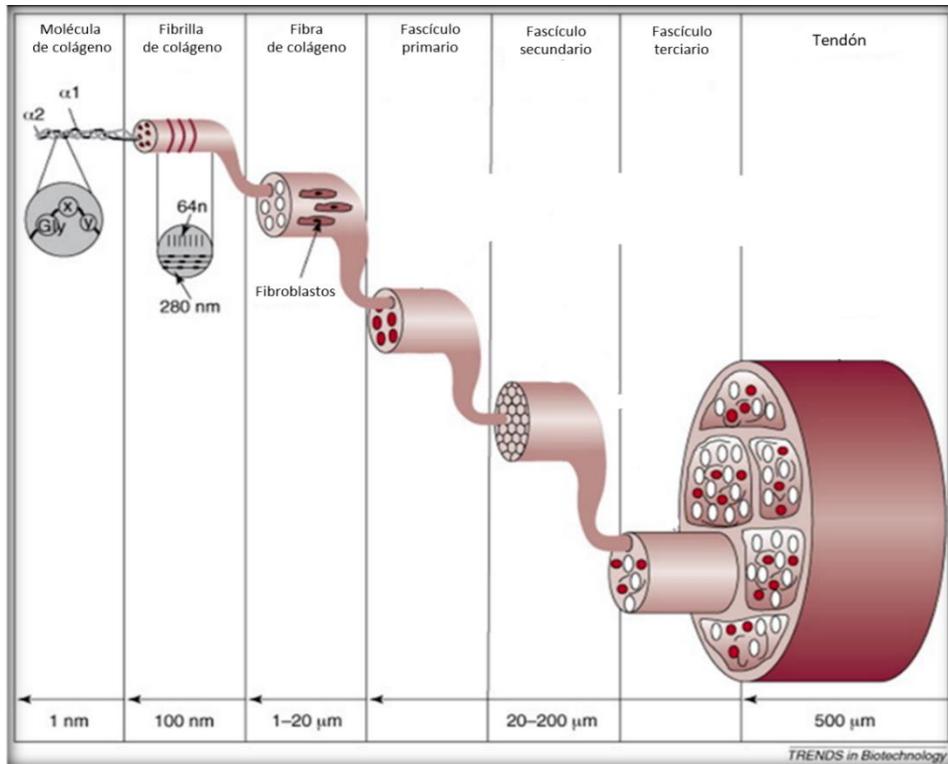


Figura 2: Estructura del tendón.
Fuente: Modificado de Liu *et al.*, 2008.

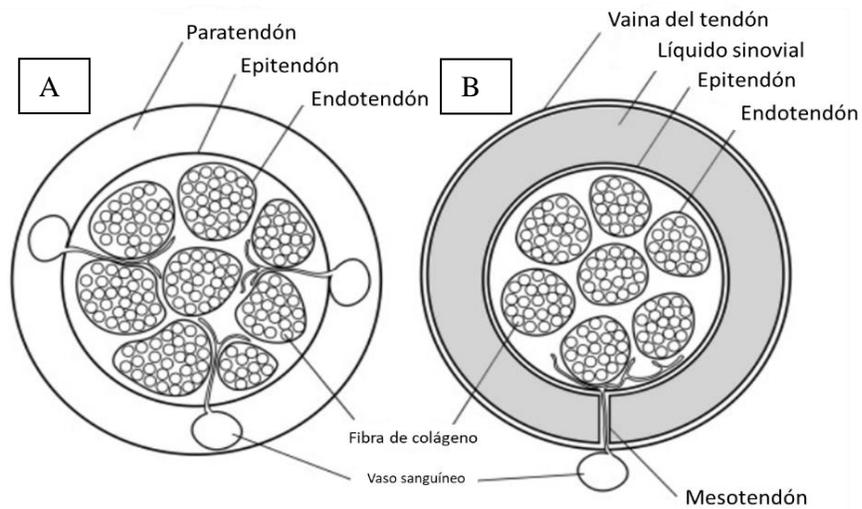


Figura 3: Corte transversal del tendón. A) Cubierto con paratendón. B) Cubierto por una vaina.
Fuente: Modificado de Lee, 2021.

Lesión del tendón

El tratamiento de lesiones tendinosas forman parte de las necesidades insatisfechas existentes en la medicina actual siendo más frecuentes en mamíferos atléticos como humanos y caballos (Patterson-Kane *et al.*, 2012), las cuales son a menudo desgastantes, dolorosas y con altas tasas de recurrencia de lesiones, dado principalmente por curaciones prolongadas ineficientes (Banik *et al.*, 2016). Estas lesiones pueden implicar desde, inflamaciones hasta la rotura parcial o total del tendón, alterando su integridad y conduciendo a una pérdida del movimiento y la actividad mecánica propia del individuo (Yu *et al.*, 2022).

La transmisión de fuerza desde los músculos a los tendones, la tensión muscular y la resistencia del tendón deben permanecer constantes a lo largo de la vida, es aquí donde las propiedades mecánicas de los tendones están relacionadas al diámetro de las fibras de colágeno, ya que las fibras de mayor diámetro son más fuertes y resistentes a las fuerzas de tracción, mientras que las de menor diámetro son más elásticas (Bianchi *et al.*, 2021). De acuerdo con la gravedad del daño de la matriz causado una hiperextensión del tendón, existen tres categorías principales: **Grado I**, que implica el estiramiento de las fibras junto con una inflamación local leve y la recomendación de terapias conservadoras, **grado II**, referidas a un desgarro o ruptura parcial del tendón, que puede detectarse por dolor e inflamación localizados. Se recomienda un tratamiento conservador o quirúrgico en función de los resultados de una evaluación clínica y las lesiones de **grado III**, que son desgarros o roturas completas, que restringen la función mecánica y exigen una reconstrucción quirúrgica. (Ekwueme *et al.*, 2017). La propiedad viscoelástica del tendón le permite recuperar su forma al momento de quitar una carga sobre él, de la misma forma, a medida que aumenta el estrés, aumenta la curva tensión-deformación, llegando a un punto donde las lesiones pueden pasar de una rotura parcial a una total (Ruiz-Alonso *et al.*, 2021).

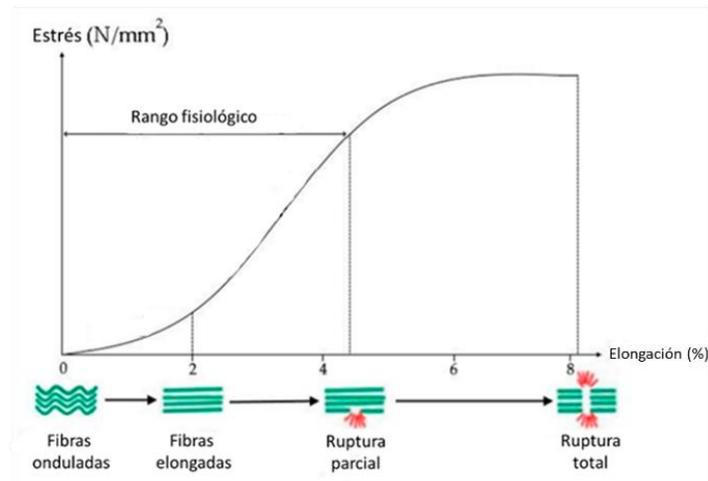


Figura 4: Mecanismo de deformación mecánica del tendón.
Fuente: Modificado de Bianchi *et al.*, 2021.

El microdaño celular que se desarrolla con el tiempo como resultado de la hipertermia que experimentan los tenocitos durante la actividad deportiva, es otra causa común de rotura de tendones, donde el sistema vascular es ineficaz en la disipación de la energía interna, por ejemplo, el núcleo del tendón flexor digital superficial (TFDS) de un caballo al galope registra temperaturas entre 43 °C y 45 °C, estas temperaturas están por encima del umbral de viabilidad celular, con niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocado por la hipoperfusión, reperfusión e hipertermia, poniendo en riesgo al tendón a una falla mecánica (Patterson-Kane *et al.*, 2012). Exposiciones de tenocitos a 43 °C por 30 minutos inducen la muerte de una pequeña parte de ellos y aumenta la expresión de genes catabólicos y proinflamatorios de las células restantes (O’Brien *et al.*, 2021).

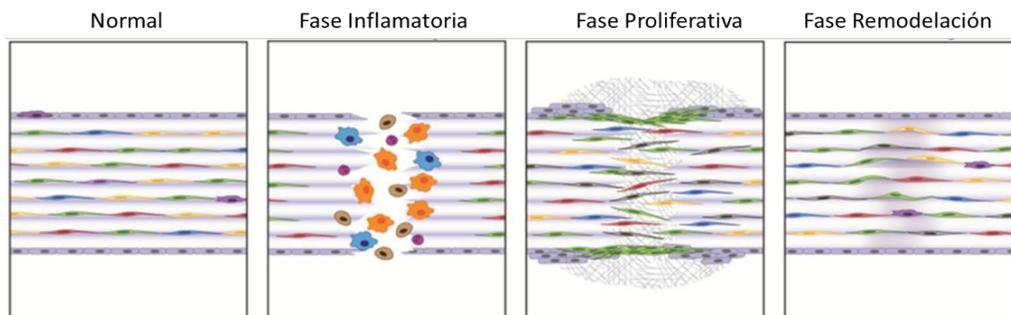
Estos problemas ocurren frecuentemente durante el entrenamiento, por un incorrecto programa de acondicionamiento físico (Castejón-Riber *et al.*, 2017), en donde tiempos insuficientes de recuperación con cargas repetidas, sumado a factores individuales como la especie, edad o la raza vuelven más susceptible al tendón a sufrir lesiones (O’Brien *et al.*, 2021). Otro factor a tener en consideración es el genético, estudios respaldan las asociaciones entre polimorfismos de genes independientes como el colágeno tipo V-A1 que participa en la organización de la matriz y en la regulación del tamaño de las fibras con la lesión y ruptura de tendones (Vaughn *et al.*, 2017). A pesar de que estas lesiones pueden ocurrir en cualquier tendón, aquellos que soportan grandes cargas, almacenan y transmiten energía se ven afectados con mayor frecuencia como lo es, por ejemplo, el

tendón calcáneo (Bottagisio y Lovati, 2017), lesiones que requieren intervención quirúrgica de este tejido corresponden a 18 por cada 100.000 personas al año en Estados Unidos (Raikin *et al.*, 2013).

Curación del tendón

Cuando existe una lesión posteriormente ocurre un proceso de regeneración, el que se divide en tres etapas (**Figura 5**), que incluye la expresión de distintos factores según el periodo (**Figura 6**) en que se encuentre: 1) Inflamación, 2) Proliferación y 3) Remodelación (Bosch *et al.*, 2011). La inflamación es la primera fase posterior a una lesión del tendón, posee una duración aproximada entre los 3 y los 7 días, en la cual se liberan gran cantidad de factores de la respuesta inflamatoria que estimulan una respuesta angiogénica futura como lo son neutrófilos, monocitos, macrófagos junto con la proliferación de fibroblastos y tenocitos (**Tabla 2**) (Lee, 2021). La segunda fase, proliferación, ocurre entre la tercera y cuarta semana, aquí disminuye la cantidad de factores, pero hay un aumento en la celularidad, fibroblastos principalmente, junto con la síntesis de depósitos aleatorios de colágeno tipo III principalmente, que van modulando este proceso de reparación (Oliva *et al.*, 2011). La remodelación es la tercera fase y última etapa, esta se descompone a su vez en consolidación y maduración. En la consolidación, los tenocitos y las fibras de colágeno se alinean a lo largo del eje longitudinal del tendón, paralelamente disminuye la celularidad mientras que aumenta la producción de colágeno tipo I. La maduración es la etapa final, que puede llevar mucho más tiempo, incluso años, el tejido cicatricial comienza a parecerse histológicamente al tendón sano a medida que madura. Aunque, el tendón recuperado tiene características biomecánicas más débiles, dado por la menor cantidad de enlaces cruzados y menor diámetro de las fibras de colágeno, haciéndolo más propenso a sufrir daños (Ruiz-Alonso *et al.*, 2021).

Figura 5: Etapas de regeneración del tendón



Fuente: Modificado de Nichols *et al.*, 2019

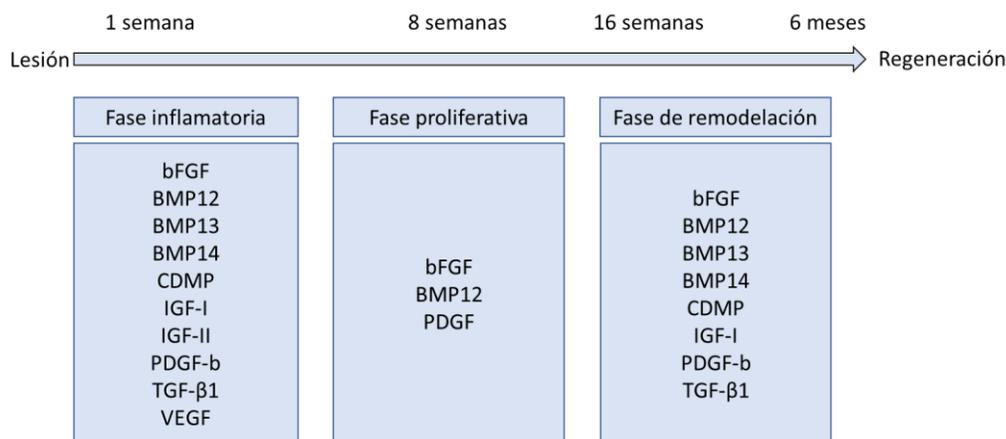


Figura 6: Periodos y factores expresados en la regeneración del tendón

Fuente: Modificado de Olivia *et al.*, 2011

Tabla 2: Función de los factores expresados durante la regeneración del tendón

Factor	Nombre	Función	Referencia
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico	Angiogénesis y mitogénesis de fibroblastos, cicatrización de heridas	Chan <i>et al.</i> , 1997
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Induce la quimiotaxis de fibroblastos y síntesis de colágeno	Batten <i>et al.</i> , 1996
BMP	Proteínas morfogenéticas óseas	Estimulan la formación ósea, mitogénesis de células tendinosas y cicatrización del tendón aumentando la expresión de elastina y colágeno	Kovacevic y Rodeo, 2008
CDMP	Proteínas morfogenéticas derivadas del cartílago	Forman parte del desarrollo embrionario del esqueleto, morfogénesis articular y formación de los tendones	Erlacher <i>et al.</i> , 1998
TGFβ	Familia del factor de crecimiento transformante β	Estimula la mitogénesis tendinosa y la producción de proteínas de la MEC y aumentan la producción de colágeno tipo I y III.	Klein <i>et al.</i> , 2002
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina	Estimula la síntesis de colágeno y células tendinosas	Trippel <i>et al.</i> , 1993
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	Promueve a angiogénesis y aumenta la permeabilidad capilar	Bidder <i>et al.</i> , 2000

Fuente: Chan *et al.*, 1997; Batten *et al.*, 1996; Kovacevic y Rodeo, 2008; Erlacher *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2002; Trippel *et al.*, 1993; Bidder *et al.*, 2000.

Posterior a una cirugía de reconstrucción, la reparación del tendón ocurre por la formación de un tejido cicatricial, el cual es funcionalmente deficiente en comparación a la capacidad que posee un tendón normal (Alves *et al.*, 2011). Esto está dado por una escasa celularidad en relación a la gran MEC que posee el tendón, con fibras donde circulan escasos vasos sanguíneos que limitan la llegada de nutrientes, enzimas y mediadores de la inflamación necesarios para el mecanismo de recuperación del tejido (Bosch *et al.*, 2011). En donde el tendón es provisto de colágeno tipo III con una matriz fragmentada y una arquitectura desorganizada que, si bien, proporciona cierto nivel de estabilidad al tejido, este carece de aquella integridad mecánica previa a la lesión. A esto se le suma las complicaciones quirúrgicas en la cicatrización dado por la formación de adherencias fibrosas entre el tendón, la vaina y los tejidos adyacentes limitando el éxito del procedimiento (Lee, 2021), por lo que actualmente los objetivos terapéuticos en roturas de tendones son: 1) Promover la verdadera regeneración del tejido tendinoso fuera de una cicatriz fibrosa limitada, 2) Impedir el desarrollo de adherencias peritendinosas en los pacientes (Nichols *et al.*, 2019). Todo lo anterior, explica en parte por qué, por ejemplo, en humanos complicaciones relacionadas a nuevas rupturas del tendón del manguito rotador posterior a cirugías de reconstrucción oscilaron entre el 11,4 y 94% (Lim *et al.*, 2019).

Hoy independiente de la especie no existe un tratamiento concluyente para restaurar la funcionalidad de un tendón dañado capaz de transmitir fuerza, almacenar energía y mantener similar capacidad de resistencia y elasticidad que un tendón normal (Russo *et al.*, 2022), medidas actuales incluyen antiinflamatorios, fisioterapia, cirugías y otros procedimientos como el uso de células madre, plasma rico en plaquetas (PRP), injertos o autoinjertos (Pietschmann *et al.*, 2013; Shojaee y Parham, 2019; Bottagisio y Lovati, 2017). Cuando se trata de autoinjertos, estos han demostrado ser una alternativa exitosa donde, se toma tejido de otra parte del cuerpo para reponerlo en el tejido lesionado en una cirugía reconstructiva, con la gran ventaja de evitar el rechazo por parte del organismo. Sus principales inconvenientes son las limitaciones funcionales del tejido donante, la cantidad limitada de tejido que se puede extraer y la ubicación no anatómica con el tejido lesionado (Lim *et al.*, 2019).

ELECTROSPINNING Y SUS APLICACIONES EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

Generalidades

La nanotecnología es uno de los campos más estudiados en el desarrollo de la ciencia y la tecnología, trabajando el comportamiento de materias en rangos dimensionales de 0,1 a 100 nm (Li *et al.*, 2021). Es por esta razón que el interés de utilizar la ES como una metodología de nanofabricación de materiales electrohilado basado en fibras poliméricas ultrafinas es fundamental, y esto se debe a su mecanismo de fabricación simple, versatilidad y su gran campo de aplicabilidad, la cual incluye la administración controlada de fármacos, procesos de filtración, almacenamiento de energía, usos biológicos, médicos, etc. Dependiendo de la aplicación, se puede crear una variedad de estructuras que ofrecen una mayor superficie de contacto, porosidad y estabilidad estructural utilizando mallas electrohiladas 3D (Badmus *et al.*, 2021). Este interés también se ha visto reflejado en la cantidad de publicaciones anuales relacionadas con esta técnica, las cuales han ido en aumento estos últimos años según en analizador de resultados de Scopus (**Figura 7**).

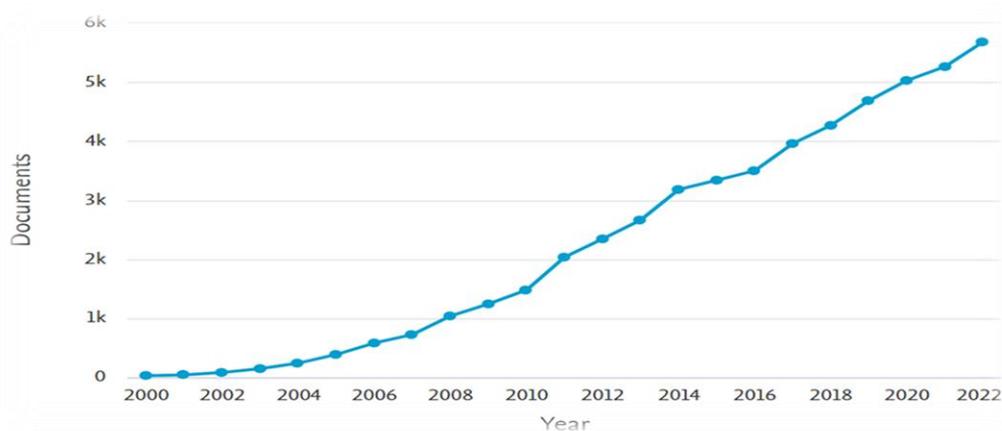


Figura 7: Publicaciones anuales con “ELECTROSPINNING” como palabra clave entre los años 2000-2022 (Scopus, 2022).

El proceso de electrohilado corresponde a la fabricación de mallas nanométricas de fibras a partir de soluciones poliméricas de interés bajo un campo eléctrico (kV) controlando variables tales como: presión, temperatura y humedad controladas utilizando un equipo de electrospinning (**Figura 8**). El alto voltaje aplicado genera cargas en la solución polimérica en la punta de jeringa que lo contiene, estas cargas se repelen entre si logrando al momento que se rompa la tensión

superficial de la gota cargada formar un cono de Taylor. Cuando la tensión aplicada supera la tensión superficial de la gota, el cono de Taylor se deforma y este chorro cargado es expulsado desde la punta de la aguja en dirección a un colector, en el cual se solidifican las fibras por la evaporación del solvente (Hassan y Anke, 2020). Estas fibras ultrafinas poliméricas son recolectadas por un colector plano que recibe las fibras con una distribución aleatoria, por el contrario si las fibras son recibidas en un colector rotatorio se forman fibras con una orientación alineada (**Figura 9**) (Zhang *et al.*, 2020).

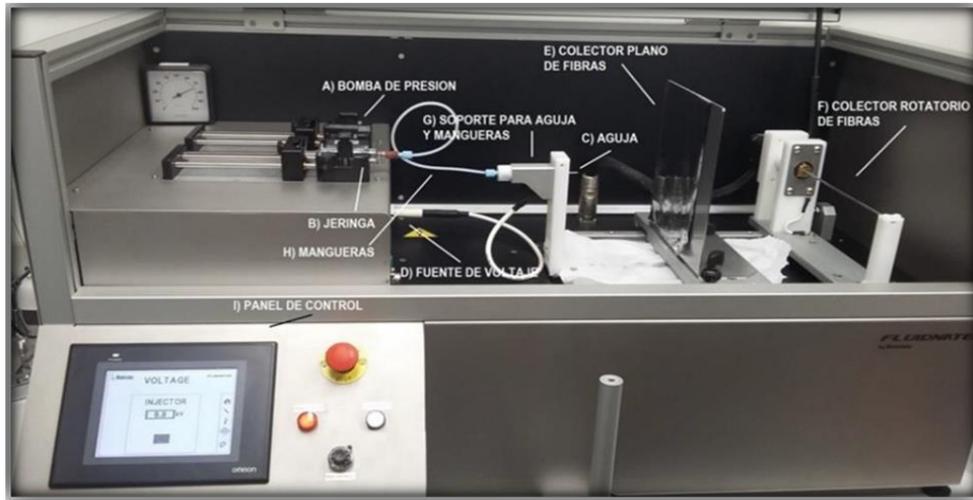


Figura 8: Equipo de electrospinning FLUIDNATEC® LE-10.
Fuente: Laboratorio Polyforms - Universidad de Chile, 2022.

Existen varios factores que afectan el proceso de electrohilado, produciendo fibras con partículas (perlas), acúmulos de polímero o simplemente la imposibilidad de electrohilar, estos parámetros son: 1) de la solución del polímero, 2) de la técnica ES, 3) ambientales (**Tabla 3**) (Hassan y Anke, 2020).

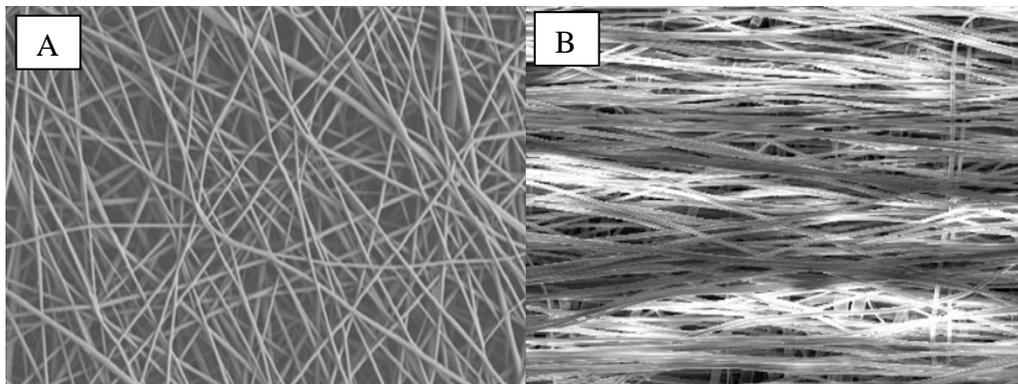


Figura 9: A. SEM mallas aleatorias, B. SEM mallas alineadas.
Fuente: A) Quian *et al.*, 2016.; B) Bianchi *et al.*, 2022.

Tabla 3: Parámetros de electrohilado y sus efectos en la morfología de las fibras.

Parámetros	Efectos sobre la morfología de la fibra	
Parámetros de la solución		
Viscosidad	↑	Aumento del diámetro de la fibra, dificultad de extrusión del polímero
	↓	Disminución del diámetro de la fibra, generación de perlas
Concentración	↑	Aumento del diámetro de la fibra, sin generación de perlas
	↓	Incapacidad de electrohilar, fibras delgadas y generación de perlas
Peso molecular del polímero	↑	Reducción y/o eliminación de perlas
	↓	Generación de perlas por ruptura de la onda capilar
Conductividad	↑	Disminución del diámetro de la fibra
	↓	Aumento del diámetro de la fibra
Tensión superficial	↑	Incapacidad de electrohilar por inestabilidad de los chorros
	↓	Fibras sin generación de perlas
Parámetros del proceso		
Voltaje	↑	Disminución del diámetro de la fibra, sin generación de perlas
	↑ ↑	Aumento del diámetro de la fibra, generación de perlas
Distancia entre punta y colector	↑	Disminución del diámetro de la fibra
	↓	Fibras con generación de perlas
Tasa de alimentación	↑	Fibras con generación de perlas
	↓	Fibras sin generación de perlas
Parámetros Ambientales		
Humedad	↑	Aumento en la porosidad en las fibras
Temperatura	↑	Disminución del diámetro de la fibra

Fuente: Bhardwaj y Kundu, 2010; Hassan y Anke, 2020. La fecha hacia arriba o hacia abajo indica un aumento disminución del efecto morfológico en la fibra.

La tecnología del ES se utiliza para la formación de mallas electrohiladas diversas fuentes. La ES se distingue por su bajo costo, sencillez, eficiencia y facilidad de control mecánico de las fibras, tanto en disposición como en diámetro. (Yoon *et al.*, 2018). La ES puede utilizar polímeros naturales, sintéticos o sus combinaciones lo cual es una ventaja dada la variedad de biomateriales disponibles (Radish *et al.*, 2020); donde los polímeros naturales biodegradables y biocompatibles como colágeno, gelatina, seda, quitosano, alginato, etc. así como sintéticos como poliglicolida, PCL, PLGA, poly (vinyl alcohol), etc, han mostrado propiedades que los han llevado a ser aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para usos clínicos en humanos (**Figura 10**) (Kai *et al.*, 2014).

Para lograr con éxito la formación de fibras por la técnica de ES una de las consideraciones fundamentales es la elección de un solvente con capacidad de disolver al polímero a utilizar (Avossa *et al.*, 2022), que tengan propiedades como buena volatilidad, presión de vapor, punto de ebullición y que pueda mantener la integridad de la solución del polímero (Bhardwaj y Kundu, 2010). En general se prefieren solventes volátiles, ya que sus altas tasas de evaporación facilitan la evaporación del solvente en las fibras cuando viaja desde la aguja al colector, si esto no ocurre el acumulo de un solvente que no ha evaporado en el colector provocará la formación de fibras irregulares (**Figura 11**) (Haider *et al.*, 2018).

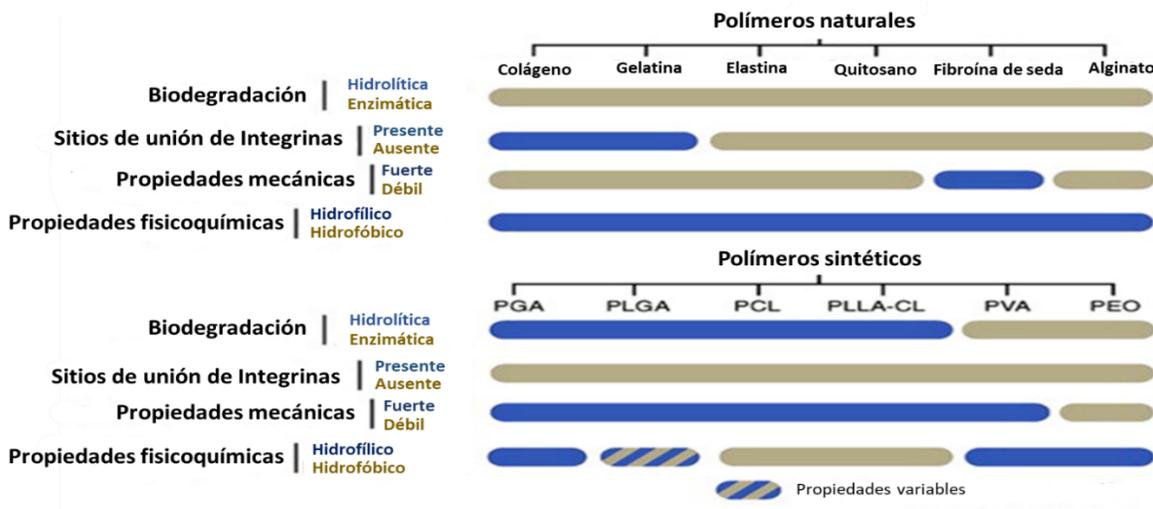


Figura 10: Propiedades biológicas, mecánicas y fisicoquímicas de polímeros naturales y sintéticos.
Fuente: Modificado de Kai *et al.*, 2014.

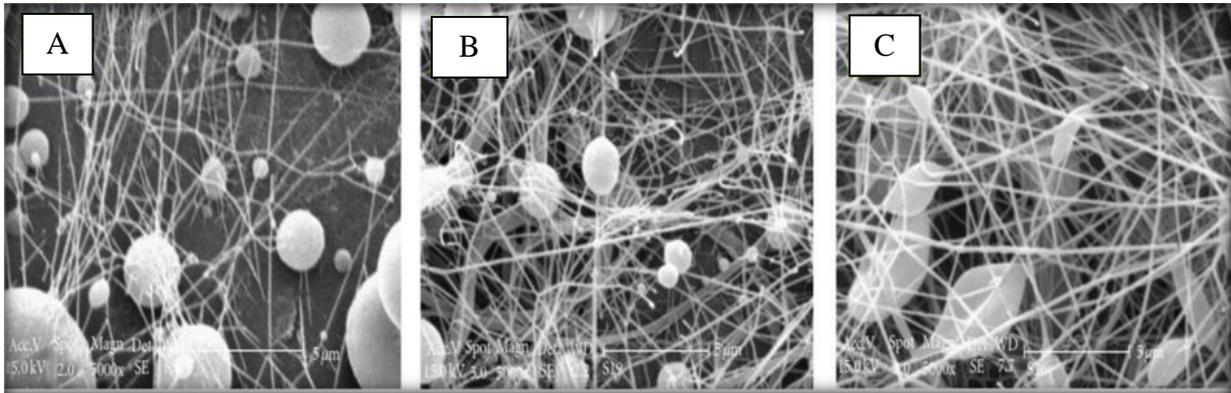


Figura 11: SEM de PCL al 5% disueltas en: A) ácido acético glacial, B) ácido acético al 90%, C) cloruro de metileno/DMF = 4/1.
Fuente: Haider *et al.*, 2018.

Ingeniería de tejidos

La complejidad quirúrgica en conjunto al tratamiento posoperatorio y la barrera que han significado los injertos convencionales en la reconstrucción de tejidos, ha dado paso a la denominada, “ingeniería de tejidos”, un campo prometedor para la medicina regenerativa con la incursión de andamios 3D de materiales biocompatibles con entornos propicios para imitar la MEC, la cual es utilizada en cultivos de terapia celular actuando, por ejemplo, como un soporte mecánico en la cicatrización de la reparación de los tejidos (Jung *et al.*, 2016; Rahmani *et al.*, 2022). Así mismo, se localiza el tratamiento en el sitio deseado, sin la difusión a lugares no deseados, junto con poder controlar la degradación del andamio (Ruiz-Alonso *et al.*, 2021). El objetivo del concepto es lograr producir un tejido auxiliar seguro y eficaz que sea capaz de regenerar tejidos en un medio biológico (Lim *et al.*, 2019).

Las aplicaciones de la ingeniería de tejidos han sido modulando respuestas en cicatrización de, heridas (Guo *et al.*, 2022), cartílagos (Badmus *et al.*, 2021), tejido cardiovascular (Maleki *et al.*, 2022), tejido óseo (Sadeghzadeh *et al.*, 2022), tendones (Peters *et al.*, 2022), entre otros. Este éxito se debe fundamentalmente a la capacidad de interacción célula-célula y célula-matriz por las similitudes entre la estructura jerárquica de los andamios y la MEC (Haider *et al.*, 2018), sumado a alta relación superficie/volumen y porosidad que permite un óptimo intercambio de oxígeno, suministro de nutrientes, migración y extrusión de exudados que favorecen la adhesión, proliferación y diferenciación celular (Kai *et al.*, 2014).

Por otro lado, el uso de células madre es muy popular en la ingeniería de los tejidos, principalmente por sus amplias capacidades de autorrenovación y diferenciación según el linaje deseado, sumado la gran cantidad de sitios de recolección que poseen como, por ejemplo, cordón umbilical, medula ósea o tejido adiposo (Lim *et al.*, 2019). Los andamios, entre otras características, poseen la capacidad de recrear este ambiente y organización del tejido original de interés, permitiendo el crecimiento y diferenciación celular, logrando acercar el concepto de la ingeniería de los tejidos a su objetivo (Bianchi *et al.*, 2021).

Si bien el ES permite gran reproductividad en base a resultados biológicos exitosos, las desventajas en la ingeniería de tejidos radican en un problema mecánico donde la fuerza, resistencia y estabilidad que soporten los movimientos y carga durante la rehabilitación de una lesión superan los límites máximos de los andamios, con roturas o degradaciones anticipadas a la solución del problema. (Banik *et al.*, 2016; Pien *et al.*, 2021; Lomas *et al.*, 2015).

ELECTROSPINNING: TENDONES

Estos últimos años se han hecho esfuerzos por encontrar innovadores tratamientos para ser utilizados en la regeneración de las lesiones tendinosas. La calidad de vida de los pacientes ha mejorado gracias a las mejoras en los métodos convencionales, pero estos esfuerzos no han tenido el éxito deseado debido a las características de estos tejidos, como baja vascularidad, hipocelularidad, anisotropía y propiedades mecánicas no lineales (Sensini y Cristofolini, 2018).

La ingeniería de tejidos basada en mallas electrohiladas en este sentido aportaría una solución adecuada a las limitantes de los tratamientos convencionales, con estructuras capaces de modificar la organización espacial del tejido original, mantener las funciones biomédicas del tendón, ser un esqueleto en el proceso reparativo junto con la capacidad de poder constatar el tiempo de degradación del andamio e incorporar de manera controlada células, factores de crecimiento y genes que son utilizados en otras terapias clásicas (Ruiz-Alonso *et al.*, 2021).

En el caso particular de los tendones y su regeneración, los andamios deben poseer una estructura acorde al tejido con propiedades que guíen la proliferación del mismo, en los que destacan (**Figura 12**): *Biocompatibilidad; Biodegradabilidad; Propiedades Mecánicas; Morfología; Porosidad; Actividad biológica y Rentabilidad* (Zhang *et al.*, 2018; Ruiz-Alonso *et al.*, 2018), por lo que es aquí donde la correcta elección de un material 3D es clave para lograr

el éxito terapéutico. En este contexto, se han investigado una gran cantidad de biopolímeros naturales, sintéticos o mezclas en tendones como por ejemplo: poli (ácido l -láctico), PLGA, poliuretano, quitosano, poli (etilenglicol diacrilato), PCL, gelatina, óxido de polietileno (PEO), entre otros (Sensini y Cristofolini, 2018). Otra característica que debe poseer el andamio es que sea capaz de inducir la tenogénesis de células madre, proporcionando un microambiente tal que permita la regeneración del tendón y estas no se diferencien a otros linajes como hueso o cartílago (Zhang *et al.*, 2018). Resultados alentadores se han visto al utilizar células estromales derivadas de tejido adiposo, mostrando una mayor expresión de genes del linaje tendinoso al ser sembradas en mallas electrohiladas, así como también, reportado que células del estroma de la medula ósea sembradas en andamios alineados tuvieron mayor producción de colágeno que en andamios con disposición aleatoria (Brennan *et al.*, 2018).

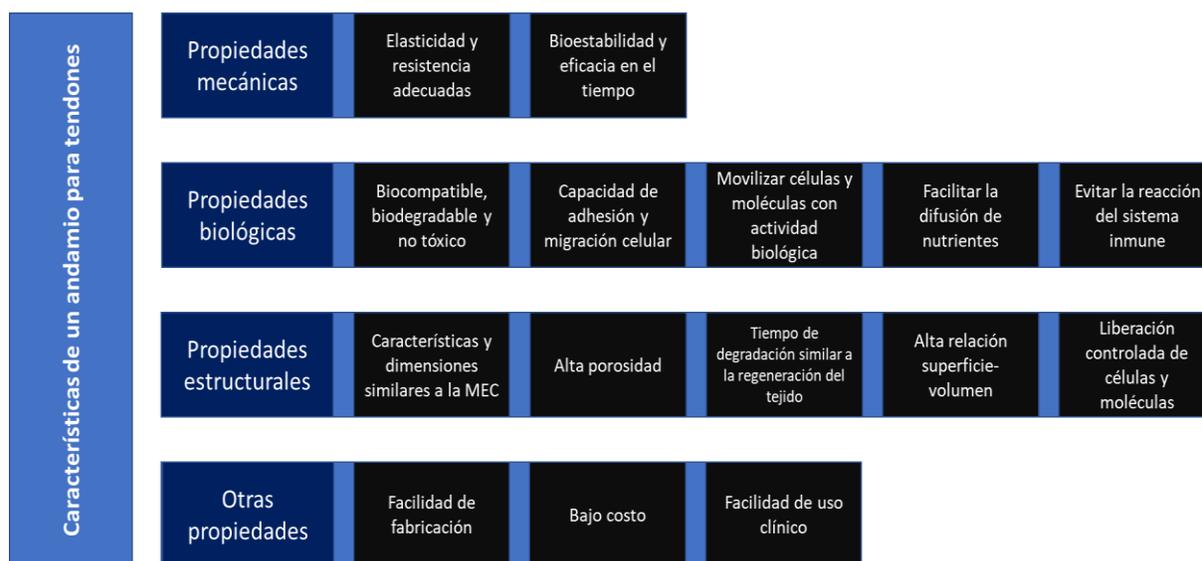


Figura 12: Características de un andamio para uso clínico en tendones
Fuente: Modificado de Ruiz-Alonso *et al.*, 2021.

La planificación de la degradación en función del tejido y tipo de lesión, es una característica que hace que las mallas electrohiladas posean ventajas sobre los implantes permanentes. Idealmente, el proceso de reparación debería ir de la mano con este proceso de degradación, especialmente en la fase inicial posterior a la cirugía, donde el andamiaje además debe ser capaz de proteger a las células y al tejido nuevo de un estrés severo, permitiendo un desarrollo terapéutico adecuado sin respuestas inmunitarias que alteren este proceso y en consecuencia el rechazo por parte del organismo (Bianchi *et al.*, 2021). Si bien se han descrito limitaciones en

algunos materiales, principalmente mecánicas, la posibilidad de fabricar andamios a partir de mezclas de polímeros (andamios poliméricos) permiten integrar atributos del material complementario, logrando modificar las estructuras de las fibras y ampliando el abanico de posibilidades a la hora de encontrar un andamio capaz de resistir las exigencias biomecánicas de los tendones (Wu *et al.*, 2018), por ejemplo, materiales como PCL, el poli (ácido l-láctico), PLGA o el poliuretano, los cuales presentan excelentes propiedades de degradación, biocompatibilidad y nula toxicidad, poseen inconvenientes al momento de la siembra celular y es su marcada hidrofobicidad, lo que condiciona la adhesión y alojamiento de estas, mientras que, otros polímeros como el quitosano o la gelatina son hidrofílicos, por lo que sus propiedades bioactivas en esta materia son superiores (Bianchi *et al.*, 2021).

Por otro lado, las propiedades biológicas y mecánicas dependen principalmente del polímero base y de la topografía de las mallas, tanto en distribución como en tamaño (Cardwell *et al.*, 2012), la diferenciación celular, por ejemplo, depende en gran parte del microambiente. El microambiente del tendón es una MEC formada por fibras alineadas y ordenadas (Fratzl, 2008) de 1 a 20 μm (Liu *et al.*, 2008), y las mallas electrohiladas permiten formar este ambiente anisotrópico específico, al no crear este microambiente, las células podrían diferenciarse en otro linaje como cartílago o hueso (Zhang *et al.*, 2018), que tienen el mismo origen embrionario mesodérmico (Ross y Pawlina, 2013). Cardwell *et al.*, (2012) estudió como la topografía de los andamios influye en la diferenciación de células madre mesenquimales (MSC por su sigla en inglés) de la línea murina C3H10T1/2 (fibroblastos embrionarios) en linaje tenogénico, para esto se hicieron andamios alineados y aleatorios en base a poli (uretano urea) con diámetros de fibra pequeños ($< 1 \mu\text{m}$), medianos (1-2 μm) y grandes ($> 2 \mu\text{m}$) esta evaluación se hizo en base a la expresión génica de colágeno tipo 1, decorina y escleraxis; concluyendo que la mayor expresión de todos estos genes fue en fibras grandes, sin diferencias significativas entre andamios alineados o aleatorios al cabo de 14 días.

Una limitante crítica en relación a los andamios utilizados son tanto la resistencia como la rigidez en procesos reparativos que implican cargas, por ejemplo, polímeros biocompatibles comunes como PCL o la seda tienen resistencias al fallo por tracción mucho menores que los tendones, en donde la alineación de las fibras ha demostrado aumentar la resistencia máxima a la tracción (Brennan *et al.*, 2018), por ejemplo, pruebas mecánicas en andamios a base de PCL-

PLGA con orientación aleatoria han mostrado resistencias máximas de 2,36 MPa, mientras que los mismos andamios pero con orientación alineada mostraron una resistencia máxima de 20,66 MPa (Zamanlui *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta que, en el caso de los tendones flexores de la mano del humano, la resistencia mínima requerida para la rehabilitación inmediata es entre los 2,79 – 3,98 MPa, se demuestra la importancia del enfoque topográfico en la respuesta mecánica de los andamios, resultando tan importante como el biológico (Pien *et al.*, 2021). A nivel biológico, los estudios han arrojado hallazgos alentadores, y existe la esperanza de que las mallas electrohiladas, con su adaptabilidad a una amplia gama de técnicas, polímeros y combinaciones entre ellos, en el futuro puedan superar estas limitaciones y fomentar el desarrollo de un tendón recuperado resistente y de aspecto auténtico (Brennan *et al.*, 2018).

Esta técnica ha mostrado resultados positivos también, como método de prevención de adhesiones tendinosas posterior a una resolución quirúrgica clásica, por ejemplo, Song *et al.*, (2015) diseñó una membrana electrohilada de PLGA con el objetivo de impedir o reducir esta problemática típica utilizándola en una cirugía reconstructiva posterior a una lesión inducida del tendón calcáneo de un modelo murino, demostrando en los ensayos *in vitro* tener una excelente microestructura y cinética de degradación, mientras que en los ensayos *in vivo* se concluyó que reduce significativamente las áreas de adhesión entre el tendón y el tejido circundante (**Figura 13**), además que mejora la cicatrización del tendón en comparación al grupo que no utilizó la malla PLGA.

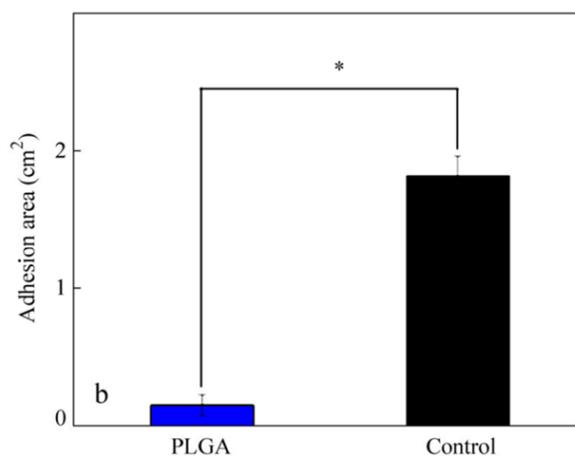


Figura 13: Área de adhesión tendinosa (cm²) 3 semanas después de la cirugía de tendón. Fuente: Song *et al.*, 2015.

BIOMATERIALES: PCL-PLGA

PCL

La PCL, un polímero biodegradable miembro de la familia de los poliésteres alifáticos muy utilizado en la ingeniería de los tejidos gracias a sus ventajas viscoelásticas y reológicas; huesos, cartílagos, vasos sanguíneos, piel, nervios, tendones y ligamentos forman parte de las áreas en que se ha utilizado este polímero con el objetivo de reemplazar o reparar tejidos (Espinoza *et al.*, 2020). Esto lo ha llevado a ser aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por su sigla en inglés Food and Drug Administration) para uso en humanos y ser uno de los polímeros más estudiados año a año (**Figura 14**), su biocompatibilidad, nula toxicidad junto con su miscibilidad lo hacen ideales para poder moldear su estructura a un fin particular como lo son, por ejemplo, sus niveles de afinidad con el agua y velocidad de degradación (Siddiqui *et al.*, 2018).

El PCL corresponde a un polímero semicristalino con una temperatura de transición vítrea de 60 °C, un punto de fusión aproximado a los 64 °C, una temperatura de descomposición máxima en torno a los 350 °C (Woodruff y Hutmacher, 2010; Azari *et al.*, 2022) y un tiempo de degradación de 2 a 3 años en medios biológicos controlados, por lo que su uso en ingeniería de tejidos es principalmente en la sustitución de tejidos duros, que son tejidos donde el proceso terapéutico es también de tiempos prolongados (Malikmammadov *et al.*, 2017). Pero sus usos han ido más allá del estudio de los tejidos sino también en administración de fármacos con usos en terapias contra el cáncer y como método de encapsulación de antiinflamatorios, antibióticos o anticonceptivos (Azari *et al.*, 2022).

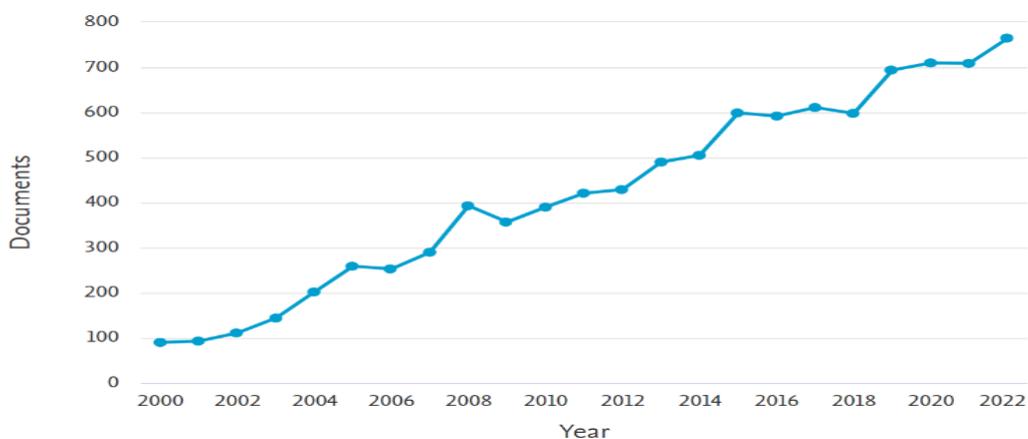


Figura 14: Publicaciones anuales con “PCL” AND “POLYMER” como palabras claves entre los años 2000-2022 (Scopus, 2022).

El PCL se prepara a partir de un proceso de polimerización con apertura de anillo de ϵ -caprolactona, formando la estructura de PCL (**Figura 15**). Su estructura química ha sido resuelta espectroscópicamente mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) mostrando bandas de absorción a $2943/\text{cm}^{-1}$ (CH_2 asimétrico), $2866/\text{cm}^{-1}$ (CH_2 simétrico), $1722/\text{cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$), $1293/\text{cm}^{-1}$ ($\text{C}-\text{C}$ y $\text{C}-\text{O}$), $1239/\text{cm}^{-1}$ ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) (Gumusderelioglu *et al.*, 2011) Posee una alta solubilidad en benceno, cloroformo, ciclohexanona, tolueno, diclorometano y 2-nitropropano, solubilidad media en acetona, acetonitrilo, 2-butanona y acetato de etilo, mientras que es insoluble en agua, alcohol etílico, éter dietílico y éter de petróleo (Malikmammadov *et al.*, 2017).

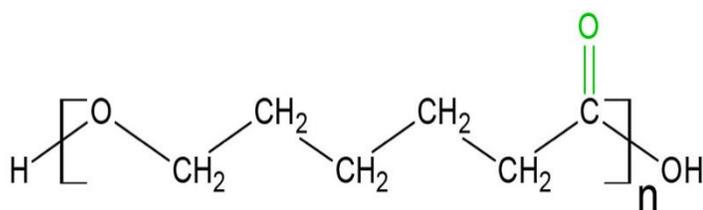


Figura 15: Estructura química de PCL.
Fuente: Pereira *et al.*, 2020.

El proceso de degradación de un polímero reabsorbible y degradable como PCL puede durar de 2 a 4 años dependiendo de su peso inicial y medio. En animales y humanos por la falta de enzimas adecuadas, el proceso de reabsorción *in vivo* pasa por 3 fases (**Figura 16**): 1) Hidratación, dura aproximadamente 6 meses, 2) Periodo de pérdida de masa, asociado a la escisión hidrolítica no enzimática, 3) Reabsorción y metabolización, aquí el polímero sufre una degradación intracelular con la absorción de fragmentos por parte de macrófagos y células gigantes (Woodruff y Hutmacher, 2010; Hutmacher, 2001). Mientras que el proceso de degradación hidrolítico es a partir de la formación de los intermediarios, ácido 6-hidroxicaproico y acetil coenzima A que pasan a formar parte del ciclo del ácido cítrico y posterior eliminación del organismo (**Figura 17**) (Woodruff y Hutmacher, 2010).

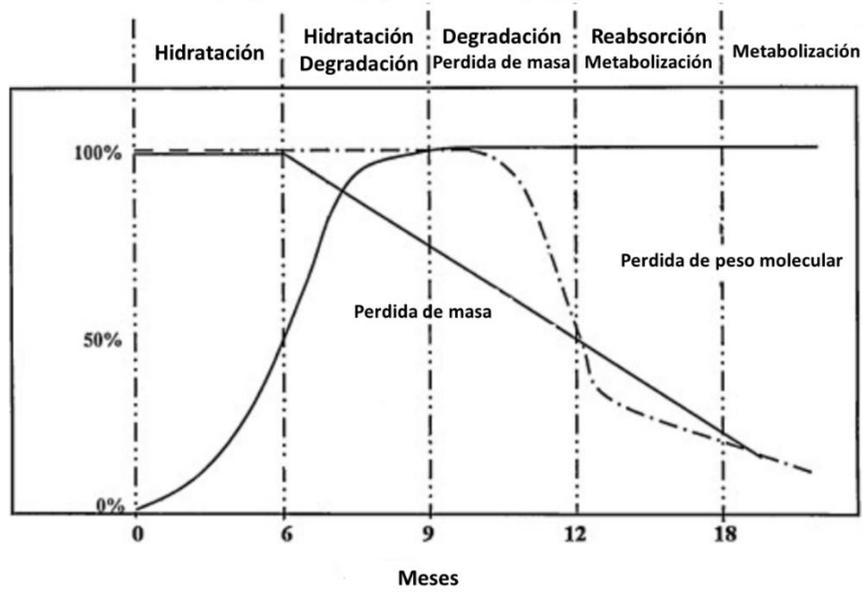


Figura 16: Proceso de degradación de un polímero reabsorbible como PCL.
Fuente: Modificado de Hutmacher, 2001.

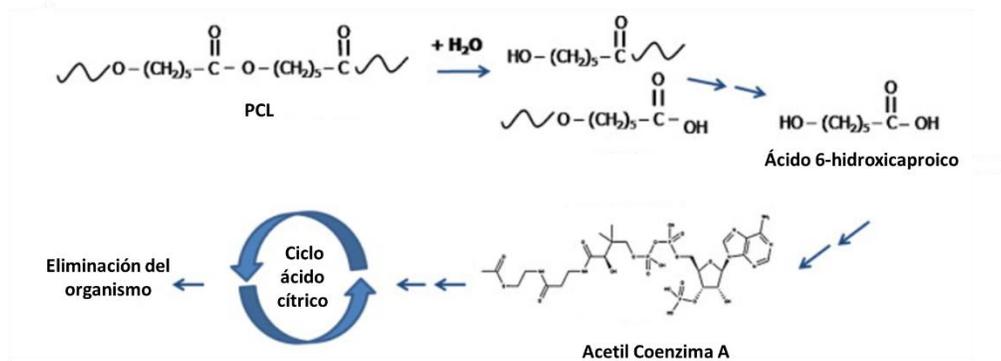


Figura 17: Degradación de PCL
Fuente: Modificado de Woodruff y Hutmacher, 2010.

A nivel biológico, una de sus principales limitantes es la escasa solubilidad en el agua que posee este polímero, solucionable al mezclarse con un polímero hidrofílico o modificando la estructura superficial del PCL añadiendo algún elemento hidrofílico a través de las interacciones químicas, físicas o electrostáticas propias del polímero y así mejorar la viabilidad, proliferación y diferenciación celular (Mandal y Shunmugam, 2020).

A nivel mecánico, los resultados de PCL son variados y dependientes de los tipos copolímeros utilizados, por ejemplo, Surucu y Turkoglu, (2016) fabricó andamios con fibras orientadas aleatoriamente en base a PCL/Quitano, en la comparativa los andamios fabricados solo a base

de PCL (15% p/v) mostraron un módulo de Young de 1.33 MPa, una deformación máxima a la rotura de 77% y un ángulo de contacto de 114° que confirma su naturaleza hidrofóbica, mientras que el andamio PCL (15% p/v) / Quitosano (8% p/v) obtuvo un módulo de Young de 3,28 MPa, una deformación máxima a la rotura de tan solo un 11% y un ángulo de contacto de 78°, es decir, hidrofílico. Otro ejemplo mecánico fue reportado por Dehkordi *et al.*, (2022) con la fabricación de andamios doble capa aleatorios en base a PCL (12% p/v) con módulos elásticos de 126% y un módulo de Young de 7,23 MPa. Las propiedades mecánicas de PCL se ven afectadas por su peso molecular, concentración del polímero, copolimerización, parámetros, técnica y topografía que influyen al momento de realizar el proceso de electrohilado en los resultados mecánicos de estas mallas (Azari *et al.*, 2022).

PLGA

El ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) es un poliéster alifático biodegradable formado por la copolimerización del ácido láctico (LA) y el ácido glicólico (GA), posee propiedades que lo han llevado a ser aprobado por parte de la FDA para uso en humanos, con publicaciones que se han mantenido estables a lo largo de los años (**Figura 18**). Posee aplicaciones tanto en ingeniería de tejidos como método de transporte de fármacos encapsulados como nanopartículas, esferas, implantes, varillas, películas delgadas o nanogeles. Sus productos de degradación son el lactato y el glicolato, ambos pueden participar de la vía metabólica propia de las células y es por eso que poseen una alta biocompatibilidad y nula toxicidad (Cherreddy *et al.*, 2018).

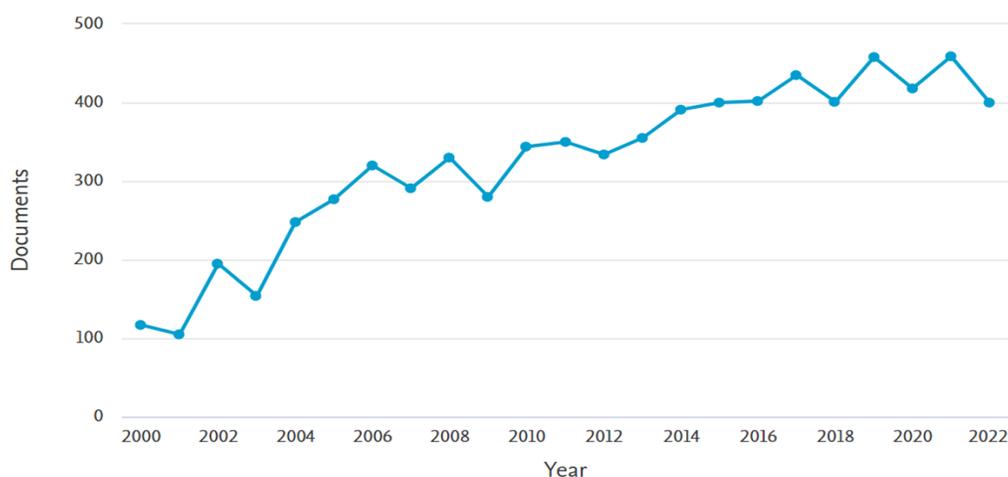


Figura 18: Publicaciones anuales con “PLGA” AND “POLYMER” como palabras claves entre los años 2000-2022 (Scopus, 2022).

Sus características fisicoquímicas dependen de las proporciones de los monómeros (LA:GA). Se ha informado que el período de reabsorción *in vivo* completa del LA es de entre 12 y 24 meses, mientras que para el componente GA es de entre 6 y 12 meses. Esto se debe a que LA tiene una mayor hidrofobicidad y tasa de degradación que GA, por lo que los copolímeros de PLGA con una proporción de 75:25 tardan más en reabsorberse que aquellos con una proporción de 50:50 o 25:75 (Kapoor *et al.*, 2015). Estas proporciones junto con variaciones en sus pesos moleculares determinados por el fabricante pueden cambiar la estructura final de este copolímero, para así acomodarlo a su uso objetivo (**Tabla 4**).

Tabla 4: Variaciones en la estructura de PLGA según proporción y peso molecular.

Fabricante	Proporción	Peso molecular (kDa)	Grupo terminal
Sigma-Aldrich	50:50	40-75	Ácido carboxílico
	50:50	30-60	Éster
	65:35	40-75	Éster
	65:35	24-38	Ácido carboxílico
	75:25	4-15	Ácido carboxílico
	75:25	76-115	Éster

Fuente: Stromberg *et al.*, 2021; Kapoor *et al.*, 2015.

El PLGA al entrar en contacto con el agua comienza un proceso de biodegradación por hidrolisis de sus enlaces éster, disminuyendo el peso molecular y logrando la separación del polímero en LA y GA, luego se descompone en el organismo formando dióxido de carbono y agua (**Figura**

19) (Kapoor *et al.*, 2015). Así, por ejemplo, Jia *et al.*, (2012) fabricó mallas electrohiladas aleatorias de PLGA (80:20) al 10% y en las pruebas de ángulo de contacto los valores fueron 106°, lo cual confirma esta condición. Poseen una naturaleza amorfa con una temperatura de transición vítrea entre 45 – 55°C. Soluble en solventes comunes como tetrahidrofurano, acetona, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo o alcohol bencílico (Kapoor *et al.*, 2015; Makadia y Siegel, 2011), y propiedades mecánicas dependientes de la proporción LA:GA (**Tabla 4**).

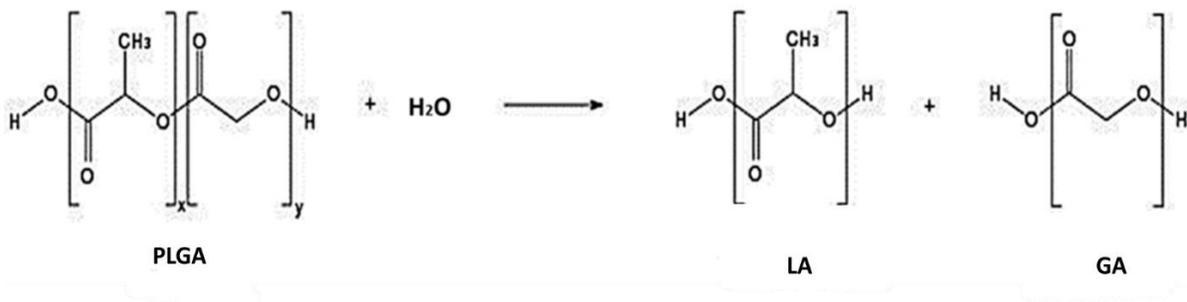


Figura 19: Hidrolisis de PLGA.
Fuente: Makadia y Siegel, 2011.

Biológicamente presenta una estructura capaz de generar un microambiente ideal al crecimiento, unión y proliferación celular con excelente conexión para el transporte de nutrientes (Shi *et al.*, 2019). A nivel mecánico las propiedades son ajustables y dependientes de la proporción de LA:GA, por ejemplo, Shi *et al.*, (2019) fabricó mallas electrohiladas aleatorias de PLGA (50:50) al 24% obteniendo un módulo de Young de 126 MPa y un alargamiento a la rotura de 123%. Kolluru *et al.*, (2013) fabricó estructuras mineralizadas resistentes de PLGA (85:15) al 25% para andamios tendón-hueso y logró un módulo de Young de 1,65 GPa y una resistencia elástica máxima de 150%.

SOYA: UN BIOPOLÍMERO NATURAL

Generalidades

En los últimos años se ha producido un auge nutricional en el consumo de proteínas de origen vegetal, y la soja se ha perfilado como su principal representante, básicamente por su disponibilidad, con producciones puras de miles de toneladas anuales a nivel mundial y sus beneficios asociados al consumo, ya que es una excelente fuente de aminoácidos, ácidos grasos insaturados, vitaminas del complejo B, fibra, hierro, calcio y zinc entre otros activos

nutricionales. (Rizzo y Baroni, 2018). La proteína de soya, que incluye a todos los aminoácidos esenciales para la nutrición humana, está compuesta por una mezcla de albuminas y globulinas, de esta última destacan principalmente conglicina (7S) con un peso molecular de 175.000 kDa y glicina (11S), con un peso molecular de 360.000 kDa (Tansaz y Boccaccini, 2015) que corresponden al 35 y 52% de la estructura total de la proteína respectivamente. En comparación a las proteínas de origen animal, en este tipo de proteínas el peso molecular es más bajo, por lo que al ser utilizado en un ser vivo son altamente susceptibles a la degradación enzimática, y los tratamientos químicos como la reticulación son esenciales para garantizar su estabilidad (Barkay-Olami y Zilberman, 2016).

Por otro lado, a partir de la soya se procesan tres productos comerciales: 1) Harina de soya, 2) Concentrado de proteína de soya y 3) Aislado de proteína de soya, cada una de ellas contiene una composición distinta (**Tabla 5**) (Tian *et al.*, 2018).

Tabla 5: Composición de los diferentes productos a partir de la proteína de soya.

Componente (%)	Harina de soya	Concentrado de proteína de soya	Aislado de proteína de soya
Humedad	3.4	9.0	4.8
Proteína	41.0	65.3	92.0
Grasas	22.5	0.3	-
Fibra	1.7	2.9	0.25
Cenizas	5.1	4.7	4.0

Fuente: Tian *et al.*, 2018.

Biopolímero natural

Las propiedades de la proteína de soya se pueden modificar según sea el uso objetivo a través de tratamientos físicos, químicos o enzimáticos, sus cadenas polipeptídicas consisten en enlaces de disulfuro e hidrogeno con grupos funcionales como el grupo amino (NH₂), hidroxilo (OH) o sulfhidrilo o tiol (SH) que facilitan la capacidad gelificante, emulsionante e hidrofílica con absorción de agua lo que permite que se pueda combinar con otros biopolímeros (Jayakumar *et al.*, 2022; Tansaz y Boccaccini, 2015). Espectroscópicamente se reporta que la proteína de soya presenta bandas de absorción a 3300 cm⁻¹ que tiene relación a grupos -OH y -NH libres, 1648

cm^{-1} por estiramiento de C=O (amida I) y 1547 cm^{-1} que representa un estiramiento de N-H (amida II) y a 1454 cm^{-1} la banda de absorción del grupo COOH (Kaith *et al.*, 2013)

A lo largo del tiempo el uso de la soya ha ido más allá de la industria de los alimentos, siendo considerada junto a la zeína y el gluten de trigo como “polímeros naturales” con aplicaciones en empaques, espumas, administración de medicamentos, fibras, plásticos biodegradables, adhesivos, entre otros (Tian *et al.*, 2018). Se han demostrado ventajas similares en biología, que incluyen biocompatibilidad, no inmunogenicidad, no toxicidad, biodegradabilidad y estabilidad a largo plazo. Se ha afirmado que los productos elaborados con proteína de soya fomentan la regeneración de tejidos al integrarse a los coágulos de sangre de esta manera promueven la síntesis de colágeno y la reparación de heridas (Peles y Zilberman, 2012). Dentro de sus pares proteicos, la soya es quien contiene mayor cantidad de isoflavonas como la genisteína o la daidzeína que son consideradas clave en la señalización celular para inducir la actividad antiinflamatoria (Tansaz y Boccaccini, 2015)

Dentro de los productos nanométricos (1-100 nm) hechos en base a la proteína de soya se clasifican en (**Figura 20**): 1) unidimensionales como placas, laminas o cubiertas; 2) bidimensionales que incluyen nanofibras o nanotubos; 3) tridimensionales como lo son las nanopartículas proteicas (NPP) o nanorellenos que se utilizan para mejorar las propiedades funcionales de un material (Jayakumar *et al.*, 2022)

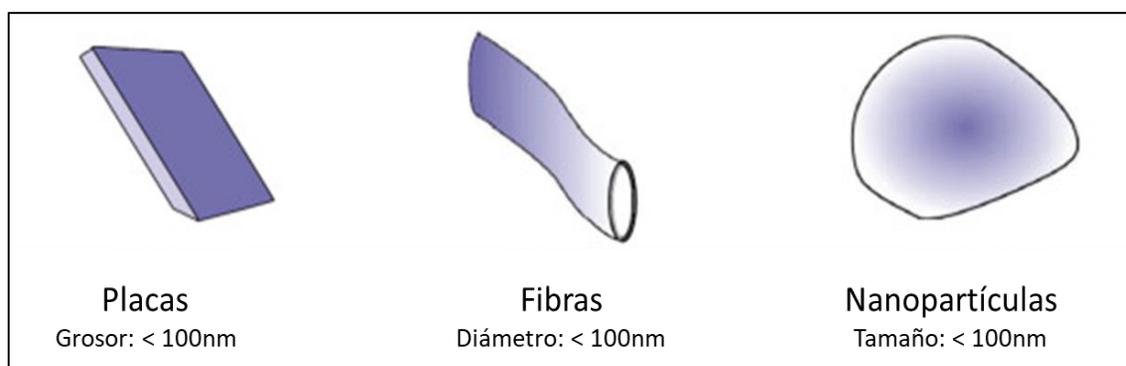


Figura 20: Dimensiones y tipos de productos derivados de proteína de soya.

Fuente: Modificado de Jayakumar *et al.*, 2022.

Es así como Varshney *et al.*, (2020) fabricó mallas electrohiladas en base a aislado de proteína de soya junto con fibroína de seda, concluyendo que no es posible electrohilar en base a 100% aislado de proteína de soya, luego al fabricar andamios en una proporción de 75% aislado de

proteína de soja y 25% fibroína de seda se formaron fibras con presencia de partículas y ya en una proporción 50:50 se lograron formar fibras lisas. Otro punto es que, a mayor proporción proteica de la soja, mayor es la capacidad de retención de agua (una ventaja en la absorción de excesos de exudados de una herida), así como también lo es la viabilidad y más alta es la tasa de degradación.

Por otro lado, NPP fueron utilizadas por Du *et al.*, (2021) quien reforzó andamios en base a polihidroxibutirato (PHB) con NPP de soja para aplicaciones biomédicas (**Figura 21**) con el método de autoensamblaje (la proteína de soja no es soluble en agua, pero si en etanol), en donde concluyó que la adición de NPP de soja incrementó la temperatura de transición vítrea de 17,7 a 41,8 °C. Así como también, aumentó la resistencia máxima a la tracción de 11.91MPa a 12,77 MPa. El PHB es hidrofóbico y al añadir NPP de soja pasó de tener un ángulo de contacto de 124° a 44°, es decir, pasó a ser hidrofílico. La adhesión y proliferación celular aumentaron en un 35 y 15% en comparación al andamio no reforzado y finalmente la degradación fue mayor en el electrohilado de PHB reforzado con una degradación en una solución enzimática de 30,4% a comparación del 14,4% del andamio sin reforzar en un periodo de 30 días.

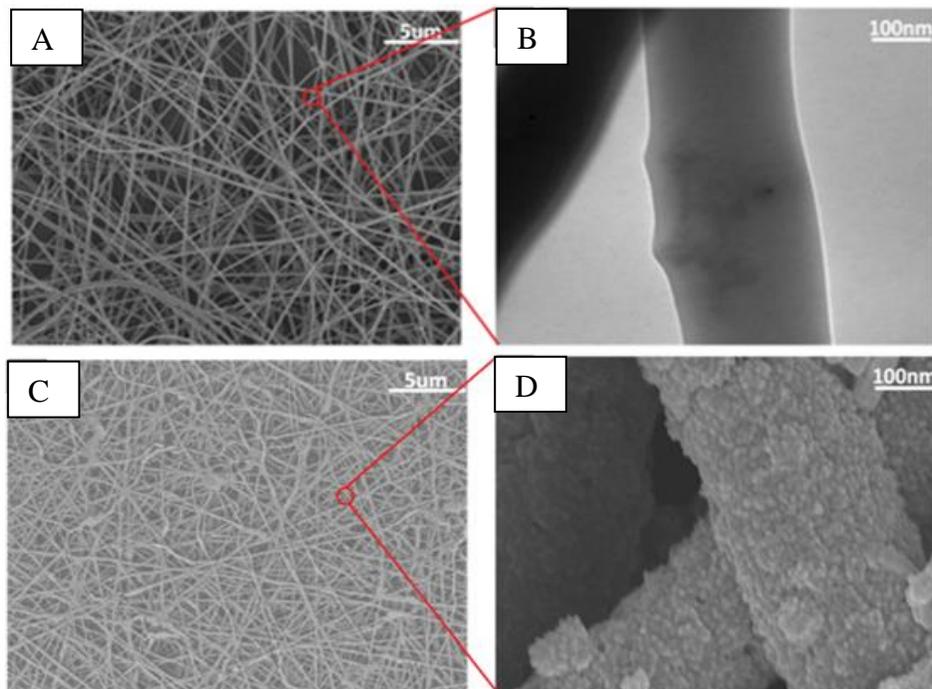


Figura 21: Imágenes SEM de PHB. A) y B) fibras sin reforzar; C) y D) fibras reforzadas con NPP de soja.

Fuente: Du *et al.*, 2021

OBJETIVO GENERAL

Realizar una revisión bibliográfica para la fabricación de una malla electrohilada de PCL-PLGA reforzada con nanopartículas de proteínas (NPP) de soja y proponer un protocolo *in vitro* para evaluar la malla de PCL-PLGA reforzada y describir un modelo *in vivo* de uso para modular resoluciones quirúrgicas en tendones utilizando un modelo murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar una búsqueda bibliográfica para la fabricación de una malla electrohilada en base a PCL-PLGA reforzada con NPP de soja como andamio fibrilar 3D.
2. Describir técnicas para conocer la morfología y estructura de mallas de PCL-PLGA reforzada con NPP de soja.
3. Proponer un modelo experimental *in vitro* e *in vivo* que permita evaluar clínicamente el uso de una malla electrohilada de PCL-PLGA reforzada en la reparación quirúrgica del tendón calcáneo en un modelo murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se propone la fabricación de mallas electrohiladas de PCL-PLGA reforzadas con NPP de soja utilizando un equipo de ES modelo eStretching LE-10 Fluidnatek[®] del Laboratorio Polyforms de Favet a cargo del Dr. A. Neira-Carrillo. Se recopiló información científica utilizando la base de datos Scopus, suscrita por la Universidad de Chile sobre las características biomecánicas de los polímeros PLC y PLGA, así como también de la preparación de NPP de soja y de la técnica de ES, estas fueron organizadas sistemáticamente según la metodología a fin de concluir según su relevancia en el presente documento de tesis.

Métodos

La metodología incluye la búsqueda de artículos y revisiones de revistas científicas en inglés desde el año 2010 (inclusive) hasta la fecha con modelos mamíferos independiente de la especie, raza y sexo estudiado en ensayos *in vivo* para su posterior análisis. Publicaciones utilizadas con fecha anterior a la descrita justifican su uso al contener información base, inalterable durante transcurso del tiempo, como lo son referencias anatómicas o aquellas que sean consideradas importantes para el desarrollo del estudio. Se considera el uso de palabras clave tales como: “*electrospinning*”, “*electrospun*”, “*biomaterials*”, “*tendon*”, “*polycaprolactone*”, “*poly (lactic-co-glycolic acid)*” and “*soy*”. Las áreas temáticas son: “Bioquímica, genética y biología molecular”, “Medicina”, “Química”, “Farmacia”, “Ciencia de los materiales”, “Ciencias Veterinarias”, “Ingeniería química” y “Profesiones de Salud”.

El diseño de información utilizado se enmarcó en las pautas dictadas por el modelo “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis 2020” (PRISMA), obteniendo resultados esquematizados según la guía actualizada por Page *et al.*, (2021). La información se valoró según el factor de impacto de la revista, incluyendo solo las pertenecientes a los cuartiles I y II (Q1-Q2) según el ranking de “Scimago Journal & Country Rank” (SJR). Todos los títulos sintetizados a este nivel se importaron al software Rayyán, que es una herramienta para la selección detallada de los artículos de interés. Finalmente, a modo de conocer el impacto productivo de los autores es que se detallan: 1) Índice H, 2) Artículos publicados y 3) N° de citas totales por artículos publicados. Los criterios de exclusión de información serán todas

aquellas publicaciones anterior al año 2010, artículos no concernientes a la biomedicina y al cumplimiento de los objetivos planteados en esta Memoria de título monográfica, así como también reportes de caso, cartas a editores, comentarios y conferencias. Luego de la recopilación y revisión del estado del arte, la información fue organizada en capítulos: “*Tendones: Lesiones y proceso recuperativo*”, “*Electrospinning y sus aplicaciones en ingeniería de tejidos*”, “*Electrospinning: Tendones*”, “*Biomateriales: PCL – PLGA*”, “*Soya: Un biopolímero natural*”, “*Propuesta: Modelo experimental in vitro e in vivo*”.

METODOLOGÍA OBJETIVO 1

Preparación de mallas electrohiladas PCL-PLGA

Las condiciones de fabricación de mallas son el resultado del análisis bibliográfico comentado anteriormente. Para esto se propuso, la fabricación de 12 mallas electrohiladas, de esta manera de obtener resultados comparables distintos entre todas las mallas compuestas de los polímeros PCL y PLGA, seis mallas con distintas composiciones estequiométricas, distinto control topográfico sobre la orientación de las fibras y seis mallas iguales entre ellas divididas en tres grupos: 100PCL, 50PCL-50PLGA y 50PLGA (**Tabla 6**).

Tabla 6: Fabricación de 12 mallas electrohiladas y su composición.

Grupo	Malla	Composición estequiométrica	Control topográfico
100PCL	Malla 1	100% PCL	Alineada
	Malla 4	100% PCL	Aleatoria
	Malla 7	100% PCL	Alineada
	Malla 10	100% PCL	Aleatoria
50PCL - 50PLGA	Malla 2	50% PCL – 50% PLGA	Alineada
	Malla 5	50% PCL – 50% PLGA	Aleatoria
	Malla 8	50% PCL – 50% PLGA	Alineada
	Malla 11	50% PCL – 50% PLGA	Aleatoria
100PLGA	Malla 3	100% PLGA	Alineada
	Malla 6	100% PLGA	Aleatoria
	Malla 9	100% PLGA	Alineada
	Malla 12	100% PLGA	Aleatoria

Fuente: Elaboración propia.

Para la fabricación de las soluciones PCL-PLGA y modelo de electrohilado se propuso seguir los modelos clásicos de electrohilado, modificado de Boncu *et al.*, (2020) y Han *et al.*, (2022), en este caso de con el uso de PCL (Peso molecular = 80.000 g/mol), PLGA (85:15) Resomer® RG 858 S (M = 190.000 – 240.000 g/mol), cloroformo (CHCl₃), CHCl₃: 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) en relación 1:1 y linezolid (\geq 98% HPLC) todos por Sigma-Aldrich. Fabricar una solución al 10% p/v de cada polímero, 100PCL en solvente CHCl₃, 100PLGA en solvente linezolid al 5% y 50PCL-50PLGA en solvente CHCl₃: 2,2,2-trifluoroetanol (1:1) (basado en el peso seco de los polímeros). Para los parámetros de electrohilado se utilizó una jeringa de 10 ml calibre 18, con el equipo de electrospinning conectado a una fuente de voltaje de 15 kV a un caudal constante de 1mL/hora con una distancia al colector (rotatorio o plano según la malla) de 25 cm para formar mallas de 10cm x 15cm x 0,5mm. Una vez fabricadas las mallas se secaron al vacío por una noche antes de empezar los análisis. Los parámetros clave del proceso de electrospinning se describen a continuación (**Tabla 7**).

Tabla 7: Parámetros solución y electrohilado.

Parámetros de la solución				Parámetros de electrohilado			
Malla	% p/v	PCL:PLGA	Solvente	Aguja	Voltaje (kV)	Caudal (mL/h)	Distancia al colector (cm)
Malla 1	10	100:0	CHCl ₃	18	15	1	25
Malla 2	10	50:50	CHCl ₃ :TFE	18	15	1	25
Malla 3	10	0:100	Linezolid	18	15	1	25
Malla 4	10	100:0	CHCl ₃	18	15	1	25
Malla 5	10	50:50	CHCl ₃ :TFE	18	15	1	25
Malla 6	10	0:100	Linezolid	18	15	1	25
Malla 7	10	100:0	CHCl ₃	18	15	1	25
Malla 8	10	50:50	CHCl ₃ :TFE	18	15	1	25
Malla 9	10	0:100	Linezolid	18	15	1	25
Malla 10	10	100:0	CHCl ₃	18	15	1	25
Malla 11	10	50:50	CHCl ₃ :TFE	18	15	1	25
Malla 12	10	0:100	Linezolid	18	15	1	25

Fuente: Modificado de Boncu *et al.*, 2020 y de Han *et al.*, 2022.

Preparación de mallas reforzadas con NPP de soja

Una vez electrohiladas las mallas se procedió a reforzarlas con NPP de aislado de proteína de soja, de las doce mallas solo seis fueron reforzadas y las otras seis fueron utilizadas como control comparativo según cada grupo (**Tabla 8**).

Tabla 8: Mallas electrohiladas reforzadas y no reforzadas con NPP de soja.

Grupo	Malla	Composición estequiométrica	Control topográfico	Refuerzo con NPP de soja
100PCL	Malla 1	100% PCL	Alineada	Si
	Malla 4	100% PCL	Aleatoria	Si
	Malla 7	100% PCL	Alineada	No
	Malla 10	100% PCL	Aleatoria	No
50PCL - 50PLGA	Malla 2	50% PCL – 50% PLGA	Alineada	Si
	Malla 5	50% PCL – 50% PLGA	Aleatoria	Si
	Malla 8	50% PCL – 50% PLGA	Alineada	No
	Malla 11	50% PCL – 50% PLGA	Aleatoria	No
100PLGA	Malla 3	100% PLGA	Alineada	Si
	Malla 6	100% PLGA	Aleatoria	Si
	Malla 9	100% PLGA	Alineada	No
	Malla 12	100% PLGA	Aleatoria	No

Fuente: Elaboración propia.

La preparación y adición de NPP de soja para reforzar biomecánicamente las mallas creadas, para esto se utilizó la técnica de autoensamblaje inducido por evaporación, con técnicas tomadas y modificadas de las referencias Du *et al.*, (2021) y Zhijiang *et al.*, (2019), que aprovecha las características moleculares de la proteína de soja y las químicas de los andamios para poder adherirse. Para esto se propuso utilizar aislado de proteína de soja (APS) comercial Sigma-Aldrich. La fabricación de las NPP se preparó en dos etapas: **Etapa 1:** Preparación de una solución de APS al 1% (p/v) usando una mezcla de solventes de etanol: agua (70:30) bajo tratamiento en agitador ultrasónico durante 4 horas. **Etapa 2:** Se introducen las mallas en un vaso precipitado de 100 mL el cual contiene la mezcla etanol:agua (70:30) de APS por 12 horas a 25 °C con agitación para luego dejar secar al vacío por una noche. Transcurrido este periodo se induce la formación in situ de NPP sobre la superficie de las mallas mediante el proceso de autoensamblaje (formación de micelas) inducido por evaporación de solvente (**Figura 22**) dada

por la característica anfifílica de la proteína de soja, con la interacción electrostática entre los grupos carbonilo/carboxilo de las mallas y los grupos hidrofílicos de las NPP de soja por adsorción. Finalmente el andamio es lavado tres veces en una mezcla etanol:agua (70:30) para eliminar los restos proteicos libres de la superficie de las mallas y secar al vacío durante 12 horas para remover el solvente.

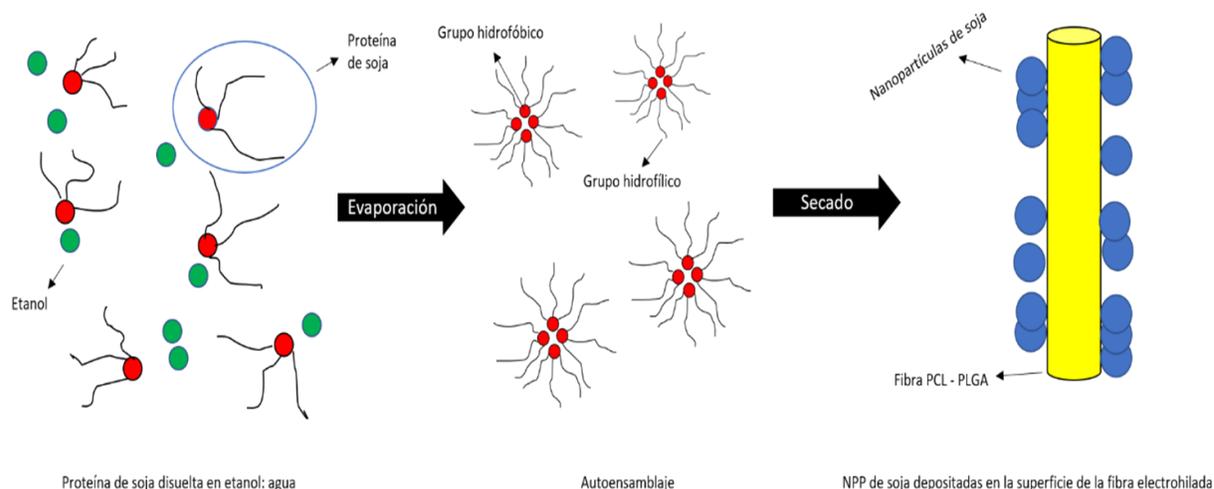


Figura 22: Esquema de formación de mallas reforzada con NPP de soja
Fuente: Modificada de Du *et al.*, 2021.

METODOLOGÍA OBJETIVO 2

Análisis morfológico y estructural

Para conocer los aspectos morfológicos de las mallas reforzadas y no reforzadas con NPP de soja como forma, diámetro y distancia de las fibras se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM). Para el análisis morfológico mediante SEM se empleó un microscopio JEOL JSM-IT300LV (JEOL USA Inc., Peabody, MA, EE. UU.) perteneciente a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, asociado a un conector de dispersión de energía de rayos X (SEM-EDX) el cual utiliza un software Aztec EDX (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido) para el microanálisis elemental de las mallas. Para la metalización de las mallas se usó oro mediante pulverización catódica con un espesor de 20 nm utilizando el sistema Denton Vacuum Desk V y un voltaje de 20 kV. (Butto *et al.*, 2020). La estructura molecular y presencia de los grupos funcionales químicos de las mallas se analizó mediante espectroscopía FTIR en un equipo “INTERSPECTRUM, Interspec 200-X®” ubicado en el laboratorio Polyforms de

FAVET de la U. de Chile con espectros de medición entre 500 – 4000 cm^{-1} (Zamanlui *et al.*, 2017). Para medir el índice de cristalinidad de los componentes de las fibras se utilizó Difracción de Rayos X (XRD) en un equipo difractómetro de rayos X Siemens D-5000X (Siemens, Munich, Alemania) o similar con radiación $\text{CuK}\alpha$ (monocromador de grafito) y un generador de rayos X ENRAF Nonius FR 590. La determinación de la estructura cristalina se mide utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$ (40 kV), un barrido escalonado de $0,2^\circ$ y ángulo (2θ) en el rango de $5 - 60^\circ$. Utilizando software DiffracPlus para el control de datos (Arce *et al.*, 2022).

Análisis mecánico

Se realizan pruebas mecánicas de tracción tendientes a encontrar propiedades satisfactorias para esto se propuso el uso de las referencias modificadas de Sarikaya y Gümüşderelioglu, (2021) y Pien *et al.*, (2021). Inicialmente, se miden mallas de dimensiones 10 cm x 5 cm x 0,5 mm de espesor, las cuales son incubadas previamente en PBSa 37°C por una noche. Para los ensayos de tracción se emplea un equipo Tinius Olsen 5ST o similar y un software Horizon con sus 4 extremos conectados a las abrazaderas a 1cm de los bordes de los andamios, partiendo con una tensión precarga 0,2 N y tirando a una velocidad de $20 \text{ mm}/\text{min}^{-1}$ hasta la rotura, obteniendo, modulo elástico, plástico y la fuerza máxima a la tracción calculada a partir de la curva tensión-deformación. Las características hidrofílicas y/o hidrofóbicas de cada malla son evaluadas por la prueba de ángulo de contacto, en un equipo VCA-Optima (AST Inc., Massachusetts, EE.UU.) o similar conectado a una microjeringa utilizando un volumen de caída de $3\mu\text{L}$ de agua desionizada sobre la superficie de las mallas y mediante la captura de imágenes se obtiene el ángulo de contacto de la gota con la superficie de la malla. Un ángulo menor a 90° indica características hidrofílicas y mayor a 90° características hidrofóbicas (Bazgir *et al.*, 2021). Finalmente, para determinar los puntos cruciales como el punto de fusión y el punto de máxima degradación de las mallas, se emplea estabilidad térmica de las mallas, para esto se propuso utilizar un analizador termográfico STA409PC (Netzsch, Alemania) o similar con rangos desde la temperatura ambiente hasta los 800°C a una velocidad de calentamiento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ (Du *et al.*, 2021).

Todos los resultados de la propuesta mecánica deben realizarse por triplicado y son analizados estadísticamente usando medidas de media, varianza y/o desviación estándar, mientras que, según la propuesta se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y/o entre

grupos en estudio, considerando un valor $P < 0,05$ para determinar una diferencia estadísticamente significativa. El análisis estadístico propuso el uso del software Prism - GraphPad™ o el programa estadístico Minitab 19 disponibles en el laboratorio Polyforms de FAVET.

METODOLOGÍA OBJETIVO 3

Estudios *in vitro* de las mallas electrohiladas

Actualmente no existe disponible en el mercado un material que satisfaga la composición natural del tendón que sea usado como un modelo *in vitro* en las tendinopatías, a pesar de la enorme investigación en el desarrollo de nuevos materiales como posibles biomateriales (Meeremans *et al.*, 2021). Para el análisis *in vitro* se propuso describir sus propiedades mecánicas, respuesta biológica celular en cultivos celulares, y su comportamiento de degradación *in vitro* usando medio biológico simulado del cuerpo humano SBF (SBF, del inglés Simulated Body Fluid).

Respuesta biológica celular *in vitro*

Usando células madre mesenquimales de la médula ósea, que han demostrado ser capaces de diferenciarse al linaje tenogénico, se evaluó su respuesta en las mallas a fin de acelerar el proceso de curación del tendón promoviendo el crecimiento de tenocitos. (Al-Ani *et al.*, 2015). Para esto se propuso el uso de Rat Mesenchymal Stem Cells (Bone Marrow) (BMSC) de Sigma-Aldrich código SCR027. Las cuales son incubadas en mallas, estas mallas son cortadas en círculos con dimensiones de 20 mm de diámetro y 4mm de altura usando placas para cultivo celular de 96 orificios INOMATRIX previamente esterilizadas por radiación UV. Luego, las mallas son puestas en tres placas de cultivo, sembrando 24 muestras iguales por cada malla según su grupo: P1 (100PCL), P2 (50PCL-50PLGA) y P3 (100PLGA) (**Figura 23**).



Figura 23: Ejemplo, Placa 1 (100PCL): 24 muestras de “Malla 1” (estrellas azules), 24 muestras de “Malla 4” (estrellas negras), 24 muestras de “Malla 7” (estrellas amarillas), 24 muestras de “Malla 10” (estrellas rojas).

Fuente: Laboratorio Polyforms – Universidad de Chile.

Las placas de cultivo son incubadas con células según la metodología modificada de la referencia Du *et al.*, (2021) y Lee *et al.*, (2011). Se siembran $1,5 \times 10^4$ células/ml mantenidas en un medio celular Dulbecco's Modified Eagle's Medium de Sigma-Aldrich adicionando 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 10% de SBF y 5,6% de bicarbonato de sodio durante 48 horas en una cámara de cultivo a 37 °C con CO₂, posteriormente cada 2 días el medio de cultivo es reemplazado hasta llegar a las 2 semanas o hasta lograr una confluencia del 80%. Para la diferenciación tenogénica se propuso el uso de la referencia modificada de Lee *et al.*, 2021 suplementando con 50 ng/mL del factor BMP-12 (Proteína morfogenética ósea, del inglés Bone Morphogenetic Protein) o Mouse GDF-7/BMP-12 de R&D Systems en un medio de diferenciación StableCell™ MEM, Alpha Modification de Sigma-Aldrich por 14 días con cambio de medio cada 2 días. Después del periodo de incubación se mide la viabilidad a partir de la funcionalidad mitocondrial de las células mediante ensayo colorimétrico MTT según modelos de Bikuna-Izaguirre *et al.*, (2022) y Sukanya y Mohanan, (2018) en los cuales se debe retirar el medio y lavar los pocillos con una solución salina tamponada con fosfato DPBS (del inglés Dubbecco's Phosphate Buffered Saline), luego se realiza un ensayo colorimétrico añadiendo 50 μL de solución de una sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a temperatura ambiente por 4 horas en oscuridad. Finalmente, se

descartará el medio y se añadirán 400 µL de dimetilsulfóxido en los pocillos para diluir los cristales de formazán durante una noche a 37°C para luego medir la viabilidad celular según valores de absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro UV-Vis como el equipo UV 1601 (Shimadzu, Japón, Lamda 25, PerkinElmer, Singapur) o similar. Luego, se evalúa la adhesión celular sobre las mallas mediante SEM, modelo de la referencia Shudo *et al.*, (2018), para esto se propone que las MSC adheridas a las superficies de las mallas se fijen en glutaraldehído al 2,5%, y se deshidraten progresivamente en solución de etanol, posteriormente son secadas en CO₂ supercrítico (Equipo Tousimis, Autosamdri-815B Supercrítico) y son analizadas mediante SEM. La diferenciación celular es confirmada mediante la medición de la expresión de los genes propios del tendón (SCX, TNMD y COL1) usando Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) para esto se plantea el uso del modelo utilizado por Chen *et al.*, (2015), en el cual se extrae el ARN de las células con TRI Reagent® de Sigma-Aldrich (Trizol) siguiendo el protocolo del fabricante para posteriormente sintetizar el ADNc a partir de este ARN extraído usando el kit Transcriptasa inversa SuperScript™ III de Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific). Para Q-PCR se utiliza KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ de Sigma-Aldrich y un sistema de detección de secuencias ABI PRISM™ 7900HT de Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific) y luego se calcula los niveles de expresión de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa según las secuencias de los cebadores (**Tabla 9**).

Tabla 9: Secuencias de cebadores qPCR.

Gen	Secuencia de cebadores	Tamaño (bp)
COL1	F: TGGTGAGACGTGGAAACCTG R: CTTGGGTCCCTCGACTCCTA	193
TNMD	F: GCGACAATGTGACTATGTAC R: GTCTTCTCCACCTTCACTTG	163
SCX	F: GCAAGCTCTCCAAGATTGAG R: CGTCTTCTGTCACGGTCTT	281

Fuente: Chen *et al.*, 2015.

Estudio de degradación celular

Al momento utilizar andamios *in vivo* se debe tener la certeza de que estos no se degraden antes del periodo necesario, en el caso de la recuperación posquirúrgica de regeneración del tendón la malla debe estar presente en la fase inflamatoria, de proliferación y a los menos la primera parte de la fase de remodelación antes de degradarse, para este estudio se propuso registrar cinco trozos de cada una de las mallas fabricadas con tamaño y pesos conocidos (5cm x 5cm), utilizando el

modelo de Pien *et al.*, (2021), las cuales serán incubadas en 1L de SBF a 37°C por 16 semanas. Cada 7 días las mallas son lavadas con agua destilada y eliminados los minerales depositados sobre la superficie, secadas al vacío en una estufa a 37°C y 100 mbar por una noche para que al día siguiente sean medidas y pesadas, se registra su pérdida de peso y se continua con el periodo de incubación restante (Pien *et al.*, 2021). Finalmente, todos los resultados de los ensayos realizados se analizan por diferencias estadísticas usando ANOVA (Prism - GraphPad™).

Estudios *in vivo*: Selección de mallas electrohiladas

Una vez hechas todas las pruebas y analizados los datos estadísticamente se procedió a la elección de las mallas según procedimiento *in vivo*, de las doce mallas totales se eligieron solo tres, independiente de su topografía o refuerzo de NPP de soya, siendo una malla por cada grupo, es decir, una malla del grupo 100PCL, una malla del grupo 50PCL-50PLGA y una malla del grupo 100PLGA. Para la selección de cada una de estas mallas se completó la “Tabla de selección de mallas electrohiladas” (ANEXO 1) que permite a partir de puntajes relacionados a los análisis mecánicos e *in vitro* seleccionar las mejores mallas.

Estudios *in vivo* de evaluación biológica de las mallas en reparación quirúrgica

Se describe un protocolo experimental *in vivo* utilizando el modelo de Lee *et al.*, (2019). Básicamente, 20 ratas *Rattus Novergicus* de 10 semanas de edad, fueron divididos en 4 grupos (G0-G3) de 5 ratas cada uno con un periodo de evaluación de 16 semanas. Los distintos grupos incorporaron una de las tres mallas seleccionadas de la siguiente forma: G0: grupo de control (este grupo no utiliza malla), G1: malla PCL100, G2: malla 50PCL-50PLGA, G3: malla 100PLGA. La propuesta propuso realizar un procedimiento quirúrgico bajo anestesia general inducida por 5mg/kg de xilacina y mantenida por isoflurano al 1,5% con 100% de O₂, realizando una incisión longitudinal en la piel diseccionando el tendón de Aquiles de forma perpendicular a las fibras del mismo, generando una rotura total. Esta zona expuesta se aplastó durante 5 minutos con un clip vascular de 100 g para completar una lesión por aplastamiento. Luego, en el proceso quirúrgico reparativo se implantaron las mallas cargadas con BMSC diferenciadas correspondientes a cada grupo entre las fibras rotas del tendón para luego seguir con una cirugía clásica reparativa (tenorrafia) (Figura 24), una vez concluido ese proceso se recubre esta zona del tendón en forma envolvente con la malla del mismo grupo cargada con ácido hialurónico a fin de evitar adherencias en el proceso posquirúrgico. En el caso del G0 este no utiliza mallas y

su proceso reparativo es mediante una tenorrafia clásica. Todas las mallas utilizadas son lavadas con PBS y esterilizadas en una campana deflujo laminar con radiación UV durante 2 horas previo a los estudios *in vivo*. Mediante jaulas de actividad se medieron diariamente los tiempos de activación totales de los distintos grupos para su posterior análisis estadístico (ANOVA), además cada 7 días se realizaron pruebas de ultrasonografía para evaluar y valorar los niveles de recuperación. Así, 16 semanas después de la implantación se extraerán los tendones de los grupos G0-G3 y para ser teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción tricrómica para su posterior análisis histológico y de comportamiento mecánico, sometiendo a estos tendones a las pruebas descritas en la “METODOLOGÍA OBJETIVO 2: Análisis mecánico”. Es importante destacar y aclarar que todo procedimiento concerniente al trato de los animales que involucre toma de muestras, tratamientos o eutanasia, son realizados por Médicos Veterinarios respetando el capítulo “*Utilización de animales en la investigación y educación*” del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE, 2021.

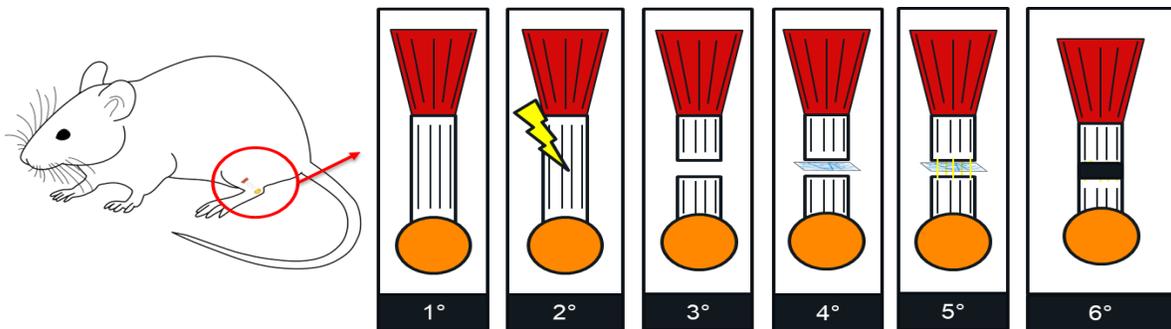


Figura 24 (G1-G3): 1º Tendón de Aquiles en condiciones normales, 2º Se genera la rotura del tendón por aplastamiento, 3º el tendón queda dividido en 2 segmentos, 4º se procede a implantar en entre las fibras rotas del tendón una malla electrohilada cargada con MSC diferenciadas, 5º una vez sobrepuesta la malla se procederá a fijar y unir ambas partes del tendón mediante una tenorrafia clásica, 6º otra malla del mismo grupo recubriendo la zona para evitar posibles adherencias.

Fuente: Elaboración propia.

RESULTADOS

Se utilizó el modelo PRISMA 2020 para sintetizar y organizar la información, los resultados bibliográficos esquematizados en el “Diagrama de Flujo PRISMA 2020” nacieron de las palabras clave: “*electrospinning*” OR “*electrospun*” OR “*biomaterials*” OR “*tendón*” OR “*PCL*” OR “*PLGA*” OR “*nanoparticles*” OR “*soy*” desde la base de datos Scopus dando como resultado 1.169.284 publicaciones. Se han eliminado registros por no cumplir con los criterios de selección como lo son fecha (256.355), área temática no concerniente (169.171), tipo de documento (71.003), idioma (19.533), artículos de revistas fuera de los cuartiles de selección (371.246), revistas de áreas temáticas no concernientes (35.068), dejándonos 246.908 publicaciones a disposición, del total disponible 246.807 publicaciones no han sido consideradas, utilizando en 105 publicaciones (**Figura 25**), las cuales provienen desde 77 revistas de las cuales 55 son Q1 y 22 son consideradas Q2 por Scimago Journal & Country Rank.

De la página web Academia.edu se obtuvo el libro “Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular 6a.” Utilizando en total 106 referencias bibliográficas para la fabricación de esta Memoria de Título. Para la evaluación y análisis de la calidad de las publicaciones científicas dentro de su área de estudio (**Tabla 10**). Así como también, se detallan los indicadores de impacto productivo de los autores en relación a la cantidad de publicaciones, número de citas por artículo e índice H (**Tabla 11**).

Diagrama de flujo PRISMA 2020

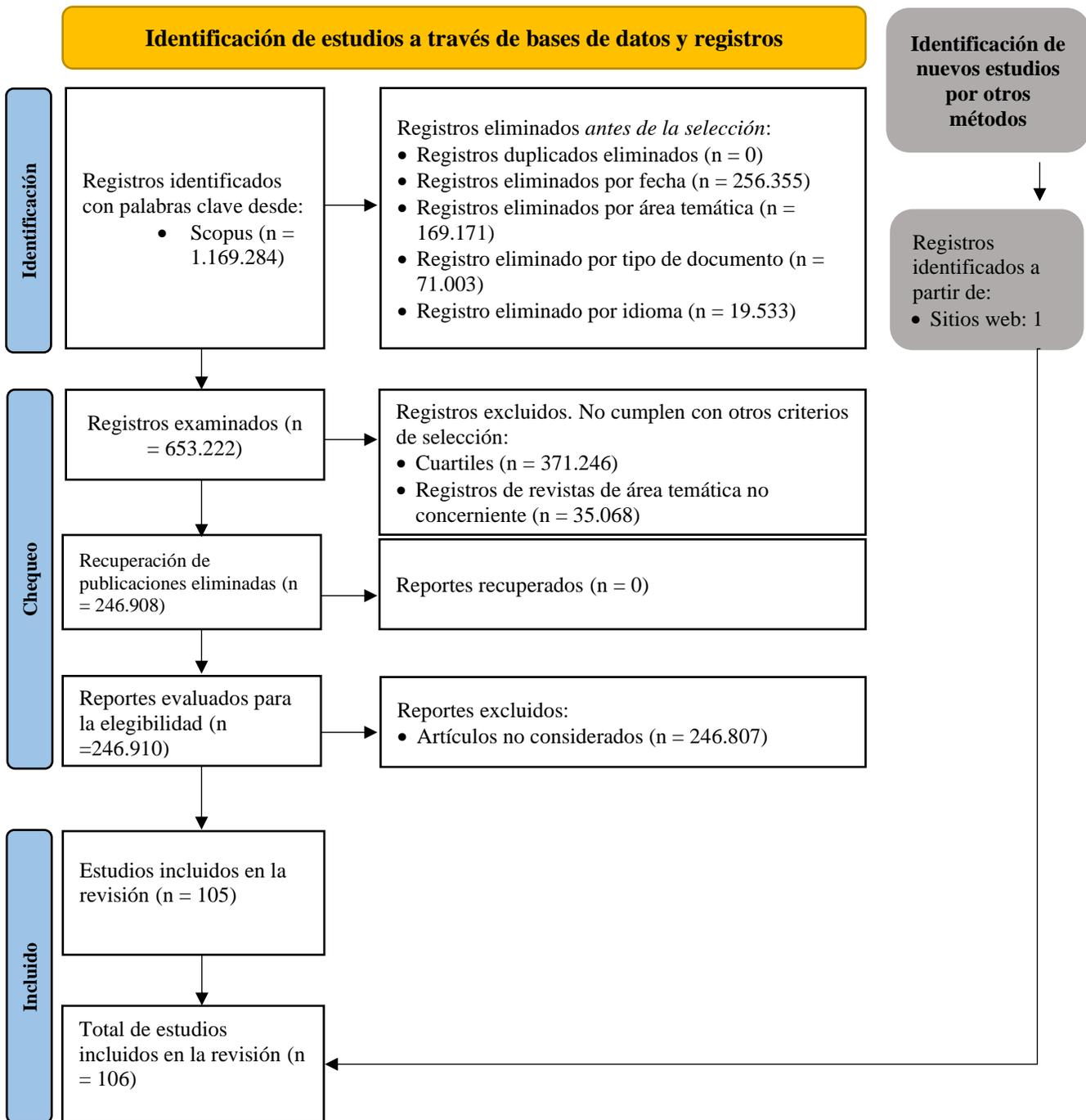


Figura 25: Diagrama de Flujo PRISMA
Fuente: Modificado de Page *et al.*, 2021.

Tabla 10: Factor de impacto de las revistas utilizadas

Revista	Factor de impacto
Cells	Q1
Current Reviews in Musculoskeletal Medicine	
Equine Practice	
Green Chemistry	
Advanced Pharmaceutical Bulletin	
Nano Materials Science	
Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials	
Stem Cell Research & Therapy	
Pharmaceutics	
Polymers	
Biotechnology Advances	
Scandinavian Journal of Medicine & science in sports	
Advanced healthcare materials	
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	
The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	
Journal of Controlled Release	
Journal of Drug Delivery Science and Technology	
International Journal of Pharmaceutics	
Chemical Engineering Journal	
Arabian Journal of Chemistry	
Polymer Testing	
Materials & Design	
Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery	
Materials Science and Engineering: C	
Acta Biomaterialia	
Orthopaedics and Trauma	
PLoS ONE	
Journal of Industrial and Engineering Chemistry	

Advanced Materials Technologies	
Trends in Biotechnology	
Advanced Drug Delivery Reviews	
Journal of Biomechanics	
Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy	
Translational Research	
Equine Veterinary Journal	
The BMJ	
Scientific Reports	
Materials Chemistry and Physics	
Nutrients	
Stem Cell Research and Therapy	
International Journal of Biological Macromolecules	
Cytotherapy	
Chinese Journal of Polymer Science	
Orthopaedic Journal of Sports Medicine	
Materials Today	
Progress in Polymer Science	
Advanced Materials	
Cellulose	
Biomaterials	
Tissue Engineering - Part B: Reviews	
International Journal of Nanomedicine	
Clinical Orthopaedics and Related Research	
Journal of Bone and Mineral Research	
Journal of Hand Surgery	
Journal of Bone and Joint Surgery - Series A	

Stem Cells International	Q2
Regenerative Engineering and Translational Medicine	

Journal of Materials Science: Materials in Medicine	
Crystals	
Journal of Equine Veterinary Science	
Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	
Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials	
Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	
International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials	
Journal of Orthopaedic Research	
Journal of Nanomaterials	
Therapeutic Delivery	
Tissue Engineering and Regenerative Medicine	
Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition	
Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry	
Journal of Materials Science: Materials in Medicine	
Materials	
Molecular Biotechnology	
Journal of Experimental Orthopaedics	
Nanocomposites	
Sports Medicine and Arthroscopy Review	
Journal of Comparative Pathology	

Fuente: Scimago Journal & Country Rank, 2022.

Tabla 11: Indicadores de impacto productivo de los autores referenciales

Autor	Artículos publicados	N° de citas por artículo	Índice H
Al-Ani, Mohanad Kh	8	155	8
Al-Makhzoomi, Anas K.	5	67	2
Alves, A.	1	36	1
Arce, Tatiana	1	0	0
Avossa, Joshua	18	179	8
Azari, Arezo	8	41	4
Badmus, Muhammad	1	-	1
Banik, Brittany L.	17	800	8
Batten, M.	1	118	1
Barkay-Olami, Hilla	3	30	2
Bazgir, Morteza	3	12	2
Bianchi, Eleonora	6	27	2
Bidder, Miri	21	850	15
Bikuna-Izagirre, Maria	2	2	1
Bhardwaj, Nandana	30	5.013	20
Bosch, Gerco	15	532	11
Bottagisio, M.	34	462	13
Brennan, David A.	7	108	6
Butto, Nicole	7	48	4
Castejón-Riber, Cristina	19	111	6
Cardwell, Robyn D.	5	158	5
Chan, Barbara	95	3.482	34
Chen, Wan	26	273	11
Chereddy, Kiran Kumar	10	548	7
Chor, Ana	5	47	4

Dehghani, Bijan	5	211	4
Dehkordi, Azar Nourian	2	12	1
Du, Zhanwen	1	-	1
Ekwueme, Emmanuel C.	16	157	7
Erlacher, Ludwig	59	2.203	25
Espinoza, Sergio Miguel	2	65	1
Fratzl, P.	-	-	-
Gumusderelioglu, M.	73	1.885	29
Guo, Yani	2	18	1
Han, Dongxue	9	199	6
Haider, Adnan	65	2.424	25
Hassan, Ibrahim	46	602	23
He, Yumiao	4	28	2
Izumi, Soutarou	16	255	11
Jayakumar, Aswathy	36	315	10
Jia, Jun	10	258	5
Jung, Christian	16	262	8
Kai, Dan	87	4.144	37
Kaith, Balbir Singh	199	4.468	42
Kapoor, Deepak N.	42	756	14
Klein, Matthew	134	7.084	42
Kolluru, Pavan V.	10	150	6
Kovacevic, David	58	1.506	22
Lee, Conrad	1	-	-
Lee, Jonathan Y.	5	251	4
Lee, Sang-jin	75	2.029	29
Li, Ya	39	920	18

Lim, Wei Lee	2	85	2
Liu, Yang	2	197	2
Lomas, Alex J.	8	306	5
Makadia, Hirenkumar K.	7	2.754	4
Maleki, Sasan	2	8	2
Malikmammadov, Elbay	4	421	4
Mandal, Piyali	6	17	2
Meeremans, Marguerite	4	8	2
Müller, Sebastian	37	822	12
Nichols, Anne E.C.	16	162	8
Oliva, Francesco	237	3.664	39
O'Brien, Claire	2	9	1
Page, Matthew J.	138	61.094	46
Patterson-Kane, J.	96	1.953	30
Peles, Zachi	4	115	3
Pereira Barros, Janetty	3	10	2
Pien, Nele	11	104	4
Pietschmann, Matthias F.	91	1.500	25
Qian, Yunzhu	17	271	8
Rashid, Mustafa Saad	24	314	9
Rahmani, Azizeh	13	413	10
Rizzo, Gianluca	35	809	15
Ross, Michael	-	-	-
Ruiz-Alonso, Sandra	8	70	5
Russo, Valentina	80	758	22
Sadeghzadeh, Hadi	7	193	6

Sarıkaya, Burcu	5	37	2
Sensini, Alberto	13	202	10
Shi, Ming	113	3.222	32
Shojaee, Asiyeh	7	27	2
Shudo, Yashuhiro	103	1.171	19
Siddiqui, Nadeem	11	297	7
Song, Jae-hwang	21	142	8
Song, Zhiming	9	106	7
Stromberg, Zachary R.	28	281	10
Sukanya, V. S.	2	56	2
Tian, Huafeng	127	2.531	33
Trippel, S.	85	3.269	35
Varshney, Neelima	14	73	4
Vaughn, Natalie H.	8	60	10
Vigano, Marco	84	865	20
Wang, Xianfeng	112	4.760	45
Woodruff, Maria A.	142	6.423	33
Wu, Yang	35	567	18
Yoon, Jihyun	10	277	3
Yu, Yihsun	45	285	11
Zamanlui Benisi, Soheila	16	231	9
Zhang, Can	14	781	9
Zhang, Hong	5	26	3
Zhang, Xi	6	112	6
Zhijiang, Cai	29	794	18

Fuente: Scopus, 2022

DISCUSIÓN

Los conocimientos sobre lesiones graves que terminan en roturas de tendones hablan de un pronóstico limitado en su proceso recuperativo por las deficiencias fisiológicas de estos, pero la información disponible sobre las interacciones de las poblaciones celulares participantes al momento de la curación del tendón es muy limitada (fibroblastos, miofibroblastos o macrófagos), ya que las interacciones entre ellas pueden alterar su comportamiento, señalización o incluso como en el caso de interacciones paracrinas, impulsar fibrosis en los tejidos (Nichols *et al.*, 2019) por lo que el planteamiento de los objetivos de la medicina regenerativa debe comprender como punto clave las interacciones célula-célula y célula-matriz para poder crear el microambiente ideal en los andamios (Banik *et al.*, 2016). Andamios que han mostrado resultados alentadores en el mundo de la ingeniería de los tejidos, con grandes aplicaciones en diversas áreas con variedad de polímeros y técnicas, pero que a día de hoy sigue teniendo limitantes que le han impedido ser la solución ideal, como lo son las capacidades mecánicas y biológicas, las cuales tienen directa relación con los parámetros de las soluciones y sus procesamientos (viscosidad, voltaje, concentración del polímero, conductividad, distancia al colector, tamaño de la aguja, topografía de la malla, etc.), por lo que los desafíos son establecer parámetros ideales para cada área de estudio (Bhardwaj y Kundu, 2010). Algo similar es lo que pasa en esta área, pero aplicada a los tendones, donde se describen resultados prometedores de estudios que han producido fibras ultrafinas que se asemejan a la MEC logrando promover efectivamente la reparación de tendones desgarrados con capacidades incluso de promover la diferenciación celular en los andamios (Zhang *et al.*, 2015). Una crítica que poseen los polímeros sintéticos, es el riesgo de la respuesta inmunitaria por parte del organismo, así como también la transmisión patógenos y productos de degradación que pudieran ser tóxicos (Ruiz-Alonso *et al.*, 2021).

La técnica ES puede ampliar su uso a una gran variedad de polímeros de distinta naturaleza, lo cual permite potenciar cada una de las mallas según sea el objetivo, y unos de los polímeros que poseen justamente esta capacidad miscible son PCL y PLGA, los cuales al unirse ofrecen propiedades mecánicas superiores de hilabilidad, flexibilidad, biocompatibilidad, no toxicidad, etc. puntos que se han criticado a otros materiales aquí han sido candidatos deseables a nivel biomecánico (Qian *et al.*, 2016). Por otro lado, sus características moleculares les permiten seguir ampliando sus capacidades mediante refuerzos como por ejemplo la proteína de soya, la cual ha

dejado de ser utilizada únicamente como fuente nutricional, convirtiéndose en un biopolímero natural de excelentes características, logrando mejorar los parámetros de las mallas al ser utilizadas como nanopartículas, de la misma forma en la que se han usado como laminas o fibras (Jayakumar *et al.*, 2022; Du *et al.*, 2021), pero sin establecer información precisa sobre como la proteína de soya actúa sobre los comportamientos célula-célula o célula-matriz, por lo que hace falta más información para poder entender el verdadero funcionamiento a nivel biológico del uso de esta proteína como apoyo a los andamios tradicionales.

Las metodologías de búsqueda de la información utilizadas en esta Memoria de título arrojaron resultados favorables a los objetivos planteados, con revistas destacadas que han permitido plantear de forma completa una propuesta de fabricación de mallas electrohiladas, pruebas morfológicas, mecánicas, *in vitro* e *in vivo*. Si bien muchos autores tienen un índice H bajo, se ha descartado como método de selección/exclusión por la subjetividad que esto representa, investigadores jóvenes por ejemplo, no tendrán las mismas publicaciones que otros investigadores seniors destacados que llevan más años, lo que no significa que sus publicaciones sean deficientes, es por esto que se ha decidido que las revistas participantes posean un índice Q1 o Q2, lo cual representa un factor importante para destacar la calidad de las publicaciones, ya que revistas de alto impacto tienen un alto estándar para publicar en ellas. A partir del método PRISMA se logró sintetizar una gran cantidad de información, mucha de ella no concerniente al área de estudio (cardiología, gastrointestinal, ocular, etc.) y mucha que no cumplía con los criterios descritos, por lo que el umbral de trabajo se adaptó a esta metodología logrando resultados positivos que permitieron desarrollar todos los objetivos de esta Memoria de Título monográfica.

El objetivo práctico planteó la preparación de 12 mallas electrohiladas, todas distintas entre sí a modo de poder tener una comparativa lo suficientemente amplia en cada una de las pruebas asociadas, pruebas que fueron seleccionadas en base a las necesidades de su uso posterior *in vivo* y en las deficiencias que han planteado otros investigadores, por ejemplo, se han descrito problemas mecánicos y de biodegradabilidad, ya sea por andamios con poca resistencia o que se degradan antes del periodo crítico posterior a la cirugía, por lo que son pruebas que forman parte de esta propuesta de tesis, así como también una metodología que analizó la capacidad y respuestas de viabilidad, proliferación y diferenciación celular en este tipo de andamios. Lo

anterior, aplicado tanto a mallas reforzadas, no reforzadas, con una concentración total de PCL, de PLGA, mixta o si la topografía afecta a este tipo de resultados para finalmente elegir en base a las pruebas realizadas las mallas que formaron parte del protocolo *in vivo*.

Respecto de los análisis de FTIR y XRD, estas nos permitieron conocer la estructura molecular y confirmar o descartar el éxito de la idea principal que fue lograr mezclar todos los materiales en una sola malla nueva compuestas de PCL, de PLGA y de NPP de soya. De la misma forma, se ha informado el éxito del uso de células madre mesenquimales como apoyo a la recuperación de tendones de manera directa al diferenciarse al linaje tenogénico (Al-Ani *et al.*, 2015) se espera que al crear un microambiente propicio esto pueda ocurrir de la misma forma sobre las mallas creadas a partir de la suplementación con BMP-12 que ha mostrado un alto nivel de efectividad (Lee *et al.*, 2022), así como la topografía que emula esta característica anisotrópica típica de los tendones (Cardwell *et al.*, 2012), es que se espera un desarrollo a este linaje a lo que se debe considerar que al no crear este microambiente las células podrían diferenciarse en otro linaje como cartílago o hueso (Zhang *et al.*, 2018). Si bien, se espera que las mallas alineadas reforzadas tengan mejores resultados en las pruebas *in vitro* e *in vivo*, el cuestionamiento podría ser, el por qué se propone el uso de mallas con topografía aleatoria, que no emulan las características del tendón en su totalidad. La base de esto es tener un espectro lo más amplio posible al momento de comparar los resultados obtenidos, por ejemplo, conocer los niveles de expresión génica, capacidades mecánicas, morfológicas, etc. Al utilizar todas las mallas en un procedimiento *in vivo* tendríamos un espectro de análisis mucho mayor, hay que tener en cuenta que al trabajar con seres vivos los protocolos deben ser más estructurados y evitar el uso de la mayor cantidad de modelos posibles, según se establece en el Código sanitario para animales terrestres” de la OIE, 2021. Se determinó que el uso de las mallas que cumplan con las mejores propiedades a las pruebas de los tres grupos presentados (100PCL, 50PCL-50PLGA y 100PLGA), la evaluación incluyó una cirugía que no se adapta a la realidad de operación (corte de tendón por aplastamiento) pero que nos ofrece un escenario de modular la lesión por parte de la malla a utilizar. Conocer cómo afecta la carga celular y como una malla de refuerzo que recubre el tendón puede evitar posibles adherencias, es por esto que se ha buscado abarcar la mayor cantidad de áreas posibles en este estudio a modo de obtener la mayor cantidad de información posible que sea un apoyo en la búsqueda del objetivo terapéutico absoluto en este tipo de lesiones.

CONCLUSIÓN

A partir de la recolección de información recabada en esta Memoria de Título, se demuestra que:

- ES, como técnica de nanofabricación de andamios electrohiladas de importancia en la ingeniería de los tejidos, posee capacidad de imitar la MEC de los tendones, dado su versatilidad, capacidad de utilizar mezclas de materiales poliméricos, sencillez y parámetros de configuración de la técnica, los cuales permiten lograr andamios 3D capaces de modulares reparaciones posquirúrgica de los tejidos lesionados.

- Mallas fibrilares de PCL-PLGA reforzados con NPP de soya, dado sus características morfológicas, mecánicas y biológicas, pueden ser utilizados como método modulador en lesiones que involucren roturas de los tendones en un modelo murino. Se encontró que las características de las mallas se ajustan a lo reportado en bibliografía.

Finalmente, de esta Memoria de Título monográfica refleja la versatilidad de esta profesión para abordar temáticas de la clínica clásica, y explorar otras disciplinas como la química, la bioquímica, la farmacia e incluso la medicina humana.

BIBLIOGRAFÍA

AL-ANI, M.; XU, K.; SUN, Y.; PAN, L.; XU, Z.; YANG, L. 2015. Study of Bone Marrow Mesenchymal and Tendon-Derived Stem Cells Transplantation on the Regenerating Effect of Achilles Tendon Ruptures in Rats. *Stem Cells International*. 2015:984146.

AL-MAKHZOOMI, A.; KIRK, T.; DYE, D.; ALLISON, G. 2021. Contribution of glycosaminoglycans to the structural and mechanical properties of tendons – A multiscale study. *Journal of Biomechanics*. 128:110796.

ALVES, A.; STEWART, A.; DUDHIA, J.; KASASHIMA, Y.; GOODSHIP, A.; SMITH, R. 2011. Cell-based Therapies for Tendon and Ligament Injuries. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 27(2):315-333.

ARCE, Z.; YAZDANI-PEDRAM, M.; NEIRA-CARRILLO, A. 2022. Electrocrystallization of Calcium Oxalate on Electrospun PCL Fibers Loaded with Phytic Acid as a Template. *Polymers*. 14(15):3190.

AVOSSA, J.; HERWIG, G.; TONCELLI, C.; ITEL, F.; ROSSI, R. 2022. Electrospinning based on benign solvents: current definitions, implications and strategies. *Green Chemistry*. 24(6):2347-2375.

AZARI, A.; GOLCHIN, A.; MAYMAND, M.; MANSOURI, F.; ARDESHIRYLAJIMI, A. 2022. Electrospun Polycaprolactone Nanofibers: Current Research and Applications in Biomedical Application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 12(4):658-672.

BADMUS, M.; LIU, J.; WANG, N.; RADACSI, N.; ZHAO, Y. 2021. Hierarchically electrospun nanofibers and their applications: A review. *Nano Materials Science*. 3(3):213-232.

BANIK, B.; LEWIS, G.; BROWN, J. 2016. Multiscale Poly-(ϵ -caprolactone) Scaffold Mimicking Non-linearity in Tendon Tissue Mechanics. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. 2:1-9.

BATTEN, M.; HANSEN, J.; DAHNERS, L. 1996. Influence of dosage and timing of application of platelet-derived growth factor on early healing of the rat medial collateral ligament. *Journal of Orthopaedic Research*. 14(5):736-741.

BARKAY-OLAMI, H.; ZILBERMAN, M. 2016. Novel porous soy protein-based blend structures for biomedical applications: Microstructure, mechanical, and physical properties. *Journal of Biomedical Materials Research – Part B Applied Biomaterials*. 104(6):1109-1120.

BAZGIR, M.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; ELIES, J.; SAEINASAB, M.; COATES, P.; YOUSEFFI, M.; SEFAT, F. 2021. Degradation and Characterisation of Electrospun Polycaprolactone (PCL) and Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Materials*. 14(17):4773.

BIANCHI, E.; RUGGERI, M.; ROSSI, S.; VIGANI, B.; MIELE, D.; BONFERONI, M.; SANDRI, G.; FERRARI, F. 2021. Innovative strategies in tendon tissue engineering. *Pharmaceutics*. 13(1):1-24.

BIANCHI, E.; FACCENDINI, A.; DEL FEVERO, E.; RICCI, C.; CALIOGNA, L.; VIGANO, B.; PAVESI, F.; PEROTTI, C.; DOMINGUES, R.; GOMES, M.; ROSSI, S.; SANDRI, G. 2022. Topographical and Compositional Gradient Tubular Scaffold for Bone to Tendon Interface Regeneration. *Pharmaceutics*. 14(10):2153.

BIDDER, M.; TOWLER, D.; GELBERMAN, R.; BOYER, M. 2000. Expression of Mrna for vascular endothelial growth factor at the repair site of healing canine flexor tendon. *Journal of Orthopaedic Research*. 18(2):247-252.

BIKUNA-IZAGIRRE, M.; ALDAZABAL, J.; PAREDES, J. 2022. Gelatin Blends Enhance Performance of Electrospun Polymeric Scaffolds in Comparison to Coating Protocols. *Polymers*. 14(7):1311.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 28(3):325-347.

BONCU, E.; USKUDAR, A.; FARUK, M.; SAVASER, A.; GOKCE, A.; OZDEMIR, N. 2020. In vitro and in vivo evaluation of linezolid loaded electrospun PLGA and PLGA/PCL fiber mats for prophylaxis and treatment of MRSA induced prosthetic infections. *International Journal of Pharmaceutics*. 573:118758.

- BOSCH, G.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P.; VAN SCHIE, H.** 2011. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scandinavian Journal of Medicine & science in sports*. 21(4):554-561.
- BOTTAGISIO, M.; LOVATI, A.** 2017. A review on animal models and treatments for the reconstruction of Achilles and flexor tendons. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 28:45.
- BRENNAN, D.; CONTE, A.; KANSKI, G.; TURKULA, S.; HU, X.; KLEINER, M.; BEACHLEY, V.** 2018. Mechanical Considerations for Electrospun Nanofibers in Tendon and Ligament Repair. *Advanced healthcare materials*. 7(12):1701277.
- BUTTO, N.; COTRINA, N.; DÍAZ-SOLER, F.; YAZDANI-PEDRAM, M.; NEIRA-CARRILLO, A.** 2020. Effect of Chitosan Electrospun Fiber Mesh as Template on the Crystallization of Calcium Oxalate. *Crystals*. 10(6):453.
- CASTEJON-RIBER, C.; RIBER, C.; RUBIO, M.; AGÜERA, E.; MUÑOZ, A.** 2017. Objectives, Principles, and Methods of Strength Training for Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 56:93-103.
- CARDWELL, R.; DAHLGREN, L.; GOLDSTEIN, A.** 2012. Electrospun fibre diameter, not alignment, affects mesenchymal stem cell differentiation into the tendon/ligament lineage. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 8(12):937-945.
- CHAN, B.; CHAN, K.; MAFFULLI, N.; WEBB, S.; LEE, K.** 1997. Effect of basic fibroblast growth factor: An in vitro study of tendon healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 342:239-247.
- CHEN, W.; TANG, H.; ZHOU, M.; HU, C.; ZHANG, J.; TANG, K.** 2015. Dexamethasone inhibits the differentiation of rat tendon stem cells into tenocytes by targeting the scleraxis gene. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 152:16-24.
- CHEREDDY, K.; PAYEN, V.; PRÉAT, V.** 2018. PLGA: From a classic drug carrier to a novel therapeutic activity contributor. *Journal of Controlled Release*. 289:10-13.

CHOR, A.; PIRES, R.; MACHADO, A.; FARIÑA, M.; PONCHE, A.; SIRELLI, L.; SCHRODJ, G.; GREE, S.; RODRIGUES, L.; ANSELME, K.; LOPES, M. 2020. In Vitro Degradation of Electrospun Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) for Oral Mucosa Regeneration. *Polymers*. 12(8):1853.

DEGHANI, B.; RODEO, S. 2019. Cell Therapy-a Basic Science Primer for the Sports Medicine Clinician. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. 12(4):436-445.

DEHKORDI, A.; SHAFIEI, S.; CHEHELGERDI, M.; SABOUNI, F.; SHARIFI, E.; MAKVANDI, P.; NASROLLAHI, N. 2022. Highly effective electrospun polycaprolactone/layered double hydroxide nanofibrous scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 76:103827.

DU, Z.; JIA, S.; XIONG, P.; CAI, Z. 2021. Preparation of protein nanoparticle-coated poly(hydroxybutyrate) electrospun nanofiber based scaffold for biomedical applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 71(9):677-691.

ERLACHER, L.; MCCARTNEY, J.; PIEK, E.; TEN DIJKE, P.; YANAGISHITA, M.; OPPERMANN, H.; LUYTEN, F. 1998. Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 13(3):383-392.

EKWUEME, E.; CHOI, B.; YU, C.; RAO, R.; PELLEGRINI, M.; MOHIUDDIN, M.; FREEMAN, J. 2017. Sub-failure Stretch Injury Response in Rat Achilles Tendon. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. 3(4):239-246.

ESPINOZA, S.; PATIL, H.; SAN MARTIN, E.; CASTAÑAS, R.; IGE, P. 2020. Poly-ε-caprolactone (PCL), a promising polymer for pharmaceutical and biomedical applications: Focus on nanomedicine in cancer. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 69(2):85-126.

FRATZL, P. 2008. Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction. En: Collagen Structure and Mechanics. Germany. Springer. pp. 1-12.

GUMUSDERELIOGLU, M.; DALKIRANOĞLU, S.; SEDA, R.; ÇAKMAK, S. 2011. A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 98(3):461-472.

GUO, Y.; HUANG, J.; FANG, Y.; HUANG, H.; WU, J. 2022. 1D, 2D, and 3D scaffolds promoting angiogenesis for enhanced wound healing. *Chemical Engineering Journal*. 437(2):134690.

HAN, D.; GHUBAYRA, R.; CARPENTER-THOMPSON, R.; JIAO, T.; LI, B. 2022. Solvent selection and its effect on crystallization behavior of poly(ϵ -caprolactone) in electrospun poly(ϵ -caprolactone)/poly (lactic-co-glycolic acid) blend fibers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 644:128896.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. 2018. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*. 11(8):1165-1188.

HASSAN, I.; ANKE, K. 2020. A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. *Polymer Testing*. 90:106647.

HE, Y.; QUIN, L.; FANG, Y.; DAN, Z.; SHEN, Y.; TAN, D.; HUANG, Y.; MA, C. 2020. Electrospun PLGA nanomembrane: A novel formulation of extended-release bupivacaine delivery reducing postoperative pain. *Materials & Design*. 193:108768.

HUTMACHER, D. 2001. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues – State of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 12(1):107-124.

IZUMI, S.; OICHI, T.; SHETYE, S.; ZHANG, K.; WILSON, K.; IWAMOTO, M.; KUO, C.; AKABUDIKE, N.; ADACHI, N.; SOSLOWSKY, L. 2021. Inhibition of glucose use improves structural recovery of injured Achilles tendon in mice. *Journal of Orthopaedic Research*. 40(6):1409-1419.

JAYAKUMAR, A.; RADOOR, S.; RADHAKRISHNAN, E.; NAIR, I.; SIENGCHIN, S.; PARAMESWARANPILLAI, J. 2022. Soy protein-based polymer blends and composites. En: Biodegradable Polymers, Blends and Composites. 1^o ed. Woodhead Publishing. pp. 39-57.

JIA, J.; LIU, G.; GUO, Z.; YU, J.; DUAN, Y. 2012. Preparation and Characterization of Soluble Eggshell Membrane Protein/PLGA Electrospun Nanofibers for Guided Tissue Regeneration Membrane. *Journal of Nanomaterials*. 2012:282736

JUNG, C.; SPREITER, G.; AUDIGÉ, L.; FERGUSON, S.; FLURY, M. 2016. Patch-augmented rotator cuff repair: influence of the patch fixation technique on primary biomechanical stability. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 136:609-616.

KAI, D.; LIOW, S.; LOH, X. 2014. Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 45:659-670.

KAITH, B.; BHATIA, J.; DHIMAN, J.; SINGLA, R.; METHA, P.; YADAV, V.; BHATTI, M. 2013. Synthesis and optimization of soy protein fiber based graft copolymer through response surface methodology for removal of oil spillage. *Polymer Bulletin*. 70(11):3155-3169.

KAPOOR, D.; BHATIA, A.; KAUR, R.; SHARMA, R.; KAUR, G.; DHAWAN, S. 2015. PLGA: A unique polymer for drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 6(1):41-58.

KLEIN, M.; YALAMANCHI, N.; PHAM, H.; LONGAKER, M.; CHANG, J. 2002. Flexor tendon healing in vitro: Effects of TGF- β on tendon cell collagen production. *Journal of Hand Surgery*. 27(4):615-620.

KOVAVECIC, D.; RODEO, S. 2008. Biological augmentation of rotator cuff tendon repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466(3):622-633.

KOLLURU, P.; LIPNER, J.; LIU, W.; XIA, Y.; THOMOPOULOS, S.; GENIN, G.; CHASIOTIS, I. 2013. Strong and tough mineralized PLGA nanofibers for tendon-to-bone scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 9(12):9442-9450.

LEE, C. 2021. Tendon physiology and repair. *Orthopaedics and Trauma*. 35(5):274-281.

LEE, J.; ZHOU, Z.; TAUB, P.; RAMCHARAN, M.; LI, Y.; AKINBIYI, T.; MAHARAM, E.; LEONG, D.; LAUDIER, D.; RUIKE, T.; TORINA, P.; ZAIDI, M.; MAJESKA, R.; SCHAFFLER, M.; FLATOW, E.; SUN, H. 2011. BMP-12 Treatment of Adult Mesenchymal

Stem Cells In Vitro Augments Tendon-Like Tissue Formation and Defect Repair In Vivo. PLoS ONE. 6(3):e17531.

LEE, S.; KIM, H.; HEO, M.; LEE, H.; CHOI, E.; KIM, H.; LEE, D.; REIS, R.; DO, S.; KWON, I. 2019. In vitro and in vivo assessments of an optimal polyblend composition of polycaprolactone/gelatin nanofibrous scaffolds for Achilles tendon tissue engineering. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 76:173-180.

LI, Y.; ZHU, J.; CHENG, H.; LI, G.; CHO, H.; JIANG, M.; GAO, Q.; ZHANG, X. 2021. Developments of Advanced Electrospinning Techniques: A Critical Review. Advanced Materials Technologies. 6(11):2100410.

LIM, W.; LIAU, L.; NG, M.; CHOWDHURY, S.; LAW, J. 2019. Current Progress in Tendon and Ligament Tissue Engineering. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 16(6):549-571.

LIU, Y.; RAMANATH, H.; WANG, D. 2008. Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies. Trends in Biotechnology. 26(4):201-209.

LOMAS, A.; RYAN, C.; SORUSHANOVA, A.; SHOLOGU, N.; SIDERI, A.; TSIOLI, V.; FTHENAKIS, G.; TZORA, A.; SKOUFOS, I.; QUINLAN, L.; O'LAIGHIN, G.; MULLEN, A.; KELLY, J.; KEARNS, S.; BIGGS, M.; PANDIT, A.; ZEUGOLIS, D. 2015. The past, present and future in scaffold-based tendon treatments. Advanced Drug Delivery Reviews. 84:257-277.

MAKADIA, H.; SIEGEL, S. 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers. 3(3):1377-1397.

MALEKI, S; SHAMLOO, A.; KALANTARNIA, F. 2022. Tubular TPU/SF nanofibers covered with chitosan-based hydrogels as small-diameter vascular grafts with enhanced mechanical properties. Scientific Reports. 12(1):6179.

MALIKMAMMADOV, E.; TANIR, T.; KIZILTAY, A.; HASIRCI, V.; HASIRCI, N. 2018. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 29(7):863-893.

MANDAL, P.; SHUNMUGAM, R. 2020. Polycaprolactone: a biodegradable polymer with its application in the field of self-assembly study. *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry*. 58(2):111-129.

MEEREMANS, M.; VAN DAMME, L.; DE SPIEGELAERE, W.; VAN VLIERBERGHE, S.; DE SCHAUWER, C. 2021. Equine Tenocyte Seeding on Gelatin Hydrogels Improves Elongated Morphology. *Polymers*. 13(5):747.

MÜLLER, S.; TODOROV, A.; HEISTERBACH, P.; MARTIN, I.; MAJEWSKI, M. 2015. Tendon healing: an overview of physiology, biology, and pathology of tendon healing and systematic review of state of the art in tendon bioengineering. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 23(7):2097-2105.

NICHOLS, A.; BEST, K.; LOISELLE, A. 2019. The cellular basis of fibrotic tendon healing: challenges and opportunities. *Translational Research*. 209:156-168.

O'BRIEN, C.; MARR, N.; THORPE, C. 2021. Microdamage in the equine superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*. 53(3):417-430.

OLIVA, F.; GIAI, A.; MAFFULLI, N. 2011. Role of Growth Factors in Rotator Cuff Healing. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*. 19(3):218-226.

PAGE, M.; MCKENZIE, J.; BOSSUYT, P.; BOUTRON, I.; HOFFMANN, T.; MULROW, C.; SHAMSEER, L.; TETZLAFF, J.; AKL, E.; BRENNAN, S.; CHOU, R.; GLANVILLE, J.; GRIMSHAW, J.; HRÓBJARTSSON, A.; LALU, M.; LI, T.; LODER, E.; MAYO-WILSON, E.; MCDONALD, S.; MCGUINNESS, L.; STEWART, L.; THOMAS, J.; TRICCO, A.; WELCH, V.; WHITING, P.; MOHER, D. 2021. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *The BMJ*. 372:71.

PATTERSON-KANE, J.; BECKER, D.; RICH, T. 2012. The Pathogenesis of Tendon Microdamage in Athletes: the Horse as a Natural Model for Basic Cellular Research. *Journal of Comparative Pathology*. 147(2):227-247.

PELES, Z.; ZILBERMAN, M. 2012. Novel soy protein wound dressings with controlled antibiotic release: Mechanical and physical properties. *Acta Biomaterialia*. 8(1):209-217.

PEREIRA, J.; DOS SANTOS, I.; GUIMARÃES, N.; LIA, M.; RAMOS, R. 2020. Influence of PCL on the epoxy workability, insights from thermal and spectroscopic analyses. *Polymer Testing*. 89:106679.

PIEN, N.; PEETERS, I.; DECONINCK, L.; VAN DAMME, L.; DE WILDE, L.; MARTENS, A.; VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL, P.; MIGNON, A. 2021. Design and development of a reinforced tubular electrospun construct for the repair of ruptures of deep flexor tendons. *Materials Science and Engineering: C*. 119:111504.

PIETSCHMANN, M.; FRANKEWYCZ, B.; SCHMITZ, P. DOCHEVA, D.; SIEVERS, B.; JANSSON, V.; SCHIEKER, M.; MÜLLER, P. 2013. Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds in a full-size tendon defect model. *J Mater Sci: Mater Med*. 24:211-220

QIAN, Y.; CHEN, H.; XU, Y.; ZHOU, X.; ZHANG, F.; GU, N. 2016. The preosteoblast response of electrospinning PLGA/PCL nanofibers: effects of biomimetic architecture and collagen I. *International Journal of Nanomedicine*. 11:4157-4271.

RADISH, M.; DUDHIA, J.; DAKIN, S.; SNELLING, S.; DE GODOY, R.; MOUTHUY, P.; SMITH, R.; MORREY, M.; CARR, A. 2020. Histopathological and immunohistochemical evaluation of cellular response to a woven and electrospun polydioxanone (PDO) and polycaprolactone (PCL) patch for tendon repair. *Scientific Reports*. 10:4754.

RAHMANI, A.; BABAIE, S.; NIKNAFS, B.; ABEDELAHI, A.; MEHDIPOUR, A.; GHAHREMANI, A. 2022. High efficiency biomimetic electrospun fibers for use in regenerative medicine and drug delivery: A review. *Materials Chemistry and Physics*. 279:125785.

ROSS, M.; PAWLINA, W. 2013. *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular* 6a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 169p.

RIZZO, G.; BARONI, L. 2018. Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. *Nutrients*. 10(1):43.

RUIZ-ALONSO, S.; LAFUENTE-MERCHAN, M.; CIRIZA, J.; SAENZ, L.; PEDRAZ, J. 2021. Tendon tissue engineering: Cells, growth factors, scaffolds and production techniques. *Journal of Controlled Release*. 333:448-486.

RUSSO, V.; EL KATHIB, M.; PRENCIPE, G.; CERVERÓ-VARONA, A.; RITA, M.; MAURO, A.; BERARDINELLI, P. FAYDAVER, M.; HAIDAR-MONTES, A.; TURRIANI, M.; DI GIACINTO, M.; RASPA, M.; SCAVIZZI, F.; BONAVENTURA, F.; LIVERANI, L.; BOCCACCINI, A.; BARBONI, B. 2022. Scaffold-Mediated Immunoengineering as Innovative Strategy for Tendon Regeneration. *Cells*. 11(2):266.

SADEGHZADEH, H.; MEHDIPOUR, A.; DIANAT-MOGHADAM, H.; SALEHI, R.; KHOSHFETRAT, A.; HASSANI, A.; MOHAMMADNEJAD, D. 2022. PCL/Col I-based magnetic nanocomposite scaffold provides an osteoinductive environment for ADSCs in osteogenic cues-free media conditions. *Stem Cell Research and Therapy*. 13(1):143.

SARIKAYA, B.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. 2021. Aligned silk fibroin/poly-3-hydroxybutyrate nanofibrous scaffolds seeded with adipose-derived stem cells for tendon tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 193:276-286.

SENSINI, A.; CRISTOFOLINI, L. 2018. Biofabrication of Electrospun Scaffolds for the Regeneration of Tendons and Ligaments. *Materials*. 11(10):1963.

SHI, M.; XUAN, L.; WANG, D.; YE, F.; SHI, X.; LI, Y. 2019. Synergistic effects of thermal treatment and encapsulation of calcium phosphate nanoparticles on enhancing dimensional stability and osteogenic induction potential of free-standing PLGA electrospun membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 183:110437.

SHOJAEI, A.; PARHAM, A. 2019. Strategies of tenogenic differentiation of equine stem cells for tendon repair: current status and challenges. *Stem Cell Research & Therapy*. 10:181.

SHUDO, Y.; COHEN, J.; GOLDSTONE, A.; MACARTHUR, J.; PATEL, J.; EDWARDS, B.; HOPKINS, M.; STEELE, A.; JOUBERT, L.; MIYAGAWA, S.; SAWA, Y.; WOO, Y. 2018. Isolation and trans-differentiation of mesenchymal stromal cells into smooth muscle cells: Utility and applicability for cell-sheet engineering. *Cytherapy*. 18(4):510-517.

SIDDIQUI, N.; ASAWA, S.; BIRRU, B.; BAADHE, R.; RAO, S. 2018. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Molecular Biotechnology*. 60(7):506-532.

SONG, J.; KANG, C.; HAN, S.; PARK, W.; KIM, M.; MOON, J.; TAE, J.; PARK, H.; YOO, I.; PARK, J.; YEO, Y.; KIM, D. 2021. Comparative analysis of Achilles tendon healing outcomes after open tenotomy versus percutaneous tenotomy: An experimental study in rats. *Journal of Orthopaedic Research*. 40(6):1446-1456.

SONG, Z.; SHI, B.; DING, J.; ZHUANG, X.; ZHANG, X.; FU, C.; CHEN, X. 2015. Prevention of Postoperative Tendon Adhesion by Biodegradable Electrospun Membrane of Poly(lactide-co-glycolide). *Chinese Journal of Polymer Science*. 33(4):587-596.

STROMBERG, Z.; PHIPPS, M.; MAGURUDENIYA, H.; PEDERSEN, C.; RAJALE, T.; SHEEHAN, C.; COURTNEY, S.; BRADFUTE, S.; HRABER, P.; RUSH, M.; KUBICEK-SUTHERLAND, J.; MARTINEZ, J. 2021. Formulation of stabilizer-free, nontoxic PLGA and elastin-PLGA nanoparticle delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 597:120340.

SUKANYA, V.; MOHANAN, P. 2018. Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) and bio-interactions with mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 163:107-118.

TIAN, H.; GUO, G.; FU, X.; YAO, Y.; YUAN, L.; XIANG, A. 2018. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 120:475-490.

TRIPPEL, S.; WROBLEWSKI, J.; MAKOWER, A. WHELAN, M. SCHOENFELD, D.; DOCTROW, S. 1993. Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth-factor I and basic fibroblast growth factor. *Journal of Bone and Joint Surgery – Series A*. 75(2):177-189.

VARSHNEY, N.; KUMAR, A.; PODDAR, S.; KUMAR, S. 2020. Soy protein isolate supplemented silk fibroin nanofibers for skin tissue regeneration: Fabrication and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 160:112-127

VAUGHN, N.; STEPANYAN, H.; GALLO, R.; DHAWAN, A. 2017. Genetic Factors in Tendon Injury: A Systematic Review of the Literature. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 5(8).

VIGANO, M.; RAGNI, E.; MARMOTTI, A.; DI GIROLAMO, L. 2022. The effects of orthobiologics in the treatment of tendon pathologies: a systematic review of preclinical evidence. *Journal of Experimental Orthopaedics*. 9(1):31.

WANG, X.; DING, B.; LI, B. 2013. Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering. *Materials Today*. 16(6):229-241.

WOODRUFF, M.; HUTMACHER, D. 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 35(10):1217-1256.

WU, Y.; HAN, Y.; WONG, Y.; FUH, J. 2018. Fibre-based scaffolding techniques for tendon tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 12(7):1798-1821.

YOON, J.; YANG, H.; LEE, S.; YU, W. 2018. Recent progress in coaxial electrospinning: new parameters, various structures and wide applications. *Advanced Materials*. 30(42):1704765.

YU, Y.; SHEN, S.; HSU, Y.; CHOU, Y.; YU, P.; LIU, S. 2022. Tri-Layered Doxycycline-, Collagen- and Bupivacaine-Loaded Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanofibrous Scaffolds for Tendon Rupture Repair. *Polymers*. 14(13):2659.

ZAMANLUI, S.; MAHMOUDIFARD, M.; SOLEIMANI, M.; BAKHSHANDEH, B.; VASEI, M.; FAGHIHI, S. 2017. Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on PCL/PLGA Electrospun with Different Alignment and Composition. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 67(1):50-60.

ZHANG, C.; YUAN, H.; LIU, H.; CHEN, X.; LU, P.; ZHU, T.; YANG, L.; YIN, Z.; HENG, B.; ZHANG, Y.; OUYANG, H. 2015. Well-aligned chitosan-based ultrafine fibers committed teno-lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells for Achilles tendon regeneration. *Biomaterials*. 53:716-730.

ZHANG, H.; LUI, M.; LUI, R.; SHEN, W.; YIN, Z.; CHEN, X. 2018. Physical Microenvironment-based Inducible Scaffold for Stem Cell Differentiation and Tendon Regeneration. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. 24(6):443-453.

ZHANG, X.; SHI, X.; GAUTROT, J.; PEIJS, T. 2020. Nanoengineered electrospun fibers and their biomedical applications: a review. *Nanocomposites*. 7(1):1-34.

ZHIJIANG, C.; PING, X.; SHIQI, H.; CONG, Z. 2019. Soy protein nanoparticles modified bacterial cellulose electrospun nanofiber membrane scaffold by ultrasound induced self-assembly technique: characterization and cytocompatibility. *Cellulose*. 26:6133-6150.

ANEXO 1: Tabla de selección de mallas para procedimiento *in vivo*

Análisis	Grupos	100PCL				50PCL – 50PLGA				100PLGA			
	Mallas	Malla 1	Malla 4	Malla 7	Malla 10	Malla 2	Malla 5	Malla 8	Malla 11	Malla 3	Malla 6	Malla 9	Malla 12
Mecánico	Ensayos de Tracción												
	Ángulo de Contacto												
	Estabilidad Térmica												
<i>In vitro</i>	Degradación												
	Proliferación												
	Viabilidad												
	Diferenciación												
	Total												

Análisis	Ponderación
Mecánico	“x”
<i>In vitro</i>	“2x”

Se seleccionaron una malla por grupo (100PLC, 50PCL-50PLGA y 100PLGA), la malla seleccionada tubo la mayor puntuación en la sumatoria total de “x” de su grupo. Para esto cada ensayo mecánico es poseedor de “x” y cada análisis in vitro de “2x”. Por tanto, es poseedor de “x” o “2x” la malla con resultado estadísticamente significativo al resto o en su defecto con mejor desempeño comparativo a la muestra.

