



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DE LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL DE
MEMBRANAS POLIMÉRICAS EN EL PROCESO DE
INTERACCIÓN CÉLULA-MATRIZ EXTRACELULAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

FEBE CAROLINA VÁZQUEZ VÁZQUEZ

TUTOR:

Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

FACTULTAD DE ODONTOLOGÍA

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de ser parte del Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez por abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia y apoyo en todos mis experimentos, por compartir su conocimiento y contagiarme su gusto por la ciencia.

Al Dr. Fernando Suaste Olmos por la asesoría, así como el importante y excelente apoyo técnico.

Al Laboratorio de Ciencias Básicas de la UASLP por el apoyo técnico y colaboración, especialmente al Dr. Amaury Pozos Guillen por su respaldo, sus consejos y su amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, las horas de trabajo siempre eran agradables en su compañía, principalmente a Iriczalli y José Luis, no la habría logrado sin su ayuda.

A Anita por su paciencia y ayuda en todos los tramites desde el propedéutico hasta la fecha.

Se agradece el apoyo por parte de DGAPA-UNAM: PAPIIT IN213912, PAPIIT IN210815.

A CONACyT, por el apoyo económico con número becario: 297735 para mis estudios de maestría.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1.-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.-Biología de la Matriz Extracelular.....	1
1.1.1 .-Matriz Extracelular.....	1
1.1.2 .-Interacción célula-matriz.....	3
1.2.- Características de un andamio polimérico.....	5
1.2.1.-Topografía del andamio.....	5
1.2.2.-Materiales poliméricos utilizados en la síntesis.....	7
1.2.3.-Policaprolactona (PCL).....	8
1.3.-Técnica de Síntesis del andamio.....	11
1.3.1.-Técnica de Electrohilado.....	11
1.4.-Técnicas de Caracterización del material.....	15
1.4.1.-Métodos de imagen.....	15
1.4.2.-Microscopio Óptico (MO).....	16
1.4.3.-Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	17
1.4.4.-Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).....	19
2.-JUSTIFICACIÓN.....	21
3.-HIPÓTESIS.....	22
4.-OBJETIVOS.....	22
4.1.-Objetivo general.....	22
4.2.-Objetivos específicos.....	22
5.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1.-Caracterización del material.....	23
5.1.1.-Diseño de las andamios de PCL.....	23
5.1.2.-Caracterización de las nanofibras.....	23
5.2.-Ensayos Biológicos.....	24
5.2.1.-Cultivo Celular.....	24
5.2.2.-Ensayo de adhesión celular.....	24
5.2.3.-Ensayo de proliferación celular.....	24
5.2.4.-Interacción célula-material.....	25
5.2.5.-Aislamiento de RNA.....	26
5.2.6.-Detección de moléculas de adhesión.....	27

5.3.-Análisis Estadístico.....	27
6.-RESULTADOS.....	28
6.1.- Caracterización del material.....	28
6.1.1.- Microscopio Óptico.....	28
6.1.2.- Microscopio Electrónico de Barrido.....	29
6.1.3.- Microscopio de Fuerza Atómica.....	31
6.2.- Ensayos Biológicos.....	34
6.2.1.-Cultivo Celular.....	34
6.2.2.-Ensayo de Adhesión Celular.....	35
6.2.3.-Ensayo de Proliferación Celular.....	39
6.2.4.-Interacción Célula-Material.....	43
6.2.5.-Expresión de mensajeros por RT-PCR.....	48
7.-DISCUSIÓN.....	50
8.-CONCLUSIONES.....	52
9.-REFERENCIAS.....	53

RESUMEN

La bioingeniería de tejidos está orientada al desarrollo de materiales capaces de facilitar la regeneración de un tejido dañado por un trauma o enfermedad.

Para lograr lo anterior; la bioingeniería de tejidos se enfoca a imitar por medio de andamios poliméricos biocompatibles a la matriz extracelular de los tejidos, que pueden ser implantados directamente en el sitio deseado y, pueden ser colonizados por células blanco.

La policaprolactona (PCL) tiene características que la hacen un candidato atractivo para la síntesis y diseño de andamios biodegradables, debido a que es un poliéster hidrofóbico semi-cristalino, que está aprobado por la FDA y MHRA para varias aplicaciones biomédicas, como liberación de fármacos, suturas y andamios para reparación de tejidos, tiene un módulo de tensión que va de 0.21 a 0.44 GPa y un módulo de fuerza de 10.5 a 42 MPa.

Varios métodos han sido investigados para la fabricación de andamios biodegradables a partir de PCL. Uno de estos métodos es la técnica de electrohilado. En el electrohilado las nanofibras son depositadas capa por capa conformando varios tamaños de fibra, (con un rango de diámetro de 25-100 μ m) y con una alta porosidad (80-90%). Las fibras electrohiladas son atractivas debido a que los andamios fibrilares pueden imitar la nanomorfología estructural de la matriz extracelular tanto en orientación alineada como desordenada, la cual es clave en la regeneración tisular del órgano dentario.

En este estudio hemos caracterizado la morfología alineada y desordenada de las fibras poliméricas obtenidas mediante la técnica de electrohilado y también evaluado la influencia en la respuesta celular como la proliferación y orientación de las células cultivadas *in vitro*.

Los resultados con células de diferentes fenotipos odontogénicos nos indican que son capaces de pensar y responden a la morfología del sustrato.

El proceso de adhesión celular es el que se ve más afectado según la morfología del sustrato la cual es regulada por vías moleculares conformada por complejos de adhesión y del citoesqueleto de actina-miosina. Por ello; es claro que las propiedades nano-mecánicas de los andamios en contacto con el citoesqueleto tienen importantes implicaciones en la morfología, comportamiento y proliferación celular como lo reportado en este trabajo de investigación de tesis.

ABSTRACT

Tissue bioengineering is oriented toward the development of materials capable of facilitating the regeneration of damaged tissue by a trauma or disease.

To achieve the above; tissue bioengineering focuses to emulate through biocompatible scaffold the extracellular matrix of the tissues, which can be implanted directly at the desired site and could be colonized by the cells.

The polycaprolactone (PCL) has features that make it an attractive candidate for the synthesis and design of biodegradable scaffolds, because it is a polyester hydrophobic and semi-crystalline approved by FDA and MHRA for various biomedical applications, such as drug release, sutures and scaffolds for tissue repair. This polymer has a tension module that goes from 0.21 to 0.44 GPa and a module of force of 10.5 to 42 MPa.

Several methods have investigated for manufacture of biodegradable scaffolds from PCL. One of these methods is electrospinning technique, where the nanofibers are deposited layer by layer to form various pore sizes (with a diameter range from 25-100 nm) and with a high porosity (80-90 %). Electrospun fibers are attractive because they can mimic the fibrillar structure of the extracellular matrix in desordenadas or aligned orientation, which could be the key in tissue regeneration of the dental organ.

In this study we characterized the morphology of the fibers obtained by the electrospinning technique in desordenadas and aligned orientation and evaluated the influence onto cellular responses such as proliferation and orientation of cells cultured *in vitro*.

The results from different odontogenic cells phenotypes indicate that cells could census and are able to respond to the specific morphology of the substrate.

The process of cell adhesion is that which is most affected by the morphology of the scaffold, which is regulated by molecular pathways complexes formed by adhesion and cytoskeletal actin-myosin proteins signaling. Therefore, it is clear that the nano-mechanical properties of the scaffolds in contact with the cytoskeleton have important implications in morphology, behavior and cell proliferation as reported in this thesis research.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema de la Matriz Extracelular.

Figura 2.- Señalización mediada por Integrina

Figura 3.- Cascada de señalización en la interacción célula- matriz extracelular

Figura 4.- Estructura macro, micro y nanométrica de un andamio fibrilar.

Figura 5.- Estructura química de la ϵ -caprolactona

Figura 6.- Estructura química del PCL

Figura 7.- Fibras de PCL sintetizadas por la Técnica de Electrohilado

Figura 8.- Técnica de Electrohilado

Figura 9.- Estructura de la Matriz e Interacción Celular

Figura 10.- Microscopio Óptico

Figura 11.- Microscopio Electrónico de Barrido

Figura 12.- Microscopio de Fuerza Atómica

Figura 13.- Microfotografías ópticas de las películas delgadas, micro y nanofibras

Figura 14.- Imágenes de MEB de las películas delgadas, microfibras y nanofibras

Figura 15.- Histogramas del tamaño de poro de las microfibras y nanofibras

Figura 16.- Imágenes de MFA en 3D de las micro- y nano- fibras de PCL

Figura 17.- Imágenes de MFA de las fibras alineadas micro- y nano- de PCL

Figura 18.- Imágenes de MFA de las fibras desordenadas micro- y nano- de PCL.

Figura 19.- Cultivos primarios de fibroblastos gingivales, periodontales y de pulpa, observados con un microscopio invertido.

Figura 20.- Adhesión celular de fibroblastos gingivales a 1 hora, 4 horas y 24 horas por el ensayo de cristal violeta.

Figura 21.- Adhesión celular de fibroblastos periodontales a 1 hora, 4 horas y 24 horas por el ensayo de cristal violeta.

Figura 22.- Adhesión celular de fibroblastos de pulpa a 1 hora, 4 horas y 24 horas por el ensayo de cristal violeta.

Figura 23.- Adhesión celular de osteoblastos a 1 hora, 4 horas y 24 horas por el ensayo de cristal violeta.

Figura 24.- Proliferación celular de osteoblastos a 2 días, 4 días y 6 días por el ensayo de presto blue.

Figura 25.- Proliferación celular de fibroblastos de pulpa a 2 días, 4 días y 6 días por el ensayo de presto blue.

Figura 26.- Proliferación celular de fibroblastos gingivales a 2 días, 4 días y 6 días por el ensayo de presto blue.

Figura 27.- Proliferación celular de fibroblastos periodontales a 2 días, 4 días y 6 días por el ensayo de presto blue.

Figura 28.- Inmunomarcaje de osteoblastos sobre andamios alineados nanométricos.

Figura 29.- Inmunomarcaje de fibroblastos de ligamento periodontal sobre andamios alineados nanométricos.

Figura 30.- Inmunomarcaje de fibroblastos de pulpa sobre andamios alineados nanométricos.

Figura 31.-Inmunomarcaje de fibroblastos de encía sobre andamios alineados nanométricos.

Figura 32.-Inmunomarcaje de fibroblastos de pulpa sobre andamios desordenados nanométricos.

Figura 33.- Inmunomarcaje de fibroblastos de ligamento periodontal sobre andamios desordenados nanométricos

Figura 34.-Inmunomarcaje de fibroblastos gingivales sobre andamios desordenados nanométricos.

Figura 35.-Inmunomarcaje de osteoblastos sobre andamios desordenados nanométricos

Figura 36.- RT-PCR de andamios fibrilares desordenadas nanométricos

Figura 37.- RT-PCR de andamios fibrilares alineados nanométricos

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.-Biología de la Matriz Extra Celular

1.1.1.-Matriz Extracelular (MEC)

La matriz extracelular es una red organizada de materiales extracelulares que se encuentra más allá de la proximidad inmediata de la membrana plasmática. Aunque la matriz extracelular puede tomar diversas formas en diferentes tejidos y organismos, tiende a estar compuesta por macromoléculas similares. A diferencia de la mayoría de las proteínas presentes dentro de las células que son moléculas compactas y globulares, las del espacio extracelular casi siempre son fibrosas y extendidas. En el espacio extracelular, estas proteínas pueden disponerse por sí mismas en una red tridimensional interconectada. Entre sus diversas funciones, las proteínas de la MEC sirven como andamios, soporte, sostén y unión (Figura 1).

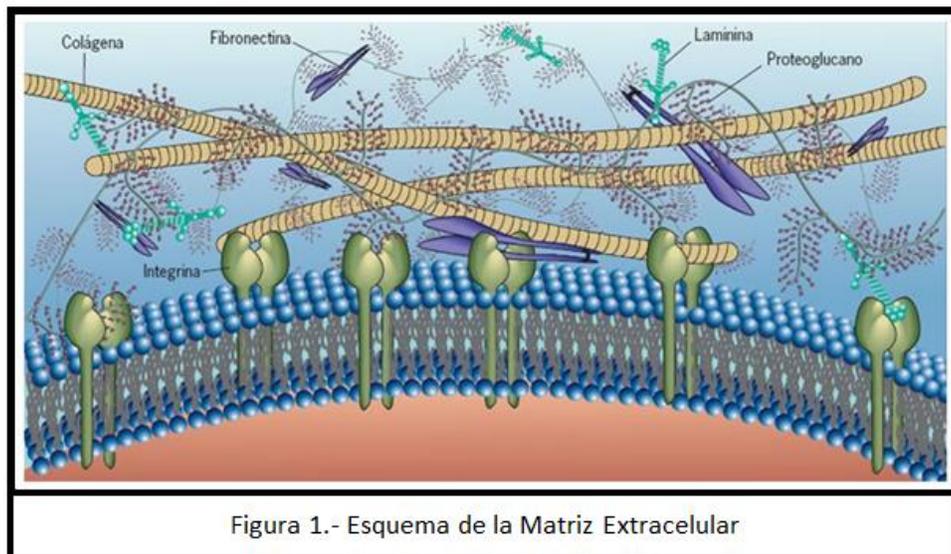


Figura 1.- Esquema de la Matriz Extracelular

Proteínas como colágena fibrilar, fibronectina, proteoglicanos, fibras de laminina y ácido hialurónico, la provee de una naturaleza química, mecánica y de señales topográficas que son necesarias para influenciar la respuesta y destino celular. Una de las moléculas más importantes y ubicuas de la MEC es la colágena.

Las colágenas son una familia de glucoproteínas fibrosas que sólo están presentes en las matrices extracelulares. La colágena es la proteína individual más abundante en el cuerpo humano (representa más del 25% de todas las proteínas), un hecho que refleja la presencia diseminada de los materiales extracelulares. La colágena se produce sobre todo en los fibroblastos, las células que se encuentran en varios tipos de tejido conectivo, y también en las células de

músculo liso y epitelial. Varias colágenas, incluidos los tipos I, II y III, se describen como colágenas fibrilares porque se disponen en fibrillas rígidas parecidas a cuerdas, que a su vez se disponen en fibras más gruesas, casi siempre lo bastante grandes para verse en el microscopio óptico. Las moléculas individuales de colágena de una fibrilla no están alineadas de manera compacta, sino que están escalonadas aproximadamente a un cuarto de longitud en relación con las fibras contiguas. Esta disposición escalonada de las moléculas incrementa la fuerza mecánica del complejo y produce las patrones en banda característicos de la colágena¹.

El concepto “matriz” implica una estructura formada por una red de componentes interactivos. El término resulta muy adecuado para la matriz extracelular (MEC), que toma diferentes formas en los diferentes tejidos y en los diferentes estados de desarrollo en el mismo tejido. La diversidad surge a través de las combinaciones e interacciones de moléculas específicas, entre numerosas isoformas, radios y arreglos geométricos de colágena, elastina, proteoglicanos y proteínas de adhesión. Esto crea un medio ambiente que está repleto con información y diversos mecanismos moleculares regulan la diseminación de esta información. Las células en su ambiente natural están rodeadas por la matriz extracelular, que está compuesta por moléculas fibrosas entretrejidas como fibrina, elastina, fibronectina, laminina, incluso fluidos como suero y motivos de adhesión, que forman la arquitectura estructural capaz de soportar y dirigir las células a través de las interacciones célula-matriz extracelular².

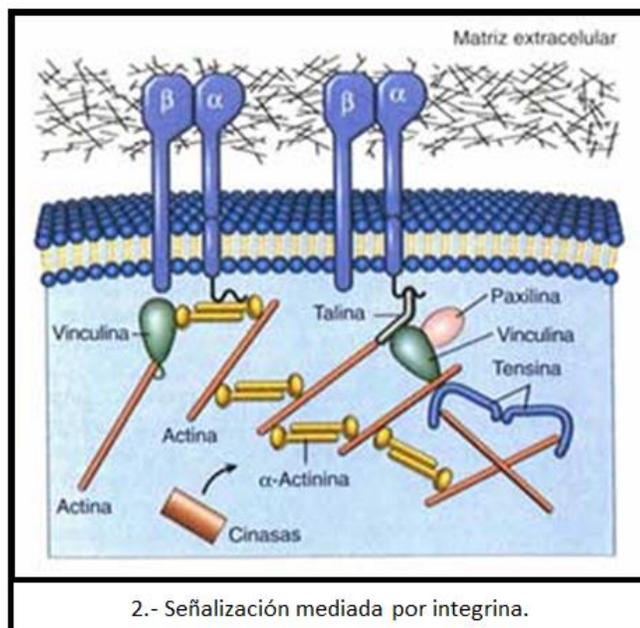
La fibronectina tiene sitios de unión para la colágena y los proteoglicanos, estos sitios de unión facilitan las interacciones que vinculan estas moléculas en una red estable e interconectada. También tiene sitios de unión para receptores en la superficie celular, que sostienen la MEC en una unión estable con la célula. Las lamininas extracelulares influyen en un grado notorio en el potencial migratorio, crecimiento y diferenciación de las células. Algunos eventos fisiológicos locales liberan proteasas y factores de crecimiento dentro de la MEC, proporcionando señales químicas que pueden tener influencia en el comportamiento celular³.

La MEC puede mostrar propiedades dinámicas, tanto en espacio como en tiempo. Desde el punto de vista espacial, las fibrillas de la MEC pueden estirarse varias veces su longitud normal cuando las células tiran de ellas y se contraen cuando se alivia la tensión. Desde el punto de vista temporal, los componentes de la MEC están sujetos a la degradación y reconstrucción continuas. Estos procesos sirven para renovar la matriz y permitir que se remodele durante el desarrollo embrionario o después de la lesión tisular. La degradación de materiales extracelulares, junto con las proteínas de superficie celular, es tarea sobre todo de una familia de enzimas que contienen cinc llamadas metaloproteinasas de la matriz (MPM) y se secretan hacia el espacio extracelular o están fijadas a la membrana plasmática³.

1.1.2.- Interacción Célula-Matriz Extracelular

Los componentes de la MEC, como la fibronectina, laminina, proteoglucanos y colágena, son capaces de unirse con receptores situados en la superficie celular. La familia más importante de receptores que adhiere las células a su microambiente extracelular son las integrinas⁴.

Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas que están compuestas de una subunidad α y β cada una de las cuales tiene un dominio extracelular y un dominio citoplasmático. Los dominios extracelulares se unen a numerosas proteínas de la MEC, incluyendo colágena tipo I, II, III y IV, fibronectina y proteínas de matriz.⁴ Los receptores de la membrana celular casi nunca actúan solos, forman parte de sistemas con componentes múltiples que dan lugar a la integración de diversas señales, por ejemplo entre factores de crecimiento y vías de señalización.³ La señalización mediada por integrinas envuelve una variedad de procesos celulares como la diferenciación, adhesión y migración.⁴ Los dominios citoplásmicos de las integrinas se unen con una gran variedad de proteínas, incluidas moléculas como la talina, que causan separación de las subunidades α y β (Figura 2).



Estas uniones de integrina activan una cascada de vías de señalización intracelular, dando lugar a cambios en la expresión genética y afectando muchos aspectos del comportamiento celular, modificando la diferenciación, proliferación y la expresión de las proteínas de la matriz extracelular, activación de factores de crecimiento y el mantenimiento de las señales de supervivencia para prevenir la apoptosis.

Las integrinas participan en dos tipos principales de actividades: adhesión de las células con el sustrato (o con otras células) y la transmisión de señales del ambiente exterior al interior de la célula, fenómeno que se conoce como señalización de “afuera a adentro”⁵.

La unión del dominio extracelular de una integrina con el ligando, como la fibronectina o la colágena, induce un cambio en la conformación en el extremo citoplásmico de la integrina. A su vez, cambios en el extremo citoplásmico alteran la forma en que la integrina interactúa con las proteínas citoplásmicas cercanas, como la enzima cinasa de adhesión focal (FAK). Cuando las integrinas se unen con un ligando extracelular, pueden activar las cinasas de proteína citoplásmicas como FAK, luego fosforilan a otras proteínas e inician una reacción en cadena. En algunos casos, la reacción en cadena llega hasta el núcleo, donde puede activarse un grupo específico de genes. Las señales de afuera adentro transmitidas por las integrinas (y por otras moléculas de la superficie celular) influyen en muchos aspectos del comportamiento celular, como la diferenciación, motilidad, crecimiento e incluso la supervivencia de la célula⁵ (Figura 3)⁵.

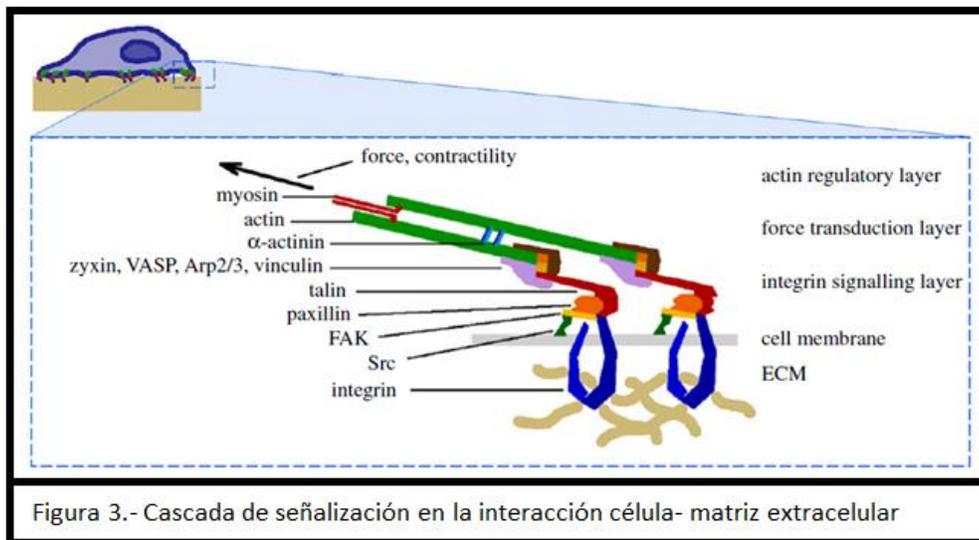


Figura 3.- Cascada de señalización en la interacción célula- matriz extracelular

Los receptores de integrina transmembranales, con más de veinte miembros identificados, son los más extensamente caracterizados y reconocen motivos como Ar-Gly-Asp (RGD) con proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y vitronectina. Estos receptores unen el citoesqueleto celular con las fibras de la matriz extracelular, formando adhesiones focales (FA). Los dominios citoplásmicos de las integrinas contienen sitios de unión para diversas proteínas citoplásmicas, incluidas varias que funcionan como adaptadores que unen la integrina con filamentos de actina del citoesqueleto. El papel de las integrinas dentro del establecimiento de la conexión de la MEC y el citoesqueleto se ve mejor en dos estructuras especializadas: adhesiones focales y hemidesmosomas⁶.

Las células se mueven a través de protrusiones en la membrana celular, esto se lleva a cabo con la formación de adhesiones de integrina y la contracción celular, la dirección del movimiento de las células está guiada por estímulos del medio ambiente, como señales biofísicas y bioquímicas. Las células también responden a estímulos mecánicos relacionados con los grados de dureza o rigidez del sustrato⁷.

El medio ambiente que rodea a la célula le provee una variedad de complejas señales biofísicas y bioquímicas a las células que se encuentran distribuidas en la superficie de la matriz extracelular por medio de los filopodios. Una respuesta temprana notable de la célula a la nanotopografía es el incremento de los filopodios debido que puede incrementar el nivel de percepción celular, donde un gran número de procesos biológicos, movimientos celulares y migración pueden tomar lugar⁸.

1.2.-Características de una andamio polimérico.

1.2.1.- Topografía del andamio.

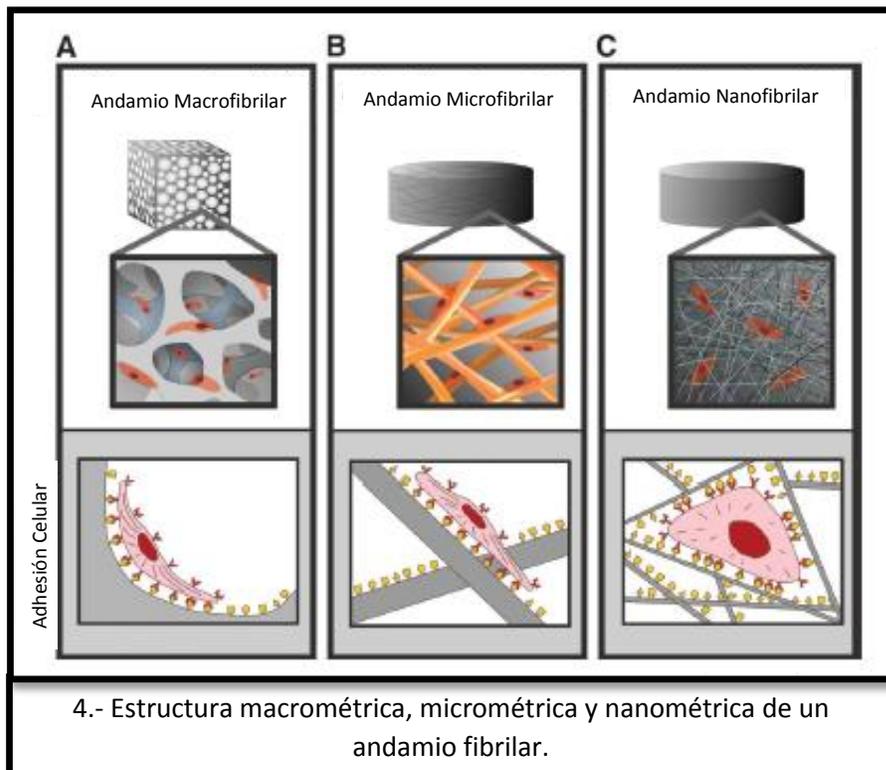
El andamio provee la base para que las células sean cultivadas y comiencen el proceso de adhesión, proliferación y diferenciación. Durante este proceso el andamio imita el ambiente de la matriz extracelular y las células inician la construcción de una nueva matriz extracelular, esto provee integridad para el nuevo tejido y el andamio es degradado a través del tiempo⁹.

El control de las características superficiales de los andamios puede influir directamente en la adhesión celular, adsorción de proteínas, proliferación y morfología. Además las células tienen la capacidad de modificar su microambiente con la estructura del andamio para cambiar la forma en que se produce la matriz. Esto se lleva a cabo mediante la síntesis o degradación de la matriz extracelular, secreción de citocinas y comunicación con otras células en el andamio por medio de señales físicas y moleculares¹⁰.

Es claro que la interacción de las células, la matriz extracelular y las características nanotopográficas de la superficie del andamio son un proceso dinámico y es crucial entender la respuesta celular como un todo en el desarrollo de biomateriales.⁷ La topografía del andamio es muy importante debido a que la naturaleza de la matriz extracelular que rodea a las células se compone de estructuras jerárquicas con rangos hasta decimas de nanómetros¹¹.

Se necesita cuidar muchos parámetros para que un andamio tenga una estructura adecuada. Por ello, se ha reportado que las propiedades nano mecánicas de los andamios son importantes para la respuesta de biocompatibilidad y actúa adicionalmente como estimulante de las funciones celulares. La biocompatibilidad del material evita la citotoxicidad, la respuesta inmune y la inflamación en el sitio del andamio.¹²

La topografía del material en cuanto a su porosidad juega un rol importante en la determinación de las propiedades físicas y químicas de los substratos. Debido a que los andamios al tener un gran volumen de área, así como una red interconectada de poros permiten el transporte de metabolitos y fluidos¹³ (Figura 4)¹⁴.



Una alta porosidad en el andamio ayuda a la adhesión celular y promueve la regeneración y sustitución gradual de la matriz extracelular. Por lo tanto la porosidad es un factor muy importante para imitar la matriz extracelular en la ingeniería de tejidos.¹⁵ Un andamio con tamaños de poros por arriba de las micras tiende a tener como resultado una respuesta tisular moderada y un rápido proceso de curación con la formación capsular fibrosa que lleva a la pérdida de la regeneración tisular¹¹.

El tratar de imitar la MEC ha llevado a investigar la estrategia más adecuada para la síntesis de andamios que cumplan con estas características topográficas.¹⁴ Hoy día, se propone a los andamios hilados como biomateriales capaces de imitar algunos de los componentes que conforman la matriz extracelular como la característica fibrilar y nanoporosa interconectada que podría permitir la llegada de señales bioquímicas y mecánicas del micro ambiente celular¹⁶.

La arquitectura del andamio debe cumplir con tres rangos distintos. El primero es la súper estructura que es esencial para cubrir la totalidad de la forma y dimensión del defecto a cubrir. La segunda es la microestructura que se refiere a las características de la superficie del andamio a un nivel celular. La tercera y que ha empezado a tomar relevancia es la nanoestructura que se refiere a las características sub-celulares en la superficie del andamio⁷. Las modificaciones de la topografía a nivel nanoestructural, mejora diversos comportamientos celulares, que van desde cambios en la adhesión celular, orientación celular, motilidad celular, presentación de antígenos, condensación del citoesqueleto, activación de tirosinas cinasas y modulación de vías de señalización intracelular que regulan la actividad transcripcional y la regulación genética. Este comportamiento celular no se encuentra únicamente modulado por la escala sino también por el tipo de ordenamiento de la topografía (rugosa, escalonada, ranurada, de pilares o fosas) e incluso por su simetría (ortogonal, hexagonal)³.

Por lo cual, se han buscado materiales que puedan ser sintetizados con dichas características y de entre los grupos de materiales, los polímeros son los que están tomando relevancia en el diseño de andamios que biomimeten las características de la MEC¹⁷.

1.2.2.- Materiales Poliméricos utilizados en la Síntesis

Los polímeros han tomado relevancia ya que se pueden trabajar a temperatura ambiente, son biodegradables y sus propiedades fisicoquímicas son de fácil modulación¹⁸.

Se consideran biocompatibles si cuando son colocados en un medio biológico no generan reacciones tóxicas, y se pueden clasificar en polímeros naturales o sintéticos¹⁹.

Los polímeros naturales incluyen polisacáridos (alginato, quitina, quitosano, ácido hialurónico y sus derivados) o proteínas (colágena, gelatina, fibrina y seda), tienen pobres propiedades mecánicas, una ventaja en su estructura es que permite formar compósitos con polímeros sintéticos, que lleva a la obtención de dos características deseables; la fuerza y durabilidad de los polímeros sintéticos y la afinidad celular específica de los polímeros naturales. Los polímeros naturales tienen ventajas por su alta biocompatibilidad, sin embargo ha crecido el interés y la atención en los polímeros sintéticos debido a su amplio rango de propiedades así como su nula inmunogenicidad²⁰.

Los polímeros sintéticos más usados son el PCL (Policaprolactona), PLA (Poli ácido láctico), PVA (poli vinil alcohol), PGA (poli ácido glicólico) y sus copolímeros como el PLGA (poli ácido láctico glicólico) entre otros²¹.

Una de las ventajas de los polímeros sintéticos es que son degradados hidrolíticamente y enzimáticamente en un ambiente fisiológico a productos no tóxicos, que los hacen buenos candidatos para aplicaciones a mediano y largo plazo²².

Los polímeros biodegradables son generalmente poli α -hidroxi-ésteres y sufren una degradación lenta en el cuerpo, produciendo metabolitos simples. En general los polímeros son resistentes y pueden ser fabricados en una variedad de formas diferentes como discos, fibras y películas delgadas, que son usadas para aplicaciones específicas. Además pueden ser producidos con topografía micro y nanométrica, para inducir propiedades físicas que mejoren la interacción celular con la superficie del andamio. Otra ventaja que presentan los polímeros en su aplicación, son las similitudes físicas y químicas que presenta respecto a los tejidos celulares²³.

Cuando se considera a los polímeros es importante tener en mente que el hecho de que sea biodegradable no significa necesariamente que sea bioreabsorbible, esto significa que cuando algo se degrada se mueve lejos de su sitio de acción en el cuerpo pero no es necesariamente eliminado. En contraste bioreabsorbible es un concepto que refleja la eliminación total del material extraño y los productos de degradación in situ sin efectos residuales²⁴.

Los poliésteres biodegradables son de los más usados dentro de los materiales sintéticos para andamios electrohilados porque su mecanismo de degradación es por medio de la metabolización de los productos de degradación del cuerpo (ácido láctico), el rango de degradación de los poliésteres puede ser controlado cambiando la constitución del polímero, algunos de los más comunes son PLA (poli ácido láctico), (poli ácido glicólico), PCL (policaprolactona), y sus co-polímeros, que están aprobados por la U.S Food and Drug Administration (FDA), y han sido usados en aplicaciones médicas como suturas y sistemas de liberación controlada de medicamentos²⁵.

1.2.3.- Policaprolactona. (PCL)

La ϵ -caprolactona es un compuesto de 6 carbonos, de la familia de las lactonas. Su fórmula condensada es $(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2$, como las observamos en la figura 5. Es un éster cíclico que compone la poli (ϵ -caprolactona).

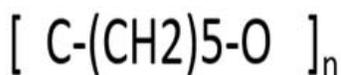
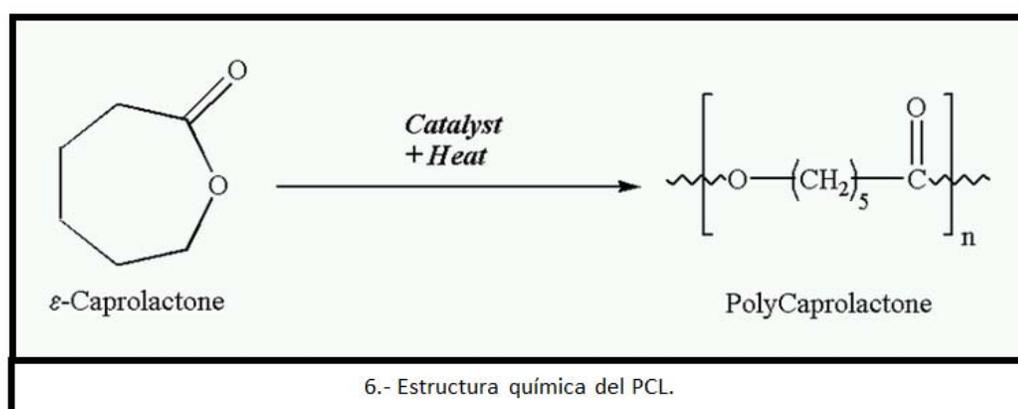


Figura 5.- Estructura química de la ϵ -caprolactona

La Poli (ϵ -caprolactona) o PCL pertenece a la primera generación de poliésteres alifáticos sintéticos, con una fórmula química $[O (CH_2)_5CO]_n$, con un peso molecular que va generalmente de 3000 a 800,000 g/mol.²⁶ Puede obtenerse mediante la polimerización del anillo abierto de la ϵ -caprolactona usando una variedad de catalizadores aniónicos, catiónicos o coordinados como el octoato de estaño o por la polimerización del anillo abierto 2-metil-1-3dioxipano por medio de la vía de radicales libres y los alcoholes de bajo peso molecular son usados para controlar la polimerización del PCL que afecta el resultado del peso molecular, la distribución del peso molecular, composición del grupo terminal y estructura química²⁷ (Figura 6).



Es un poliéster hidrofóbico, biodegradable, biocompatible, con bajo punto de fusión (59-64°C) y una temperatura de transición vítrea de aproximadamente -60°C²⁸. Es semicristalino, esta cristalinidad está reportada de un 45% a un 67% y tiende a disminuir cuando se incrementa el peso molecular. Su baja cinética de degradación lo hace un polímero ideal para la funcionalización y diseño de biomateriales que necesitan estar en el cuerpo a largo plazo. Posee propiedades viscoelásticas superiores a las de otros polímeros reabsorbibles lo que le permite una fácil manufactura y manipulación en un amplio rango de estructuras, sus rutas de producción son relativamente baratas²⁹.

El PCL es soluble en cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, tolueno, ciclohexanona y 2-nitropropano a temperatura ambiente. Tiene una baja solubilidad en acetona, 2-butanona, acetato de etilo, di-metilformamida y acetonitrilo; y es insoluble en éter de petróleo y dietil-éter.

Puede ser combinado con otros polímeros para mejorar su resistencia a la ruptura por estrés, permeabilidad y adhesión, como propionato de celulosa, acetato de celulosa, ácido poli-láctico, ácido poliláctico co-glicólico y los biopolímeros naturales como colágena, gelatina, alginato y fibrina. Se ha reconocido que el PCL es susceptible a ser combinado con otros materiales como

nanopartículas metálicas y cerámicas, así como a ser funcionalizados con diversas moléculas biológicas³⁰.

El PCL sufre dos estados en su proceso de degradación, el primero mediante la escisión hidrolítica no enzimática de los grupos éster y la segunda cuando el polímero es más cristalino y de bajo peso molecular (debajo de 3000) se somete a una degradación intracelular de la cual se tiene evidencia cuando se observan fragmentos de PCL en los fagosomas de macrófagos, células gigantes y los metabolitos del ácido caproico 6-hidroxilo y acetil coenzima A, que a su vez entran en el ciclo del ácido cítrico y así son eliminados del cuerpo.

La solubilidad del PCL es alta en solventes orgánicos y su capacidad de combinarse con otras moléculas facilita la creación de diversas estructuras que se pueden usar como agentes terapéuticos.¹⁰ Uno de los mayores problemas de algunos polímeros biodegradables como PLA y PLGA es que generan ambientes ácidos durante su degradación con un pH de 2-3 que puede disminuir su eficiencia¹¹. Cuando la policaprolactona se degrada se observa un cambio de pH en el tiempo de 7.6 ± 0.1 a 7.3 ± 0.1 después de 10 días³¹.

Los polímeros biodegradables como el PCL tienen cadenas que se rompen por hidrólisis en condiciones fisiológicas y los productos de degradación son eliminados por el cuerpo a través de vías metabólicas. Estos polímeros se degradan básicamente en sus respectivos monómeros u oligómeros por vía de la hidrólisis en medio ambientes acuosos. Lo cual soporta la teoría de que el PCL se reabsorbe y degrada completamente vía intracelular una vez que el peso es reducido a 3000 o menos y se ha reportado que al manipularlo en escalas nanométricas la degradación es lograda debido a su gran área de superficie, que entra en contacto directo con el agua y posteriormente son eliminadas por la difusión³².

Por ello; el peso molecular y la cristalinidad del polímero son variables que deben de tomarse en cuenta al momento de sintetizar un biomaterial. Las propiedades de las superficies también tienen un papel clave en una buena adsorción de proteína que precede a la adhesión celular y la futura degradación del material¹⁹.

Debido a sus potenciales aplicaciones biomédicas, estos polímeros son de los más usados para sintetizar fibras por medio de electrohilado.²⁷ Se ha observado que las nanofibras poliméricas se degradan más rápido que sus respectivos polímeros en macro escala, debido principalmente a la gran área de superficie de las nanofibras, pero existen otros factores.³³ Las nanofibras poliméricas son degradadas por la erosión de su superficie debido a que no son materiales en bulto, si no existe auto catálisis en la matriz de la nanofibra, el pequeño diámetro de la fibra permite su rápida degradación²⁵.

La estructura de las fibras poliméricas puede afectar su rango de degradación dependiendo de varios factores. La gran área de superficie que

tienen las nanofibras las hace especialmente vulnerables a la degradación hidrolítica, que da lugar a un incremento en la tasa de degradación comparada a la de las microfibras. Un incremento en la cristalinidad y en la orientación de las cadenas en las fibras con diámetros pequeños puede dar lugar a una reducción en el tiempo de degradación. Finalmente una reducción en el diámetro de la fibra y un incremento en el área de superficie incrementan la difusión de los productos de biodegradación de las fibras, lo que puede disminuir el rango de degradación autocatalítica³⁴.

1.3.- Técnica de Síntesis

1.3.1- Técnica de Electrohilado

El electrohilado es un método versátil y barato para producir micro y nanofibras hechas a base de polímeros en solución, las cuales tienen múltiples aplicaciones en ingeniería de tejidos, biomateriales, liberación controlada de fármacos, ciencia de materiales y textiles inteligentes.³⁵ El principio de esta técnica se basa en la aplicación de una diferencia de potencial entre dos electrodos, uno conectado a la solución polimérica y otro al colector. Por el incremento de esta diferencia de potencial, la tensión superficial es superada y la fibra es formada depositándose sobre el plato colector, las fibras continuas se producen en forma de una membrana³⁶.

Un fuerte campo eléctrico, del orden de 15-30 kV se aplica entre dos electrodos, uno formado por una aguja que es parte del sistema de inyección y otro por un plato metálico (colector). Las fibras formadas se depositan sobre el colector formando andamios hiladas con características específicas como textura, color y densidad³⁷.

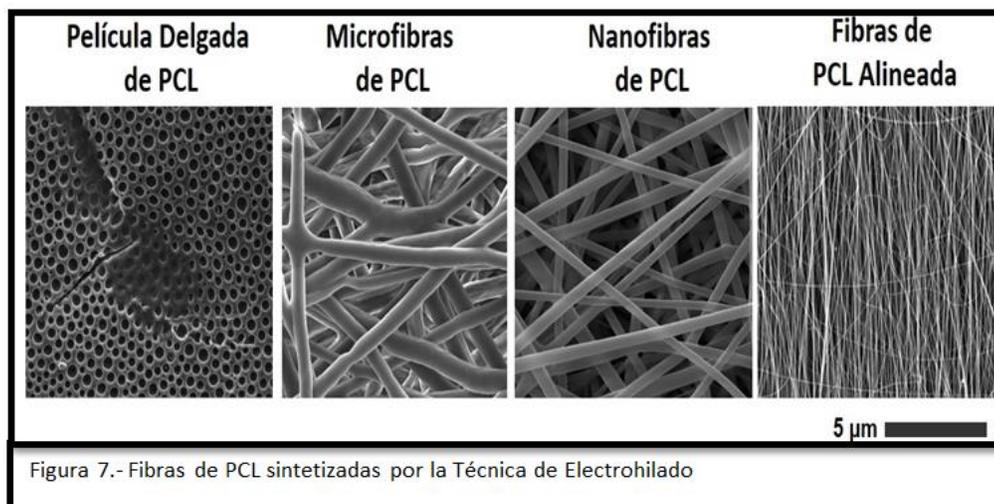
La solución polimérica previamente preparada se carga dentro de una jeringa, la cual se conecta a una aguja. Una bomba de infusión de uso médico se conecta a la jeringa para que la solución polimérica sea extraída por la aguja de la jeringa con una velocidad de flujo constante. Por el efecto de la polarización causada por el campo eléctrico, la solución se estira hacia el plato colector que se encuentra a una distancia de 5-30 cm de la aguja.³⁸ Durante la creación del chorro (cono de Taylor), el solvente se evapora gradualmente y el producto obtenido se deposita en forma de andamios con diámetros de fibras entre 50 nm hasta 10 micras³⁹.

El proceso de electrohilado fue desarrollado originalmente por la industria textil y ha sido usada por los pasados 100 años. Se ha refinado la técnica en la década pasada y se ha incrementado su uso en la manufactura de fibras.⁴⁰ Debido a la demanda de materiales con dimensiones en escala nanométrica; esta técnica se ha convertido en un proceso atractivo gracias a la posibilidad de sintetizar un amplio rango de materiales en forma de nanofibras a bajo costo y con relativa facilidad.⁴¹ Las fibras producidas son usadas para generar estructuras de nanofibras con poros que permitan a las células entrar al andamio, mientras se

permite el flujo de nutrientes y el paso de los residuos de las células.⁴² Los andamios de polímeros sintéticos como PLA, PGA y PCL o naturales como colágeno, quitosano, elastina, fibrina y seda son sintetizados por esta técnica.

El electrohilado puede producir diferentes estructuras fibrilares usando diversos parámetros, con dos o tres formas en la misma dimensión, incluyendo fibras alineadas con forma de hilo, con forma tubular o fibras con partículas. La flexibilidad y versatilidad del electrohilado lo hacen la técnica más popular para la fabricación de andamios micro- y nano- fibrilares²⁵.

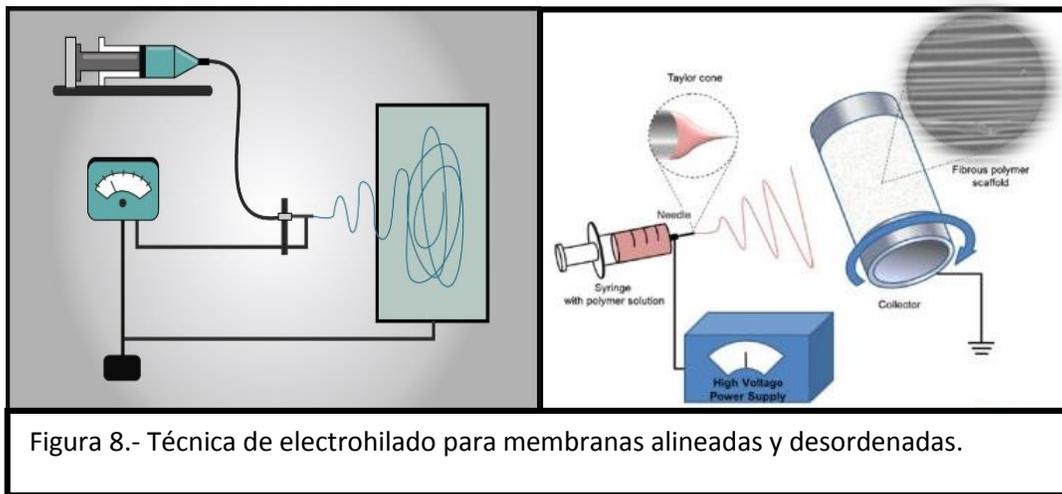
La longitud de las nanofibras sintetizadas puede estar en escala micro y nanométrica, de forma desordenada o estar orientadas en una sola dirección, lo cual puede mejorar la resistencia a la tracción del andamio a lo largo del eje de la fibra¹² (Figura 7).



Estas fibras pueden ser ordenadas paralelamente representando una simple, accesible y reproducible estrategia para inducir el alineamiento celular por medio de las guías de contacto del andamio y el crecimiento celular direccionado. Se ha observado que las células censan la geometría sobre la que son cultivadas y ellas mismas se alinean en dirección del eje axial de la fibra.⁴³ Esta alineación de las nanofibras es particularmente relevante en tejidos que tienen una estructura fibrilar ordenada como el músculo esquelético, ligamentos, vasos sanguíneos y nervios⁴⁴.

El montaje para la ejecución de la técnica de electrohilado, consta de un capilar a través del cual debe ser expulsada la solución polimérica (aguja, cono, etc); una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno al lugar de salida de la solución y otro directamente al plato

colector (lamina de metal conductor, mandril rotativo etc) donde se depositaran las fibras posterior a la evaporación del disolvente (Figura 8).

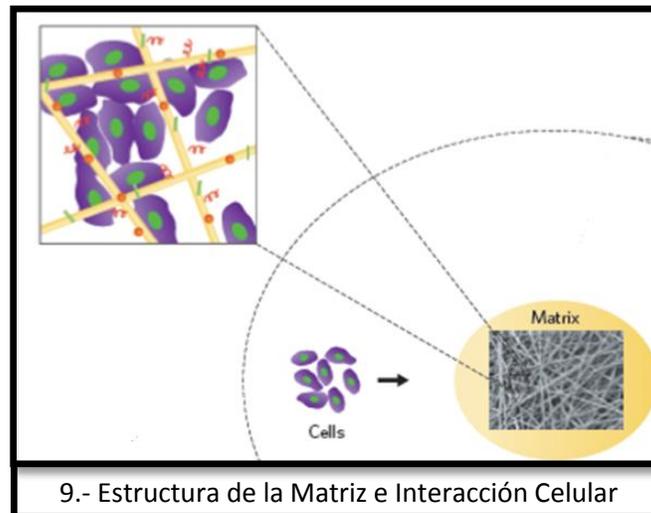


A pesar de que la técnica de electrohilado es relativamente fácil de usar, hay una serie de variables en el procesamiento que pueden afectar significativamente la formación de fibras. Las variables principales en el proceso de electrohilado son, el voltaje aplicado, velocidad de flujo del polímero y la distancia entre la aguja y el colector. Estas variables son de gran importancia ya que pueden influir en la formación de defectos (aglomerados) en las fibras⁴⁵.

La flexibilidad en la elección del material y el manejo de los parámetros de síntesis, permite que el electrohilado pueda ser usado para generar andamios adecuados para muchos tipos de tejidos.⁴⁴ El diámetro de la fibra puede ser controlado cambiando algunos parámetros de síntesis. En los andamios alineados, la velocidad de rotación del mandril tiene una fuerte influencia en el alineamiento de la fibra, bajas velocidades (<12.99xg) usualmente dan lugar a morfologías no ordenadas, mientras que las velocidades altas (~49.99xg) permiten un alineamiento adecuado de las fibras.¹⁹ Cuando aumenta la velocidad de rotación, la evaporación del solvente, la formación de la fibra, y su alineamiento ocurren muy rápido y las cadenas moleculares del polímero no tienen suficiente tiempo para completar la cristalización en el electrohilado. La velocidad de síntesis no afecta el punto de fusión del PCL (62°) pero disminuye la cristalinidad de las fibras.¹² Otros factores a considerar del material, son las propiedades mecánicas, su densidad y la distancia entre la punta y el colector.¹⁹ El electrohilado reorganiza las cadenas poliméricas del PCL y las nanofibras tienen una menor cristalinidad que el PCL en bulto o sin procesar. El diámetro de las fibras de PCL producidas por medio de la técnica de electrohilado es de 50-700 nm⁴⁶.

Con la posibilidad que se tiene de modular los parámetros para generar la estructura de las fibras en el electrohilado, la influencia de la topografía que rodea

las células o tejidos puede ser estudiada.⁴⁴ Además del alineamiento, el cambio en el diámetro de las fibras a diferentes escalas permite imitar la estructura jerárquica que presenta la matriz extracelular. A través de la interacción de las células con las fibras de diferentes diámetros es posible tener influencia significativa sobre la distribución, migración, proliferación y diferenciación celular⁴⁷ (Figura 9).



Un decremento en el diámetro de la fibra resulta en una disminución en la porosidad y en el tamaño del poro, pero en un incremento en el área de superficie de la fibra y la fuerza mecánica. La gran superficie de área de las fibras con un diámetro pequeño permite la distribución, adhesión y proliferación celular debido a que existe un incremento en el área de anclaje de la célula.⁴⁸ Cuando se incrementa el diámetro de la fibra también se incrementa el promedio del tamaño del poro, mientras que la porosidad permanece constante. Aunque el diámetro de las fibras afecte diversos aspectos del metabolismo celular, los resultados observados también dependen del tipo celular y las condiciones de cultivo⁴.

1.4.- Técnicas de caracterización del material

A pesar de su auge en los últimos años, las nanofibras siguen representando una clase relativamente nueva de materiales y es necesario considerar no solo su síntesis y aplicaciones, sino también su caracterización detallada⁵⁰.

Se ha caracterizado su composición química, propiedades mecánicas, comportamiento térmico, hidrofiliicidad e hidrofobicidad. Además de estas propiedades, la morfología juega un papel clave en las posibles aplicaciones de las nanofibras, especialmente en el campo biomédico. Sin embargo la estructura específica de las nanofibras necesita un enfoque complejo para examinar la morfología usando una combinación de varios métodos, como los métodos de

imagen, porosimetría de mercurio o mediciones de adsorción/desorción, junto con bases teóricas de las ventajas y limitaciones en cada método⁴⁵.

Los métodos de imagen son ampliamente usados para la evaluación de la estructura y representar una parte esencial de la caracterización de la mayoría de los materiales, incluyendo las nanofibras⁵².

Una variedad de métodos han sido usados para la caracterización de las nanofibras y los andamios fibrilares. Muchos de estos métodos de caracterización no son únicamente para nanofibras y en muchos casos se deben de tener algunas consideraciones específicas debido al pequeño tamaño de las fibras. El diámetro de la fibra, alineamiento y geometría son comúnmente determinados por microscopia electrónica de barrido (MEB) y microscopia de fuerza atómica (MFA)⁵³.

El tamaño del poro del andamio fibrilar es un parámetro crucial en la ingeniería de tejidos y afecta directamente la habilidad de las células para infiltrarse en el material. La caracterización del poro incluye la determinación de la porosidad del andamio, así como el tamaño de poro y la distribución⁵⁴.

1.4.1.- Métodos de Imagen

El grupo de métodos de imagen usados para caracterización de fibras, implica microscopia óptica (MO) en el rango visible, MEB) y MFA.

La gran ventaja de los métodos de imagen, es que la estructura puede ser visualizada directamente en varios lugares de la muestra. Por lo tanto las imágenes obtenidas proporcionan una información útil para comparar las estructuras locales con la totalidad de la muestra⁵⁵.

Los métodos de imagen también juegan un papel clave de la evaluación de experimentos *in vitro*, que representa el método de cultivo celular sobre varios sustratos sintéticos. A pesar de los beneficios, las técnicas de imagen, no proporcionan valores numéricos definidos para permitir la comparación cuantitativa entre diversos materiales nanofibrilares⁵⁵.

1.4.2.- Microscopio Óptico (MO)

Un microscopio de óptico utiliza una serie de lentes de vidrio para enfocar la luz en una zona del espécimen a analizar, permitiendo ver una imagen ampliada.

El sistema de lentes que se encuentra cerca del objeto recibe el nombre de objetivo y el que se encuentra en donde se coloca el ojo del observador se le llama ocular. El objetivo forma una imagen real, invertida y aumentada del objeto,

la cual reside en el espacio sobre el plano focal de la lente ocular. Los rayos que divergen de cada punto de esta imagen emergerán de los oculares paralelos. El ocular aumenta la imagen intermedia aún más. Entonces, el poder de aumento del sistema es el producto del aumento lineal transversal del objetivo, y el aumento angular del ocular⁵⁶ (Figura 10).



En el primer tercio del siglo XX ya se había conseguido alcanzar el límite teórico de aumentos para los microscopios ópticos sin rebasar ampliificaciones superiores a 2000X sin embargo existía la necesidad de observar los detalles más finos de los objetos.

La resolución limitada del microscopio óptico (aproximadamente 200 nm) impide la caracterización de las nanoestructuras en detalle. El microscopio óptico se usa para los estudios preliminares de las nanofibras durante el proceso de fabricación. Para poder obtener información detallada de la muestra se usa la microscopia electrónica⁵⁶.

1.4.3.- Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

El MEB proporciona imágenes y datos físico-químicos de la superficie de cuerpos generalmente opacos a los electrones, por medio de un delgadísimo haz de electrones que recorre dicha superficie y de detectores que adquieren e interpretan las señales que de ella emanan, transformándolas en corrientes eléctricas que se utilizan para formar una imagen en un monitor. Para realizar estas funciones los MEB cuentan con las siguientes partes: a) óptica electrónica, b) cámara del espécimen, c) circuitos de alimentación de la óptica electrónica, de generación de alto voltaje y de producción de barrido, d) detectores de electrones secundarios emitidos por la muestra, de electrones retrodispersados y otros tipos de detectores, e) dispositivos para observación y registro de las imágenes. (Figura 11)⁵⁷.

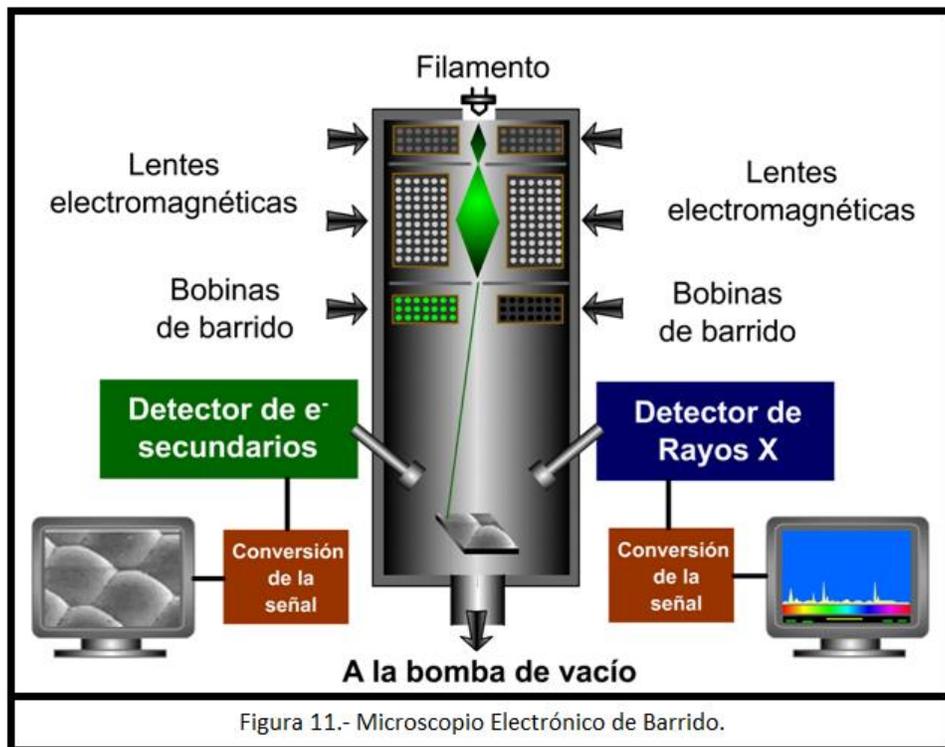


Figura 11.- Microscopio Electrónico de Barrido.

La imagen del microscopio electrónico es el resultado de la interacción de la muestra con el haz de electrones. Muchos factores como la energía del electrón, la densidad de la muestra, el número atómico de los elementos y la topografía de la superficie de la muestra, tienen un efecto en esta interacción. Las interacciones elásticas y no elásticas de los electrones con los átomos de la muestra generan electrones secundarios, auger y electrones retrodispersados, continuos, rayos X característicos y fluorescencia.

Los electrones secundarios generados a partir de los electrones con los átomos de la muestra son usados para traer información importante acerca de la muestra y son usados en otras técnicas espectroscópicas⁵⁵.

MEB es usado para la caracterización superficial del poro pero no puede evaluar el interior del andamio. La caracterización del poro a profundidad se realiza comúnmente por porosimetría de mercurio, sin embargo esta técnica no puede ser aplicada a todos los casos debido a que su uso se complica con andamios nanofibrilares con pequeños poros o muestras muy delgadas³⁴.

Una de las limitaciones de MEB es que la observación se realiza en alto vacío y durante el secado de la muestra, pueden existir cambios en la estructura. Esta desventaja es resuelta en diversas modificaciones de MEB, tales como microscopia electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM). La magnificación es más baja comparada con MEB, pero no es necesario cubrir la muestra con una capa conductora.

Los beneficios son que debido a su nitidez provee información acerca de las estructuras a varias distancias de nivel de escaneo, por lo tanto es un método útil para evaluar las características básicas de las nanofibras (como el diámetro de la fibra) y además permite observar artefactos en la estructura de las nanofibras que se generen durante el proceso de síntesis⁵⁷.

La MEB es un método insustituible para la evaluación de la orientación de las nanofibras, que no solo afectan las propiedades mecánicas, sino que también desempeñan un papel clave en muchas funciones biológicas. Los resultados de los experimentos realizados en nanofibras *in vivo* e *in vitro* muestran un comportamiento significativamente diferente dependiendo de la disposición alineada o aleatoria de las fibras⁵⁵. El MEB es probablemente la técnica más usada debido a su accesibilidad y su facilidad de uso, pero tiene como inconveniente que el haz del electrón puede dañar las fibras con diámetros < 200nm, reduciendo la precisión. Además, las muestras no conductoras deben ser cubiertas con una capa delgada de un material conductor como el oro, lo que puede dar lugar a características cuestionables de las fibras muy delgadas. Por esta razón el MFA, se considera una técnica adecuada complementaria para caracterizar la morfología y topografía, especialmente de las fibras más pequeñas⁵⁷.

1.4.4.- Microscopia de Fuerza Atómica (MFA)

El microscopio de fuerza atómica (MFA) es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los piconewtons. Al rastrear muestras, es capaz de registrar su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica. La sonda va acoplada a un listón o palanca microscópica muy flexible de sólo unos 200µm. El MFA ha sido esencial en el desarrollo de la

nanotecnología, para la caracterización y visualización de muestras a dimensiones nanométricas ($1 \times 10^{-9} \text{ m} = \text{nm}$)⁵⁸.

La fuerza atómica es detectada cuando la punta está muy próxima a la superficie de la muestra, entonces es posible registrar la pequeña flexión del listón mediante un haz láser reflejado en su parte posterior. Un sistema auxiliar pizoeléctrico desplaza la muestra tridimensionalmente, mientras que la punta recorre ordenadamente la superficie. Todos los movimientos son controlados a través de una computadora. La resolución del instrumento es de aproximadamente 0.2 nm (10^{-9} m), y la pantalla de visualización permite distinguir detalles en la superficie de la muestra con una amplificación de varios millones de veces⁵⁸ (Figura 12).

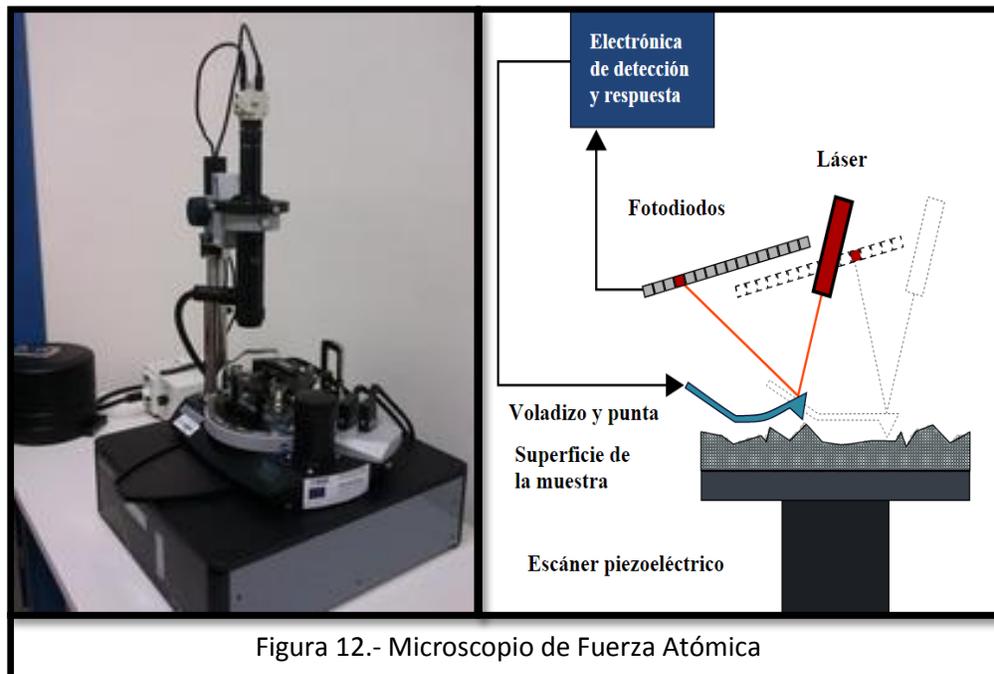


Figura 12.- Microscopio de Fuerza Atómica

La MFA ha provisto una herramienta poderosa para determinar la morfología de estructuras en rangos nanométricos.⁵⁹ El microscopio MFA utiliza la punta metálica muy delgada para explorar directamente la superficie de la muestra, mediante un barrido mecánico que utiliza cristales pizoeléctricos, que se contraen al pasarles corriente. En la MFA la superficie de la muestra se detecta con la punta, que se mueve en estrecha proximidad de la muestra debido a interacciones de van der Waals. El modelo tridimensional de la superficie de la muestra es reconstruido a partir de las posiciones individuales de la punta⁵⁹.

EL MFA tiene un alta resolución que en algunas aplicaciones puede llegar a la estructura atómica de los cristales. El MFA puede darnos importantes resultados en el examen de materiales poliméricos, la estructura particular de la fibra puede ser observada y el diámetro de la fibra puede ser medido efectivamente. En comparación con las microscopias electrónicas, el MFA puede realizarse en un entorno de no-vacío o en condiciones húmedas, lo que garantiza obtener datos de la morfología de los andamios hilados sin ningún recubrimiento que pueda afectar la rugosidad del material⁵⁹.

2. JUSTIFICACIÓN

Las células son sistemas que contienen diferentes componentes interconectados que traducen las entradas mecano químicas que reciben en señales bioquímicas que dan lugar a una modificación conductual. En el proceso de adhesión celular a la matriz extracelular, las células censan señales como la fuerza mecánica y la rigidez del substrato a través de proteínas receptoras sensoriales que se encuentran en la superficie de la célula; traducen estas entradas de señales mecánicas y responden con señales bioquímicas que subsecuentemente determinan la función y destino celular³¹. Diferentes tipos de información se encuentran codificados dentro de la matriz extracelular y se combinan para formar una red que las células usan para guiar sus actividades y mantener su diferenciación dentro de los tejidos. Los receptores celulares distribuidos a través de la membrana celular perciben los cambios en los gradientes de señalización y responden con comportamientos direccionados como migración y expresión de los componentes de la matriz extracelular³¹. Debido a los mecanismos dinámicos de la matriz extracelular los andamios en la ingeniería de tejidos deben basarse en biomateriales que dirijan la interacción, comportamiento y crecimiento celular, ya sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas en el mismo. Materiales sintéticos como los polímeros biodegradables ofrecen una alternativa versátil, debido a sus buenas propiedades mecánicas al ser sintetizados. Los andamios nanofibrilares son sintetizados exitosamente y con relativa facilidad a partir de diferentes polímeros a través de la técnica de electrohilado la cual permite obtener fibras con diámetros que van desde micrómetros hasta decenas de nanómetros. Las características básicas del andamio son: tener una alta porosidad interconectada, una máxima área superficial, rigidez superficial, una forma específica tridimensional y necesita ser lo más específico a la matriz extracelular que se pretende regenerar. Los andamios sintetizados por la técnica de electrohilado poseen una alta porosidad, alta interconectividad y es posible generar un alineamiento controlado de las fibras que tiene una influencia directa en la orientación y migración celular. De lo mencionado anteriormente se puede desprender la justificación para este trabajo. La presencia de una rugosidad superficial, una estructura porosa y su interconexión le provee al andamio puertos de entrada para la migración de la célula y la disponibilidad de una máxima área para la interacción de numerosas células específicas. La morfología, topografía, química y las propiedades mecánicas juegan un rol importante en la respuesta celular.¹⁷ La estructura del andamio debe tomar en cuenta el tipo celular, el biomaterial más adecuado y el efecto de la topografía nanométrica y micrométrica en la superficie para obtener la respuesta celular más favorable para su aplicación¹.

3.- HIPÓTESIS

Los andamios fibrilares alineados y desordenados al ser manipulados en rangos nanométricos con una alta interconexión porosa y área superficial, aumentan la respuesta de biocompatibilidad (adhesión, proliferación y reorganización del citoesqueleto) de las células de linajes odontogénicos.

4. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICO

4.1.-Objetivo general:

Determinar el efecto de la rugosidad y la interconexión porosa de los andamios fibrilares alineados y desordenados de PCL en la interacción de las células de linajes odontogénicos (fibroblastos gingivales, fibroblastos de ligamento periodontal, fibroblastos de pulpa y osteoblastos).

4.2.-Objetivos específicos:

1. Analizar la topografía de los andamios fibrilares (rugosidad y porosidad) alineados y desordenados de PCL micro- y nano- métricos por MO, MEB y MFA.
2. Establecer el efecto de la morfología superficial de las fibras de PCL en la interacción célula-material (adhesión y proliferación).
3. Correlacionar el papel regulador de la proliferación de las células de linajes odontogénicos con la topografía de los andamios electrohilados alineados y desordenados de PCL (reorganización del citoesqueleto).

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Caracterización del material

5.1.1. Diseño de los andamios de PCL:

El proceso de elaboración de los andamios, se llevó a cabo por la técnica de electrohilado, utilizando PCL con un peso molecular de 65,000 kDa, adquirido de la compañía SIGMA, Aldrich. Se llevó a cabo la solución a base de PCL (0.05 g/mL) que se disolvió en 75ml de 2, 2, 2-trifluoroetanol (TFE) bajo agitación magnética a 36°C toda la noche y posteriormente se le añadió 25ml de cloroformo (CHCl₃) y se mantuvo bajo agitación magnética durante una hora. La solución de PCL fue puesta en una jeringa de 5 mL con una aguja hipodérmica de 18 Ga conectada al polo positivo (BD Plastipack). El polo negativo fue ubicado en una plataforma metálica recubierta por papel aluminio para recolectar las fibras electrohiladas y obtener los andamios desordenados. Para obtener los andamios alineados se colocó como superficie colectora un mandril rotativo metálico recubierto por papel aluminio. Durante el proceso de síntesis por electrohilado se consideraron diferentes parámetros para optimizar la morfología final de las fibras.⁴ En particular; la distancia entre la punta, la jeringa y el colector fue fijado a 14cm para los andamios nanométricos y 10cm para los andamios micrométricos; el voltaje fue de 13 kV/cm y la velocidad del flujo fueron de 0,5 mL/h por un tiempo de depósito de 10 h para garantizar que se procesaran la misma cantidad de volumen de las soluciones¹⁷.

5.1.2 Caracterización de las nanofibras.

Los andamios de PCL obtenidos por medio de la técnica de electrohilatura fueron visualizados mediante microscopía óptica (MO) en los objetivos 10X y 40X para observar la diferencia en la morfología de la superficie de las microfibras y las nanofibras tanto con una organización desordenada como ordenada. Se eligió la técnica de MFA en la modalidad de contacto (JEOL, JSPM-3210) para realizar la caracterización superficial de las nanofibras y obtener los mapeos y la rugosidad de la interconexión porosa y MEB en la modalidad de bajo voltaje, se obtuvieron imágenes de la homogeneidad de los andamios nanométricos y micrométricos alineados y desordenados.

5.2.-Ensayos Biológicos

5.2.1.-Cultivo Celular

Las células de linajes odontogénicos (fibroblastos gingivales, fibroblastos de ligamento periodontal, fibroblastos de pulpa) se aislaron y cultivaron en el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, los osteoblastos fueron obtenidos de la línea hFOB 1.19 ATCC, CRL-11372. Los cultivos primarios se obtuvieron a partir terceros molares sanos con indicación para extracción por motivos ortodoncicos en el departamento de cirugía maxilofacial del DEPEI, se colocaron en un tubo de 50ml con medio DMEM, antibióticos y antimicóticos para ser transportados al laboratorio, se separaron los tejidos (encía y ligamento) del órgano dentario con un bisturí del número 5, y se llevó a cabo la disgregación mecánica antes de colocar los tejidos en el tubo de 15ml con Tripsina-EDTA (0.25%) durante 5 minutos en la incubadora a 37°C, la pulpa se obtuvo a partir de un corte a nivel del cuello del órgano dentario con un micromotor y un disco de diamante, se retiró la corona y se accedió a la cámara pulpar. El tejido pulpar se extrajo con una lima de endodoncia del #15, se colocó en un tubo de 15ml con Tripsina-EDTA (0.25%) durante 5 minutos en la incubadora a 37°C. Los tubos se centrifugaron a 500 rpm, se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1.5 ml de Medio Dulbeccos Modificado (DMEM) que fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), con antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100µg/mL) y fungisona (0.3 µg/mL), se colocó en una caja de cultivo de 6 pozos con 2 ml de medio. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad. Los cultivos se dejaron por 3 semanas hasta obtener colonias que fueron aisladas para su posterior sembrado en cajas de 75 cm² para obtener las líneas celulares odontogénicas.

5.2.2.- Ensayo de adhesión celular.

Se utilizó el ensayo de cristal violeta para analizar la interacción de las células de los linajes odontogénicos con los andamios poliméricos micro- y nano-fibrilares de PCL. Las distintas células (fibroblastos gingivales, fibroblastos de ligamento periodontal, fibroblastos de pulpa y osteoblastos) se sembraron sobre los andamios a la concentración de 5×10^3 , y se cultivaron en cajas de 96 pozos durante 1, 4 y 24 horas. Transcurrido el tiempo de adhesión celular; las células se lavaron con PBS al menos 3 veces; se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, se lavaron con PBS y se incubaron en una solución de cristal violeta al 1% por 15 minutos. Se lavó el exceso de cristal violeta con agua bidestilada y se extrajo el colorante con 200 µl de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2%. La solución resultante fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570nm. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre la caja de cultivo. El fondo del colorante fue restado de los valores de los andamios electrohilados sin presencia de células y sometidas al mismo tratamiento que se utilizó en el ensayo de cristal violeta.

5.2.3.- Ensayo de Proliferación celular

Se utilizó el ensayo de proliferación por Presto Blue (Cell Viability Reagent, Invitrogen) para poder correlacionar el papel regulador de la proliferación de las células de linajes odontogénicos con la interconexión porosa de los andamios poliméricos micro- y nano- fibrilares de PCL. La ventaja de utilizar el ensayo de Presto Blue se debe a que se puede analizar la proliferación durante todo el transcurso del experimento (en nuestro caso 6 días de incubación) sin necesidad de interferir con la proliferación celular, desventaja que presenta el ensayo por MTT al utilizar dimetil sulfoxido o alcohol ácido para obtener el producto convertido por la enzima deshidrogenasa. El ensayo Presto Blue cuantifica el indicador de óxido-reducción que cambiara a un producto fluorescente en respuesta a la reducción química por las enzimas mitocondriales tales como la flavina mononucleótido deshidrogenasa, flavina adenina dinucleótido deshidrogenasa y nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa vertiéndolo en el medio de cultivo celular. Esto nos permitió correlacionar el valor con la actividad metabólica de las células vivas que están en la parte más interna de la interconexión de poros de los andamios. Para lograr este objetivo; se sembraron en cajas de 96 pozos las diferentes células a una concentración de 5×10^3 y se incubaron durante 2, 4 y 6 días de cultivo. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó una alícuota de 1ml de Presto Blue diluido 1:10 en medio libre de rojo fenol y de suero fetal bovino. Para obtener el proceso de óxido-reducción se incubaron durante 4 horas a 37°C. Pasado el tiempo se tomaron 200 μ L de esta solución y se transfirió a una placa de 96 pocillos para el análisis colorimétrico. Como controles de cuantificación metabólica se utilizaron los pozos de las cajas de cultivo sin células para la corrección de las interferencias de fondo del indicador de óxido-reducción. La densidad óptica se midió inmediatamente con un espectrofotómetro a longitudes de onda de 570 nm y de referencia a 600 nm. El porcentaje de proliferación celular se evaluó de acuerdo al protocolo del fabricante. Una vez obtenida la lectura; las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con medio DMEM suplementado con 10% de SFB para continuar con los siguientes tiempos de incubación. Repitiendo este proceso durante los 6 días de incubación. Los cultivos control fueron las células sembradas sobre las cajas de cultivo.

5.2.4.- Interacción célula-material

Para llevar a cabo el análisis de la morfología del citoesqueleto celular, las células de linajes odontogénicos (fibroblastos gingivales, fibroblastos de ligamento periodontal, fibroblastos de pulpa y osteoblastos) se sembraron en cajas de 96 pozos a una concentración de 1×10^4 células sobre los andamios nanofibrilares alineados y desordenados de PCL en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Después de 4 y 24 horas de incubación se fijaron con paraformaldehído al 4% durante toda la noche a 4°C, se lavaron con PBS dos veces y se permeabilizaron con Tritón durante 5 minutos, se lavaron con PBS 2 veces y se bloqueó con solución de bloqueo (suero bovino fetal al 10% en PBS, tween 0.05%) durante una hora, posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios

policlonales anti-vinculina, anti-vimentina, anti-integrina beta 1 y anti-Alfa- actina que se encuentran en la Tabla 1, con una concentración 1:100 toda la noche a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS-Tween (0.05%) Se colocaron los anticuerpos secundarios anti cabra-conejo acoplados a fluorocromos en verde como FITC y en rojo TR a una concentración 1:200 por una hora a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-Tween 2 veces (0.05%), con PBS 1 vez y se dejaron en PBS para su posterior observación al microscopio confocal.

Tabla-1 Anticuerpos primarios que se utilizaron para el análisis de la morfología del citoesqueleto celular

Proteína	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
Vinculina	Monoclonal (ratón)	Cabra anti-ratón
Alfa-actina	Monoclonal (ratón)	Cabra anti-ratón
Integrina beta-1	Policlonal (conejo)	Cabra anti-conejo
Vimentina	Policlonal (conejo)	Cabra anti-conejo

5.2.5.- Aislamiento del RNA

Para llevar a cabo el aislamiento del RNA, las células de linajes odontogénicos (fibroblastos gingivales, fibroblastos de ligamento periodontal, fibroblastos de pulpa y osteoblastos) se sembraron en cajas de 96 pozos a una concentración de 1×10^4 células sobre los andamios nano fibrilares alineados y desordenadas de PCL en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Después de 24 horas de incubación las células se lavaron con PBS 2 veces durante 2 minutos y se colocaron en un eppendorf con 500µl de trizol (TRIzol Reagent, Invitrogen) y fueron colocados a -80 grados durante toda la noche. Posteriormente se homogenizo vigorosamente, y se les añadió 100 µl de cloroformo y se homogenizo nuevamente. Se centrifugaron a 12, 000 rpm por 15 minutos. Ya obtenida la separación de fases se extrajo la fase acuosa, se agregó 1ml de isopropanol para precipitar el material genético a una temperatura de -80°C toda la noche. Se centrifugo por 10 minutos a 13,000 rpm, se retiró el sobrenadante y al botón obtenido se le agregó 1 ml de etanol al 75% a -4°C, se centrifugo a 13,000 rpm por 5 minutos y se decantó el excedente. Se centrifugo a 13 000 rpm por 50 segundos y se dejó secar a temperatura ambiente, se almaceno el material seco o resuspendido en agua DEPC a -80. La concentración de RNA fue estimada con una absorbancia de 260nm y 280nm.

5.2.6.- Detección de moléculas de adhesión.

Los cultivos celulares de las líneas de linajes odontogénicos sembrados sobre los andamios nanométricos alineadas y desordenadas que fueron cultivados en medio DMEM durante 24 horas, se analizaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la expresión genética de marcadores relacionados con adhesión. La muestra de RNA (1µg) se utilizó para realizar la reacción de RT-PCR de un solo paso (PROMEGA) de acuerdo al protocolo del fabricante, en el que el programa de síntesis de cDNA (1 ciclo, 45 min de duración, 45°C) fue seguido por la desnaturalización (2min de duración, 94°C). El cDNA fue amplificado a 94°C por 30 segundos, 60° por 1 minuto, 68°C por 1 minuto por 40 ciclos en un termociclador (MultiGene OptiMax Thermal Cycler). Los cebadores usados para detectar la GAPDH como gen constitutivo así como los cuatro genes de adhesión que se muestran en la tabla 2. Los productos obtenidos de la reacción se separaron por electroforesis con un gel de agarosa al 2%, teñido con 0.05 µg/mL de bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron utilizando un transiluminador y fueron capturadas con MicroBis System (Bio-Imaging Systems).

Tabla-2 Oligos que se utilizaron para la amplificación de genes específicos de moléculas de adhesión.

Gen	Secuencia (FW)	Secuencia (RV)
GAPDH	5'agccacatcgctcagacac3'	5'gcccaatacgaccaaattcc3'
Integrina B1	5'ctctcactagattgaatgacactgct3'	5'acactcttgtcttccacatacatcac3'
Talina	5'taccatggtgtacgacgcct3'	5'gtcctctacacctgctcc3'
Vinculina	5'agcaccagctcaaaacct3'	5'gcgcagtgtaaattccagcat3'
FAK	5'aatacggcgatcactggg3'	5'catgccttgcttttcgctgt3'

5.3.- Análisis estadístico

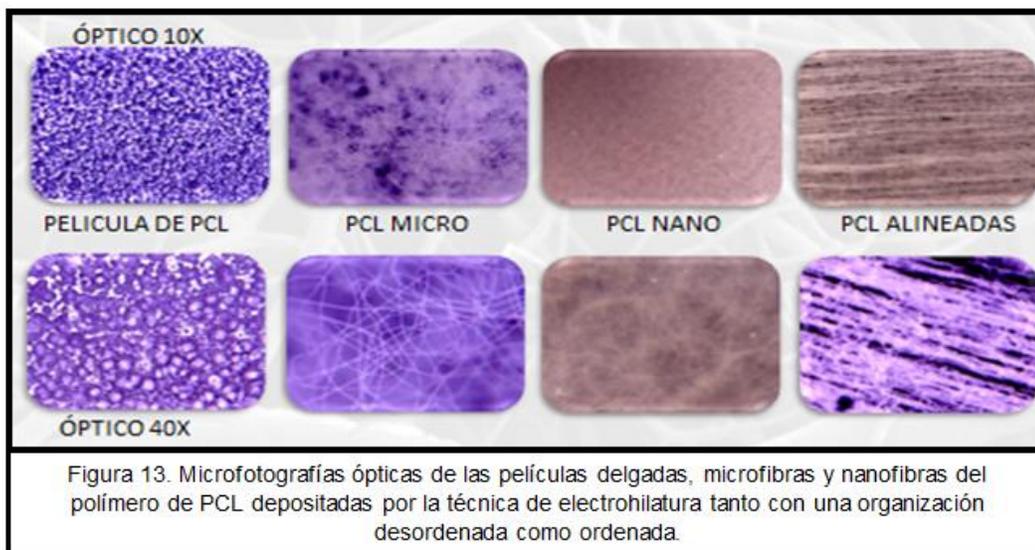
El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa GraphPad Prism. Se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías y Tukey Post-Hoc para la comparación entre grupos, representando la significancia ± desviación estándar. Los resultados fueron considerados significativos con una $p < 0.05$.

6.-RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL

6.1.1 MICROSCOPIO ÓPTICO (MO)

El análisis con el microscopio óptico mostró las diferencias en la morfología de las superficies de los andamios hilados de PCL micrométricos y nanométricos alineados y desordenados, utilizando un objetivo de 10X y 40X. La figura 13 muestra que la película de PCL tiene una morfología macrométrica y rugosa, mientras que el andamio micrométrico desordenado se observa una morfología desordenada de fibras; debido al tamaño y la morfología de los andamios nanofibrilares de PCL, solo observamos tenuemente las fibras hiladas nanométricas con un arreglo desordenado con el objetivo de 40X y están en mayor cantidad con respecto a las micro fibras. En los andamios de PCL con un arreglo alineado, los rangos nanométricos debido a su alta disposición ordenada y la distribución uniforme de las fibras, se observan con la microscopía óptica en los objetivos 10X y 40X. Esta microscopía también nos ayudó a evaluar si las fibras no tenían artefactos extraños que se estuvieran generando durante el proceso de síntesis. (Figura 13)



La microscopía óptica nos permitió observar las diferencias superficiales entre la película delgada de PCL que fue usada como control, y los andamios nanométricos y micrométricos desordenados obtenidos con la técnica electrihilada convencional; nanométricos y micrométricos alineados, en cuanto a la organización de las fibras y su distribución.

6.1.2 MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (MEB)

Los resultados del análisis por MEB de los andamios nanoestructurados muestran imágenes su homogeneidad, la porosidad que presenta la película delgada de PCL, y la diferencia en la morfología comparada con las microfibras de PCL en las cuales podemos observar una distribución de fibras desordenadas las cuales forman poros de diferente diámetro en la membrana, las nanofibras presenta una distribución desordenada pero con un aumento en la cantidad de fibras y una disminución en el diámetro de la misma, obteniendo así poros interconectados más pequeños y con mayor superficie de contacto como se muestra en la figura 14.

Las fibras de PCL alineadas presentan una morfología totalmente diferente ya que todas las fibras están orientadas hacia una dirección específica, lo que la provee de propiedades diferentes debido a su alta disposición ordenada y a su empaquetamiento. También se llevaron a cabo los histogramas de distribución de tamaño de fibra para las fibras micrométricas ordenadas y desordenadas y para las fibras nanométricas ordenadas y desordenadas, haciendo 100 mediciones para cada tipo de fibra sobre las microfotografías de MEB con el software Origin 8.

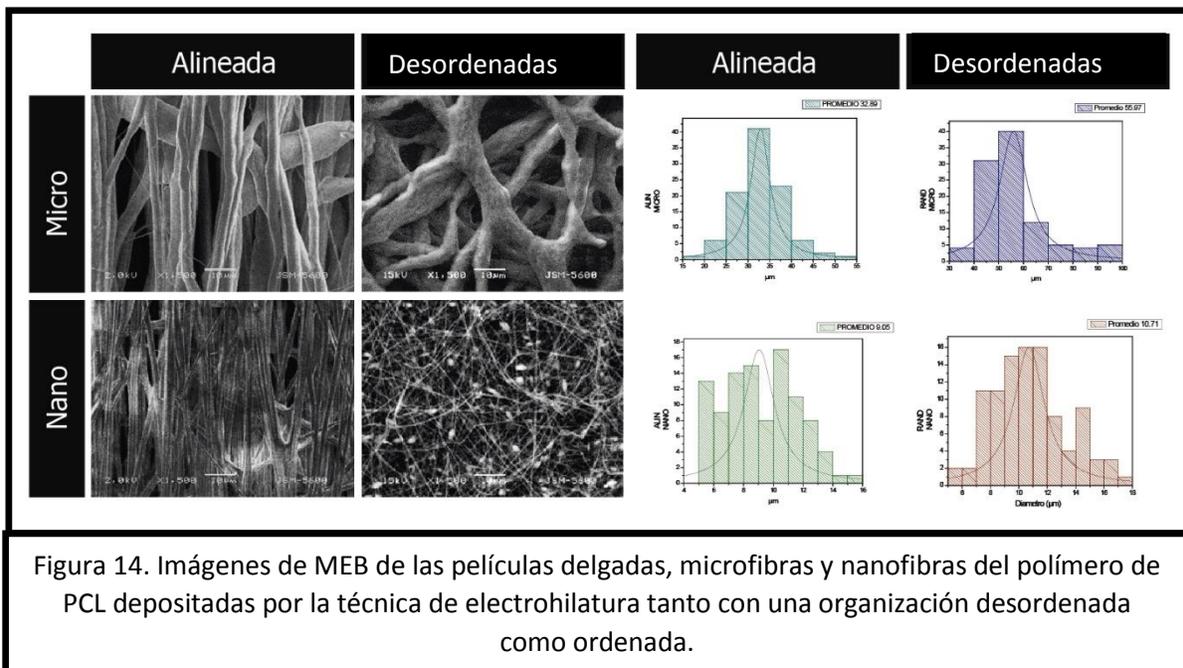


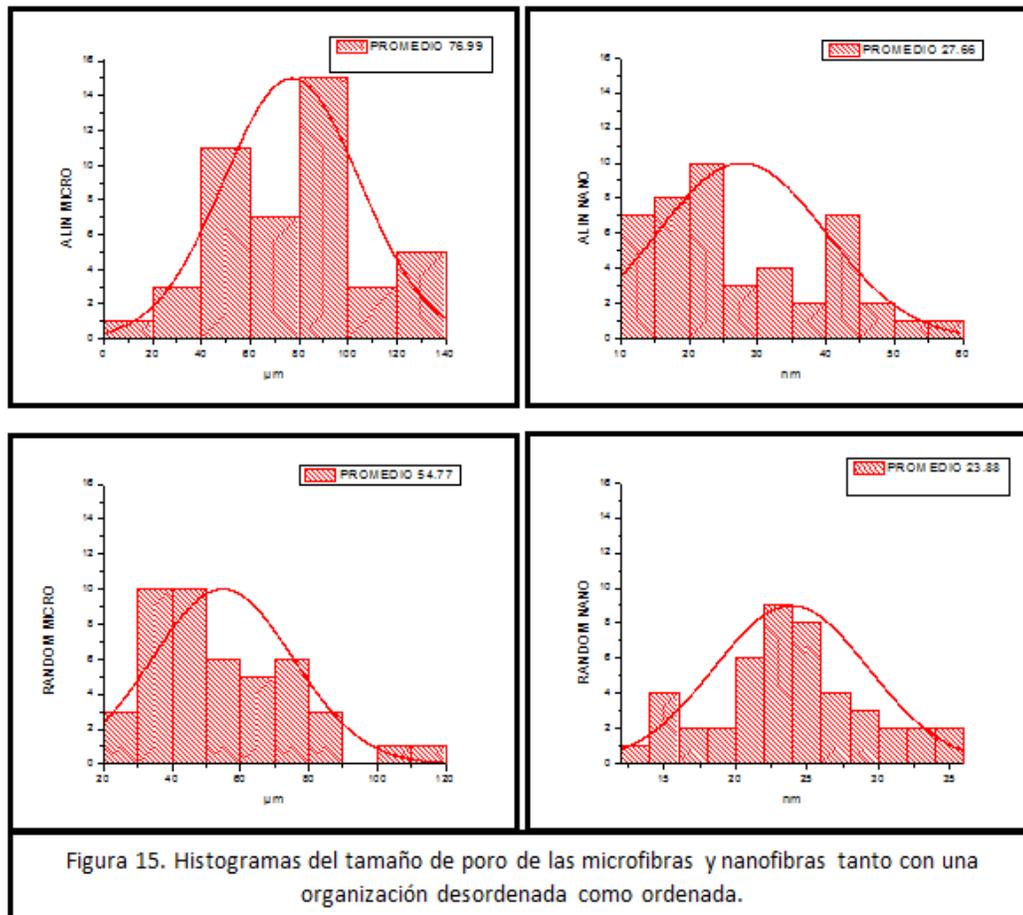
Figura 14. Imágenes de MEB de las películas delgadas, microfibras y nanofibras del polímero de PCL depositadas por la técnica de electrohilatura tanto con una organización desordenada como ordenada.

La microscopia electrónica de barrido, nos proporcionó información acerca de la morfología superficial de las fibras, su distribución y su diámetro promedio. Las fibras alineadas se observan con una disposición homogénea y con una sola orientación en los andamios micrométricos y nanométricos, la separación entre las fibras y su diámetro es mayor en las micrométricas; el diámetro disminuye y la disposición ordenada aumenta en los andamios en rangos nanométricos. Se

realizaron 100 mediciones en diferentes microfotografías elegidas de forma aleatoria, y se procesaron por medio del software origin 8 para obtener los histogramas y el promedio de diámetro de las fibras.

En los histogramas de los andamios micrométricos alineados se obtuvo un promedio de diámetro de fibra de 76.99 μm con poros que van desde los 17.27 μm -126.62 μm de diámetro. En los histogramas de los andamios micrométricos se obtuvo un promedio de diámetro de fibra de 54.77 μm con poros que van desde 28.38 μm a 114.96 μm de diámetro.

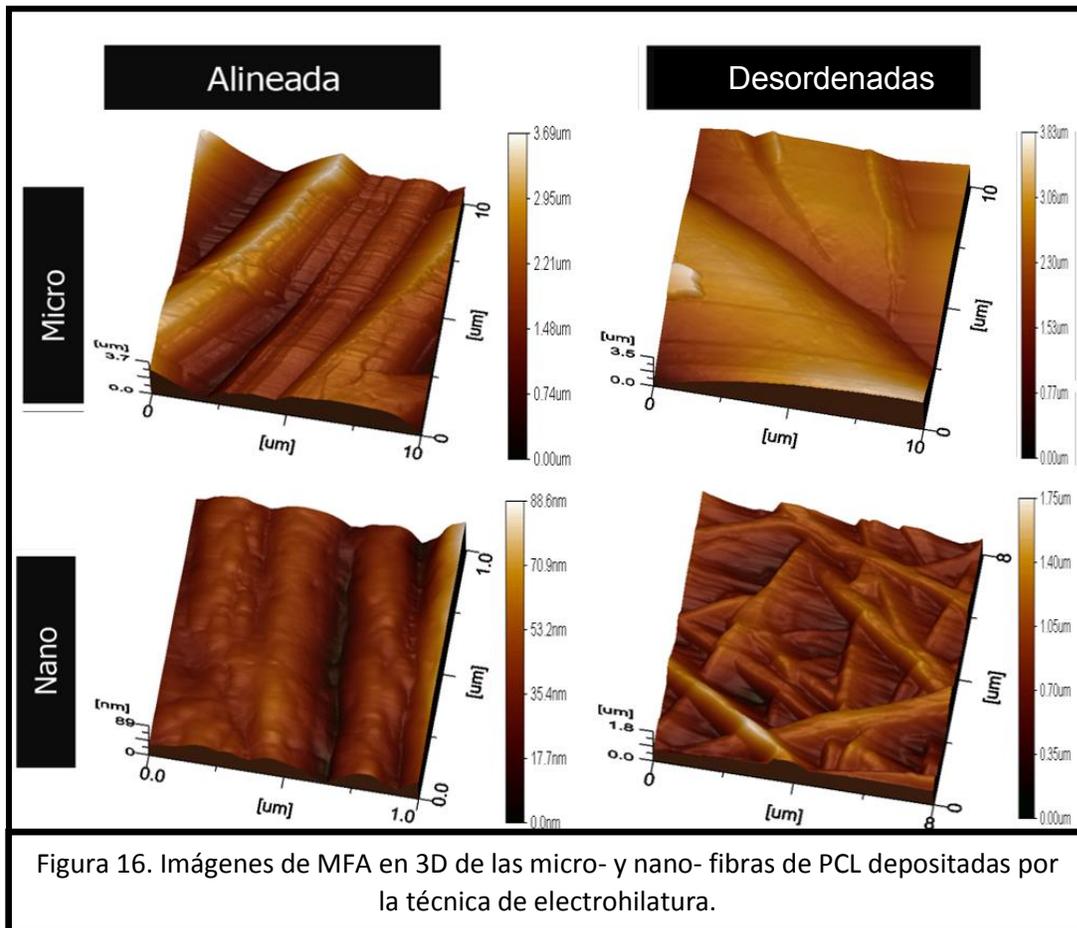
En los andamios nanométricos alineados, se obtuvo un promedio de diámetro de fibra de 27.66 nm con poros que van de 11.48 nm-56.66 nm de diámetro. Para las fibras nanométricas desordenadas, en los histogramas se obtuvo un promedio de diámetro de fibra de 23.88 nm con poros que van de 13.61 nm-35.52 nm de diámetro como se muestra en la figura 15.



El tamaño promedio de poro entre las fibras micrométricas si muestra una variación, mientras que el tamaño promedio de poro en las fibras nanometricas no presenta una variación significativa.

6.1.3 MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (MFA)

Los andamios de PCL obtenidas por la técnica de electrohilatura se sometieron a su caracterización superficial por medio de MFA en su modalidad de contacto, para obtener los mapeos, altura promedio de las fibras y rugosidad de la interconexión porosa, analizamos la topografía de nuestras andamios ya que esto es de suma importancia para la adhesión celular, y pudimos comparar la interconexión porosa de nuestros andamios, observando que la interconexión porosa es mayor en nuestras nanofibras. (Figura 16)



Las imágenes en tercera dimensión nos muestran la disposición y la forma de la superficie de las fibras y nos permiten obtener datos de la rugosidad y altura. En las fibras alineadas micrométricas se puede observar su disposición ordenada y en las nanométricas se puede observar una mayor cantidad de fibras, su empaquetamiento y una alta disposición ordenada.

En las fibras desordenadas nanométricas se observa una mayor cantidad de fibras y poros, crestas y valles, y un menor diámetro en comparación con las fibras desordenadas micrométricas (Figura 17).

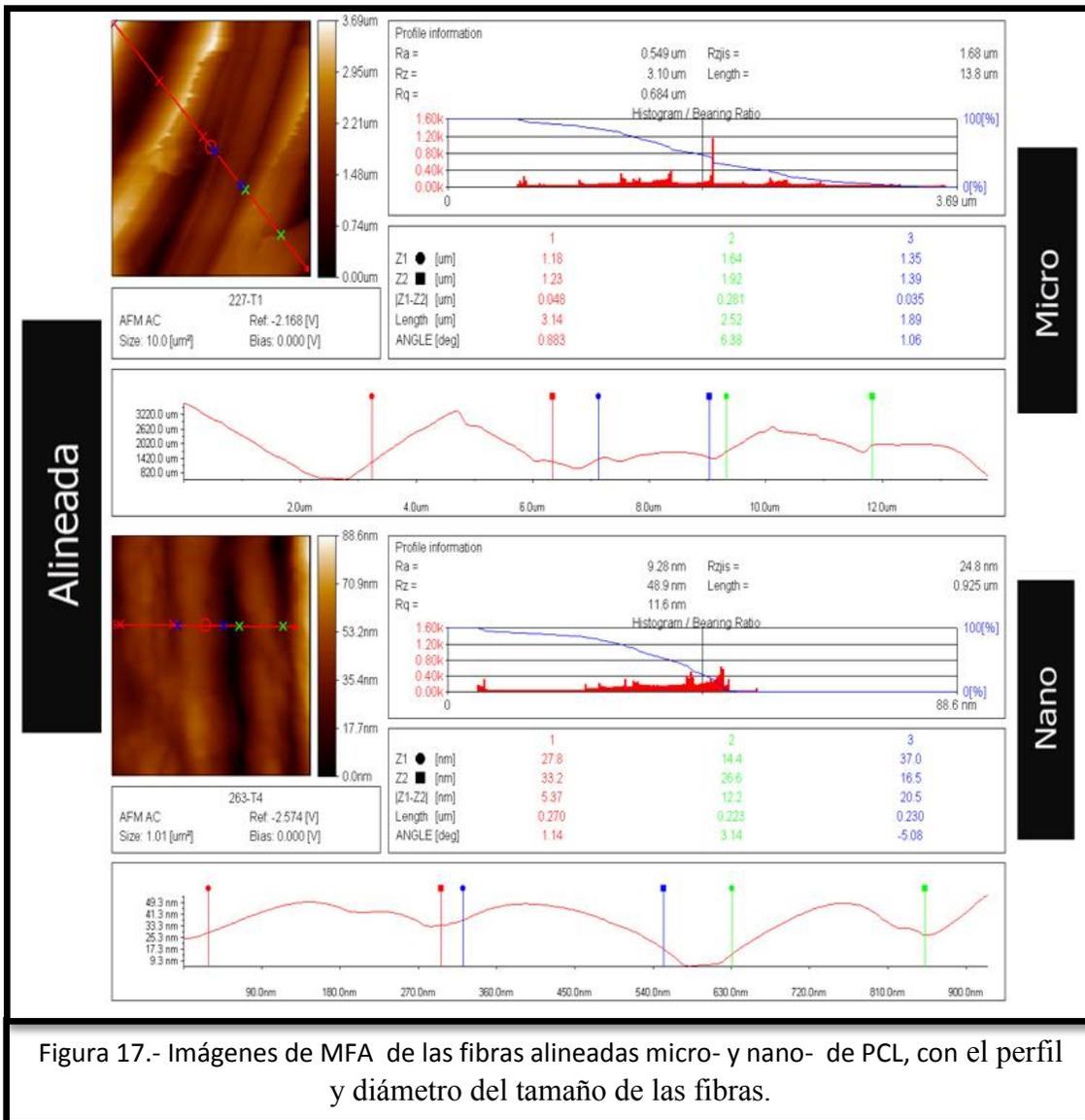


Figura 17.- Imágenes de MFA de las fibras alineadas micro- y nano- de PCL, con el perfil y diámetro del tamaño de las fibras.

Las imágenes de MFA de las fibras alineadas nos permitieron observar el alto ordenamiento que presentan así como la uniformidad de sus diámetros. El perfil observado nos muestra que tenemos fibras alineadas con una morfología cilíndrica y su diámetro va desde 1.18 μm a 1.64 μm en las alineadas micrométricas, con una rugosidad promedio de 3.10 μm y en las fibras alineadas nanométricas se obtuvo un diámetro de fibra de va desde 14.4 nm a 37.0 nm con una rugosidad promedio de 48.9 nm (Figura 18).

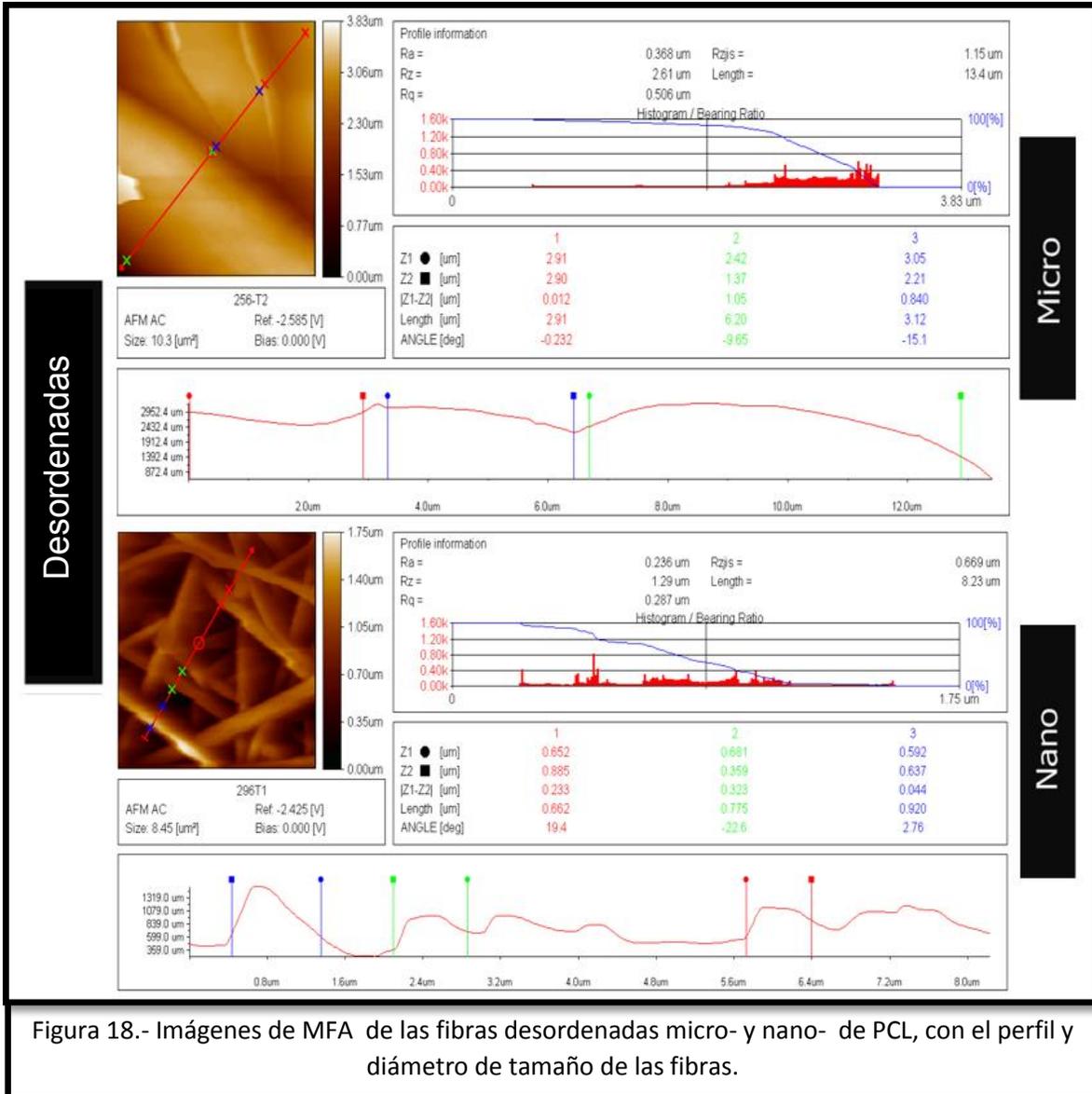


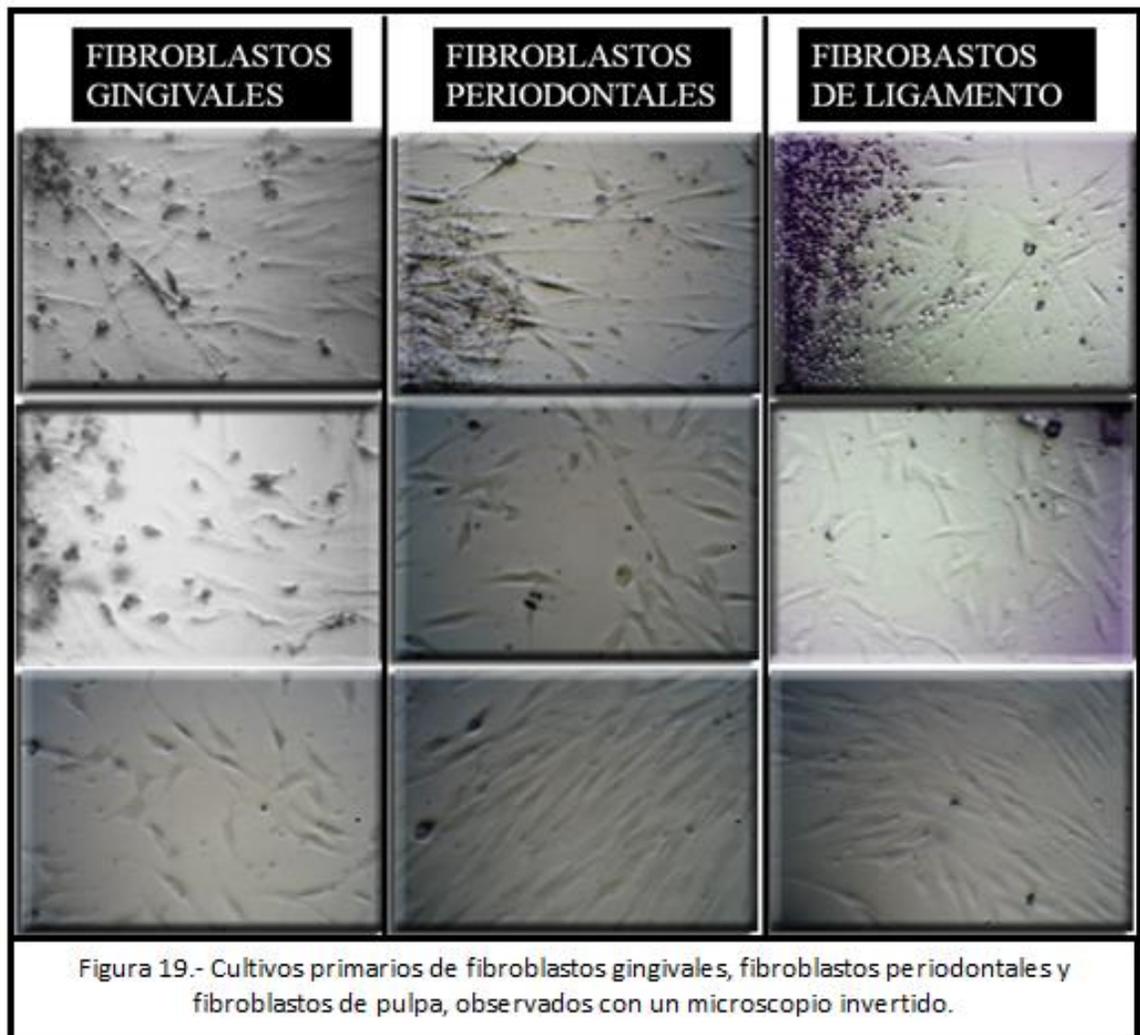
Figura 18.- Imágenes de MFA de las fibras desordenadas micro- y nano- de PCL, con el perfil y diámetro de tamaño de las fibras.

Las imágenes de MFA de las fibras desordenadas nos permitieron observar la disposición desordenada que presentan las fibras, los poros de diferentes tamaños que se generan y su interconexión porosa, así como la uniformidad de sus diámetros. El perfil observado nos muestra que tenemos fibras con una morfología cilíndrica y que el diámetro va desde 2.42 µm a 3.05 µm en las fibras alineadas micrométricas, con una rugosidad promedio de 2.61 µm y de 59.2 nm a 68.1 nm de diámetro en las fibras alineadas nanométricas con una rugosidad promedio de 129 nm.

6.2.- ENSAYOS BIOLÓGICOS

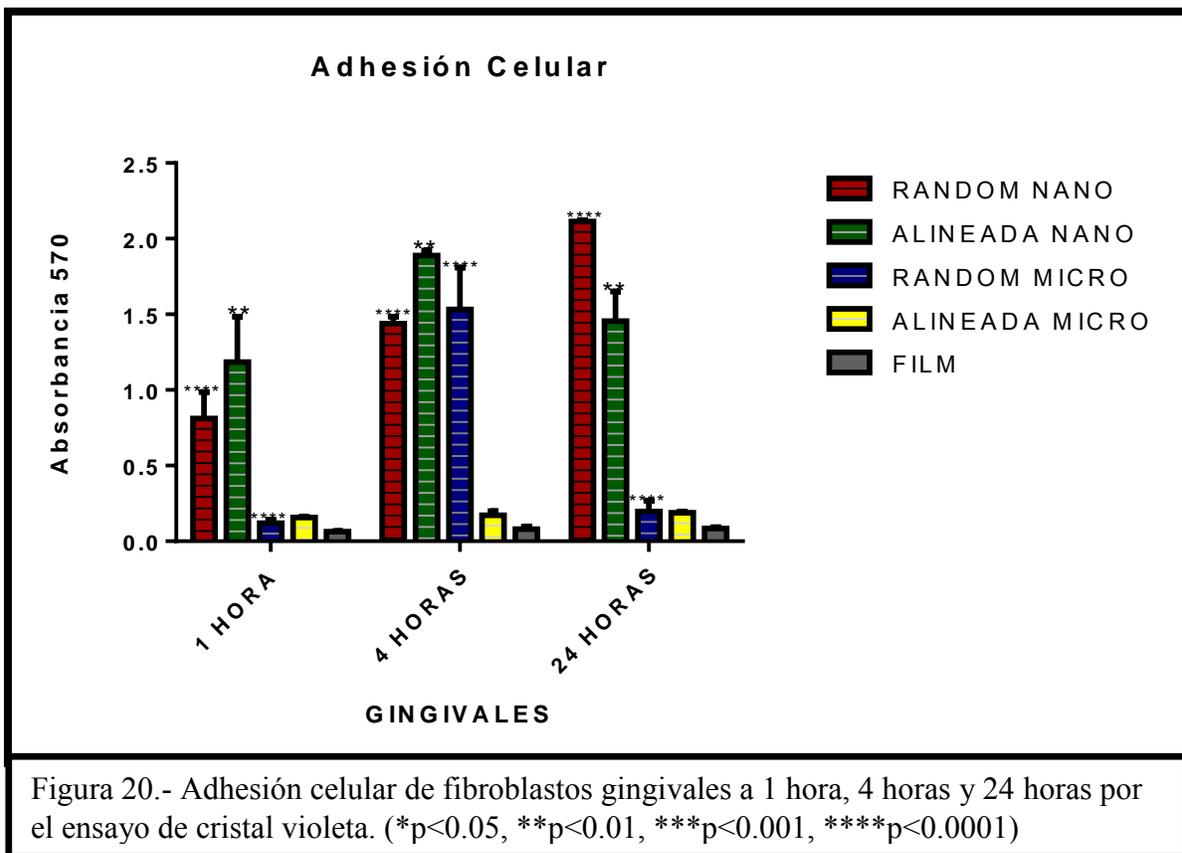
6.2.1 CULTIVO CELULAR

Se llevó a cabo el aislamiento y cultivo primario de las líneas celulares de cavidad oral, para los fibroblastos gingivales, de ligamento periodontal y de pulpa obtenidos a base de explantes de encía, ligamento y pulpa dental. Los cultivos se establecieron después de la tercera semana y se obtuvo la confluencia celular a las cuatro semanas, las células se mantuvieron en cajas de cultivo de 75cm² con medio DMEM a una temperatura de 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂. (Figura 19)

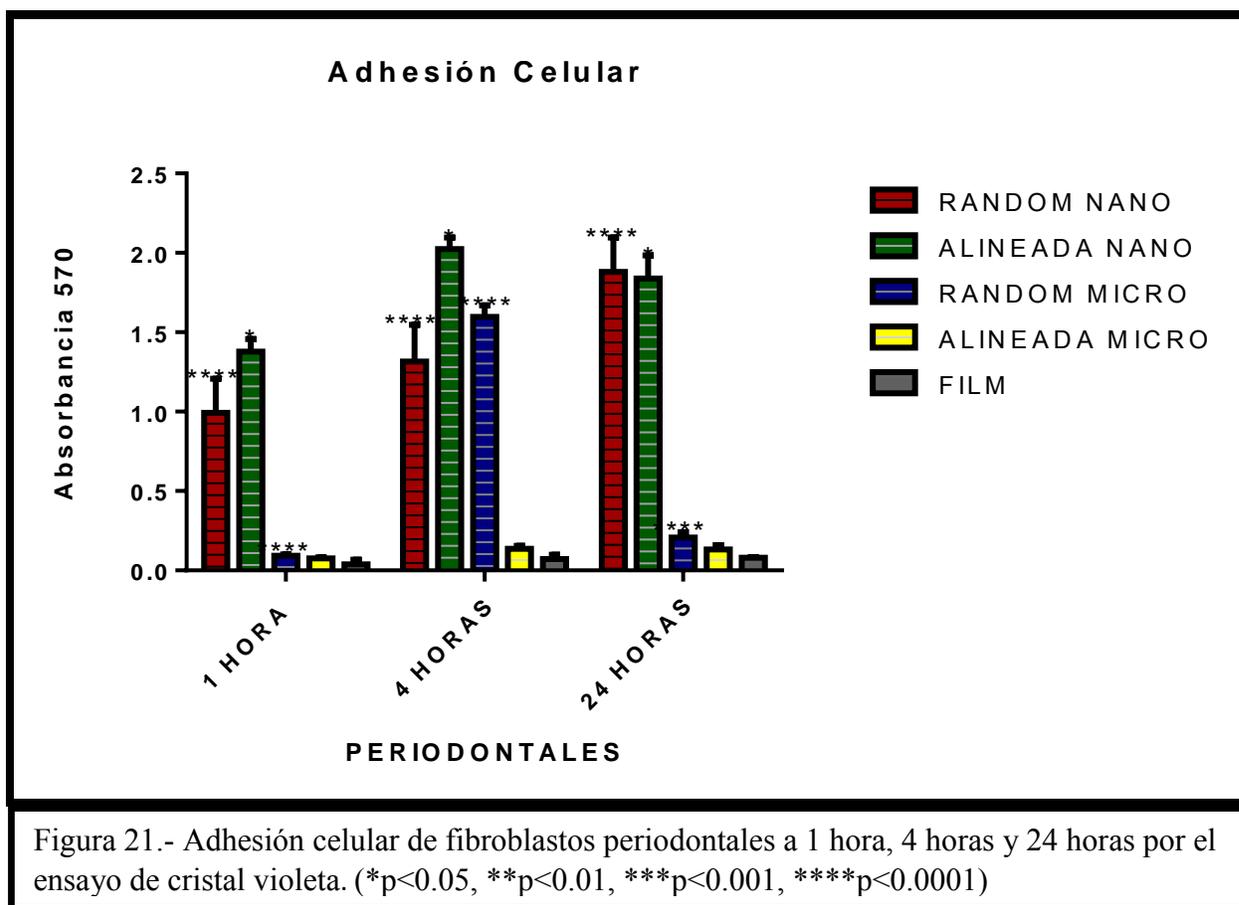


6.2.2.- ENSAYO DE ADHESION CELULAR POR CRISTAL VIOLETA.

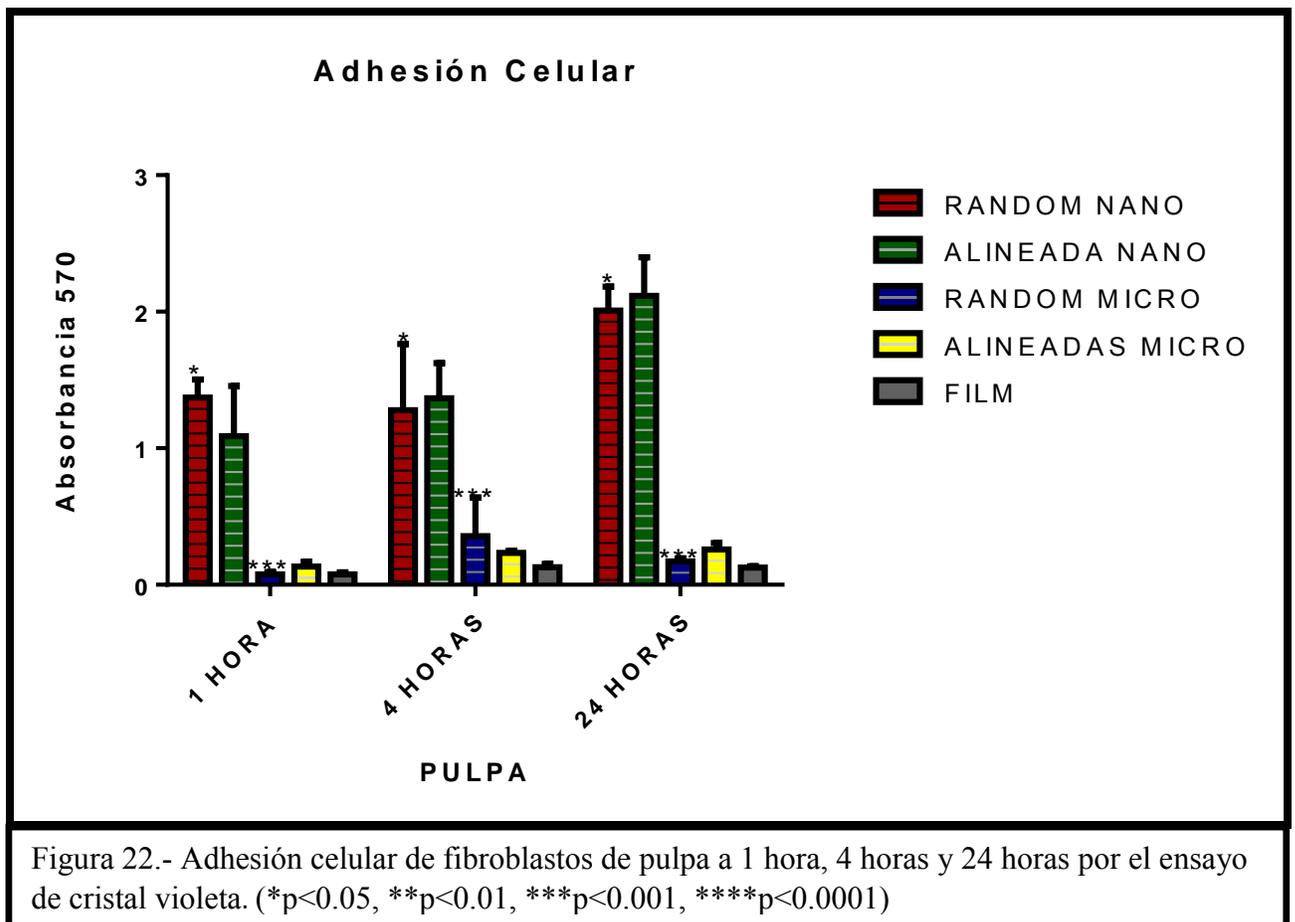
En el ensayo de adhesión celular de los fibroblastos gingivales valorados a 1 hora, 4 horas y 24 horas, se observó que los andamios con los mejores resultados fueron las desordenadas y alineadas nanométricas. Las desordenadas nanométricas al aumentar su adhesión con significancia en los 3 tiempos y con una $p < 0.0001$ (****). Las andamios alineadas nanométricas muestran un aumento en la adhesión a 1 hora y 4 horas, que disminuye a las 24 horas con una $p < 0.01$ (**) en los tres tiempos. Las andamios desordenadas micrométricas muestran un aumento en la adhesión a las 4 horas con una $p < 0.0001$ (****), las andamios alineadas micrométricas no muestran un aumento en la adhesión en ninguno de los tres tiempos y su p no es significativa, manteniéndose muy similar al control (Figura 20).



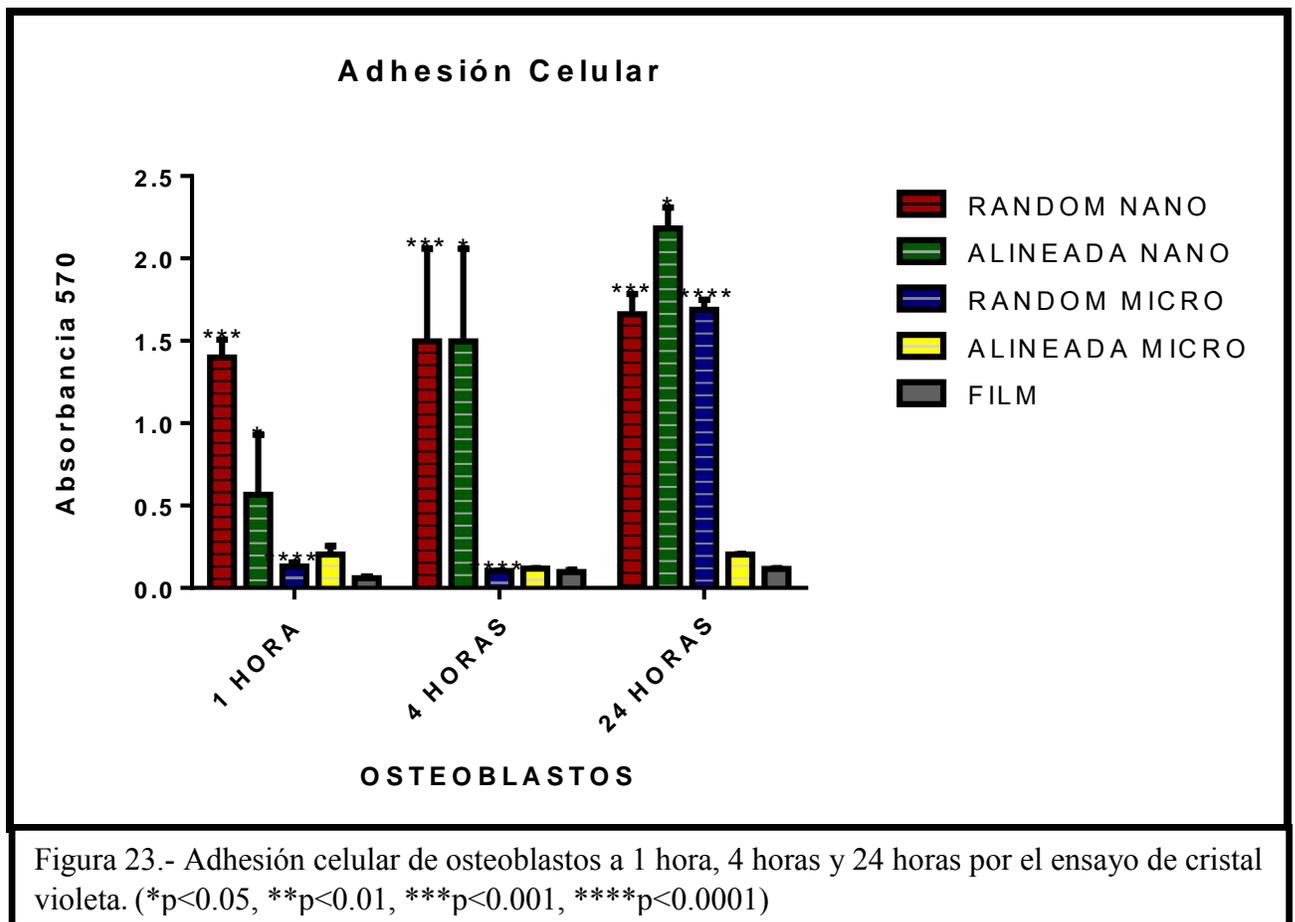
En el ensayo de adhesión celular de los fibroblastos periodontales valorados a 1 hora, 4 horas y 24 horas se observó que los andamios con mejores resultados fueron los desordenados y alineados nanométricos. La adhesión en los andamios desordenados nanométricos aumento con significancia en los tres tiempos, con una $p < 0.0001$ (****). Los andamios alineados nanométricos muestran un aumento en la adhesión a 1 hora y 4 horas, que disminuye a las 24 horas pero con significancia en los tres tiempos con una $p < 0.05$ (*). Los andamios desordenados micrométricos muestran un aumento en la adhesión a las 4 horas con una $p < 0.0001$ (****). Las andamios alineados micrométricos no muestran un aumento en la adhesión en ninguno de los tres tiempos y su es $p > 0.05$, manteniéndose muy similar al control (Figura 21).



En el ensayo de adhesión celular de los fibroblastos de pulpa valorados a 1 hora, 4 horas y 24 horas se observó que los andamios con mejores resultados fueron los desordenados nanométricos con una $p < 0.05$ (*) y con la más alta adhesión a las 24 horas. Los andamios alineados nanométricos muestran un aumento en la adhesión en los tres tiempos, pero con una p no significativa. Los andamios desordenados micrométricos muestran un aumento con significancia en la adhesión a las 4 horas con una $p < 0.001$ (***). Los andamios alineados micrométricos muestran un aumento pero su p no es significativa, manteniéndose muy similar al control (Figura 22).

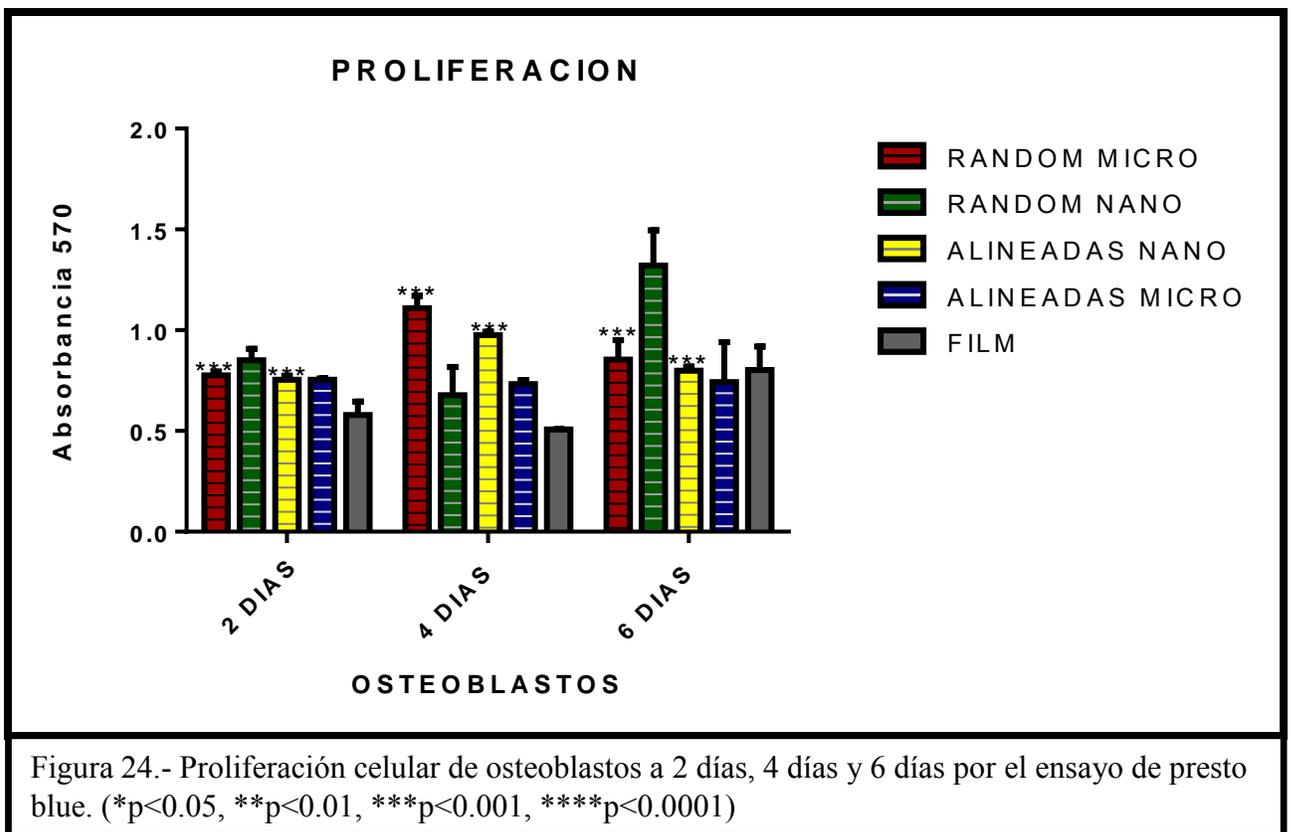


En el ensayo de adhesión celular de los osteoblastos valorados a 1 hora, 4 horas y 24 horas se observó que los andamios con mejores resultados fueron los desordenados y alineados nanométricos. La adhesión en los andamios desordenados nanométricos aumentó con significancia en los tres tiempos, con una $p < 0.001$ (***) . Los andamios alineados nanométricos muestran un aumento con significancia en los tres tiempos con una $p < 0.05$ (*). Los andamios desordenados micrométricos muestran un aumento en la adhesión con significancia a las 24 horas con una $p < 0.0001$ (****). Los andamios alineados micrométricos no muestran un aumento en la adhesión y su p no es significativa, manteniéndose muy similar al control (Figura 23).

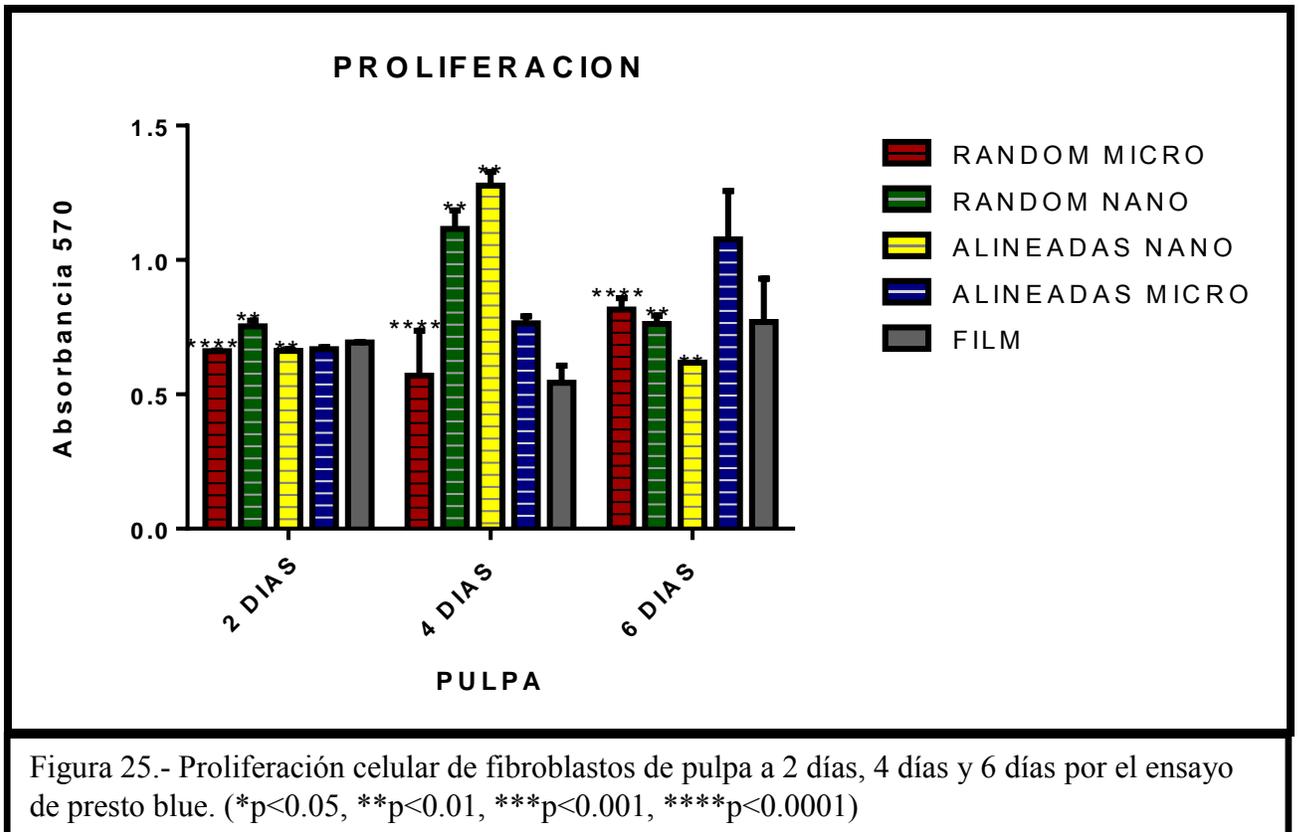


6.2.3 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

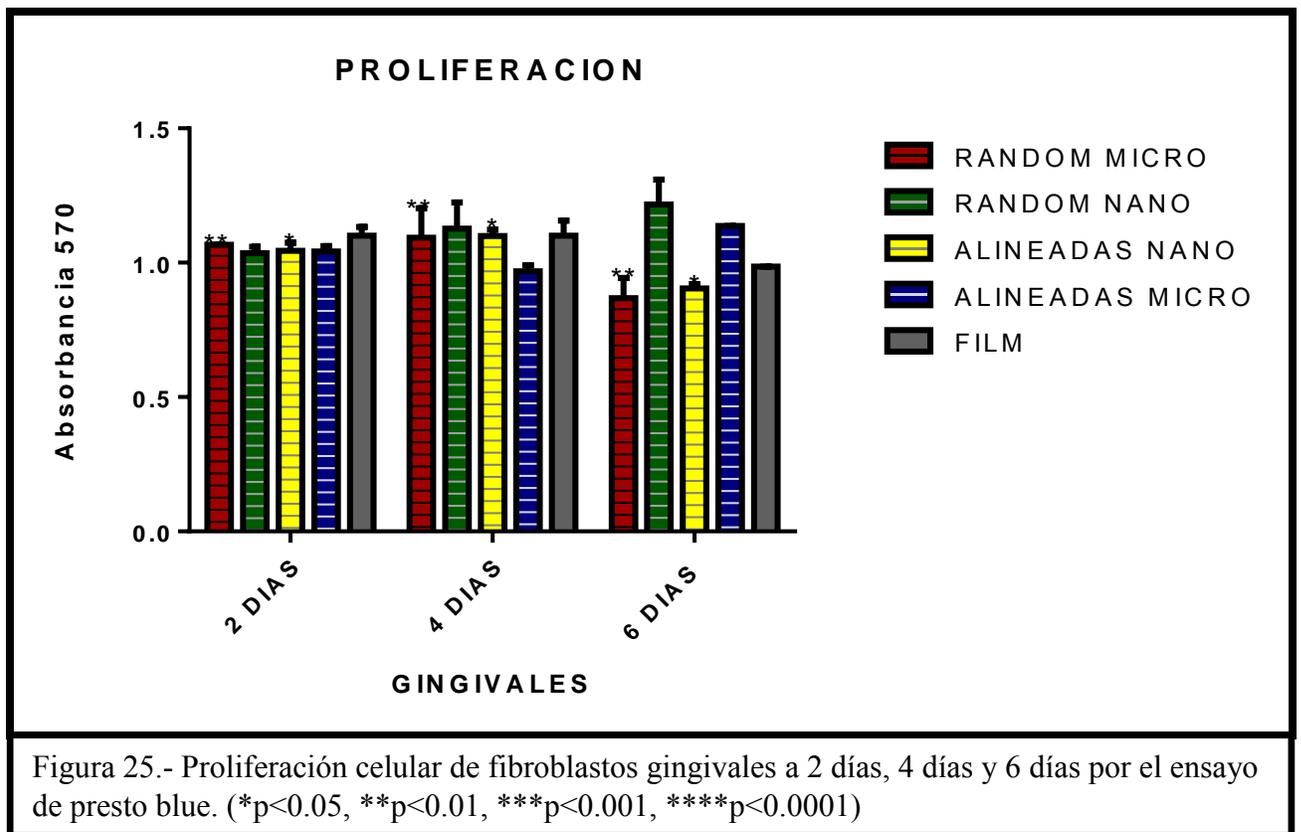
En el ensayo de proliferación celular de los osteoblastos valorado a 2 días, 4 días y 6 días se observó que los andamios con mejores resultados fueron los desordenados micrométricos y alineados nanométricos. La adhesión en los andamios desordenados nanométricos aumento con significancia al día 4, con una $p < 0.001$ (***) . Las andamios alineados nanométricos muestran un aumento significativo al día 4 con una $p < 0.001$ (***) . Los andamios desordenados nanométricos no muestran diferencias con una $p > 0.05$. Los andamios alineados micrométricos no muestran diferencias, manteniéndose muy similar al control (Figura 24).



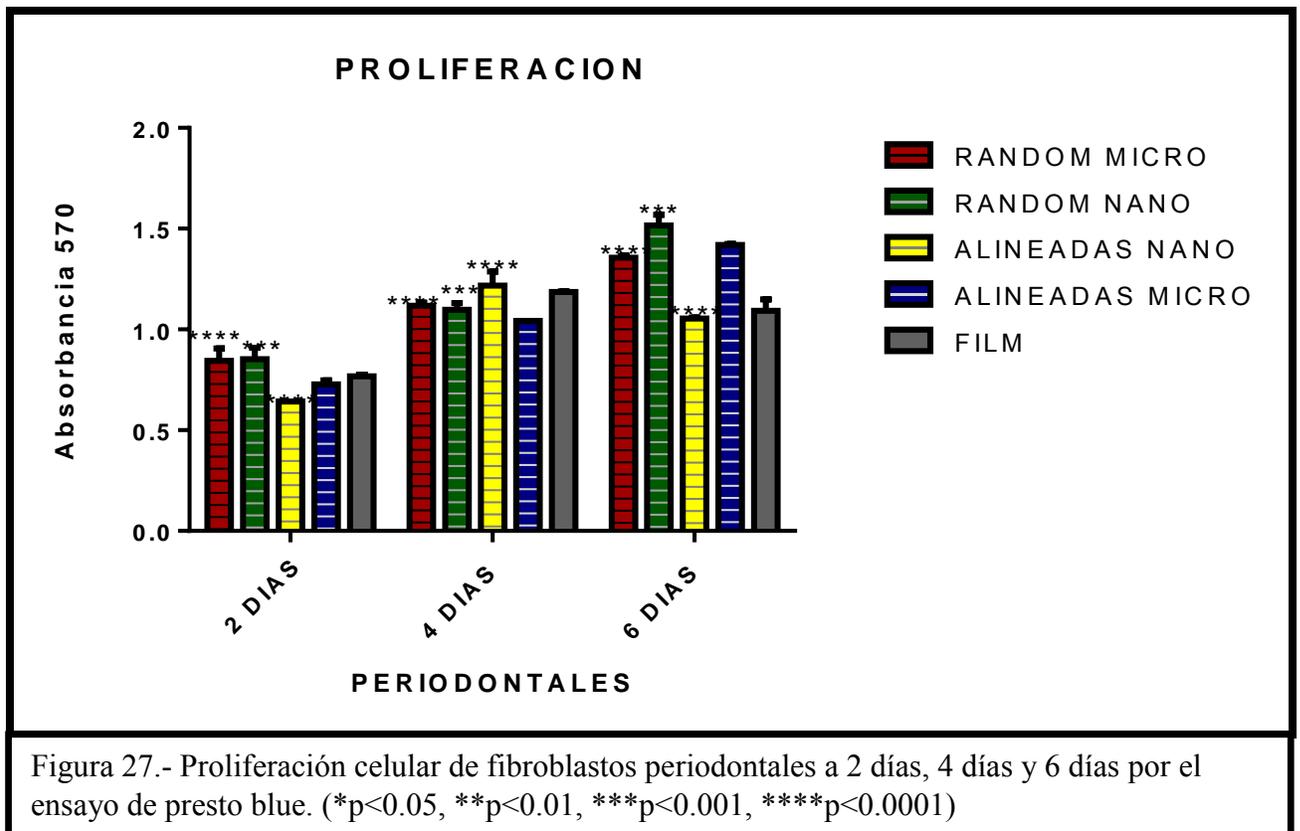
En el ensayo de proliferación celular de los fibroblastos de pulpa valorados a los 2 días, 4 días y 6 días se observó que los andamios con mejores resultados fueron los desordenados micrométricos y nanométricos y alineados nanométricos. La adhesión en los andamios desordenados micrométricos tienen una $p < 0.0001$ (****). Los andamios desordenados nanométricos muestran un aumento con significancia al día 4 con una $p < 0.01$ (**). Los andamios alineados nanométricos aumentan al día 4 con una $p < 0.01$ (**). Los andamios alineados micrométricos no muestran diferencias, con una $p > 0.05$ manteniéndose muy similar al control (Figura 25).



En el ensayo de proliferación celular de los fibroblastos gingivales valorado a los 2 días, 4 días y 6 días se observó que los andamios que muestran mejores resultados fueron los desordenados micrométricos y alineados nanométricos. La adhesión en las andamios desordenadas micrométricos tienen una $p < 0.01$ (**). Los andamios desordenados nanométricos muestran un aumento en los 3 diferentes días pero sin diferencias significativas. Los andamios alineados nanométricos aumentan significativamente al día 4 con una $p < 0.05$ (*). Los andamios alineados micrométricos no muestran diferencias con una $p > 0.05$ (Figura 26).



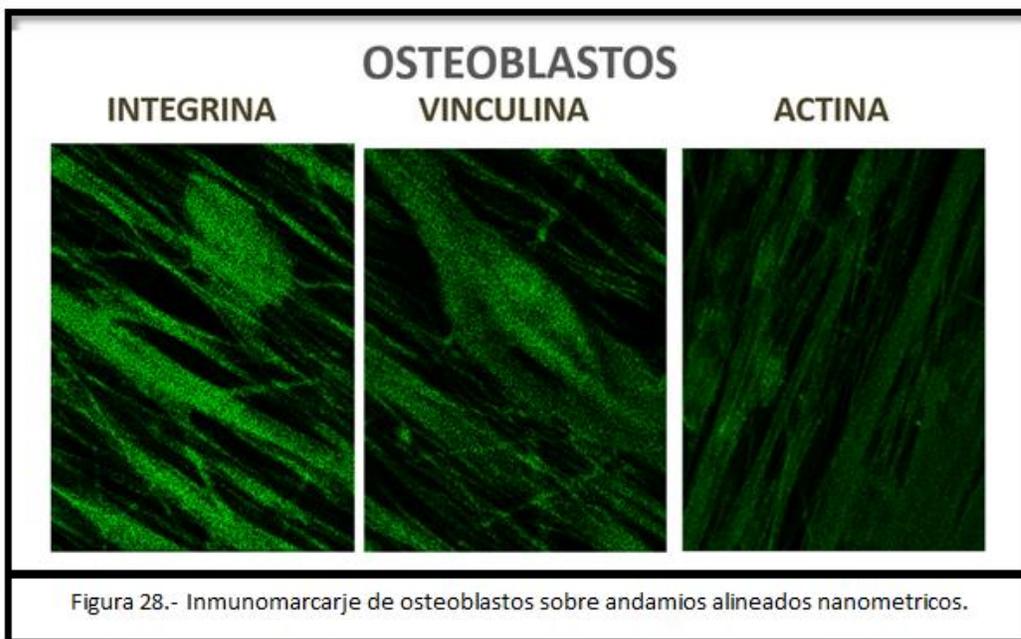
En el ensayo de proliferación celular de los fibroblastos periodontales valorado a los 2 días, 4 días y 6 días se observó que los andamios con mejores resultados fueron los desordenados micrométricos y nanométricos; y los alineados nanométricos. La adhesión en los andamios desordenados micrométricos muestra significancia con una $p < 0.0001$ (****). Los andamios desordenados nanométricos muestran un aumento significativo en los 3 diferentes días con una $p < 0.001$ (***). Los andamios alineados nanométricos aumentan con significancia al día 4 con una $p < 0.0001$ (****). Los andamios alineados micrométricos no muestran diferencias con una $p > 0.05$ (Figura 27).



6.2.4 INTERACCIÓN CELULA-MATERIAL.

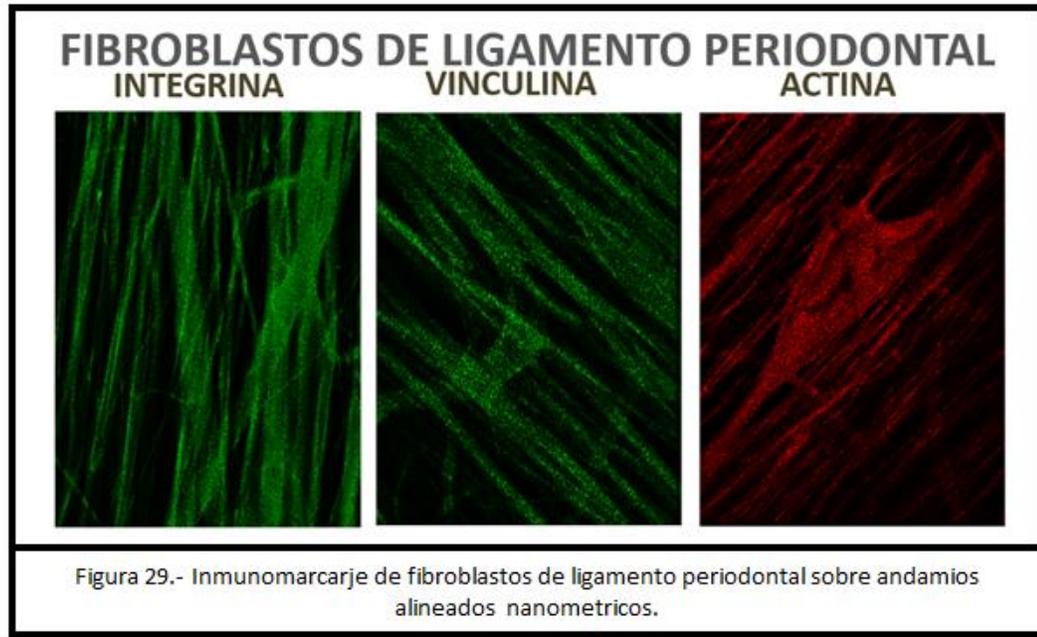
Para llevar a cabo el análisis de la morfología del citoesqueleto celular se utilizaron los anticuerpos primarios policlonales anti-vinculina, anti-integrina beta 1 y anti-actina. Se utilizaron anticuerpos secundarios anti cabra-conejo acoplados a fluorocromos en verde como FITC y en rojo TR.

En el inmunomarcaje podemos apreciar la interacción de los osteoblastos con el andamio alineado nanometrico. Se puede apreciar la localización de la vinculina, el estrés de las fibras de actina y muy ligeramente la detección de la integrina (Figura 28).



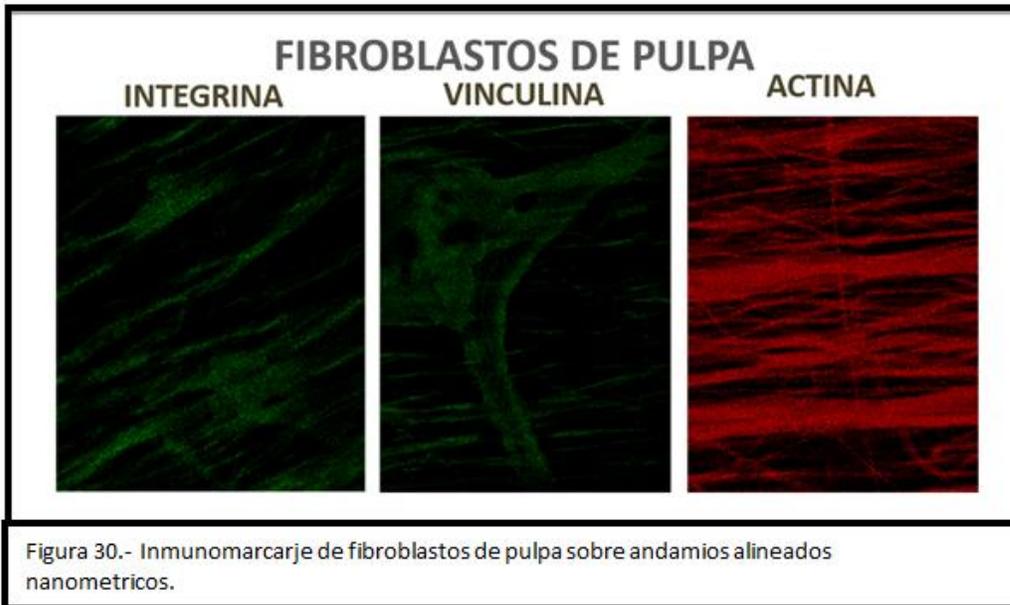
Podemos apreciar como los osteoblastos siguen el patrón fibrilar del andamio, modificando su morfología y como las células censan y responden a la superficie donde son cultivadas. Está reportado que el decremento en los niveles de vinculina benefician la migración celular debido a que se incrementan la movilidad celular. Las integrinas son frecuentemente detectadas en grupos fuera de la membrana plasmática de la célula.

En el inmunomarcaje de la Figura 29, podemos apreciar la interacción de los fibroblastos de ligamento periodontal con el andamio alineado nanométrico. Se puede apreciar la localización de la vinculina, el estrés de las fibras de actina y ligeramente la detección de la integrina.

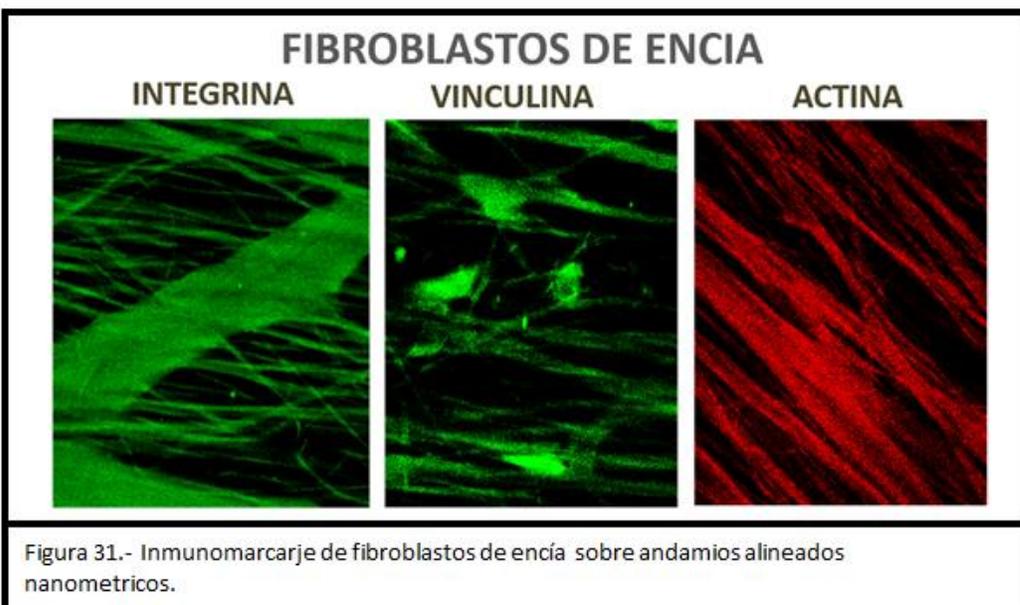


Podemos apreciar las fibras de estrés que se generan en los fibroblastos de ligamento periodontal lo cual nos indica que las células están adheridas al andamio y modifican su morfología siguiendo el patrón fibrilar alineado. Las bajas expresiones de vinculina están asociadas a la rápida migración de las células adheridas sobre las fibras de PCL. La reorganización de la actina contribuye a la formación y maduración de adhesiones focales, por lo tanto se encuentra presente en adhesiones focales iniciales y maduras. Paralelo a estos eventos las integrinas se van agrupando.

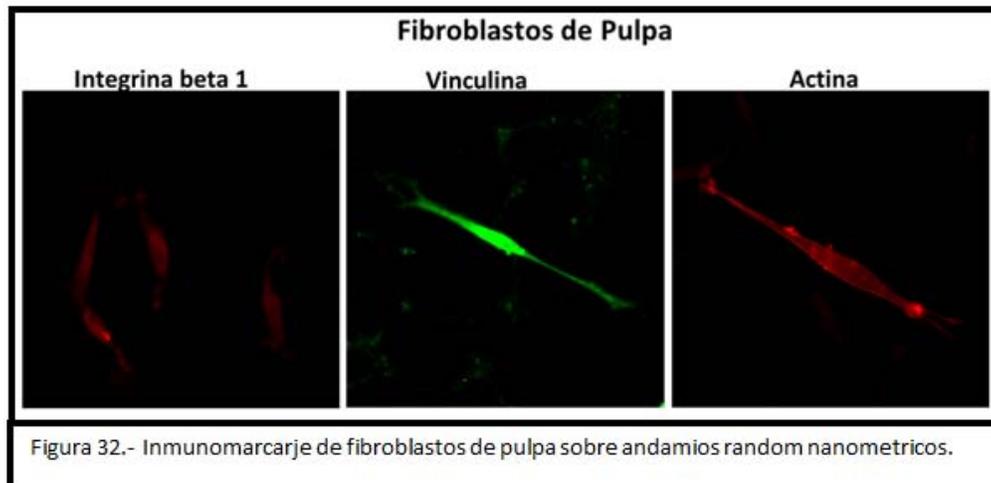
Se muestra en la Figura 30, la interacción de los fibroblastos de pulpa con el andamio alineado nanométrico. Se puede apreciar como la célula está creciendo sobre la superficie del andamio y como sigue el patrón fibrilar.



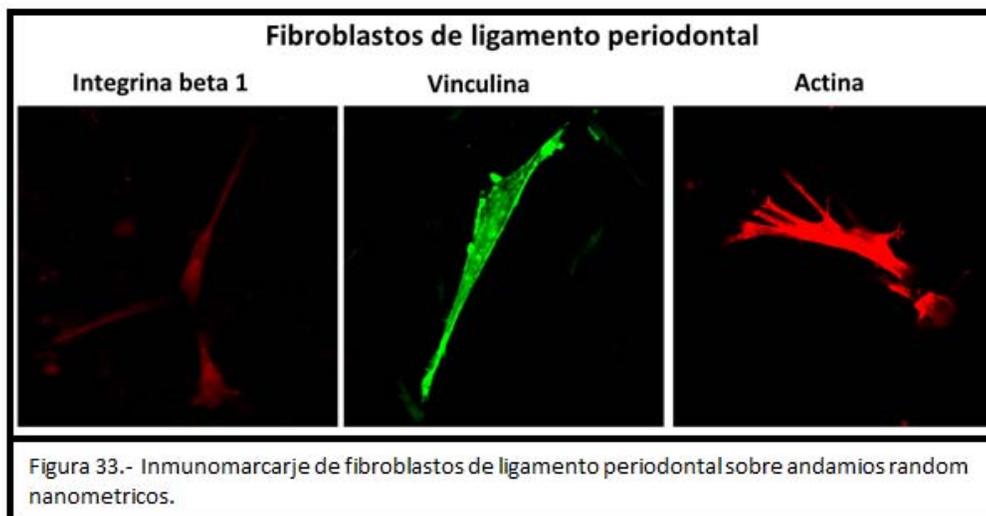
En la figura 31, se observa la interacción de los fibroblastos de encía sobre el andamio alineado nanométrico, la presencia de vinculina y de integrina b1 en menor cantidad, las células también siguen el patrón fibrilar alineado de las fibras.



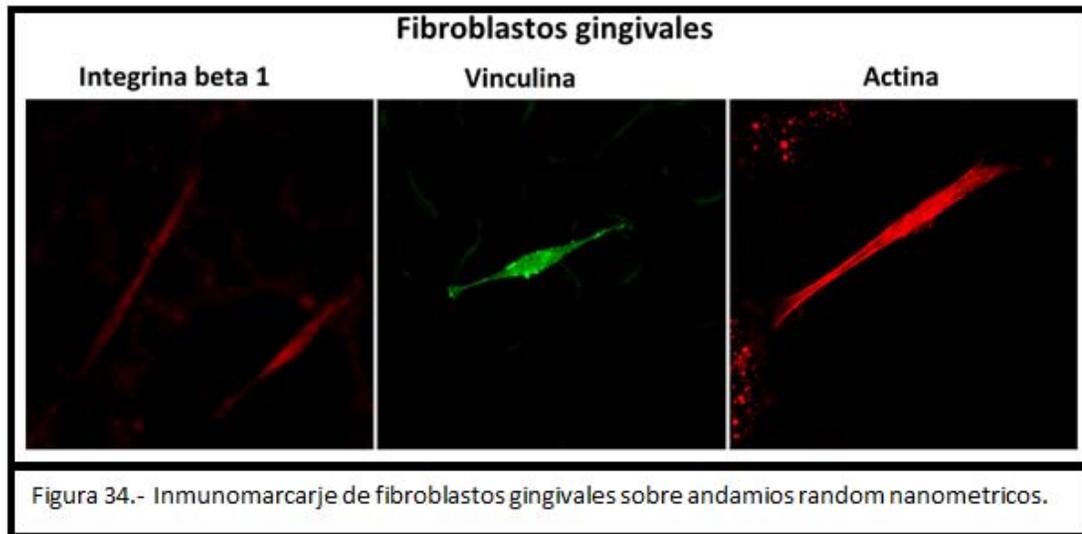
Se exhibe la interacción de los fibroblastos de pulpa dental con el andamio desordenadas nanométrico. Se puede apreciar la localización de la vinculina, el estrés de las fibras de actina y muy ligeramente la detección de la integrina (Figura 32).



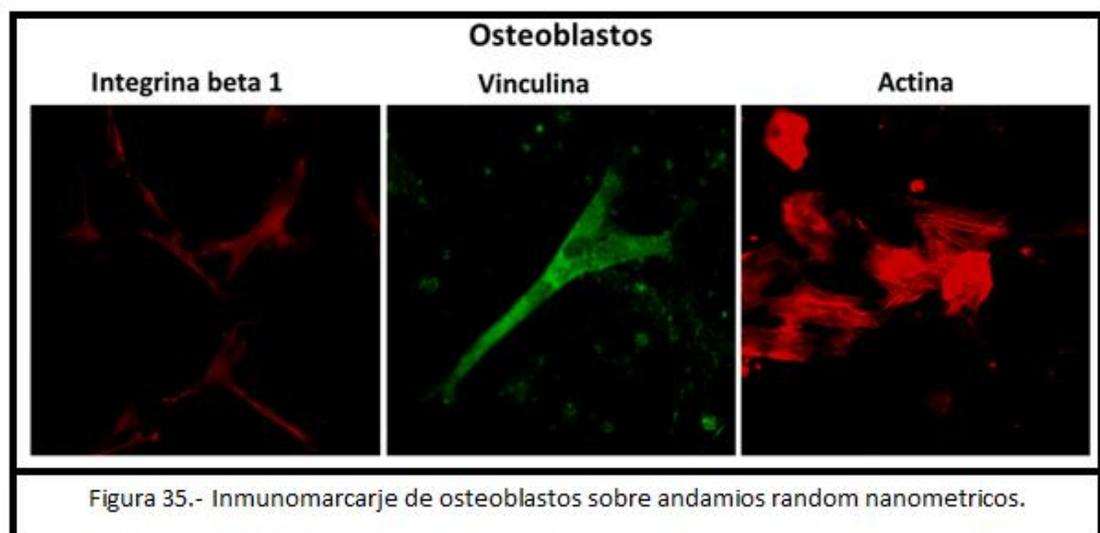
En la figura 33 se observa la interacción de los fibroblastos del ligamento periodontal con el andamio desordenadas nanometrico donde se pueden ver los puntos de interacción debido a la vinculina, el estrés de las fibras de actina y de la misma manera una ligera detección del receptor integrina beta 1.



La morfología de los fibroblastos gingivales y la detección de la vinculina, el estrés de las fibras de actina y ligeramente el receptor de integrina beta 1 se observan en la Figura 34.

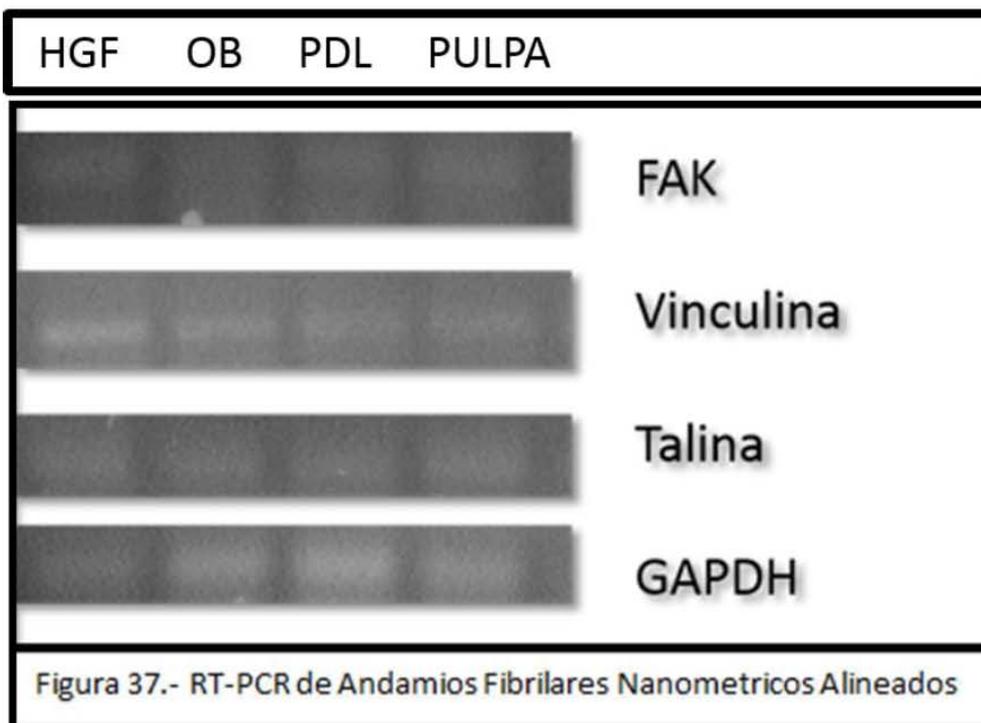
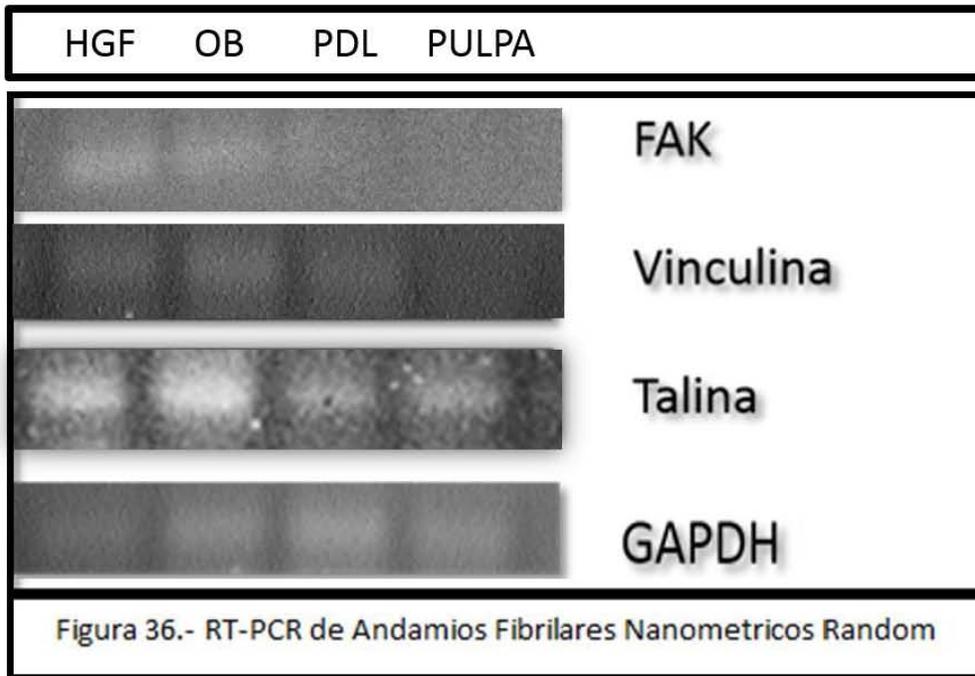


La morfología de los osteoblastos y la expresión de las proteínas inmunodetectadas de la Tabla 1, muestran el estrés de las fibras de actina al estar interactuando con el andamio hilado, los puntos de adhesión de vinculina y ligeramente el receptor de integrinas beta 1 (Figura 35).



6.2.5 Expresión de Mensajeros por RT-PCR

El análisis de los amplicones de las moléculas que se encarga de llevar a cabo los procesos de sensado y adhesión celular en las distintas líneas celulares se pueden apreciar en las figuras 36 y 37.



En ambas figuras se puede observar que FAK, Vinculina y Talina se expresan en las líneas celulares sin embargo es claro que en las líneas celulares que fueron sembradas en las andamios electrohiladas de PCL con una orientación alineada existe una expresión en todas las líneas de la moléculas que regulan el citoesqueleto, las adhesiones focales y el sensado de la superficie topográfica cuando se compara con las andamios electrohiladas en una orientación desordenadas o azaroso.

Cabe destacar que ambas andamios electrohiladas se encuentran en escalas nanométricas y la única diferencia que presentan es la organización estructural de las fibras.

La talina se requiere para la activación de las integrinas y la formación inicial de AF pero no para los siguientes pasos. FAK se encuentra rio abajo en ésta vía de señalización que también interviene en algunos eventos como la protrusión celular, mientras que vinculina se expresa como respuesta a fuerzas tensión y se asocia a la conexión talina-actina, promoviendo adhesiones focales maduras.

Nuestros resultados de la expresión de moléculas de adhesión indican que las células de linajes odontogénicos son capaces de responder a la topografía del andamio electrohilado y esto también se asocia a la respuesta morfológica que pueden presentar las células cuando son sembradas en las andamios electrohiladas y que sustenta los análisis de microscopia confocal.

7.-DISCUSIÓN

La posibilidad de generar andamios fibrilares por medio de la técnica de electrohilado a un nivel de micro y nano escala, hace posible sintetizar andamios biocompatibles que imiten la función de las fibras de colágeno en la matriz extracelular y permitan la señalización interactiva con las células y el control de su geometría, las fibras con diámetros nanométricos han logrado imitar la matriz extracelular nativa por medio de andamio que pueden ser aplicados como una matriz extracelular temporal artificial.

Se ha reportado que la topografía superficial de un andamio en escala micrométrica, tiene influencia en la adhesión, morfología y guías de contacto de la célula. Sin embargo la respuesta es dependiente de la célula y puede variar entre diferentes linajes celulares³. En este trabajo la topografía superficial de los andamios fibrilares alineados y desordenados de PCL en escalas nanométricas promovieron las mejores repuestas en los ensayos de adhesión y proliferación celular y ésta repuesta favorable se presentó en todas nuestras líneas celulares, atribuimos estos resultados al hecho de que nuestros andamios en rangos nanométricos lograron imitar la topografía natural de la matriz extracelular que se encuentra en los rangos de sub-micrómetros a nanómetros con una estructura de red nanofibrilar.

La respuesta celular a un biomaterial mejora cuando la morfología del andamio imita la estructura del tejido nativo, esto se asocia con la topografía del material y el área de superficie de contacto, que son características que se han observado en las nanofibras. Los andamios nanofibrilares están cercanos a imitar la estructura superficial y morfología de la matriz extracelular nativa de muchos tejidos.⁵ Los andamios nanométricos sintetizados para este estudio, poseen las características que imitan la matriz extracelular de los tejidos biológicos en su composición y estructuralmente, el arreglo fibrilar facilitó la interacción célula-material lo que permite que se pueda llevar a cabo el proceso de regeneración en forma similar a la natural.

Se ha observado que la comunicación célula-célula se ve afectada por los arreglos celulares que toman lugar en las fibras electrohiladas. Cuando las células están alineadas en la dirección paralela de la fibra tienen una mejor comunicación, lo opuesto se observa cuando las fibras están sobre fibras desordenadas. Por lo tanto la comunicación célula-célula puede ser limitada por los patrones de las fibras electrohiladas.¹⁴ En los andamios nanofibrilares sintetizados se observó que la proporción de las células cultivadas en las fibras alineadas fue significativamente más alta, promoviendo los mejores resultados, y la respuesta se le atribuye a las guías de contacto que se generan en los andamios nanofibrilares alineados, esta topografía juega un papel importante ya que afecta directamente los parámetros responsables del crecimiento celular, adhesión, apoptosis, diferenciación, expresión genética, migración, morfología, orientación y proliferación de las células.

La topografía del andamio hilado se propone como una estrategia para proveer una guía de contacto para la célula, que tiene influencia en el arreglo del citoesqueleto, la adhesión y el futuro comportamiento de la proliferación celular y regeneración tisular.³ Las respuestas de las células que obtuvimos con los andamios nanofibrilares pueden ser mejoradas por medio de la modificación de los parámetros como diámetro de la fibra, porosidad y morfología, por medio de un ajuste en las condiciones de síntesis, lo que permite cambios en las propiedades físicas, químicas y de organización en el andamio. Esto permitirá que los andamios poliméricos sean una opción viable para la aplicación en la ingeniería de tejidos, debido a que pueden producir la morfología y estructura de la matriz, debido a que pueden reproducir la morfología y estructura de la matriz. El efecto de polarización de las comunicaciones célula-célula en células alineadas puede tener aplicaciones en el diseño de fibras electrohiladas para formar andamios con patrones específicos y se propone como una alternativa terapéutica a futuro.

Se está estudiando de qué manera la superficie del andamio desencadena y determina muchas de las respuestas celulares. La topografía de andamio hilado se está proponiendo como una estrategia para proveer una guía de contacto para la célula, que tiene influencia en el arreglo del citoesqueleto, la adhesión y el futuro comportamiento de la regeneración tisular⁷.

El citoesqueleto, especialmente los filamentos de actina y microtúbulos, son un importante componente en el proceso de ensamblaje, tráfico y estabilización de las uniones gap. La comunicación intercelular mediada por las uniones gap puede estar asociada al cambio del citoesqueleto en respuesta a la orientación de las fibras. La extensión y el alineamiento de las células contribuyen a la formación de microtúbulos. Los andamios fibrilares que se sintetizaron para éste estudio mediante la técnica de electrohilado permitieron la interacción célula-material, que se observó por medio de los puntos de adhesión focal que están directamente relacionados con el citoesqueleto celular, integrinas, fibras de estrés de la actina y también por medio de la expresión de los ARN mensajeros de Vinculina, Talina y FAK que se encuentran dentro de la vía de señalización célula-matriz extracelular que está mediada por integrinas y que regula la señalización interna de las células, lo que les permite censar la topografía del andamio.

Se ha reportado que el decremento en los niveles de vinculina benefician la migración celular porque incrementan la movilidad celular.(14)

8.-CONCLUSIONES

Las técnicas de microscopía (MO, MEB y MFA) nos permitieron observar la disposición tanto ordenada como desordenada de las fibras electrohiladas.

Los análisis de microscopía nos indicaron que la rugosidad, el diámetro, las crestas y valles que se generan por las fibras están en rangos nanométricos.

La electrohilatura permite obtener arquitecturas de multi-escala en rangos de nanómetros y micrómetros de las fibras.

La morfología fibrilar en rangos nanométricos mejoró la respuesta celular al compararse con los rangos micrométricos.

Los andamios con morfologías alineados y desordenados poseen las características que imitan la matriz extracelular nanométrica de los tejidos biológicos.

La respuesta de adhesión celular nos permitió establecer el efecto de la morfología de los andamios, mostrando una mejor respuesta de adhesión a los andamios nanométricos respecto a los micrométricos.

La proliferación celular fue mejor en los andamios alineados y desordenados nanométricos y observamos una predilección de los osteoblastos por los andamios desordenados micrométricos.

Los datos nos indican que la nanotopografía influye en la interacción célula-material, facilitando la adhesión y proliferación.

Se logró correlacionar el papel regulador de la nanotopografía en la respuesta de la interacción célula-material por medio de inmunomarcaje.

El inmunomarcaje nos permitió observar la expresión de la integrina beta 1, los puntos focales de adhesión por medio de la vinculina y el estrés de las fibras del citoesqueleto celular por medio de la actina.

Los datos de inmunolocalización nos permitió correlacionar que la topografía tiene una influencia en el citoesqueleto celular.

El ensayo de RTPCR nos permitió entender como la nanotopografía regula la vía de señalización de la unión de la célula a la matriz fibrilar electrohilada.

9.- REFERENCIAS

- 1.-Jakub S., Radka H., Nina K., Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice. Journal of Nanomaterials. Volume 2012, Article ID 327369, 14 pages.
- 2.-Quynh P., Upma S., Antonios G. M., Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. Tissue engineering Volume 12, Number 5, 2006.
- 3.-Rebecca L., B.S., F. Kurtis K., Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. Tissue Engineering: Part B, Volume 17, Number 5, 2011.
- 4.- Jing Z., Xuesi C., Qizhi L., Xiuling X., Enzymatic Degradation of Poly (L-lactide) and Poly (ε-caprolactone) Electrospun Fibers. Macromol. Biosci. 2004, 4, 1118-1125.
- 5.-J. Pelipenko, P. Kocbek, J. Kristl, Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. International Journal of Pharmaceutics 484 (2015) 57-74.
- 6.-Yixiang D., B. Sc., Susan L., Degradation Behaviors of Electrospun Resorbable Polyester Nanofibers. Tissue Engineering: Part B, Volume 15, Number 3, 2009.
- 7.-Chen X, Fu X, Shi J., Regulation of the osteogenesis of pre-osteoblasts by spatial arrangement of electrospun nanofibers in two- and three- dimensional environments. Nanomedicine: NBM 2013; xx: 1-10.
- 8.-MacQueen L, Sun Y., Simmons CA. 2013 Mesenchymal stem cell mechanobiology and emerging experimental platforms . J R Soc Interface 10:20130179.
- 9.- Young-Wan J., Park J., Jung H., Lee W. Electrochemical Properties of Polypyrrole/sulfonated SEBS Composite Nanofibers Prepared by Electrospinning. Electrochimica Acta, volumen 52, 2007.
- 10.-McMahon RE, Wang L, Skoracki R, Mathur AB. 2013. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. J Biomed Mater Res Part B 2013; 101B:387-397.
- 11.-Haoqing C., Kevin M., Sing Y., The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the *in vivo* and *in vitro* foreign body reaction. Journal of Biomedical Materials Research Part A, September 2009.
- 12.-M. Kharaziha, M.H. Fathi, H. Edris, Effects of Surface modification on the mechanical and structural properties of nanofibrous poly (ε-caprolactone)/fosterite

scaffold for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 4512-4519.

13.- Xuan L., G errard E., Nurshahidah A., Engineering a Biocompatible Scaffold with Either Micrometre or Nanometre Scale Surface Topography for Promoting Protein Adsorption and Cellular Response. *International Journal of Biomaterials*. Volme 2013, Article ID 782549, 16 pages, 2013.

14.-Biljana J., Jan P., Miha S., Igor M., The design trend in tissue-engineering scaffolds base don nanomechanical properties of individual electrospun nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics* 455(2013) 338-247.

15.-Michael B., Wolfgang C., Thomas F., Nanostructured Fiber via Electrospinning. *Adv. Mater.* 2001, 13, No. 1, January 5.

16.-Gardin C., Ferroni L., Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 13, 737-757; 2012.

17.-Molly M. S., Julian H. G., Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science* 310, 1135 (2005).

18.- Muhammad Iqbal S., Xiaoxue X., Lu L., A review on Biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci* 7(2009) 44:5713-5724.

19.-Vinoy T., Moncy V. Jose, S. Chowdhury , Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol 17, No 9, pp. 969-984 (2006).

20.- Lina M., Leonardo R., Marcos L., Electrospinning: La era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polimeros*. Volumen 14(1), Enero de 2013.

21.-Ji Wang, Amrinder S. Nain, Suspended Micro/Nanofiber- Hierarchical Biological Scaffolds Fabricated Using Non-Electrospinning STEP –Technique. *Langmuir* 2014, 30, 13641-13649.

22.-D.H. Reneker, W. Kataphinan, A. Theron, Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning. *Polymer* 43 (2002) 6785-6794.

23.- Gerardo V.N., Olga E., Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. UNAM. 2000

24.-Chan H., Hector F., Qiming J., Biomimetic hybrid scaffolds for engineering human tooth-ligament interfaces. *Biomaterials* 31 (2010) 5945-5952.

- 25.-Hai-Sheng W., Guo-Dong F., Xin-Song L., Functional Polymeric Nanofibers for Electrospinning. *Recent Patents on Nanotechnology* 2009, Vol 3, No 1.
- 26.- J. Pelipenko, P Kocbek, B. Govedarica, R. Rosic, The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84 (2013) 401-411.
- 27.-Adam L., Duygu E., Andreas L., The contemporary role of ϵ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures. *Polymer* 54 (2013) 4333-4350.
- 28.-Oscar C., Mohamed E., Hae-Won K., Electrospinning technology in Tissue Regeneration. *Nanotechnology in regenerative medicine*, vol 811, 2012.
- 29.-Rui C., Chen H., Qinfei K., Preparation and characterization of coaxial electrospun thermoplastic polyurethane/collagen compound nanofibers for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79 (2010) 315-325.
- 30.- Nae G., Choongsoo S., Heungsoo S., Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomed. Mater.* 8 (2013), 014102(14pp). January 2013.
- 31.-Zeinab J., Hengameh S., Mehrdad M., Mohammad R.K., Mechanotransduction Pathways Linking the Extracellular Matrix to the Nucleus. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Volume 310, 2014.
- 32.- Alireza V., Mohsen B., Abolfazl A., Roya S., Preparation and characterization of novel electrospun poly (ϵ -caprolactone)- based nanofibrous scaffolds. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2014.
- 33.-Avinash B., Yiu-Wing M., Shing-Chung W., Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology* 70 (2010) 703-718.
- 34.-Maria Ann W., Dietmar Werner H., The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 1217-1256.
- 35.- Jui-Chih C., Satoshi F., Hiroyuki T., Koichi K., Cell orientation and regulation of cell-cell communication in human mesenchymal stem cell of different patterns of electrospun fibers. *Biomed. Mater.* 8 (2013) 055002 (13pp).
- 36.-Sang Jin L., Antony A., Scaffold technologies for controlling cell behavior in tissue engineering. *Biomed. Mater.* 8 (2013) 010201 (2pp).

- 37.-A. Cipitria, A. Skeleton, T. R. Dargaville, Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds-a review. *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 9419.
- 38.-Vince B., Xuejun W., Polymer Nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog and Polym Sci.* 2010 July 1; 35 (7): 868- 892.
- 39.-L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762-798.
- 40.-F. Croisier, A.-S. Duwez, C. Jerome, Mechanical testing of eletrospun PCL fibers. *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 218-224.
- 41.-Juliano E. O., Luis H. C., Willian J.O., Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofiber Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A comparative Study. *Advances in Material Science and Engineering*, Volume 2013, Article ID 409572, 14 pages.
- 42.-Xiaoling L., Muhammad S., David M., Machanical Degradation and citocompatibility properties of magnesium coated phosphate glass fibre reinforced polycaprolactone composites. *Journal of Biomaterials Applications* 2014, Vol.29 (5) 675-687.
- 43.-Benjamin M., Janne E., Havard J., Cell growth on pore-graded biomimetic TiO₂ bone scaffolds. *Journal of Biomaterials Aplicattions* 0 (0) 1- 12.
- 44.-Ulrich R., Peter B., Karen B., Integrin Expression in stem Cell from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation. *International Journal of Molecular Medicine* 21: 271-279, 2008.
- 45.-M. Kharaziha, M.H.Fathi, H.Edris, Development of novel aligned nanofibrous composite membranes for guided bone regeneration. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 24 (2013) 9-20.
- 46.-Pierantonio F., Emanuele T., Martina R., Michele M., Automatic Characterization of nanofiber assemblies by image texture analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 103 (2010) 66-75.
- 47.-Dan K., Guorui J., Molamma P., Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells. *Biotechnol. J.* 2013, 8, 59-72.
- 48.-Sowmya S., R. Jayakumar, K.P. Chennazhi, Multiscale Fibrous Scaffolds in Regenerative Medicine. *Adv Polym Sci* (2012) 246: 1-20.
- 49.-Babu V.J., Pavan V.S., Sundaray B., Murthy V.R.K., Natarjan T.S. Preparation and Characterization of Electrospun Nanofibers of Nylon-6 Doped with Copper(II) Chloride. *Maerial Science and Engineering B*, volumen 142, 2007: 46-50.

- 50.-Wojtek T., Sumona S., Sheng L., The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds. *Biomaterials* 34 (2013) 2389-2398.
- 51.-D.R. Nisbet, J.S. Forsythe, Review Paper: A Review of the Cellular Response on Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering. *J. Biomater Appl* 2009 24:7.
- 52.-Wan-Ju L., Cato T. L., Edward J. C., Rocky S. T., Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. 2002 Wiley Periodicals, Inc. *J. Biomed Mater Res* 60: 613-621, 2002.
- 53.-SuPing L., Darrel U., Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices. *Int. J.Mol. Sci.* 2009, 10, 4033-4065.
- 54.-Seema A., Joachim H.W., Andreas G., Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49 (2008) 5603-5621.
- 55.-M. J. Gupte and P. X. Ma, Nanofibrous Scaffolds for Dental and Craniofacial Applications. *J Dent Res* 91(3): 227-234, 2012.
- 56.-Miguel J. Yacamán, Jose R. Gasga, *Microscopía electrónica una visión del microcosmos*, 1995.
- 57.-Gerard K., *Biología Celular y Moleculas*. McGraw-Hill. 2005.
- 58.-Wenying L., Stavros T., Electrospun Nanofibers for Regenerative Medicine. *Adv Healthc Mater.* 2012 January 11; 1(1): 10-25, 2013.
- 59.- Jesús A. Arenas, *Contribuciones de la Física en la Historia de la Microscopía*, Revista UNAM, 2005.