



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

***POSGRADO DE ODONTOLOGÍA
BIOLOGÍA BUCAL***

**NANOTUBOS DE CARBONO COMO
ANDAMIOS PARA LA REGENERACIÓN DE
TEJIDO ÓSEO**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

PRESENTA:

CAROLINA OLIVER URRUTIA

TUTOR:

DOCTOR MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
POSGRADO DE ODONTOLOGÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Agradezco a mi tutor el Doctor Marco Antonio Álvarez Pérez por el apoyo brindado durante el desarrollo y ejecución de este trabajo, así como un especial agradecimiento al Doctor Edgar Álvarez Zauco por brindarme su incondicional apoyo y conocimientos que me impulsaron durante todo este proyecto.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México ya que a través de los proyectos DGAPA-UNAM: PAPIIT IN213912, PAPIIT IN210815 y PAPIIT: IN-113413 fue posible el desarrollo y culminación de este trabajo.

Gracias al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACyT) porque mediante el proyecto 302193 me brindaron una beca que sustentó mis estudios y el proyecto 168294, sin los cuales la obtención de este trabajo no hubiera sido posible.

Igualmente me gustaría agradecer al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos del Posgrado de Odontología y el Taller de Ciencia de Materiales de la Facultad de Ciencias donde tuve un espacio para el desarrollo de esta investigación. Así mismo doy las gracias al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) por permitirme el uso de equipos necesarios para realizar las espectroscopias de este trabajo así como al Dr. Víctor Meza por su apoyo en la obtención de imágenes por Microscopía Electrónica de Barrido.

RESUMEN

Los nanotubos de carbono se descubrieron en 1991 como resultado del estudio de los alótropos del carbono, actualmente son considerados uno de los materiales más estudiados debido a las diversas aplicaciones que surgen como consecuencia de sus propiedades químicas y físicas. A pesar de ser un excelente material es posible mejorarlo mediante la funcionalización que incrementa las aplicaciones tales como ingeniería y regeneración tisular. Los nanotubos de carbono cumplen con las propiedades necesarias para regenerar tejidos duros como el hueso, además tienen la capacidad de ser utilizados para liberar fármacos en un medio celular. Es por esto que en los últimos años se han desarrollado compuestos que utilizan los nanotubos de carbono para reforzar y mejorar las propiedades de materiales como polímeros, metales, cerámicos, etc. La incorporación de los nanotubos en todos estos materiales tiene implicaciones biológicas importantes y han llevado al desarrollo y enriquecimiento de la ciencia específicamente de la ingeniería de tisular. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han generado nuevos conocimientos y al mismo tiempo han generado diversas preguntas y mayor interés por continuar las investigaciones. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue lograr la síntesis de un material híbrido a partir de un polímero (PTFE politetrafluoretileno) y nanotubos de carbono (NTC) a través de un proceso de radiación por microondas. Una vez sintetizado y caracterizado el material fue utilizado como andamio para evaluar el comportamiento de células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea. Se realizaron pruebas de adhesión y proliferación celular para evaluar el crecimiento de las células sobre el andamio a diferentes días y posteriormente se observó la interacción de las células con el material mediante SEM (Microscopia Electrónica de Barrido). Finalmente las células se cultivaron en modelos de diferenciación celular con un medio osteogénico evaluando la actividad de fosfatasa alcalina y se realizó un análisis con SEM para observar los cambios de las células bajo estas condiciones.

ABSTRACT

Carbon nanotubes were discovered in 1991 as result of carbon allotropes study and actually are considered one of the most studied materials because of the diversity of applications and large chemical and physical properties. Despite being an excellent material it is possible to improve them through the functionalization and increase the applications such as tissue engineering and regeneration, in fact carbon nanotubes have necessary properties to be a bone regeneration material. Moreover one of the most important application is the ability to deliver drugs in a cell medium. Therefore recently it has been developed the use of carbon nanotubes to enhance the properties of materials such as polymers, metals and ceramics. The incorporation of nanotubes in all these materials has important biological implications and allow the progress of tissue engineering. Notwithstanding studies *in vitro* and *in vivo* have generated new knowledge at the same time raise doubts, thus it is necessary to continue with the research. Therefore the aim of this work was to synthesize a hybrid material composed by polytetrafluoroethylene (PTFE) and carbon nanotubes (CNT) through a process of microwave radiation. Once synthesized and characterized this material was used as scaffold for evaluating the behavior of mesenchymal stem cells derived from bone marrow trough adhesion and proliferation assays to evaluate the growth of these cells at different days and observed the interaction of cells with the material by Scanning Electron Microscopy (SEM). Lately the cells were evaluated on cell differentiation models and the alkaline phosphatase activity was evaluated. Finally SEM analysis was performed to observe the changes of the cells under these conditions.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

1.	ANTECEDENTES	11
1.1	NANOTUBOS DE CARBONO.....	11
1.2	BIOMATERIALES E INGENIERÍA TISULAR	20
1.3	REGENERACIÓN ÓSEA	32
2.	JUSTIFICACIÓN.....	38
3.	OBJETIVO GENERAL.....	39
4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
5.	HIPÓTESIS.....	39

CAPÍTULO II

6.	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	40
6.1.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	40
6.2.	ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	41
6.3.	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	41
6.4.	ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO.....	42

CAPÍTULO III

7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
<u>7.1</u>	SÍNTESIS DE MATERIALES HÍBRIDOS PTFE-NTC.....	44
<u>7.2</u>	CARACTERIZACIÓN DEMATERIALES HÍBRIDOS PTFE-NTC	45
<u>7.3</u>	ENSAYOS BIOLÓGICOS	47
<u>7.4</u>	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51

CAPÍTULO IV

8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
9.	CONCLUSIONES	85
10.	BIBLIOGRAFÍA	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura nanotubos de carbono SWCNT y MWCNT (Imagen de Carbon nanotubes: Directions and Perspectives in Oral Regenerative Medicine).....	12
Figura 2. Esquema de algunos ejemplos de funcionalización de SWCNT funcionalizados con diferentes moléculas: proteínas, fármacos, ADN y su uso como biosensores (Imagen de Functionalized Carbon Nanotubes: Biomedical Applications).....	14
Figura 3. Imagen que ejemplifica el método de descarga de arco para síntesis de nanotubos de carbono. (Imagen de Production of Carbon Nanotubes by Different Route: a Review)	16
Figura 4. Esquemización del método por ablación láser (Imagen de Production of Carbon Nanotubes by Different Route: a Review).	16
Figura 5. Esquema de método de deposición química (Imagen de Synthesis of Carbon Nanotubes).	17
Figura 6. Esquema de la diferenciación de células troncales mesenquimales y los tejidos a los que dan origen.	26
Figura 7. Esquema de célula mesenquimal y diferentes proteínas en el proceso de adhesión y el fenómeno “tenseguridad”.	30
Figura 8. Esquema de la estructura macroscópica y microscópica del hueso.....	33
Figura 9. MWCNT prístinos en polvo y sustrato híbrido (PTFE-NTC) sellados al vacío en tubos de borosilicato.....	53
Figura 10. Imagen de Microscopio electrónico de Barrido (SEM) de una muestra de MWCNT prístinos en polvo, los nanotubos forman aglomerados.	55
Figura 11. Microfotografía a mayor aumento de los MWCNT prístinos donde observamos con mayor detalle las características topográficas de la muestra.	55
Figura 12. Micrografía de politetrafluoretileno (PTFE) cuya topografía se relaciona a la tonalidad gris que semejante a través de la imagen.	56
Figura 13. Micrografía del híbrido PTFE-NTC sintetizado con radiación por microondas. Se observa la deposición de los MWCNT sobre el PTFE.	57
Figura 14. Micrografía del híbrido PTFE-NTC a un mayor aumento donde se evidencia el diámetro nanométrico de los nanotubos y su disposición sobre el PTFE.	57
Figura 15. Espectro Raman de MWCNT prístinos donde se observan los modos vibracionales D y G características del material.	59
Figura 16. Estructura molecular de PTFE (Imagen de Mechanistical studies on the electron-induced degradation of polymers).....	60
Figura 17. Espectro Raman de PTFE donde se observan bandas de baja intensidad en un rango de 200 a 500 cm^{-1} y una banda de intensidad alta en 736 cm^{-1}	61
Figura 18. Modos vibracionales de PTFE con bandas de intensidad media, baja y alta.....	62
Figura 19. Espectro Raman de PTFE donde se observan las bandas características de intensidades baja, media y alta.	62

Figura 20. Espectro Raman de MWCNT (negro) donde encontramos a 2700 cm^{-1} la banda G' presente también en los híbridos PTFE-NTC (verde y rojo) en los cuales la banda disminuye su intensidad.	63
Figura 21. Espectro Raman de MWCNT (negro), PTFE (azul) y dos muestras del híbrido PTFE-NTC (verde y rojo).	64
Figura 22. Acercamiento de Espectro Raman donde se observa con mayor precisión la banda D y su disminución en los híbridos (rojo y verde) así como ensanchamiento de la misma.	64
Figura 23. Espectro Infrarrojo de CNT (morado) y PTFE (negro) en este último se observa una banda de mayor intensidad a 2384 cm^{-1} .	65
Figura 24. Espectro infrarrojo medio de las bandas de PTFE (negro) en comparación con las de los sustratos (rojo, azul y verde).	67
Figura 25. Espectro IR donde observamos tres de nuestro híbridos (azul, rojo y verde) lo cuales presentan bandas de alta y baja intensidad que coinciden con las del PTFE.	68
Figura 26. Termograma de NTC con una temperatura de iniciación de 452°C .	68
Figura 27. Termograma de PTFE con una temperatura de iniciación de 472°C .	69
Figura 28. Termograma de sustrato híbrido PTFE-NTC con una temperatura de iniciación de 456°C .	70
Figura 29. Termograma de los tres materiales NTC, PTFE y sustrato PTFE-NTC.	70
Figura 30. Porcentaje de adhesión celular respecto a un el control positivo (100%), las barras representan la desviación estándar y la significancia a $p < 0.05$.	72
Figura 31. Microfotografía de células troncales mesenquimales sembradas sobre el sustrato PTFE-NTC a los cinco días, se observa la presencia de filopodios que permiten a las células adherirse al material.	74
Figura 32. Microfotografía de célula troncal y su anclaje al material sintetizado con nanotubos de carbono.	74
Figura 33. Microfotografía a 5,000X donde se observa con mayor detalle el anclaje de las prolongaciones celulares al material PTFE-NTC.	75
Figura 34. Microfotografía a 3000X de célula troncal sobre el teflón, la cual no posee prolongaciones que ayuden a la adhesión con el material.	75
Figura 35. Porcentaje de proliferación celular respecto al control donde se compara el teflón con el material de nanotubos de carbono (PTFE-NTC). Las barras representan la desviación estándar y la significancia se estimó a través de un análisis de Tukey $p < 0.05$.	77
Figura 36. Actividad de fosfatasa alcalina de las células sembradas sobre el sustrato PTFE-NTC en presencia de un medio normal. Las barras representan la desviación estándar estándar y la significancia estadística se reporta con $p < 0.05$ por medio de un análisis de Tukey.	79
Figura 37. Actividad de fosfatasa alcalina en células sembradas sobre el sustrato PTFE-NTC a diferentes días en presencia de un medio osteogénico. Las barras representan la desviación estándar y la significancia estadística se reporta con $p < 0.05$ por medio de un análisis de Tukey.	79
Figura 38. Microfotografía de matriz extracelular mineralizada a los 21 días de cultivo celular en presencia de un medio normal.	81
Figura 39. Acercamiento de imagen (50,000X) donde observamos la diferencia de los nanotubos de carbono que componen nuestro híbrido y la presencia de una matriz extracelular aparentemente mineralizada.	82

Figura 40. Microfotografía a los 21 días de cultivo celular sobre el híbrido PTFE-NTC en presencia de un medio osteogénico..... 83

Figura 41. Acercamiento de la matriz extracelular aparentemente mineralizada y la presencia de nanotubos de carbono en segundo plano. 83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localización de las bandas características de MWCNT mediante técnica espectroscópica Raman de acuerdo a la bibliografía..... 58

Tabla 2. Modos vibracionales del Politetrafluoretileno (PTFE) en espectro Raman de acuerdo a la bibliografía (Mihály, 2006). 60

Tabla 3. Modos vibracionales del Politetrafluoretileno (PTFE) en espectroscopia IR de acuerdo a la reportada en la bibliografía..... 66

ABREVIATURAS

NTC	Nanotubos de carbono
PTFE	Politetrafluoretileno
MWCN	Multiwall carbon nanotubes
SWCNT	Single walled carbon nanotubes
ECM	Matriz extracelular
BM-MSC	Células mesenquimales de médula ósea
TGA	Análisis termogravimétrico
SEM	Microscopia electrónica de barrido
IR	Infrarrojo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
HA	Hidroxiapatita
BMP	Proteína morfogenética del hueso
nm	nanómetros

1. ANTECEDENTES

1.1 NANOTUBOS DE CARBONO

Definición y clasificación

Los nanotubos de carbono (NTC) descubiertos en 1991 por lijima (Iijima, 1992) son láminas de grafeno cerradas enrolladas concéntricamente con un diámetro aproximado de 1 a 2 nm, tienen forma tubular y una longitud de 50 nm hasta 1 cm (Figura 1). El interés científico que han despertado está relacionado con sus propiedades físicas y químicas (Dong, 2012). Es uno de los materiales más fuertes que se conocen debido a su estructura, hibridación sp^2 y enlaces covalentes. De acuerdo al número de láminas de grafeno los NTC pueden clasificarse en dos tipos: los de capa múltiple MWCNT (por sus siglas en inglés *Multiwall Carbon Nanotubes*) y los de capa simple SWCNT (*Single Wall Carbon Nanotubes*). Los SWCNT son materiales 1-D (uni dimensionales) con propiedades electrónicas singulares, tienen una gran absorción óptica en el infrarrojo cercano y son utilizados en aplicaciones fototérmicas y fotoacústicas. Por su parte, los MWCNT formados por diversas láminas de grafeno, tienen diámetros mayores y exhiben propiedades ópticas mucho mejores que los SWCNT, sus aplicaciones biológicas pueden tener diferentes propósitos relacionados con sus características. (Liu, 2009) (Martins-Júnior, 2013).

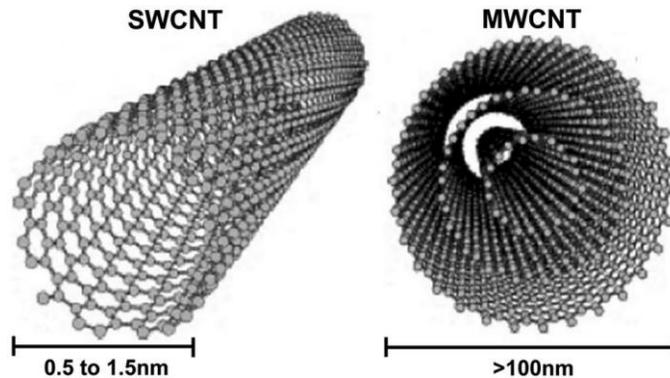


Figura 1. Estructura nanotubos de carbono SWCNT y MWCNT (Imagen de *Carbon nanotubes: Directions and Perspectives in Oral Regenerative Medicine*).

Propiedades y aplicaciones

El diamante y el grafito son formas elementales del carbono en estado sólido y presentan diferentes geometrías, tetraédrica sp^3 (diamante) y trigonal sp^2 (grafito), son estructuras consideradas tridimensionales y bidimensionales respectivamente, los nanotubos y fullerenos son de dimensión uno y cero. Una de las características más fascinantes de los nanotubos es su simetría ya que cumplen con el teorema de Euler que indica que cualquier poliedro cerrado formado por caras pentagonales y hexagonales tienen siempre 12 pentágonos y un número arbitrario de hexágonos. Las posibles aplicaciones de los nanotubos de carbono están relacionadas con algunas de sus propiedades más destacables, elevado valor de módulo de Young, alta conductividad térmica, transporte de electrones y elevada proporción longitud-diámetro (Ansón, 2005). El módulo elástico de los MWCNT se encuentra entre 0.3 a 1 TPa y tienen una fuerza de tensión de 10 a 60 GPa, estas características los convierten en la mejor fibra reforzada cuando hablamos de nanomateriales (Bronzino). El diámetro de MWCNT se encuentra comúnmente entre 6 y 50 nm y conservan una distancia de 0.34 nm entre cada capa. Diferentes análisis teóricos y experimentales muestran que son capaces de soportar hasta 15% de la deformación

ocasionada por tracción antes de la fractura, a partir de esto se ha desarrollado la aplicación como andamios en bioingeniería de tejidos y regeneración ósea ya que se piensa que podrían desempeñar una función mecánica permanente (Martins-Júnior, 2013). El diámetro y el ángulo “quiral” definen las características conductoras de los NTC y se clasifican como: metálicos, semiconductores y semiconductores de intervalo estrecho. Su síntesis se lleva a cabo a través procedimientos basados en la formación de estructuras cilíndricas sólidas a partir de unidades elementales de carbono en fase de vapor, estas unidades reactivas de carbono se generan por descomposición térmica y catalítica o bien por evaporación del grafito (Ansón, 2005). Aunque los NTC son relativamente inertes en condiciones ambientales existen diferentes procesos que pueden afectar su estructura y propiedades. Un nanotubo abierto representa una mayor superficie y facilidad para reaccionar en estas zonas las cuales quedan inestables y se saturan con los átomos o moléculas presentes en el entorno, debido a esto muchas técnicas se concentran en abrir los nanotubos o incorporar moléculas mediante la funcionalización, con lo cual se modifican y mejoran las propiedades de los nanotubos (Ansón, 2005). Uno de los grandes retos en la funcionalización es separar los aglomerados que se forman mediante interacciones de Van der Waals y que dificultan la obtención de un material con una dispersión uniforme (Bronzino). Debido a sus propiedades físicas y químicas los NTC tienen aplicaciones en diferentes áreas de la ciencia, en biomedicina destacan las siguientes:

- Biosensores biológicos
- Aplicaciones farmacéuticas
- Regeneración de tejidos
- Aplicaciones antimicrobianas

El uso de los NTC en la biotecnología crece a medida se mejora su biocompatibilidad para desarrollar nuevas aplicaciones, los estudios se extienden desde sensores, andamios en ingeniería de tejidos y vehículos para suministrar fármacos (Karl, 2011). Uno de los estudios de mayor importancia en el área de nanomateriales y biotecnología es la creación de biosensores para la detección de diferentes metabolitos en los que la funcionalización de

los NTC resulta importante esta aplicación surge a partir de las propiedades eléctricas y tamaño nanométrico, la detección de proteínas y antígenos específicos se puede llevar a cabo con un sistema semiconductor de NTC. Las características de este material ayudan a la administración y transporte de fármacos lo cual se ha demostrado con estudios *in vitro*, algunos métodos se han desarrollado a partir de la unión de moléculas dentro y fuera de los nanotubos para poder detectar células cancerosas o infectadas por algún virus (Figura 2). Por su parte los SWCNT muestran propiedades electrónicas particulares que pueden observarse mediante señales en el infrarrojo, fluorescencia, fotoacústica y espectroscopia Raman, lo cual resulta en una detección no invasiva y de alta sensibilidad, por lo que actualmente se estudia su uso como agentes de imagen para la evaluación y localización de tumores (Russell, 2013).

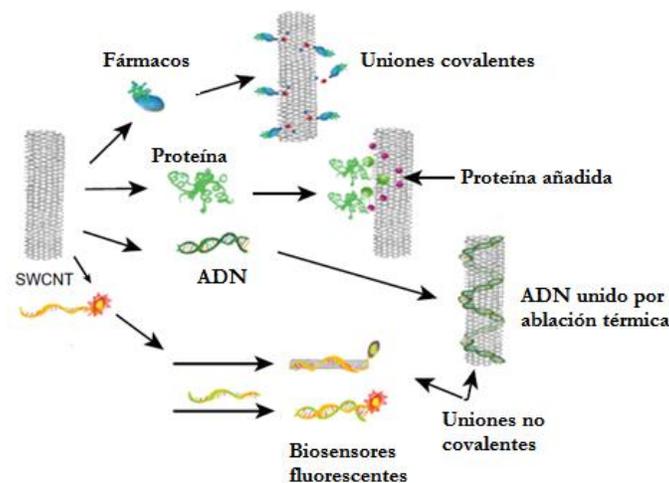


Figura 2. Esquema de algunos ejemplos de funcionalización de SWCNT funcionalizados con diferentes moléculas: proteínas, fármacos, ADN y su uso como biosensores (Imagen de *Functionalized Carbon Nanotubes: Biomedical Applications*).

Además los nanotubos han demostrado excelentes propiedades antimicrobianas y se piensa que se debe a que causan daño físico a las células microbianas por contacto directo. El diámetro de los nanotubos es un factor clave que regula sus efectos antibacterianos y se sabe que los SWCNT son mucho más tóxicos que los MWCNT (Russell, 2013). Los NTC han

surgido como un biomaterial ideal para la regeneración de tejidos duros del cuerpo. Se ha estudiado adhesión, viabilidad y proliferación celular en la superficie de andamios de MWCNT con quitosano los cuales incrementaron el crecimiento celular *in vitro*, además se han utilizado biomateriales fabricados con SWCNT como andamio de células con el fin de estudiar los comportamientos de crecimiento celular y arreglo del citoesqueleto. También se han realizado investigaciones con nanocompuestos a base de MWCNT y poli (L-lactida) (PLLA) y otros polímeros (Karl, 2011), (Ali, 2012).

Métodos de síntesis

Existen diversas técnicas para sintetizar nanotubos de carbono, los principales métodos son: método de descarga de arco, ablación láser y deposición catalítica en fase de vapor. A continuación se hablará brevemente de cada una (Rafique Alí, 2011).

Método de descarga de arco: Es uno de los métodos más antiguos utilizado por primera vez por Iijima similar al que se utiliza para producir fullerenos, consiste en conectar dos barras de grafito a una fuente de alimentación con voltaje 20-50 eV. Al emitir una chispa de corriente DC (corriente continua) entre las barras, el carbono se evapora en un plasma caliente y parte del mismo se vuelve a condensar en forma de nanotubos (Figura 3). Existen dos electrodos instalados en el centro de la cámara y se somete a una presión mediante una combinación de gases 10 Torr de metano y 40 Torr de argón (Rafique Alí, 2011).

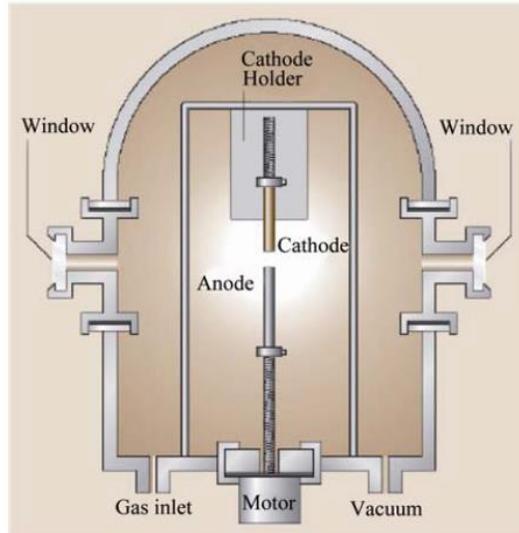


Figura 3. Imagen que ejemplifica el método de descarga de arco para síntesis de nanotubos de carbono. (Imagen de *Production of Carbon Nanotubes by Different Route: a Review*)

Método ablación láser: Esta técnica consiste en un láser generado hacia el grafito en un reactor sometido a alta temperatura en presencia de un gas inerte como el helio. Los nanotubos se generan en una superficie fría donde el vapor de carbono se condensa (Figura 4). Este método fue descubierto por Smally en 1995 al estudiar el efecto del láser sobre los metales. Pueden producirse nanotubos con diferentes diámetros y se controla modificando la temperatura de reacción (Rafique Alí, 2011).

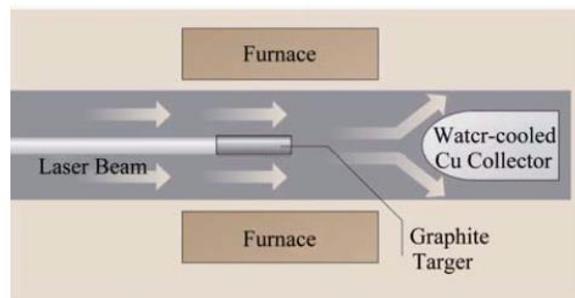


Figura 4. Esquematización del método por ablación láser (Imagen de *Production of Carbon Nanotubes by Different Route: a Review*).

Método por deposición catalítica en fase de vapor: Método descubierto en 1996 que surge para producir nanotubos de carbono a gran escala. Por medio de esta técnica es posible de controlar la dirección de crecimiento en un sustrato. En este método se utiliza una mezcla de gases hidrocarburos (etileno, matano o acetileno) y otros gases (amonio, nitrógeno u oxígeno) que se hacen reaccionar en un sustrato metálico dentro cámara a temperaturas de 700-900°C (Figura 5). Los nanotubos se forman como resultado de la descomposición del gas hidrocarburo depositado y desarrollado en la superficie metálica que actúa como catalizador (Rafique Alí, 2011).

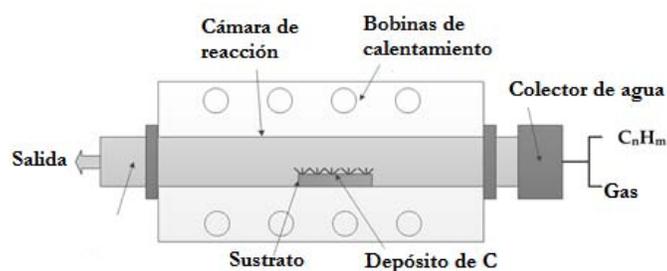


Figura 5. Esquema de método de deposición química (Imagen de *Synthesis of Carbon Nanotubes*).

Funcionalización

A pesar de las propiedades que convierten a los NTC en un material nanométrico único, existen características como la hidrofobicidad y baja solubilidad que limitan su aplicación. Una de alternativas para resolver estos problemas es la funcionalización, una modificación de las propiedades por adsorción de átomos o moléculas en la superficie de los nanotubos de carbono. La modificación química puede dividirse en no covalente donde las moléculas son adsorbidas en la superficie de los nanotubos y covalente cuando el grupo se une a través de un enlace químico fuerte (Liu, 2009).

Funcionalización covalente: La estructura curvada de los NTC tiene consecuencias en su reactividad, debido a que la lámina de grafeno está plegada sobre sí misma favorece

las reacciones de adición. Se sabe que la formación de un enlace covalente requiere la ruptura de enlaces en las paredes de los nanotubos bajo condiciones específicas. La oxidación que se genera adicionando ácido nítrico que brinda agentes oxidantes, durante este proceso se crean grupos carboxilo al final de los tubos así como en las paredes y permite la formación de grupos funcionales derivados de un grupo funcional tipo ácido carboxílico (-COOH) que puede convertirse en amida (-CO-NH), éster (-COOCH) o tiol (-CH-SH). Los nanotubos oxidados son solubles en agua. Mediante la funcionalización covalente de las paredes laterales se han descrito reacciones de: *halogenación* (al estar con especies reactivas como cloro, flúor y bromo), *hidrogenación*, *adición nucleófila* y *cicloadición*. Las reacciones de cicloadición permite la adición de carbenos, nitrenos, óxidos de nitrilo e iluros de azometino (Liu, 2009).

Funcionalización no covalente: Puede considerarse un método no destructivo que permite conservar intactas las propiedades intrínsecas de los nanotubos y permite obtener complejos derivados de NTC sin producir daños en su estructura. La funcionalización no covalente se basa en la utilización de surfactantes, ADN (ácido desoxirribonucleico) proteínas, polímeros y derivados del pireno. Se ha encontrado que estas moléculas pueden adsorberse sobre la superficie de MWCNT presumiblemente a través de interacciones electrostáticas. En el caso específico del ADN se ha reportado que pueden envolver a los nanotubos debido a su conformación helicoidal (Liu, 2009).

Biocompatibilidad

Los nanotubos de carbono son insolubles en agua y tienden a formar aglomeraciones intracelularmente generando citotoxicidad. La funcionalización incrementa su solubilidad en fluidos biológicos aumentando su biocompatibilidad. Diversos estudios realizados con el fin de conocer la toxicidad de los nanotubos, tanto SWCNT como MWCNT demuestran que la funcionalización mejora las características de biocompatibilidad, en términos de inmunidad celular, los macrófagos son los responsables de fagocitar con el fin de eliminar

residuos o destruir agentes patógenos. Cuando se inyectan nanomateriales con fines de diagnóstico o terapéutico se ha observado que los nanotubos que están funcionalizados pueden evadir esta respuesta fagocítica. Por otro lado diferentes autores han reportado que SWCNT funcionalizados se localizan dentro de las mitocondrias cuando logran rebasar la membrana celular o en lisosomas cuando son endocitados. En el caso de los MWCNT el mayor efecto se ha observado en la inducción de mecanismos inflamatorios sin embargo no existe respuesta de linfocitos T. Se sugiere que los NTC pueden evadir estas respuestas inmunes siempre y cuando se pueda evitar la interacción molecular física (Orecchioni, 2014).

El origen de la citotoxicidad en nanomateriales continúa siendo un tema de investigación, después de que las nanoestructuras entran al cuerpo interactúan con entidades biológicas, proteínas, células y el material puede conservar su estructura o ser metabolizado. Los mecanismos propuestos a través de los cuales los NTC entran en las células vivas son difusión pasiva y endocitosis, se sabe que pueden ser distribuidos a otras partes del cuerpo para finalmente ser retenidos o excretados. El tiempo en el que este proceso sucede aún es desconocido. No todos los nanomateriales son tóxicos, al modificar la forma, tamaño y composición se modifica su efecto tóxico (Madani, 2013).

Existen aspectos importantes relacionados con la toxicidad de los NTC, el primero implica aumentar la concentración en solución y se correlaciona con la disminución del crecimiento celular y apoptosis. El segundo es el tamaño, mientras más pequeños sean los NTC presentan mayor adhesión celular, sin embargo esto significa que son más propensos a interactuar con las membranas celulares e inducir una respuesta inmune. Otro aspecto importante es la síntesis y los tratamientos posteriores a ésta, además de la funcionalización. Diferentes estudios sugieren la participación mecanismos de endocitosis localizando los NTC en citoplasma pero no en núcleo. Sin embargo aún existen controversias acerca del mecanismo y de internalización de los NTC y su comportamiento dentro de las células (Heister, 2013). Es importante señalar que los estudios de toxicidad en los NTC es complicado a partir de su naturaleza hidrofóbica y gran área superficial lo que les permite

interactuar con los reactivos de ensayos de toxicidad de uso común y dando falsos negativos (Hopley, 2014).

1.2 BIOMATERIALES E INGENIERÍA TISULAR

Concepto y desarrollo histórico de los biomateriales

Un biomaterial es definido como cualquier sustancia inerte farmacológica, sistémica o combinación de ambas que se utiliza para implantes con o sin la incorporación de sistemas vivos, reemplaza las funciones de los tejidos resultando una interfase entre sustancias vivas y no vivas (Bhat S. , 2002). De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud, (*NIH* por sus siglas en inglés) un biomaterial es cualquier sustancia o combinación de sustancias de origen sintético o natural que pueden utilizarse por un periodo de tiempo dentro de un sistema reemplazando, aumentando o reparando un tejido, órgano o función del cuerpo. El origen del material brinda una de las clasificaciones más sencillas e importantes de los biomateriales, sintético o natural. La definición dada por la *NIH* sugiere que el material puede ser utilizado como todo un sistema, es decir un agente terapéutico por sí solo y como parte de un sistema en la fabricación de dispositivos biomédicos o en el desarrollo de andamios en ingeniería de tejidos. En 1982 J. Black definió a los biomateriales como cualquier material farmacológico e inerte, viable o no, natural o sintético, que es capaz de interactuar para beneficio dentro de un organismo vivo o ser parte de esta interacción. Birla y cols han afirmado que es una sustancia que estimula la matriz extracelular interactuando funcionalmente con células aisladas que ayudan a la fabricación y madurez de un tejido artificial tridimensional. Esta última definición se centra en la interacción célula-material y en este contexto se entiende que el biomaterial cumple una función importante en la estimulación de la matriz extracelular fundamentado en que las interacciones célula-matriz inician una compleja cascada de señalizaciones intracelulares que modulan el comportamiento y fenotipo celular (Birla, 2014).

El comportamiento de los materiales depende tanto de sus propiedades en masa como las de su superficie. La naturaleza de las uniones moleculares determina las propiedades de los materiales (Bhat S. , 2002). Existen tres generaciones de biomateriales: la primera generación va desde los años sesenta a la actualidad y define un biomaterial como una sustancia sistemática y farmacológicamente inerte diseñada para su colocación dentro de un sistema viviente. En la segunda generación nacida a mediados de la década de los setenta se definía como un material no viviente utilizado en dispositivos médicos destinados a interactuar con los sistemas biológicos. Finalmente en la década de los noventa nace el concepto de un material destinado a formar parte de una interfase con los sistemas biológicos para evaluar, medicar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo (Argibay, 2005).

Es importante saber que el concepto de biocompatibilidad evolucionó con la introducción de nuevos conceptos en biología molecular y los avances en proteómica ya que estos descubrimientos afectan significativamente la síntesis, diseño, uso y al mismo tiempo representan un desafío para la comunidad de biomateriales en el siglo XXI que da como resultado el surgimiento de los biomateriales inteligentes o biomiméticos que forman parte de la cuarta generación de materiales los cuales mimetizan el entorno celular. Aunque todavía estamos lejos de recrear la arquitectura molecular de la matriz extracelular (ECM) y el mecanismo dinámico mediante el cual la información se revela en respuesta al entorno se han logrado avances significativos en el diseño y fabricación de andamios en el área de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Clásicamente las características de los biomateriales inteligentes se definen por su inducción o activación de células mediante la ingeniería del material y la capacidad de respuesta a estímulos internos o externos como pH, temperatura, fuerza iónica y magnetismo. Existen diferentes estrategias que mejoran la regeneración de tejidos al modificar las propiedades de superficie, el desarrollo de la geometría tridimensional avanzada e ingeniería de los sistemas de administración de fármacos o andamios específicos. Desde un punto de vista clínico un material inteligente se

define como un material que participa activamente en la regeneración de un tejido dañado y responde o reacciona a los estímulos de su entorno en una forma valiosa (Holzapfel, 2013).

Los biomateriales mejoran la calidad de vida de un mayor número de personas cada año. El campo de aplicación es muy amplio e incluye reemplazos de articulaciones y extremidades, arterias y piel. Una creciente demanda de biomateriales surge de una población que envejece con mayores expectativas de calidad de vida, los materiales utilizados para aplicaciones biomédicas se pueden agrupar en tres tipos principales descritos por la respuesta que generan en un tejido, **inertes** (aquellos que no provocan daño o la respuesta tisular es mínima) y **bioactivos** (materiales que estimulan la unión al tejido y mejoran la integración mediante la estimulación de crecimiento de tejido nuevo). Otra forma de dividirlos es en biodegradables y bioabsorbibles (Holzapfel, 2013).

Conceptos en ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos se define como la aplicación de principios químicos, físicos, biológicos y conocimientos de ingeniería para el entendimiento de la relación estructura-función en tejidos normales y en aquellos lesionados por un trauma o enfermedad, así como el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren una función afectada. Surge a finales del siglo XX como una ciencia nueva que se fundamenta en conocimientos multidisciplinarios. El reemplazo tisular con materiales sintéticos se logra seleccionando el material que tenga las características físico-químicas con mayores similitudes a las del tejido natural, de esta forma los materiales rígidos como los metales o cerámicos se utilizan para reemplazar hueso o dentina, mientras que materiales flexibles son empleados para la sustitución de tejidos blandos. Para poder evaluar correctamente el comportamiento del biomaterial como reemplazo de tejidos es necesario revisar la fisiología, anatomía, bioquímica y biomecánica de los tejidos naturales así como los cambios fisiopatológicos que se requieren para restaurar su función. (Bhat S. , 2002). De acuerdo a

la Fundación Nacional de Ciencia se define a la ingeniería tisular como la producción de grandes cantidades de tejidos funcionales para la investigación y aplicaciones a través del esclarecimiento de mecanismos básicos del desarrollo de tejidos combinado con procesos fundamentales de ingeniería de materiales. El primer paso para hacer ingeniería de tejidos involucra el aislamiento, cultivo y expansión de células primarias. Una vez obtenido un número considerable de células, éstas se despegan de la superficie de cultivo para posteriormente ser sembradas sobre un andamio o biomaterial (Birla, 2014). Para llevar a cabo ingeniería tisular se necesitan tres elementos: andamios o membranas, células troncales o regenerativas y factores de crecimiento o moléculas de señalización (Martins-Júnior, 2013).

Uso de biomateriales en Ingeniería de tejidos

La química, arquitectura, porosidad y tasa de degradación del andamio deben proporcionar un ambiente que facilite la adhesión celular, proliferación y migración, intercambio de residuos en nutrientes, la vascularización y el crecimiento del tejido. Para cumplir estos requisitos se desarrollan diferentes métodos de síntesis de andamios permitiendo diseños macro, micro y nanoestructurados. En los últimos años, la investigación sobre biomateriales se ha concentrado en la superficie nanotopográfica y su modificación buscando controlar señales moleculares que rigen el comportamiento celular. Muchas propiedades del andamio dependen de su naturaleza y el proceso de fabricación aplicado. Además de la composición química, la geometría y microestructura influyen considerablemente en la regeneración de tejidos. La porosidad se define como el porcentaje de espacio vacío en un sólido y es una propiedad morfológica independiente del material. Las propiedades mecánicas de los biomateriales, según lo determinado por las propiedades de volumen de sus componentes y características geométricas, a su vez pueden alterar drásticamente la respuesta celular *in vitro* e *in vivo*. Aunque los mecanismos que regulan estos efectos apenas comienzan a entenderse, se plantea una hipótesis sobre mecanotransducción que se caracteriza por una interacción dinámica activa entre los componentes de la matriz extracelular y proteínas motoras celulares acopladas al citoesqueleto. Muchos materiales

como los cerámicos, polímeros y vidrios se ha utilizado como materiales sólidos y estos mismos se han combinado para adecuarlos lo mayor posible a las condiciones *in vivo*, la selección del material debe realizarse de manera individual de acuerdo a la aplicación particular para reparar un tejido determinado (Holzapfel, 2013). Los biomateriales son capaces de inducir respuestas celulares específicas. Los materiales con características nanotopográficas ofrecen propiedades similares a factores de crecimiento y pueden ser utilizados para inducir procesos biológicos específicos. Estudios previos han demostrado que algunas señales provenientes de la nanotopografía del material pueden tener un impacto en la adhesión, orientación y organización del citoesqueleto, además de influir en la morfología, capacidad migratoria, expresión de genes y por lo tanto en el destino de células mesenquimales (Salmasi, 2015).

Los avances en el área de los biomateriales han generado modificaciones en las superficies de éstos que permitan imitar las propiedades de la matriz extracelular, debido a que son las proteínas de esta matriz las que regulan las interacciones célula-material. Los receptores de membrana cuentan con características únicas que permite su activación desde el exterior o interior de la célula. Existen tres estrategias utilizadas en el desarrollo de materiales biomiméticos: la incorporación y liberación de moléculas bioactivas, la modificación superficial con moléculas de la matriz extracelular o motivos específicos de unión y finalmente superficies con patrones en nanoescala (Rahmany Maria, 2012). La nanociencia es el estudio de procesos fundamentales que ocurren en las estructuras de un tamaño entre 1 y 100 nanómetros (nm) los cuales se conocen como nanoestructuras la nanotecnología en el área de investigación científica que estudia, diseña, y fabrica materiales o sistemas a escalas nanoscópicas y les da alguna aplicación. Los nanomateriales se definen como aquellos materiales con escalas menores a los 100 nm en al menos una de sus tres dimensiones (Bronzino). Las propiedades físicas, químicas y biológicas que tiene los materiales en los sistemas nanométricos difieren en muchas formas de sus propiedades en los sistemas macroscópicos. (Takeuchi, 2009). Se sabe que las células pueden reconocer una estructura nanométrica, diferentes estudios han modificado la topografía de los materiales demostrando que algunos de ellos mejoran la adhesión celular. (Rahmany Maria, 2012).

Los nanomateriales tienen rangos desde un nanómetro hasta cientos de ellos, rangos muy parecidos a moléculas que pertenecen a los sistemas biológicos como ADN, enzimas, plásmidos, anticuerpos, etc. Los materiales en esta escala exhiben propiedades diferentes lo cual determina diversas aplicaciones en biomedicina, tanto en el diagnóstico como tratamiento de diversas enfermedades (Liu, 2009).

Células troncales e Ingeniería tisular

Las células troncales mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés) representan la población de células troncales que se encuentran en tejidos adultos y pueden aislarse, expandirse en cultivo y caracterizarse *in vitro* e *in vivo*. Sus principales características son la habilidad de autorrenovarse y su potencial de diferenciación (Figura 6). Las MSC de médula ósea pueden diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos así como producir sustancias activas que regulen la homeostasis ósea (Bradamante, 2014). Históricamente Friedenstein en 1966 fue el primero en reportar la presencia de células fibroblastoides en la médula ósea de adultos que pueden regenerar hueso (Friedenstein, 1966). Posteriormente se reportó que estas células estaban relacionadas con diferentes tejidos como hueso, cartílago, músculo y ligamento. En 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular que las MSC deben tener las siguientes características: adherirse al plástico en condiciones de cultivo, ser positivas a marcadores CD105, CD73 y CD90 pero negativas a CD34, CD45, CD14. Ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Las MSC representan menos del 0.01% de la población celular en médula ósea (Fakhry, 2013). Existe una gran cantidad de artículos que relacionan la regulación de la actividad de células mesenquimales a partir de la topografía superficial. A pesar de que desconoce mucho acerca de este mecanismo, muchos autores coinciden en que las MSCs son capaces de responder a diferentes señales biofísicas pasando de un estado quiescente a la diferenciación (Govey, 2013).

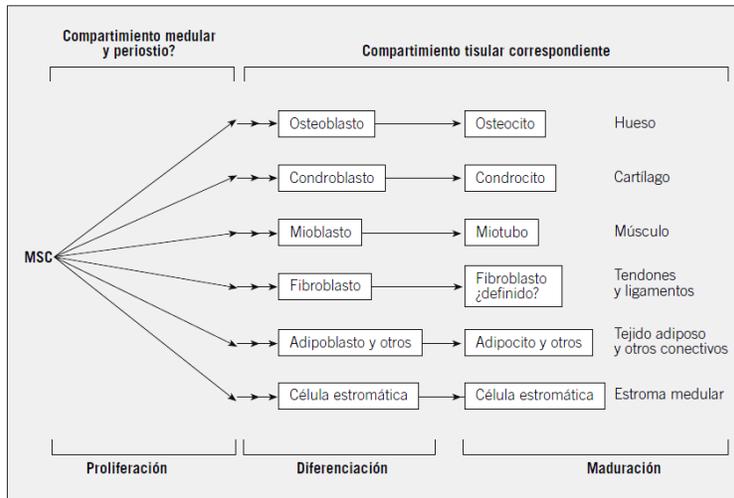


Figura 6. Esquema de la diferenciación de células troncales mesenquimales y los tejidos a los que dan origen.

Dentro de todas las señales que las células reciben es difícil saber y determinar cuáles de estas desencadenan procesos de diferenciación. Diversas características de la topografía superficial como rigidez o flexibilidad, rugosidad y morfología crean fuerzas de tensión en los contactos célula-matriz (adhesiones focales) y uniones intercelulares (uniones adherentes, uniones gap). *Dalby* resume los siguientes elementos como los responsables de las fuerzas de tensión: los microfilamentos (actina) que son el soporte de las protrusiones celulares y generan movimiento y tensión cuando se acoplan a la miosina formando adhesiones focales. Los microtúbulos (tubulina) se derivan del centrosoma y forman elementos de compresión y los filamentos intermedios que provienen del núcleo y proporcionan soporte mecánico. De acuerdo a la teoría de la “tensegridad” estos elementos mantienen un equilibrio de compresión y tensión que cambia en respuesta a fuerzas extracelulares o cambios conformacionales en la membrana, los cuales pueden transmitir fuerzas directamente al núcleo, reorganizar centrómeros y modificar la transcripción de genes. En la membrana pueden activarse canales de cationes abiertos como consecuencia de la deformación de la membrana, la estimulación de campo electromagnético o potenciales de transmisión de fluidos. La deformación del sustrato activará en las células la remodelación del citoesqueleto el cual podrá alterar directa o indirectamente la transcripción. Existen estudios donde se ha observado que un 15% de MSCs sembradas en

andamios de fibrina se diferencian en condrocitos, sin embargo al inhibir ERK1/2 se frena esta respuesta. *Song y cols* han tratado de correlacionar las respuestas celulares y el destino celular ante la tensión y deformación de un sustrato con el fin de predecir las respuestas óptimas para superficies únicas y tipos celulares específicos. Se sabe que en la diferenciación de las células troncales influye el micro ambiente que las rodea (Song, 2012). En el hueso existe un nicho donde las células provenientes de médula ósea son activadas a través de señales por aquellas que residen en él. Actualmente se piensa que los osteocitos detectan y traducen señales biofísicas que influyen directamente en las células mesenquimales ya que existe comunicación célula a célula (Govey, 2013).

La matriz extracelular (ECM) está formada por estructuras micro y nanométricas que interaccionan con las células para regular su comportamiento, esta arquitectura a diferentes escalas provoca la migración y polaridad celular proporcionando señales para que la célula pueda orientarse. A partir de lo que sucede en un tejido vivo, se toma la idea de diseñar topografías en nanoescala que puedan imitar esta matriz y así dirigir a las células e influir en su forma, función y al igual que en la ECM guiar a la célula a través de un proceso conocido como “guía por contacto” (Ho Kim, 2012). La influencia de estas topografías en la polaridad celular se demostró en células NIH 3T3 las cuales se sembraron sobre sustratos con canales y hubo un incremento de la polaridad en los materiales más densos y con ranuras más estrechas. Se ha demostrado que alterar unos nanómetros el biomaterial influye en la proliferación celular. Un estudio que se llevó a cabo sobre neuronas demostró que el grado de proliferación de estas células dependía del diámetro que tenían las nanofibras sobre las cuales estaban sembradas, la proliferación incrementaba conforme el diámetro se disminuía (Ho Kim, 2012).

Hablando sobre diferenciación celular se ha demostrado que los nanotubos pueden estimular la diferenciación osteogénica en células mesenquimales, sugiriéndose que la nanotopografía puede ser suficiente para guiar la diferenciación celular sin embargo no es tan efectiva como cuando adicionalmente se utiliza un medio inductor. Además de estas células, se han estudiado otros linajes celulares. Una de las preguntas que no se ha

contestado es ¿Cómo las células son capaces de percibir las señales nanotopográficas de los biomateriales? Evidentemente muchas respuestas emergen para contestar esta pregunta. Las primeras pistas se relacionan con los sustratos y proteínas transmembranales, integrinas y moléculas de adhesión. Las integrinas traducen fuerzas extracelulares en señales bioquímicas a través de las adhesiones focales y se asocian con otras proteínas y el citoesqueleto. De esta forma la señal se lleva hasta el núcleo regulando motilidad, proliferación y diferenciación celular (Ho Kim, 2012).

En 2007, se propuso la importancia del “nano desorden controlado” (es decir no muy ordenado pero no al azar y a nivel nanométrico) en la inducción de osteogénesis en células troncales mesenquimales (MSC). Se demostró que los patrones podrían utilizarse para controlar la diferenciación con una eficiencia similar a la estimulación química. Esta observación fue seguida por informes complementarios que demuestran que los diámetros de características de 100 nm son óptimas para la osteogénesis en superficies desordenadas. Algunos estudios se enfocan en superficies rígidas que promuevan la adhesión y promotores osteogénicos que conducen la diferenciación celular. En este contexto se demostró que si las MSCs se encontraban más adyacentes resultaban adhesiones pequeñas o cortas y la diferenciación adipogénica. En cambio si las células mesenquimales son estimuladas para expandirse y tener adhesiones más largas se observa la inducción de osteogénesis. Un poco aventurado, pero diversos autores han establecido paralelismos biomiméticos a este fenómeno impulsado por la topografía comparándolo con el tipo de estructura de la colágena X que se encuentra en los sitios de la osificación endocondral y grandes fracturas. A partir de todos estos estudios se ha tratado de comprender qué rige el comportamiento celular para permitir la diferenciación a partir de las diferentes nanotopografías. Se sabe que el nicho celular localizado en los diferentes tejidos requiere de una constante renovación en aquellos que demandan una alta regeneración tisular, como piel, hueso e intestino. El sistema nanotopográfico ha generado evidencia de una regulación bioquímica de diferentes objetivos, señales relacionadas con la adhesión a través de ERK 1/2 y c-Jun (Jnk), ambas relacionadas con funciones de crecimiento y la diferenciación celular (Dalby, 2014).

El proceso de diferenciación implica pasar de un estado quiescente a uno de gran actividad donde se requiere gran energía e incremento de diferentes proteínas que ayuden a la producción de nueva matriz extracelular durante la regeneración. Dentro de estos mecanismos relacionados a la diferenciación y andamios, existe otro término conocido como *mecanotransducción* que se divide en indirecta (cambio en la adhesión y la morfología en el citoesqueleto para desencadenar alteraciones bioquímicas) y directa (describe a la célula como una unidad mecánica en lugar de bioquímica) en esta última los cambios alteran directamente el núcleo. Por otro lado la teoría de *Ingber* sobre “tensegridad” propone que las características del material actúan como señales mecánicas que pueden ser traducidas a través de modificaciones del citoesqueleto, considerando que este se encuentra acoplado al núcleo y a partir de esto las alteraciones en la forma de la célula puede consecuentemente generar reorganización del citoesqueleto que rápidamente afecta también la morfología nuclear (Figura 7). Una de las proteínas asociadas a este mecanismo son las lamininas, filamentos intermedios que provienen del núcleo y se conectan al citoesqueleto a través de complejos de nominados LINC. En conjunto, estas observaciones demuestran la necesidad de considerar a las células no sólo como unidades bioquímicas sino también como unidades mecánicas. Los materiales proporcionan una herramienta poderosa para investigar adhesión celular y función epigenética, específicamente aquellos diseñados a escalas nanométricas ofrecen una oportunidad única para dilucidar estos mecanismos como consecuencia de su similitud en tamaño con los receptores celulares como integrinas (Dalby, 2014).

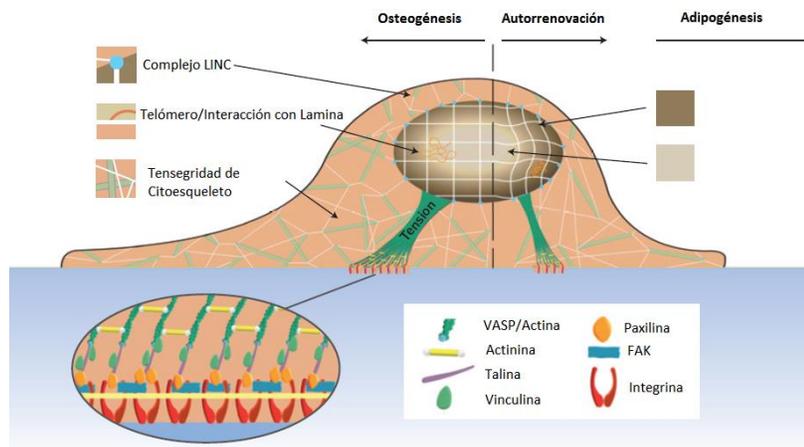


Figura 7. Esquema de célula mesenquimal y diferentes proteínas en el proceso de adhesión y el fenómeno “tensegridad”.

Andamios de NTC en Ingeniería de tejidos

Existen diferentes estudios que demuestran que las propiedades de los nanotubos pueden influir en el crecimiento celular al ser utilizados como andamios en ensayos biológicos. Diferentes tipos celulares tienen afinidad por superficies de NTC, se sabe que los fibroblastos presentan una mayor adhesión y proliferación cuando se siembran sobre fibras de NTC y poliuretano. Además existen ensayos con fibroblastos de ratón cultivados sobre MWCNT, el crecimiento celular fue 20% mayor en comparación a los que fueron sembrados sobre titanio. Los estudios en células neuronales también arrojan resultados de mayor adhesión en sustratos de SWCNT. A pesar de las investigaciones aún se desconocen los mecanismos mediante los cuales los nanotubos son capaces de mejorar proliferación y adhesión, sin embargo se piensa que las características físicas y químicas les permiten brindar a las células un sustrato ideal para su crecimiento. Es así como los NTC se convierten en una propuesta interesante para su uso en prótesis e implantes de hueso, ya que comparados con los materiales existentes los NTC son más fuertes y con mayor flexibilidad, además nos brindan la posibilidad de crear con ellos superficies que puedan imitar la ECM. Se ha demostrado que las células del hueso se adhieren y proliferan mejor sobre sustratos fabricados con nanotubos y esto se ha relacionado al módulo de Young en el material

(módulo de elasticidad) que se asocia a uniones estrechas entre osteoblastos y MWCNT. Otro estudio correlaciona la actividad metabólica de células Saos-2 con el diámetro de los nanotubos encontrando una mayor actividad en superficies de nanotubos de menor diámetro en comparación con las superficies de control. Se piensa que esta correlación negativa entre el diámetro y la actividad metabólica puede ser debido a que los de menor diámetro son más cercanos a las dimensiones de fibras de colágeno Tipo I (Heister, 2013).

El uso de biomateriales en biomedicina requiere propiedades específicas por parte de estos materiales en términos de biocompatibilidad. Dentro de los diferentes materiales nanoestructurados los nanotubos de carbono se proponen como una alternativa para este tipo de aplicaciones. La hidroxiapatita (HA) es muy utilizada por su gran biocompatibilidad y osteoconductividad y esto genera el desarrollo de materiales compuestos de HA con titanio o con nanotubos de carbono, estos últimos hacen que el material mejore sus propiedades como resistencia a fuerzas de tensión y aumento del de módulo de elasticidad. Por otro lado Gheith y cols estudiaron las propiedades de membranas poliméricas con SWCNT para diferenciación de células troncales en neuronas, resultando la existencia de sinapsis y redes neuronales funcionales (Gheith, 2006). Estos resultados demostraron que puede incrementarse la actividad neuronal al utilizar andamios con nanotubos de carbono (Meredith, 2013). En 2008 Usui y cols utilizaron fibras de MWCNT para regeneración ósea en ratones observando una buena compatibilidad del material en contacto con el tejido vivo permitiendo una buena reparación de hueso en zonas donde se realizaron defectos óseos. Los estudios realizados en ingeniería de tejido óseo con nanotubos de carbono incluyen andamios con hidroxiapatita, polímeros y funcionalización de NTC a moléculas osteoconductoras como BMPs (Bone Morphogenetic Protein) (Usui, 2008). En 2013 Kroustalliy cols utilizaron membranas de quitosán reforzadas con NTC y estudiaron sus propiedades en términos de biocompatibilidad y respuestas celulares. El material presentó un mejor módulo de Young y propiedades mecánicas superiores cuando se combinaba con los NTC. Posteriormente al sembrar miofibroblastos sobre estas membranas se mostraron diferencias significativas en la proliferación al compararlo contra un control sin NTC, la adhesión y proliferación eran deficientes en las membranas sólo con quitosán,

no se presentó toxicidad al utilizar este tipo celular y células endoteliales (Kroustalli, 2013). La utilización de los nanotubos de carbono como andamios para regeneración de tejidos es todavía un tema que se continúa investigando incluyendo los mecanismos mediante los cuales las células reconocen este material y logran incrementar el crecimiento celular así como la diferenciación de células troncales. Se sabe que tanto los SWCNT como los MWCNT pueden llegar a ser utilizados en la medicina regenerativa y es posible combinarlos con otros materiales para mejorar las propiedades de polímeros, metales y cerámicos (Meredith, 2013).

1.3 REGENERACIÓN ÓSEA

Características del tejido óseo

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado estructurado por laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas laminillas determina que el hueso sea cortical o esponjoso (Figura 8). Por su gran capacidad de regeneración el hueso puede repararse de fracturas o daños, sin embargo grandes defectos requieren de intervenciones quirúrgicas. Desde que la nanotecnología ha permitido el desarrollo de nuevos sistemas que imiten la compleja arquitectura de diferentes tejidos se ha vuelto una alternativa en la regeneración de tejido óseo. De esta forma se piensa que los NTC pueden imitar en función a las fibras de colágena controlando la nucleación de cristales (Bronzino). El tejido óseo se encuentra en un proceso de remodelación continua que consiste en una sucesión de fases de resorción y formación. El objetivo de estos procesos es reparar la matriz dañada para adaptar la microarquitectura para el medio ambiente y para regular la homeostasis de calcio (Bala Y. D., 2011). El tejido óseo se compone de una fase mineral constituida por componentes orgánicos e inorgánicos. Los componentes orgánicos están formados en un 90% por fibras de colágena principalmente tipo I además de proteoglucanos, glucosaminoglucanos, glicoproteínas, osteonectina (mantiene unidas a las fibras de colágena con la porción mineral del hueso) y osteocalcina (fija el calcio a la matriz ósea). Las fibras de colágena le confieren elasticidad al hueso y resistencia a las fuerzas de tensión.

Los componentes inorgánicos están constituidos en su mayor parte por depósitos de fosfato cálcico cristalino (hidroxiapatita) e iones de magnesio, sodio, potasio, citrato y carbonato lo cual confiere dureza al hueso (Bala Y. D., 2011).

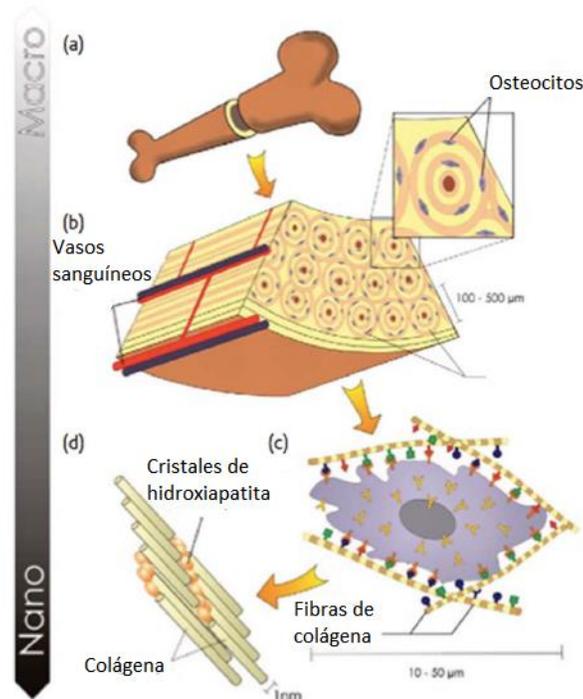


Figura 8. Esquema de la estructura macroscópica y microscópica del hueso.

El hueso es el segundo tejido humano más trasplantado por lo que existe un gran interés en el desarrollo de estrategias para reparar o reemplazar defectos óseos, como el desarrollo de materiales que ayuden al tratamiento de defectos óseos entre ellos el titanio, acero inoxidable, cerámica de alúmina, cerámica de zirconia, hidroxiapatita y polímeros sintéticos. Sin embargo los materiales que provienen de metales a menudo sufren desgaste y estrés cuando se implantan en el cuerpo, este estrés se debe a la diferencia en el módulo de Young entre el metal y el hueso. Por su parte, los cerámicos utilizados por su biocompatibilidad se limitan en su aplicación clínica debido a la fragilidad y degradación lenta. En contraste los polímeros sintéticos son biocompatibles y biodegradables pero deficientes en resistencia a la compresión en comparación al hueso. Por eso se propone la utilización de nanotubos de

carbono con la finalidad de aprovechar las propiedades que confiere la estructura nanométrica (Martins-Júnior, 2013).

Mecanismos de mineralización y remodelado óseo

El término mineralización implica no sólo la deposición inicial mineral en la matriz orgánica sino también la maduración que se alcanza con una densidad mineral superior en un volumen dado de la matriz. Esto último incluye un aumento en número, tamaño y la perfección de los cristales. Independientemente de la masa ósea y su distribución en el espacio la mineralización y la "calidad" de los minerales juegan un papel crucial en las propiedades elásticas, plásticas y viscoelásticas que definen el comportamiento mecánico de los huesos. El primer paso de la mineralización comienza 5-10 días después de la deposición inicial de matriz orgánica por los osteoblastos durante la formación de hueso. Como la remodelación ósea se produce de forma asincrónica esto resulta en una distribución heterogénea de la mineralización en todo el tejido óseo. El grado de mineralización de la matriz de cada BSU (unidad estructural del hueso) depende del tiempo transcurrido desde su deposición. El grado medio de mineralización (DMB) y su distribución están estrechamente relacionados con la frecuencia de activación de la remodelación ósea, que puede ser influida por la edad, estado hormonal o patologías. En escala nanoscópica, la "calidad" de los cristales minerales depositados es un factor clave en el proceso de mineralización y dicta las propiedades mecánicas del hueso, ya sea en los niveles local (BSU) o a nivel del tejido. El hueso humano se compone de una apatita mal cristalizada, deficiente en calcio y no estequiométrica. La fase mineral del hueso posee una gran superficie y es altamente específica y esto la convierte en metabólicamente activa y brinda diversas interacciones entre los iones desde el líquido extracelular y los iones de los cristales de apatita. Esta capacidad de intercambio de iones con los fluidos permite la formación, crecimiento, maduración y disolución de los cristales. En consecuencia, la hidratación es esencial en la matriz ósea recientemente depositada donde encontramos gran cantidad de agua y hay un constante intercambio de iones con la apatita. El nivel de agua disminuye a

medida que el espacio es ocupado por la fase mineral, dado que los iones ya no se difunden en el medio se detiene el crecimiento de cristal. Por lo general en el hueso humano la mineralización se detiene aproximadamente cuando se llega al 95% del nivel máximo que puede contener matriz orgánica. Los cristales minerales tienen forma de plaqueta y son nanométricos (1-7 nm de espesor, 15- 200 nm de longitud y 10-80 nm de ancho), su organización dentro del tejido óseo depende de las propiedades estructurales de la matriz orgánica. Las moléculas vecinas de colágena se ensamblan de forma axial generando un patrón de separación y regiones superpuestas dentro de las fibrillas (Bala Y. F., 2013).

Los cristales minerales son paralelos entre sí, la nucleación del cristal es desencadenada por la colágena y proteínas no colágenas, que también regulan varios pasos de mineralización. Al inicio los cristales se alargan para después aumentar su grosor, la presencia de apatita mejora el módulo de tracción y la fuerza de la colágena, a la inversa la matriz orgánica actúa directamente sobre las proporciones de cargas transferidas en partículas minerales que impiden el agrietamiento mineral. El tamaño de los cristales determina directamente el área de la superficie donde se producen interacciones entre el tejido mineral y la colágena. La calidad del tejido mineralizado puede ser descrita por su cristalinidad, madurez y nivel de sustituciones (Bala Y. F., 2013).

La mayor parte del recambio óseo se produce en la superficie del hueso, en su interfase con la médula ósea a través de la actividad celular específica involucrada en el remodelado. Las células participantes son los osteoblastos y osteoclastos. Los primeros tienen su origen en las células madres mesenquimales (MSCs) que dan origen a las unidades formadoras de fibroblastos que estimuladas en un microambiente especial se diferencian en osteoblastos, los cuales son productores de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y formadores de hueso. Por su parte el osteoclasto tiene su origen en las células hematopoyéticas formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos. Los monocitos evolucionan a macrófagos y finalmente a osteoclastos los cuales sintetizan activamente enzimas lisosómicas, metaloproteinasas que disuelven el colágeno. La superficie celular de remodelación está predominantemente en el hueso trabecular. En el adulto existe una remodelación continua

de tejido óseo que inician con la migración de osteoclastos hacia una superficie ósea en reposo, esto se conoce como fase de activación. En la segunda fase llamada de resorción, los osteoclastos excavan una cavidad de erosión durante un lapso de 4 a 12 días y a partir de este momento son reemplazados por células mononucleadas encargadas de suavizar la cavidad de resorción. En los siguientes 10 días una capa de proteoglicanos, glicoproteínas y fosfatasa cubren la cavidad. Una vez que la resorción finaliza se inicia la fase de acoplamiento donde los osteoblastos son atraídos hacia la superficie erosionada y se inicia el proceso de síntesis de la matriz osteoide. En esta fase de formación se produce colágena y unos días después de esta formación el osteoide sufre un proceso de mineralización con incorporación de otras proteínas óseas y participación de enzimas como fosfatasa alcalina cuya actividad se incrementa durante la fase de mineralización. La osteocalcina producida por los osteoblastos parece tener una participación en la absorción de minerales por la matriz ósea (Bronzino).

La nanociencia es particularmente útil en ingeniería de tejidos debido a que las interacciones célula-matriz se generan a niveles nanométricos, el hueso es un ejemplo de un nanocompuesto de nanocristales de hidroxiapatita y fibras de colágena. La hidroxiapatita tiene decenas de nanómetros (nm) de ancho y una longitud de 2-3 nm de profundidad. Las fibras de colágeno por su parte tienen de 1.5 a 3.5 nm de diámetro que forman triples hélices y cada uno llega a medir de 50 a 70 nm de diámetro y estas son responsables de las propiedades de tensión del hueso (Bronzino). La regeneración tisular es la respuesta que se consigue al restituir un tejido después de daño o enfermedad y a diferencia de la reparación donde el tejido que se forma es cicatricial con características diferentes al original, en la regeneración el tejido formado es igual al que se ha perdido o lesionado. Los marcadores de formación ósea incluyen a todas las proteínas sintetizadas por los osteoblastos: fosfatasa alcalina, osteocalcina y propéptido carboxiterminal de procolágeno tipo I (PICP). Existen cuatro isoenzimas de fosfatasa alcalina (ALP): placentaria, intestinal, de células germinales y hepática/hueso/riñón. Los osteoblastos son ricos en ALP y su actividad se eleva en la infancia y adolescencia, en fracturas óseas y enfermedades como hiperparatiroidismo. La osteocalcina es la mayor proteína no colágena del hueso y su

concentración en suero refleja la actividad osteoblástica, se encuentra en hueso y dentina, su incremento se asocia a la mineralización pero sus concentraciones no son siempre paralelas a la fosfatasa. La osteocalcina regula la homeostasis del calcio inhibiendo la precipitación de fosfato y calcio evitando la excesiva mineralización ósea. La mayor parte de esta proteína se incorpora a la matriz extracelular del hueso sin embargo una fracción es liberada a la circulación. El procolágeno es una molécula precursora del colágeno tipo I, su cuantificación nos da una idea de la velocidad de síntesis de la colágena tipo I, cualquier tejido que sintetiza este tipo de colágena libera propéptidos lo que hace a este marcador menos específico (Oryan, 2014).

Biomateriales para regeneración ósea

Un material ideal para regeneración ósea debe ser osteoconductor, osteoinductor, osteogénico y poseer características de osteointegración. La osteogénesis es la capacidad de producir hueso por medio de los osteoblastos al diferenciar células osteoprogenitoras presentes en el hueso o que vienen del material o injerto. La osteoinducción es la capacidad de los materiales o injertos de inducir la formación de hueso por medio de la diferenciación de células mesenquimales que rodean a los tejidos y producen células osteoprogenitoras y el desarrollo de osteoblastos. Esta habilidad ha sido descrita en factores de crecimiento como BMPs (por sus siglas en inglés *bone morphogenetic proteins*) como BMP-2 y BMP-7, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor derivado de plaquetas (PDGF). La osteoconducción es una característica mediante la cual el injerto actúa como un andamio permanente o reabsorbible, apoyando mecánicamente el crecimiento de vasos y hueso nuevo a partir de los bordes del defecto sobre sus superficies. Esta característica induce la formación de hueso nuevo. Por último, la osteointegración es la capacidad de unirse al hueso circundante sin una capa intermedia de tejido fibroso (Oryan, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

La habilidad de reemplazar un órgano o tejido mejora la calidad de vida de muchas personas, sin embargo la disponibilidad de elementos es sumamente limitado y como resultado de esto se ha incrementado el interés en el uso de materiales sintéticos que puedan generar función en los tejidos a largo plazo estando en contacto con el cuerpo o los fluidos corporales.

En los últimos años la investigación de ingeniería tisular, de estructuras artificiales que conduzcan a la construcción y regeneración de células y tejidos ha tenido grandes avances, sin embargo continúa siendo un reto ya que estas estructuras aún no presentan las propiedades mecánicas ideales para no colapsar durante el tratamiento ni durante las actividades normales del paciente. Atendiendo esta problemática se propone el desarrollo de un andamio que contenga nanotubos de carbono (NTC), siendo estos las nanopartículas más utilizadas en el refuerzo mecánico de andamios tisulares. Aunque existen investigaciones previas hasta el momento no se ha encontrado el soporte adecuado ni estudiado a profundidad la interacción de NTC y células troncales derivadas de médula ósea. Por ello, la combinación óptima de estos NTC así como el estudio de la biocompatibilidad, bioactividad y expresión génica a través de cultivos *in vitro* permitirá diseñar y fabricar un soporte que imite las propiedades del tejido óseo para establecer mecanismos adecuados para su producción y utilización en el área de la bioingeniería de tejidos. Por lo anterior se llega a la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es el nivel de biocompatibilidad, bioactividad y diferenciación en tejido óseo de las células troncales de médula ósea al sembrarse en andamios con NTC?.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la biocompatibilidad y bioactividad, así como la diferenciación de células troncales al ser sembradas en andamios de nanotubos de carbono.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Síntesis y caracterización de andamios de NTC.
2. Obtención de respuestas de adhesión y viabilidad celular de las células troncales derivadas de médula ósea.
3. Evaluar bioactividad de las células troncales derivadas de médula ósea en modelos de diferenciación celular.
4. Caracterización del tejido mineral depositado.

5. HIPÓTESIS

La adhesión, proliferación y diferenciación al fenotipo osteoblástico de células troncales se incrementará al ser sembradas en andamios de nanotubos de carbono.

CAPÍTULO II

6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

6.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopia electrónica de barrido SEM (por sus iniciales en idioma inglés *Scanning Electron Microscopy*) es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional que se utiliza ampliamente en el estudio de semiconductores, nanopartículas, modificación de productos comerciales, catálisis heterogénea, películas delgadas, física de nanocomposiciones, fotoelectroquímica y biomateriales. En un equipo SEM se genera un haz de electrones de alta energía o electrones incidentes (*E_i*) y se usa un sistema de lentes para focalizar el haz y hacerlo incidir sobre una muestra, la cual generará, electrones denominados secundarios y retrodispersados como respuesta al impacto electrónico, dichos electrones que salen de la muestra son detectados mediante dispositivos *Everhart-Thornley* y *SED (Solid State Detector)* que registran electrones y los convierten en una señal digital que se interpreta como intensidad de color, para construir una “imagen”. Cuando el haz de electrones impacta en la muestra, se generan dos tipos de electrones: electrones secundarios y retrodispersados. Cada una de estas señales brinda información diferente acerca de la muestra, dado que se generan a partir de procesos diferentes. Los electrones secundarios se generan por la colisión de los electrones incidentes con los átomos superficiales de la muestra, son electrones de baja energía y como provienen de la superficie pueden escapar con información de la morfología de la muestra (información topográfica). Son mayores en número en comparación a los electrones incidentes. Por otro lado, los electrones retrodispersados son electrones que alcanzan zonas más internas de la muestra y generan información acerca de la muestra debido a que chocan con campos magnéticos de los núcleos atómicos de la muestra y pueden ser desviados con ángulos mayores de 180° de forma que pueden escapar de la superficie. Debido a la alta resolución que puede lograrse en SEM es posible conocer las características más detalladas de un

material, su estructura cristalina, morfología superficial y composición química (Herrero-Latorre, 2015).

6.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Una de las formas de estudiar y caracterizar materiales nanoestructurados es mediante el uso de técnicas espectroscópicas, existen diversos tipos y se basan en el principio de que la luz o la radiación incidente sobre un material pueden transmitirse, reflejarse o absorberse. La espectroscopia estudia la interacción entre esta radiación electromagnética y la materia. Mediante estas técnicas podemos identificar una molécula específica y conocer sus cambios estructurales. La espectroscopia Raman ha sido utilizada para estudiar el carbono en sus diversas formas alotrópicas: diamante, grafito, fullerenos y nanotubos de carbono. Los cambios en las frecuencias de las bandas se asocian al estado de la molécula y reflejan propiedades acerca de la calidad o simetría, además brindan información acerca de la estructura electrónica y vibracional de los nanotubos de carbono, haciéndola una técnica no invasiva. Diversos autores destacan la importancia de esta técnica como instrumento para la normalización y control de calidad industrial de los nanotubos de carbono. Las propiedades de los nanotubos de carbono pueden estar relacionados con los modos de vibración en los espectros Raman que resultan de los fotones dispersados producidos cuando la muestra se somete a una fuente de luz láser intensa. La espectroscopia Raman también se ha utilizado para la determinar la estructura y dimensiones, ya que es posible obtener diferentes estructuras en función de cómo se enrollan las hojas de grafeno para crear un nanotubo de carbono. Sin embargo, estas mediciones se ven afectadas por la energía del láser utilizado y la necesidad de utilizar diferentes líneas de excitación láser es un inconveniente para este enfoque (Herrero-Latorre, 2015).

6.3 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica que mide la absorción de la radiación por vibraciones fotónicas de alta frecuencia (en la región óptica) y que también es sensible a la presencia de determinados grupos funcionales cada uno de los cuales absorbe la radiación a una frecuencia característica. El espectro electromagnético se puede dividir en tres zonas:

IR cercano de $12800\text{-}4000\text{cm}^{-1}$, IR medio de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ e IR lejano de $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$. El IR medio es donde se encuentran la mayoría de las aplicaciones comunes. Un espectro IR por transmisión se obtiene haciendo pasar radiación a través de una muestra y determinando que fracción de esa radiación incidente ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada pico en un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula. Los espectros son a menudo complicados y resulta difícil asignar cada una de las bandas que aparecen en ellos a movimientos atómicos específicos. Esto no es siempre necesario para extraer información muy valiosa, de modo que el conocimiento “incompleto” de los espectros no disminuye su utilidad para realizar análisis cuantitativos y cualitativos. De hecho, la espectroscopia IR junto a la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear, forman la base del análisis orgánico cualitativo contemporáneo centrado en la identificación de la estructura molecular de compuestos y mezclas desconocidas. También es cada vez mayor relevancia del IR en el campo del análisis cuantitativo, en el que la estimación de contaminantes atmosféricos provenientes de los procesos industriales ocupa un lugar relevante. IR se ha empleado para evaluar las impurezas resultantes de la síntesis y detectar la presencia de moléculas orgánicas en la superficie de nanotubos. La mayoría de las aplicaciones de IR y FT-IR se han dirigido a la caracterización de modificaciones superficiales (Lehman, 2011), (Herrero-Latorre, 2015).

6.4 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

Un análisis térmico comprende el estudio del comportamiento de una muestra cuando ésta es sometida a un calentamiento por altas temperaturas. La medida del cambio de masa al aumentar la temperatura se registra de manera continua en función del tiempo y nos proporciona información acerca de la estabilidad de un material así como sus condiciones de oxidación o degradación. En el análisis termogravimétrico (por sus siglas en inglés Termogravimetric Analysis, TGA) existe una temperatura de iniciación a la cual la muestra comienza a descomponerse y una temperatura de oxidación que es el punto máximo de pérdida de masa. La temperatura de oxidación de los MWCNT oscila de $450\text{ a }600^{\circ}\text{C}$, esta puede disminuir de acuerdo al diámetro y ancho de los nanotubos. Este análisis se utiliza

para analizar la calidad de los nanotubos de carbono, es una técnica destructiva que proporciona información acerca de la estabilidad térmica y una estimación cuantitativa de la pureza de la muestra sobre la base de la distribución de las temperaturas de la quema de los nanotubos. El polvo de CNT puede ser analizado sin la necesidad de preparación especial de la muestra, para evaluar las cantidades de carbono amorfo, metales de los catalizadores. A partir de estos parámetros el TGA se ha utilizado con éxito para caracterizar y comparar los NTC fabricados y para evaluar las consecuencias de los cambios durante algún proceso al que sean sometidos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las temperaturas oscilan TGA quema podrían ser influidos por el número de paredes en el NTC, por el catalizador utilizado en la síntesis, por los defectos en su superficie y por las impurezas en la muestra, tales como carbono amorfo y partículas de grafito entre otros (Herrero-Latorre, 2015). Los MWCNTs altamente cristalinos han demostrado ser más resistentes a la oxidación en comparación con otras formas de carbono como el diamante, grafito y C60. La estabilidad térmica se atribuye directamente a la unión aromática dentro de la estructura MWCNT, pero puede ser influido por el número de paredes, la presencia y la composición de catalizador, los defectos dentro de los tubos y la presencia de otros materiales dentro de la muestra (es decir, carbono amorfo, partículas de grafito). La derivada de la curva de pérdida de peso a menudo puede dar información acerca de la calidad de la materia a través de los picos de oxidación (Lehman, 2011).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 SÍNTESIS DE MATERIALES HÍBRIDOS PTFE-NTC

Para obtener los nanotubos de carbono se llevó a cabo la síntesis por medio de radiación con microondas. Para la síntesis se utilizaron rectángulos teflón politetrafluoretileno (PTFE) de 25 mm x 5 mm. Estos rectángulos se enrollaron sobre sí mismos aplicando presión para poderlos cubrirlos uniformemente con una capa delgada de nanotubos de capa múltiple (MWNT). Los rectángulos de teflón enrollados fueron introducidos en un tubo de vidrio de borosilicato, de tal manera que el cilindro de teflón se ajustara al tubo. Al tubo se le agregaron 10 µl de la solución (H₂O-H₂O₂) los tubos se sellaron en vacío dinámico de 10-3 Torr obteniendo ampollas cerradas. Posteriormente las ampollas se sometieron a tiempos de radiación por medio de un microondas convencional con una potencia de salida de 1100W y frecuencia de 1.54 GHz, durante 90 segundos y con ello se obtuvo su depósito sobre la superficie de teflón. Una vez irradiadas las muestras se sometieron a baño de ultrasonido marca Branson 2510, utilizando isopropanol (99.5%) por 10 minutos y dos lavados con agua bidestilada de 10 minutos cada uno. Finalmente se prensaron a una fuerza de 2 Ton durante un lapso de 15 minutos, con el fin de re-aplanar las muestras de teflón con los nanotubos sobre la superficie.

7.2 CARACTERIZACIÓN DEMATERIALES HÍBRIDOS PTFE-NTC

La caracterización del andamio se realizó por medio de las siguientes técnicas: SEM, TGA, Espectroscopias IR y Raman. En todas las técnicas se analizará el polvo de MWCNT, PTFE y el híbrido de PTFE-NTC.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La utilización de SEM fue propuesta para analizar las características superficiales de nuestros materiales y observar características topográficas como tamaño, longitud y uniformidad del andamio.

Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-670IF y JEOL JSM-5900. La evaluación de las superficies se llevó a cabo realizando mapeos en diferentes zonas de la muestra a 20 keV. Se analizaron MWCNT en polvo, PTFE y PTFE-NTC (andamio de NTC), las muestras necesitaron un recubrimiento con oro para su visualización.

Espectroscopia Raman

El análisis de las muestras por espectroscopia Raman fue con el objetivo de encontrar las bandas características de nuestros materiales y determinar los cambios existentes posteriores a la síntesis de nuestro andamio.

El análisis se realizó en un espectrómetro Almega XR Dispersive Raman equipado con un microscopio Olympus BX52, utilizando un objetivo Olympus x10 (N.A. =0.25) para enfocar el haz del láser sobre la muestra (con un diámetro del área efectiva de $\sim 3 \mu\text{m}$) y para coleccionar la luz dispersada en una configuración de 180° de backscattering. La luz dispersada fue coleccionada por una cámara CCD enfriada termoeléctricamente a -50°C . El espectrómetro cuenta con una rejilla (2400 líneas/mm) para resolver la radiación dispersada y un filtro

notch para bloquear la luz Rayleigh. La abertura del monocromador fue de 50 nm. Los espectros Raman fueron acumulados por más de 25 segundos con una resolución mayor a 2 cm^{-1} . La fuente de excitación fue de 532 nm proveniente de un láser Nd: YVO4 incidiendo sobre la muestra con una potencia de $\sim 8\text{ mW}$. El análisis se efectuó en aire a presión y temperatura atmosférica. Las muestras para esta técnica no requirieron tratamiento debido a que permite el análisis de los materiales en polvo (NTC) o una porción sólida en el caso del PTFE.

Espectroscopia Infrarroja

El análisis se realizó en un espectrómetro Nexus 670 FTIR de Thermo-Nicolet, equipado con un microscopio Olympus BX52, utilizando un objetivo Olympus $\times 10$ (N.A. =0.25) para enfocar la muestra y un colector de reflexiones internas, en el modo de reflexión en micro-IR. Para obtener el espectro infrarrojo de las muestras se elaboraron pastillas con MWCNT en polvo y KBr, la muestra de PTFE y PTFE-NTC no necesitaron tratamiento previo al análisis.

Análisis termogravimétrico

El análisis se realizó en un equipo Netzsch STA Jupiter 414 con flujo de calor, en una atmósfera de aire a 50 ml min^{-1} y una rampa de temperatura lineal de 5°C min^{-1} . Las muestras que se analizaron fueron MWCNT en polvo, Politetrafluoretileno (PTFE) y el híbrido de PTFE-NTC.

7.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Cultivo Celular

Para llevar a cabo el análisis de biocompatibilidad y bioactividad celular en los andamios de NTC sintetizados (PTFE-NTC), se utilizaron células troncales derivadas de médula ósea donadas por el Dr. Juan José Montesinos de la Unidad de Investigaciones Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las células BM-MSC (por sus siglas en inglés *Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells*) se mantuvieron en un medio de cultivo α -MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomina 100 μ g/ml y fungisona 0.3 μ g/ml), 2mM de glutamina y 50mM de aminoácidos no esenciales. Para la propuesta experimental se utilizaron cultivos celulares en el tercero y sexto pasaje. Los cultivos se mantendrán 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.

Ensayo de adhesión celular

Para establecer el efecto de andamios PTFE-NTC sobre la adhesión celular se cultivaron células troncales BM-MSC sobre la superficie de los andamios en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de 1×10^4 durante 4 y 24 horas. Posterior al tiempo de sembrado las células que no se adhirieron a los andamios fueron removidas por medio de tres lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos). Las células adheridas a los andamios fueron fijadas con 4% de paraformaldehído. La adherencia celular se evaluó de acuerdo al método de cristal violeta, las células fijadas fueron incubadas con 0.01% de cristal violeta por 10 minutos, lavadas 3 veces con agua bidestilada para remover el colorante no específico y posteriormente el colorante fue extraído con 500 μ L de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. De la solución obtenida se tomaron 100 μ L que se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA y fue leído en un lector de placas a una absorbancia de 570nm. Los valores de la absorbancia obtenidos fueron extrapolados de acuerdo a una curva estándar para determinar la cantidad de

células o el porcentaje de células adheridas a los andamios. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre la placa de cultivo y sobre superficies de teflón sin presencia de NTC. Los experimentos de adhesión celular se realizarán por triplicado, repitiéndose por lo menos tres veces.

Interacción célula-material

La interacción de las BM-MSC con los nanotubos de carbono se llevó a cabo sembrando una concentración de 1×10^4 sobre los andamios e incubados durante 24h. Posteriormente para visualizar la interacción células BM-MSC-NTC se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron con PBS y se deshidrataron en series crecientes de etanol en PBS (25, 50, 75, 90 y 100%). Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente y se sometieron a un recubrimiento metálico con oro por 5 minutos. La morfología de las células al interactuar con los andamios fue observada por la técnica de SEM a bajo voltaje para obtener imágenes buscando los puntos de adhesión celular.

Ensayo de viabilidad celular

Para determinar la influencia que presentan los NTC sobre la proliferación celular se utilizó el kit PrestoBlue Cell Viability Reagent (Life Technologies). El reactivo Presto Blue esta compuesto por una sal de resazurina que funciona como un indicador de la viabilidad celular utilizando el poder reductor de las enzimas deshidrogenasas tanto mitocondrial como citosólicas de las células vivas para medir cuantitativamente la proliferación de las células. El reactivo está compuesto por un elemento permeante a las membranas de color azul y virtualmente no fluorescente. Cuando se añade a las células el reactivo es modificado por el ambiente reductor de las células viables, se vuelve de color rojo y se convierte en altamente fluorescente. Este cambio se puede detectar usando mediciones de fluorescencia o absorbancia a 570 y 630nm. Para nuestro estudio de viabilidad/proliferación las células BM-MSC fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 células/mL por triplicado en los andamios de NTC durante 3, 7 y 9 días de cultivo celular. Después de cada periodo

experimental, las células fueron incubadas con la solución de PrestoBlue por adicionarles 50 μL e incubarlos a 37°C por 4 horas. Pasado este tiempo se tomaron del sobrenadante 200 μL y se depositaron en una placa de 96 pozos para ser llevado a lectura en un espectrofotómetro de ELISA, para obtenerse la densidad óptica a una longitud de onda de excitación de 570 nm y de emisión de 600 nm. Debido a que la generación del producto es directamente proporcional a la actividad oxidativa de las enzimas deshidrogenasas, una disminución en los valores que se obtengan de la reducción del reactivo nos indicaría una medida de la viabilidad celular sobre los NTC. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre las superficies de teflón sin presencia de NTC.

Ensayos de Bioactividad celular

La determinación de la bioactividad celular se efectuará por medio de modelos específicos de diferenciación en donde el objetivo es determinar el potencial de diferenciación de las células BM-MSC bajo la influencia inductiva de un medio biomineralizante. El medio para inducir la diferenciación celular hacia el fenotipo osteoblástico contiene 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato, 10^{-7}M de dexametasona. La determinación de la diferenciación celular se realizará por medio de ensayos enzimáticos y análisis del tejido mineralizado

Ensayos de actividad de la fosfatasa alcalina:

Para determinar la bioactividad celular de las BM-MSC sobre los andamios PTFE-NTC se llevó a cabo el ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (ALP). LA fosfatasa alcalina es una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que libera fosfato al medio.

Para evaluar la presencia de ALP en las células se sembraron BM-MSC 1×10^4 células/mL durante 3, 5, 7, 14 y 21 días y por triplicado. Al término de cada periodo experimental de incubación las células se lavaron con PBS y se sonicaron para extraer las capas celulares en una solución amortiguadora con 10mM de Tris-HCL pH 7.4 más 0.1% de tritón X-100 con la

finalidad de facilitar el desprendimiento de las células sobre los andamios. Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo transfiriendo 50 μ l de cada muestra a uno de los pozos del plato de cultivo de 96 y adicionando 30 μ l de la solución activadora de la enzima incluye 2 mM de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) en una solución amortiguadora Tris-HCl con un pH de 9.8 y enseguida agregando 50 μ l de p-nitrofenil fosfato (PNP) a una concentración de 8mM y se incubó a 37°C por 60 minutos para que se lleve a cabo la reacción enzimática. La reacción se detuvo añadiendo 20 μ L de 0.05 N de hidróxido de sodio (NaOH) y se realizaron mediciones de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm para medir la cantidad de producto p-nitrofenol, compuesto que cambia a color amarillo en solución alcalino.

Caracterización de Tejido Mineral Depositado:

Para determinar las características de la fase mineral formada por las células BM-MSc que se mantuvieron en diferenciación hasta 21 días sobre los andamios de PTFE- NTC, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) para obtener imágenes del tejido mineral depositado.

7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existe un efecto de los andamios PTFE-NTC en la respuesta biológica, adhesión, proliferación y actividad de ALP se realizó un análisis estadístico con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Las gráficas se representan con una desviación estándar para cada uno de los grupos y cada ensayo se analizó a través de ANOVA para tres factores con n réplicas. Donde nuestros factores se dividen en:

- Tipo de material: PTFE y PTFE-NTC
- Días: 3, 5, 7, 14 y 21
- Tipo de medio: Normal y Osteogénico

Los valores se reportan con una $p < 0.05$, adicionalmente se realizó una corrección de Tukey para poder analizar los datos en los grupos y entre los grupos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 SÍNTESIS DE HÍBRIDO PTFE-NTC

Existen diferentes técnicas para producir nanomateriales tales como autoensamblaje, electro-hilado de nanofibras y nanotubos, electro-pulverización de nanopartículas y crecimiento en plantillas utilizando surfactantes, polímeros y zeolitas. Algunas de las reacciones se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente pero algunas veces deben llevarse a cabo a temperaturas elevadas para iniciar las reacciones, este aumento de temperatura puede conseguirse por calentamiento volumétrico convencional o calentamiento por microondas. La desventaja del calentamiento volumétrico convencional es la baja transferencia de calor eficiente de las fuentes de calor sobre los reactivos, por su parte la radiación por microondas trabaja en cada una de las moléculas y proporciona un proceso de calentamiento más homogéneo y selectivo (Zhang, 2012). En nuestro método de síntesis al utilizar este tipo de calentamiento por microondas logramos obtener un andamio de nanotubos de carbono (MWCNT) depositados en membranas de PTFE. Debido al aumento de la temperatura provocado por la radiación los nanotubos lograron incrustarse sobre el teflón. En la figura 1 observamos los MWCNT en polvo envasados que se utilizaron para la síntesis del andamio. Una vez recubierto el teflón con los NTC las muestras se sellaron al vacío en un tubo de borosilicato (Figura 9) para posteriormente ser sometidas a radiación de microondas por 90 segundos y obtener los andamios.

Al comparar el método de síntesis de nuestro andamio con otras técnicas utilizadas tanto para sintetizar nanotubos como para la formación de andamios, esta técnica asistida por microondas permite la síntesis de un material híbrido al juntar un polímero (PTFE) y un material orgánico, los nanotubos de carbono, que juntos permiten su utilización como andamio. Se sabe que los compuestos híbridos son una clase de material formados por la combinación de estructuras orgánicas e inorgánicas y tienen como propósito crear materiales de alto rendimiento y funcionalidad. Al estar formados por dos o más componentes que difieren físicamente pueden presentar propiedades mejoradas en

comparación con las obtenidas por sus contrapartes individuales homogéneas. En el caso de los sustratos sintetizados se logran mejores características conservando la naturaleza de cada material y obteniendo una lámina PTFE revestida por una capa de nanotubos de carbono. Adicionalmente en este método no es necesario la adición de sustancias como ácidos utilizados en muchas otras técnicas, los cuales se ha demostrado aumentan la toxicidad de los NTC (Dong, 2012).

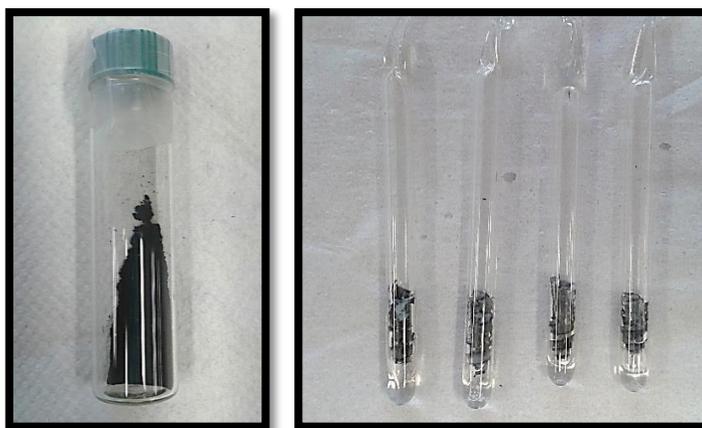


Figura 9. MWCNT prístinos en polvo y sustrato híbrido (PTFE-NTC) sellados al vacío en tubos de borosilicato.

Para la producción de materiales de carbono se requiere temperatura elevada y presión, así como, procesos de alta densidad de corriente, en otras palabras es un método que requiere de gran energía. El calentamiento por microondas es muy conocido en el área de la industria y la ciencia así como en aplicaciones médicas por su mayor eficiencia en comparación con el calentamiento térmico convencional, consideración importante para determinar el uso de esta técnica. Existen muchas ventajas en la utilización de la tecnología de microondas para la fabricación de materiales nanoestructurados, la alta eficiencia en proceso de calentamiento, simplicidad de la instrumentación y el comienzo rápido de las reacciones lo que genera una reducción de tiempo y energía, produciendo así nanocarbonos con un costo mucho menor. Así mismo existen algunas desventajas en este sistema, el calentamiento por microondas de los materiales conductores aumentará en un par de segundos a más de 1000°C por lo que es necesario conocer el material que va a utilizarse y saber la temperatura

que puede alcanzar y si es capaz de soportarlo sin sufrir cambios en su estructura (Zhang, 2012).

8.2 CARACTERIZACIÓN DE HÍBRIDO PTFE-NTC

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Los resultados obtenidos de la caracterización realizada con SEM se describen a continuación y se hace referencia a las imágenes analizadas. Se obtuvieron diferentes ampliaciones para el análisis de la morfología y microestructura del material, se analizaron los nanotubos de carbono en polvo (MWCNT), teflón (PTFE) y el híbrido (PTFE-NTC) con la finalidad de comparar las diferencias entre los materiales y efectuar conclusiones acerca del cambio estructural posterior a la síntesis.

La Figura 10 muestra una micrografía de los MWCNT en polvo los cuales presentan morfología nanoestructurada y una longitud micrométrica. De acuerdo a las referencias bibliográficas se ha demostrado que los NTC forman aglomerados y no se dispersan, esto es posible observarlo en la Figura 3 debido a la ampliación a 10, 000X (Cheng, 2011). Es difícil establecer un parámetro para medir con exactitud el tamaño de cada nanotubo, ya que en un par de micras tenemos depósitos de cientos de nanotubos y no podemos observarlos de forma individual, por lo que no se determinaron medidas exactas de tamaño y longitud, sin embargo se concluyen medidas aproximadas. La Figura 11 corresponde a un acercamiento de la imagen anterior donde observamos la barra a 100 nm y nos permite observar con detalle la estructura topográfica de los nanotubos así como su distribución. Puede observarse algunos nanotubos como en un primer plano en tonalidades cercanas al blanco y otros más al fondo de la imagen con tonos más oscuros. Todas las micrografías se compararon con las reportadas en la bibliografía (Bhattacharya, 2010).

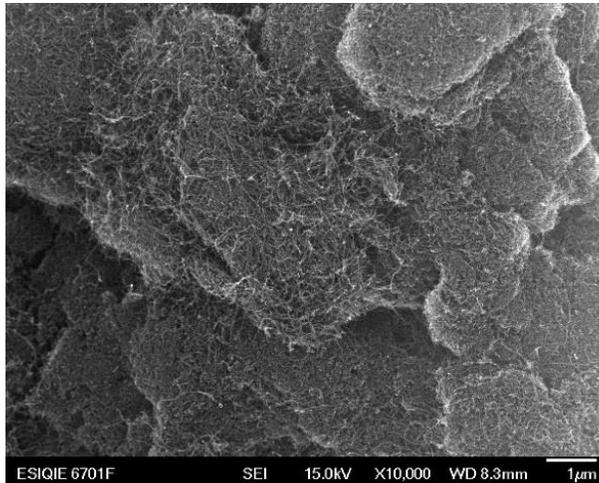


Figura 10. Imagen de Microscopio electrónico de Barrido (SEM) de una muestra de MWCNT prístinos en polvo, los nanotubos forman aglomerados.

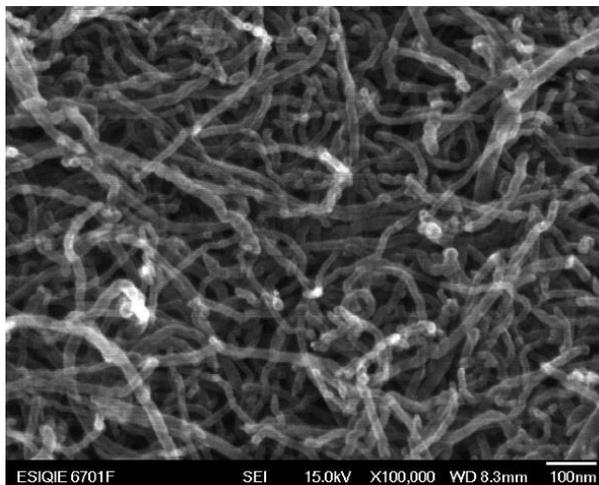


Figura 11. Microfotografía a mayor aumento de los MWCNT prístinos donde observamos con mayor detalle las características topográficas de la muestra.

El politetrafluoroetileno (PTFE) es una macromolécula fluoroalcano con una amplia gama de aplicaciones. Es bien conocido por su hidrofobicidad, ser excelente aislante eléctrico y poseer una gran estabilidad química (Laird E. B., 2013). En la Figura 12 se observa una imagen SEM del PTFE y observamos una estructura plana y libre de rugosidades. La tonalidad en gris es semejante en toda la imagen lo cual nos indica que el material es uniforme. Para la observación en el microscopio no fue necesario el recubrimiento con oro.

Diversos estudios realizados con este polímero para la construcción de biomateriales han caracterizado este material por medio de SEM (Lu, 2012).

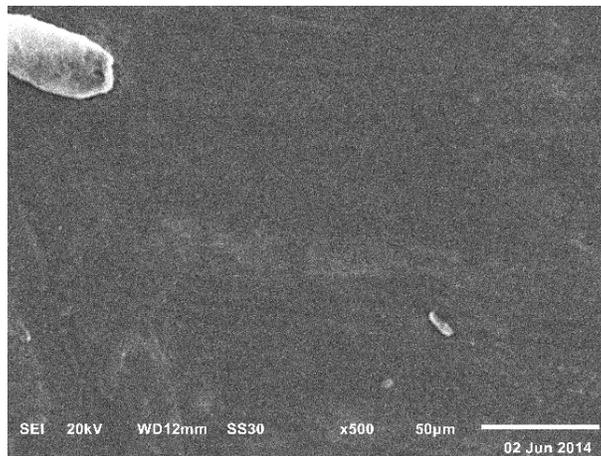


Figura 12. Micrografía de politetrafluoretileno (PTFE) cuya topografía se relaciona a la tonalidad gris que semejante a través de la imagen.

En la Figura 13 se observa el andamio sintetizado PTFE-NTC y la distribución monótona de los nanotubos sobre la lámina de teflón. La deposición se observa distinta en comparación a la microfotografía de los nanotubos en polvo, por lo que se considera probable que se han acumulado unos nanotubos sobre otros y se encuentren a su vez adheridos al teflón. A pesar de seguir observando cúmulos de nanotubos como en la Figura 13 estos aglomerados se disipan y tenemos un acomodo más aplanado. Existen reportes previos de la deposición de NTC sobre polímeros lo cual genera un andamio con el que se obtienen buenas respuestas en ensayos celulares (Pan, 2012), (Abarrategi, 2007). Por esto se piensa que a la topografía obtenida en nuestro andamio PTFE-NTC ayudará en la proliferación y adhesión celular de las BM-MSC.



Figura 13. Micrografía del híbrido PTFE-NTC sintetizado con radiación por microondas. Se observa la deposición de los MWCNT sobre el PTFE.

En un aumento de la imagen anterior a 80,000X (Figura 14) se observa que la estructura nanométrica de los nanotubos prevalece y podemos analizar con detalle que ya no se observan los nanotubos en diferentes planos como en los MWCNT en polvo, más bien parecen estar incrustados al teflón y adquieren visualmente una tonalidad más homogénea en la imagen.

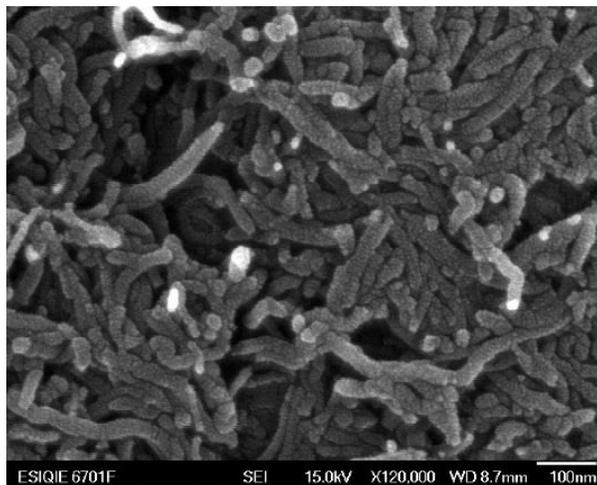


Figura 14. Micrografía del híbrido PTFE-NTC a un mayor aumento donde se evidencia el diámetro nanométrico de los nanotubos y su disposición sobre el PTFE.

Espectroscopia Raman

Los análisis de Espectroscopia Raman que se presentan a continuación corresponden a los dos materiales prístinos para crear el andamio (MWCNT en polvo y PTFE), así como el sustrato sintetizado (PTFE-NTC) que contiene los dos materiales antes mencionados. Por medio de esta técnica se localizan las bandas características de cada material. El análisis de los MWCNT muestra los modos vibracionales de los nanotubos de carbono: **D**, **G** y **G'** cuya localización coincide con la reportada en la bibliografía, la cual se presenta en la Tabla 1 (Lehman, 2011).

Tabla 1. Principales modos Raman de MWCNT mediante técnica espectroscópica Raman de acuerdo a la bibliografía (Lehman, 2011).

Modos de vibración	Número de onda (cm ⁻¹)
Banda D	1350 cm ⁻¹
Banda G	1589 cm ⁻¹
Banda G'	2700 cm ⁻¹

En la Figura 15 se observa el espectro Raman de los MWCNT y los modos vibracionales importantes detectados en los alótropos del carbono, la banda D y G. La banda característica de primer orden banda G, se encuentra a 1589 cm⁻¹ y permite definir a los nanotubos como semiconductores o metálicos, compuesta por varios picos que están relacionados con el efecto de la curvatura que rompe la simetría de los nanotubos. Esta banda se encuentra en todas las muestras, tanto en los nanotubos prístinos como en los híbridos PTFE-NTC y está relacionada con el estiramiento-encogimiento (“stretching”) de enlaces C-C hibridizados en sp². La presencia de esta banda es característica de materiales a base de grafito que han alcanzado un grado de cristalinidad. La banda D corresponde a procesos dispersivos de segundo orden y está relacionada a enlaces sp³. Se encuentra a 1352 cm⁻¹. Son fonones activos que tienen un origen relacionado con la pérdida de simetría debido al tamaño finito de los cristales, se activa cuando existen elementos inductores de desorden que disminuyen la simetría de la red. Ambas bandas (D y G) elongadas tangencialmente están presentes en los espectros de las muestras naturales y los híbridos.

Las bandas coinciden con las descritas en la bibliografía aunque existen cambios evidentes en términos de intensidad y elongación debido a variables como cantidad de material y equipo que se utiliza para analizarlo, así como características propias del material descritas anteriormente (Lehman, 2011), (Khanderi, 2010).

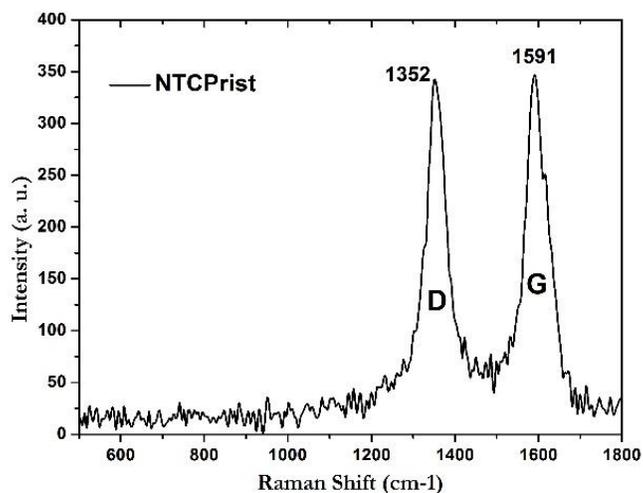


Figura 15. Espectro Raman de MWCNT prístinos donde se observan los modos vibracionales D y G características del material.

El politetrafluoretileno (PTFE) también conocido como teflón tiene una composición química de unidades repetidas de $(-CF_2-CF_2-)_n$, se forma a partir del monómero tetrafluoretileno y su característica más particular es el acomodo de los átomos de flúor en la superficie como se muestra en la Figura 16 lo que dificulta la interacción del teflón con otras moléculas (Laird E. D., 2013).

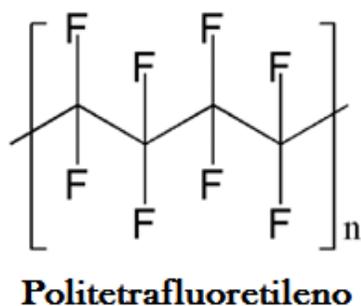


Figura 16. Estructura molecular de PTFE (Imagen de *Mechanistical studies on the electron-induced degradation of polymers*).

En el espectro del PTFE se presentan bandas que de acuerdo a su intensidad se dividen en: baja, media y altas. Cada una de estas bandas corresponde a los modos vibracionales de las moléculas de Carbono y Flúor. En la Tabla 2 se enlistan las bandas encontradas durante la caracterización de este polímero y sus correspondientes interacciones entre las moléculas del teflón, las cuales fueron comparadas con las descritas en la bibliografía (Mihály, 2006).

Tabla 2. Modos vibracionales de PTFE en espectro Raman de acuerdo a la bibliografía (Mihály, 2006).

Modos de vibración	Número de onda (cm ⁻¹)
CF (extensión)	1386 m
CF ₂ (asimétrico)	1305 m, w
CC (extensión)	1222 w
CF ₂ (extension simétrica)	736 vvs
CF ₃ (deformación simétrica)	488
CF ₂ (girado)	387 s
CF ₂ (movimiento)	293 s

La figura 17 representa el espectro de PTFE donde observamos modos vibracionales activos de baja intensidad en 293, 387 y 488 cm^{-1} , estas mismas bandas prevalecen tras la síntesis del híbrido PTFE-NTC.

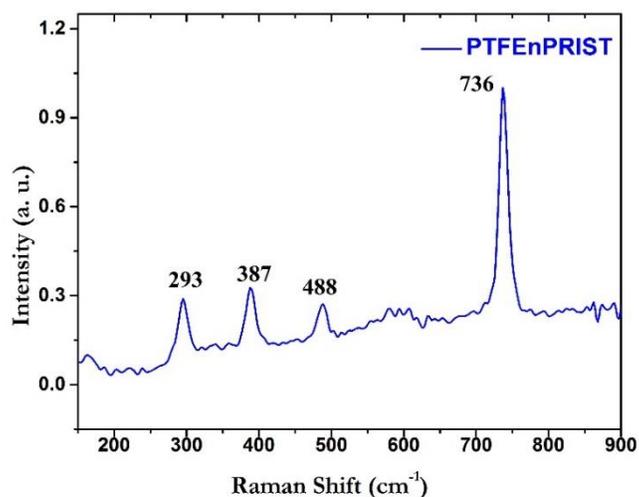


Figura 17. Espectro Raman de PTFE donde se observan bandas de baja intensidad en un rango de 200 a 500 cm^{-1} y una banda de intensidad alta en 736 cm^{-1} .

En la figura 18 y 19 se observa a 736 cm^{-1} una banda elongada, peculiar por su gran intensidad y será evidente su prevalencia en los híbridos sintetizados. Estos espectros se utilizan para evaluar el grado de desorden y la naturaleza de los enlaces químicos circundantes.

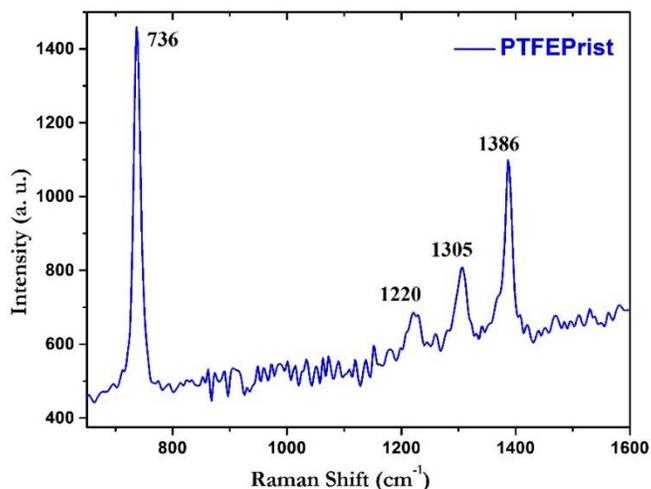


Figura 18. Modos vibracionales de PTFE con bandas de intensidad media, baja y alta.

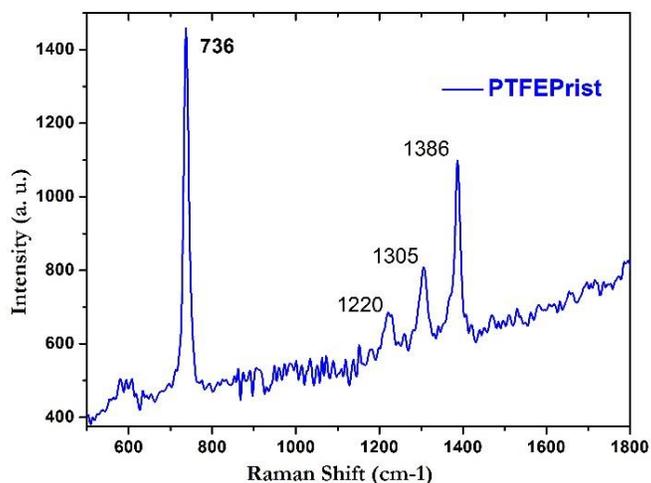


Figura 19. Espectro Raman de PTFE donde se observan las bandas características de intensidades baja, media y alta.

En la figura 20 se localiza a 2700 cm^{-1} el modo vibracional correspondiente a la banda G' cuya intensidad disminuye en los híbridos, esto se relaciona con la cantidad de material que tenemos en cada muestra, siendo mucho menor la cantidad de nanotubos en los híbridos que cuando se analiza únicamente el polvo de MWCNT. La banda G' es menos sensible a los defectos y se utiliza para extraer información acerca de la magnitud de la anisotropía de los niveles de equi-energía electrónicos y fonónicos. La frecuencia, intensidad y anchura de las

bandas D y G' aportan información sobre la estructura electrónica y fonónica, tales propiedades espectrales varían dependiendo de las condiciones mecánicas de tensión por estiramiento o compresión y la temperatura a la que se encuentran sometidos los NTC (Lehman, 2011).

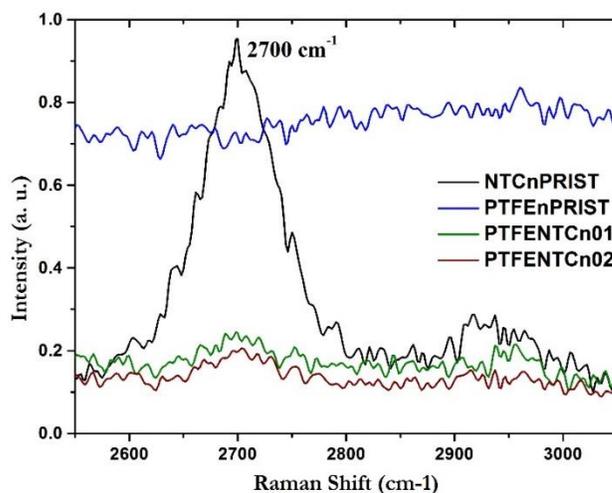


Figura 20. Espectro Raman de MWCNT (negro) donde encontramos a 2700 cm^{-1} la banda G' presente también en los híbridos PTFE-NTC (verde y rojo) en los cuales la banda disminuye su intensidad.

Posterior a la síntesis del PTFE-NTC con radiación por microondas se localizaron las bandas tanto del teflón como de los nanotubos. En la figura 21 observamos la banda G y D en nuestro híbrido, ambas con una intensidad mucho menor respecto al prístino, consecuencia de una menor cantidad de material existente. Adicionalmente la banda G cambia de ser una banda elongada y se ensancha en el espectro del PTFE-NTC debido a las condiciones a las que se someten los nanotubos de carbono durante la radiación por microondas. Como recordamos la banda G representa la simetría que brinda la curvatura de los nanotubos. En la Figura 22 se muestra con detalle la banda d a 1350cm^{-1} la cual prevalece con la evidente disminución de su intensidad.

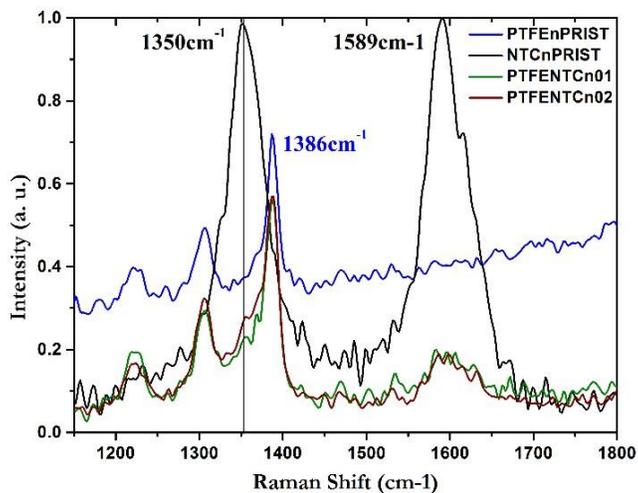


Figura 21. Espectro Raman de MWCNT (negro), PTFE (azul) y dos muestras del híbrido PTFE-NTC (verde y rojo).

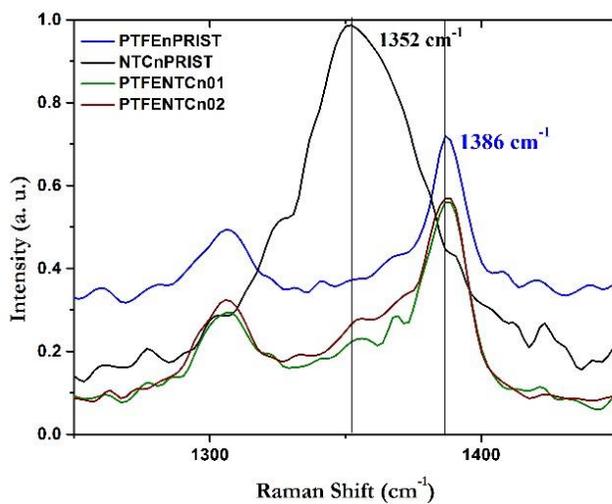


Figura 22. Acercamiento de Espectro Raman donde se observa con mayor precisión la banda D y su disminución en los híbridos (rojo y verde) así como ensanchamiento de la misma.

Espectroscopia Infrarroja

El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta. Entre muchas otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia. En la figura 23 se muestran los espectros del PTFE y los NTC prístinos, el espectro está normalizado respecto a los NTC para poder compararlo. Al igual que en el espectro Raman, en IR existen para el PTFE bandas de alta, media y baja intensidad, esto se relaciona a que cuanto más fuertes o rígidos son los enlaces químicos mayores son las frecuencias observadas y le corresponden un mayor número de bandas debido a que las vibraciones en moléculas poliatómicas son mucho más complejas. Se observa una banda de gran intensidad formada de varios picos a 2384cm^{-1} correspondiente a una banda característica del teflón, dos bandas más (de baja densidad) aparecen a 2923 y a 3548cm^{-1} , éstas se compararon con las descritas en la bibliografía determinando las similitudes existentes (Mihály, 2006), (Tu, 2006), (Chuo, 2013).

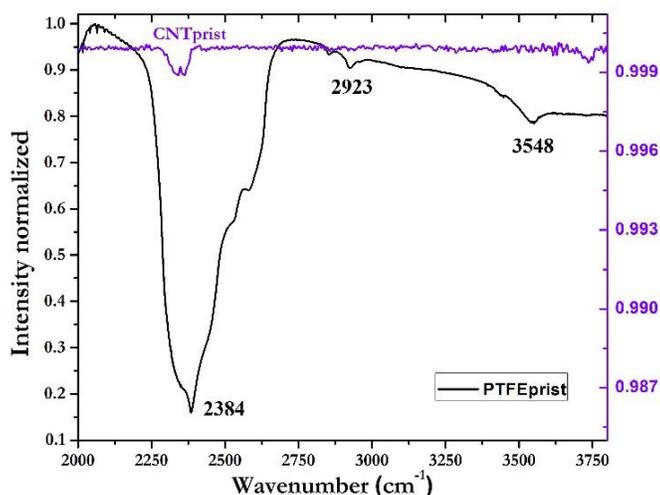


Figura 23. Espectro Infrarrojo de CNT (morado) y PTFE (negro) en este último se observa una banda de mayor intensidad a 2384cm^{-1} .

La Tabla 3 muestra los principales modos vibracionales reportados en la bibliografía para PTFE (Courtney, 2010). En la Figura 24 observamos los espectros de nuestros sustratos híbridos, los cuales preservan los modos vibracionales correspondientes al PTFE, existe una variación en sus intensidades consecuencia de la cantidad de material utilizado para cada prueba. Observamos también una banda muy ancha observada a partir de 1100 y hasta 1300 cm^{-1} , esta anchura puede deberse a la saturación del material, para poder obtener un análisis más detallado sería necesario una menor cantidad de nanotubos lo cuales impiden la observación con mayor detalle del material. La Figura 25 nos muestra la banda característica a 2384 cm^{-1} en nuestros híbridos, así como el resto de las bandas de baja intensidad (Chuo, 2013).

Tabla 3. Modos vibracionales del Politetrafluoretileno (PTFE) en espectroscopia IR de acuerdo a la reportada en la bibliografía.

Modos de vibración	Número de onda (cm^{-1})
CF_2	511 cm^{-1}
CF_2	553 cm^{-1}
CH_2	642 cm^{-1}
Amorfo	725 cm^{-1}
Amorfo	746 cm^{-1}
CF_2 simétrico	1146 cm^{-1}
CF_2 simétrico	1176 cm^{-1}
CF_2 asimétrico	1287 cm^{-1}
Combinación	2375 cm^{-1}

Existen diversas bandas entre 600 y 1200 cm^{-1} relacionadas a diferentes vibraciones moleculares, se ha reportado que bandas en 638 cm^{-1} se relacionan con enlaces entre C-F₂, denominado como “wagging mode”. Entre 1145 y 1200 cm^{-1} encontramos bandas relacionadas a C-F₂ en su modo simétrico y asimétrico respectivamente. Por otro lado las bandas encontradas cerca de 1722 cm^{-1} están asociadas a dobles enlaces formados entre C=C y CF=CF (Tu, 2006), (Küster, 2008).

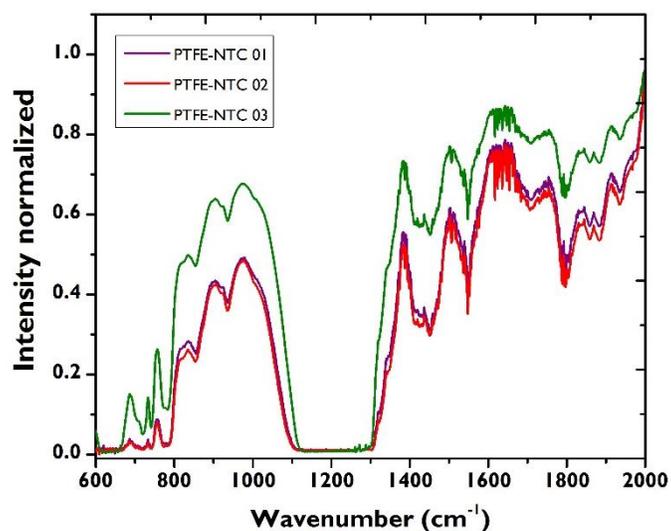


Figura 24. Espectro infrarrojo medio de las bandas de PTFE (negro) en comparación con las de los sustratos (rojo, azul y verde)

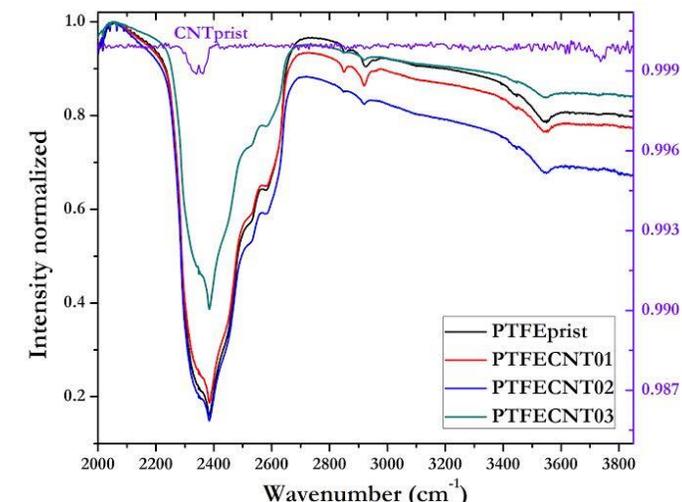


Figura 25. Espectro IR donde observamos tres de nuestro híbridos (azul, rojo y verde) lo cuales presentan bandas de alta y baja intensidad que coinciden con las del PTFE.

Análisis Termogravimétrico

Este análisis nos proporciona una curva de pérdida de masa (y su derivada) en el que existen tres parámetros de particular interés: la temperatura de iniciación, la temperatura de oxidación, que se relaciona con la estabilidad térmica de la muestra y finalmente la masa residual que se refiere a la masa que queda cuando se termina el proceso de calentamiento, que puede estar relacionado con el catalizador de metal empleado en la síntesis de NTC. En la figura 26 se muestra el termograma de los MWCNT los cuales tienen un aumento de masa en los primeros 200°C esto se explica porque el carbono se combustiona en presencia de aire e inicialmente gana masa porque se oxida. Posteriormente observamos la temperatura de iniciación a 452°C, en los nanotubos se recorre esta temperatura porque tienen más impurezas, estos reportes se encuentran descritos en la bibliografía (Fraczek, 2008).

Figura 26. Termograma de NTC con una temperatura de iniciación de 452°C.

En la figura 27 observamos el termograma del PTFE el cual tiene una temperatura de iniciación de 472°C, es decir que a esta temperatura el teflón comienza a perder masa, posteriormente la curva tiene una caída hasta llegar a los 585°C que es la temperatura de oxidación. La derivada (línea azul) en el termograma nos indica que pueden existir uno, dos o más procesos durante la pérdida de masa, el estrechamiento de cada banda indica que los procesos se suscitan uno tras otro. En el caso del teflón se observa una banda elongada a la cual preceden pequeños picos, los cuales se encuentran muy estrechos (Atta, 2013).

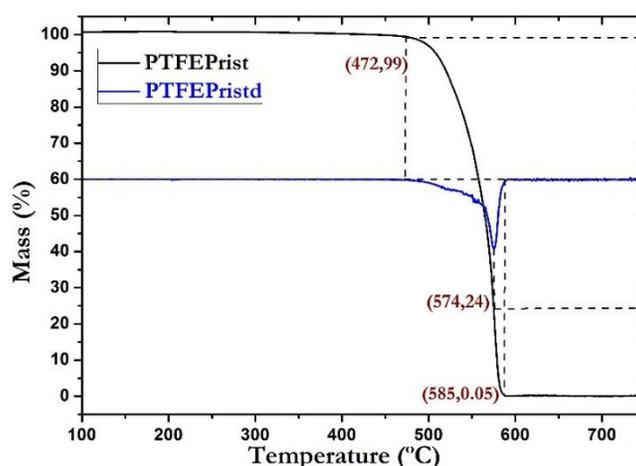


Figura 27. Termograma de PTFE con una temperatura de iniciación de 472°C.

El termograma del híbrido PTFE-NTC en la Figura 28 muestra una temperatura de iniciación de 456°C, mayor que los MWCNT pero menor al PTFE, tiene un aumento de porcentaje de masa inicial debida a los NTC. La derivada presenta tres bandas sucesivas que indican los procesos de descomposición del PTFE-NTC estos cambios de los NTC se compararon con algunos descritos en la bibliografía (Fraczek, 2008).

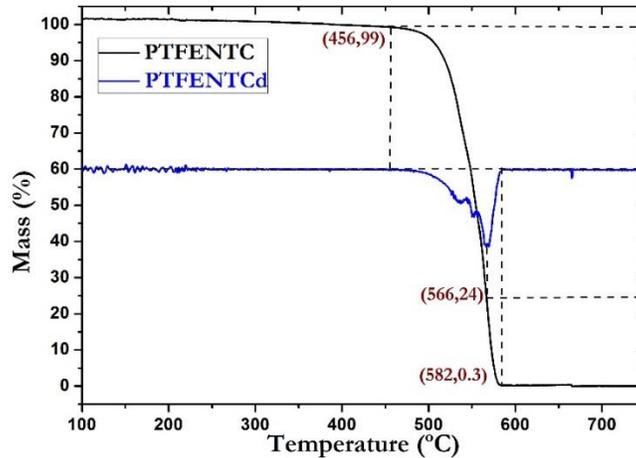


Figura 28. Termograma de sustrato híbrido PTFE-NTC con una temperatura de iniciación de 456°C.

En la Figura 29 se muestran las curvas de los tres materiales analizados en donde observamos el corrimiento de la banda correspondiente a los nanotubos, cuya temperatura de iniciación como de oxidación se posterga debido a las impurezas del material, mientras que la banda correspondiente al híbrido tiene mayor similitud con la del PTFE.

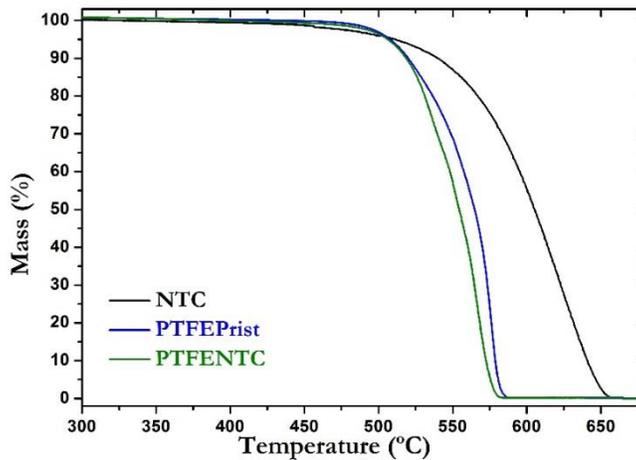


Figura 29. Termograma de los tres materiales NTC, PTFE y sustrato PTFE-NTC.

Gracias a las diferentes técnicas de caracterización fue posible seguir los cambios respectivos de nuestros materiales a través del proceso de síntesis del andamio PTFE-NTC. Cada una de las técnicas brindó información necesaria para concluir que pudimos obtener

una membrana de teflón revestida de nanotubos de carbono los cuales conservan sus características químicas.

8.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Ensayos de adhesión celular

El histograma representado en la Figura 30 nos muestra el patrón de respuesta en la adhesión celular de las células BM-MSC a las 4 y 24 horas posterior al sembrado sobre los andamios NTC. Como se puede observar existe un incremento en la adhesión celular respecto al tiempo y una diferencia significativa en comparación al material evaluado. El andamio compuesto por nanotubos de carbono presenta un mayor porcentaje de adhesión celular cuando se compara con el teflón en ausencia de los nanotubos, esto puede indicarnos que la presencia este material podría ser relevante en los procesos de adhesión celular y por lo tanto en la consiguiente respuesta de proliferación. Existen diversos estudios que demuestran que la presencia de NTC en los andamios conduce a una mayor proliferación celular, uno de ellos demostró que películas delgadas con NTC incrementan la adhesión y proliferación en comparación con placas de cultivo celular, poliuretano y fibras de carbono. Otro estudio indicó un 20% más de proliferación en fibroblastos de ratón cultivados MWCNT en comparación con titanio. Otro más probó que al colocar una capa de NTC sobre silicona promovía la adhesión y proliferación de células Saos- 2 (Heister, 2013). También se ha reportado el crecimiento de la línea celular de fibroblastos de ratón L929 en una red basada en MWCNTs interconectados. Dado que las células no sólo responden a la presencia de características topográficas sino también a las dimensiones de estas características, varios estudios tratan de responder a la pregunta ¿Cuál es la micro-nanodimensión óptima para una mejor respuesta celular? (Deligianni, 2014).

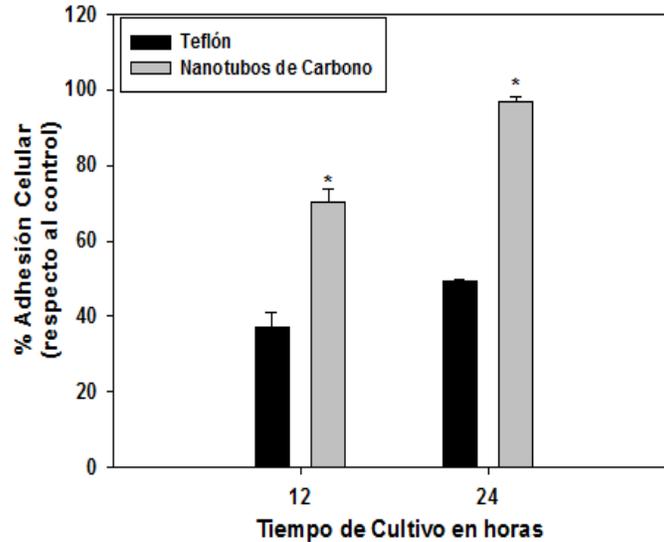


Figura 30. Porcentaje de adhesión celular respecto a un el control positivo (100%), las barras representan la desviación estándar y la significancia a $p < 0.05$.

Los resultados de adhesión celular indican un buen comportamiento de las células BM-MSC sobre los NTC para confirmar dicha respuesta celular llevamos a cabo el análisis de la interacción célula-material por MEB. Las imágenes de la figura 31 y 32 nos indican que las células BM-MSC presentan una morfología alargada con numerosos filopodios y lamelopodios que son las estructuras que permiten el anclaje a los NTC. Dado que los filopodios forman adhesiones locales con el sustrato, estos son encargados de darle directriz al citoesqueleto y los lamelopodios desarrollados por las BM-MSC ayudan unirse a los nanotubos para aumentar la adhesión de la superficie celular. En un acercamiento de la imagen (Figura 33) podemos ver con detalle estas prolongaciones que se anclan directamente a nuestro material. Por otro lado en la Figura 34 observamos una célula troncal que se encuentra sobre PTFE o teflón, en la cual se puede apreciar que existen muy pocas proyecciones de los puntos de adhesión de la célula ya sean lamelopodios o filopodios, lo que con lleva a que la célula presente una morfología menos alargada. Dejando claro que la morfología que se observa en los andamios de NTC es debido a su presencia y que puede ser determinante para que la célula tenga una interacción favorable

con el sustrato, llevando a la presencia de prolongaciones celulares que nos indican una mejor adhesión celular.

Se ha demostrado que las propiedades nanotopográficas de los NTC aumentan la adhesión celular (Hopley, 2014). Además de los cambios evidentes en la forma que pueden generarse con topografías macroscópicas, las células tienen la capacidad de detectar señales geométricas en nanoescala, las cuales pueden representar diferencias en la conformación molecular, topografía de la superficie o rugosidad, diámetro de la fibra u otros parámetros. Hayman demostró en 2005 que el crecimiento de neuronas a partir de células troncales diferenciadas fue significativamente mayor cuando se cultivaban en andamios de poliestireno 3D inertes pero altamente porosas, en comparación con superficies planas tradicionales. Interesantemente la capacidad de las células para reconocer tales señales arquitectónicas se extiende a características topográficas en nanoescala (Hayman, 2005). En 2007 un estudio con MSC humanas cultivadas en surcos de 350 nm ancho mostraron la alineación de su citoesqueleto y núcleos a lo largo de estas las ranuras. Se sabe que las nanoestructuras mejoran las interacciones topográficas y proporcionan más puntos de contacto para una adhesión celular más fuerte, pero limitan la propagación de células y se reduce el área de contacto entre la célula y el sustrato (Guilak, 2009).

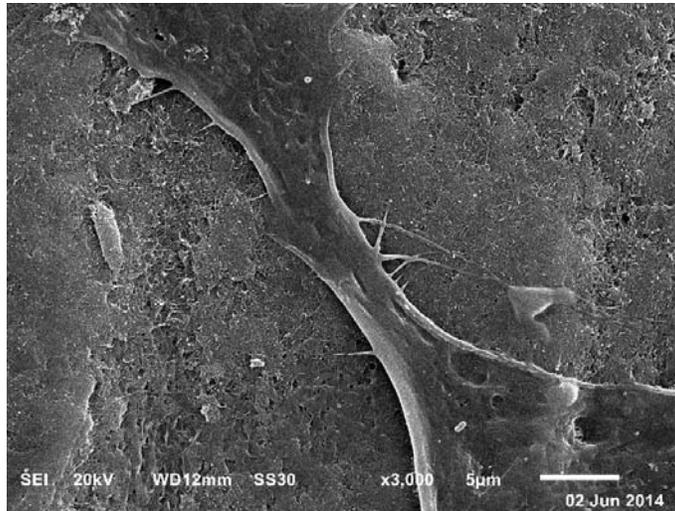


Figura 31. Microfotografía de células troncales mesenquimales sembradas sobre el sustrato PTFE-NTC a los cinco días, se observa la presencia de filopodios que permiten a las células adherirse al material.

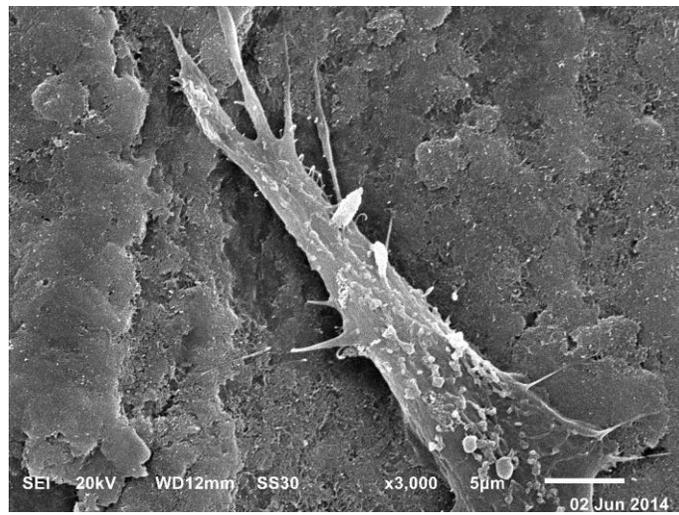


Figura 32. Microfotografía de célula troncal y su anclaje al material sintetizado con nanotubos de carbono.

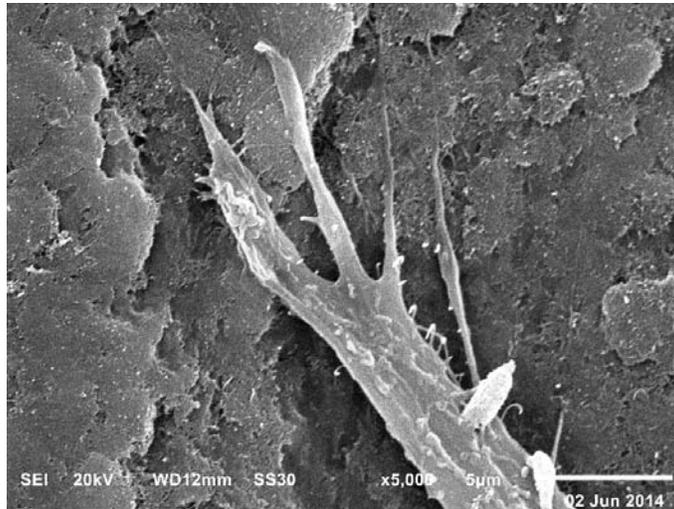


Figura 33. Microfotografía a 5,000X donde se observa con mayor detalle el anclaje de las prolongaciones celulares al material PTFE-NTC.

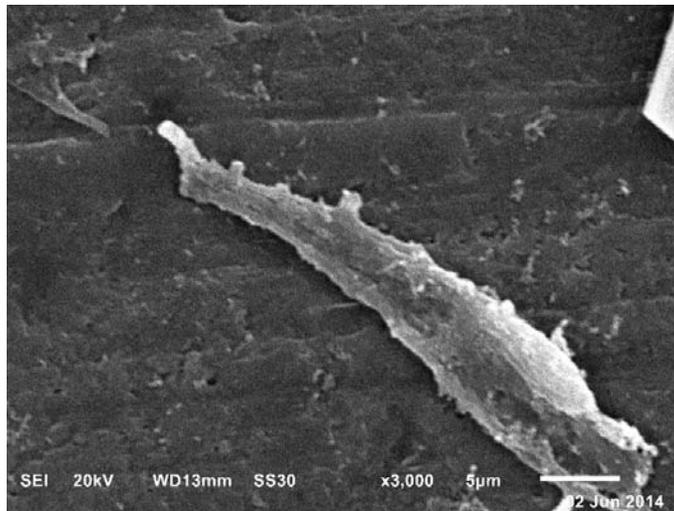


Figura 34. Microfotografía a 3000X de célula troncal sobre el teflón, la cual no posee prolongaciones que ayuden a la adhesión con el material.

Los mecanismos por los cuales las señales nanotopográficas influyen en la proliferación celular y diferenciación células troncales no se han elucidado por completo pero parecen implicar cambios en la organización del citoesqueleto en respuesta a la geometría y tamaño de las características que rodean la matriz extracelular. Es decir, los cambios en el tamaño

de la característica del sustrato pueden influir en la agrupación de integrinas y otras moléculas de adhesión celular, alterando así el número y la distribución de adhesiones focales. Por ejemplo, estudios anteriores determinaron que separaciones precisas realizadas sobre un sustrato en nanoescala puede modular la agrupación de las integrinas asociadas y controlar la adhesión y propagación de las células. Se sabe que estas nanoestructuras alteran la morfología y la proliferación de células madre embrionarias humanas a través de mecanismos mediados por citoesqueleto. En un estudio realizado por Gerecht en 2006 mostró que las señales del sustrato (polidimetilsiloxano) en células madre embrionarias alteraban su organización en diversos componentes del citoesqueleto, incluyendo F-actina, vimentina, γ -tubulina, y α -tubulina. Con base a todos estos estudios podemos determinar que la forma y número de adhesiones focales mostradas en las BM- MSC están determinadas por la presencia de nanotubos de carbono. Las nanoestructuras proporcionan señales importantes a nivel celular y es posible que regulen la respuesta celular a señales ambientales, especialmente señales mecánicas a través de un efecto sobre la reorganización de la actina (Deligianni, 2014).

Ensayos de viabilidad celular

Se ha reportado que uno de los primeros pasos para que un material tenga una buena respuesta celular es promover la adhesión celular para posteriormente llevar a cabo la proliferación celular. Nuestros datos anteriores indican que la primera fase se lleva con éxito y por ello evaluamos la viabilidad celular que presentan las BM- MSC sobre los andamios de NTC como parte de la segunda fase de crecimiento de un tejido y parte de los ensayos de biocompatibilidad celular de un biomaterial. En la figura 35 se observan los resultados de la prueba viabilidad celular de las BM- MSC sobre los andamios de NTC y en el teflón sin nanotubos. Como se puede apreciar los resultados muestran una mayor viabilidad celular en células sembradas en los andamios construidos comparados con el teflón en donde también existe un crecimiento celular pero es menor debido a que este material carece de una superficie adecuada para el crecimiento de las células, existiendo diferencias significativas entre los resultados obtenidos. Asimismo, estos resultados nos indican que la

síntesis del andamio de NTC no presenta efectos adversos en la respuesta de proliferación celular; ya que las células siguen viables después de 9 días post-siembr. Con base a los experimentos *in vitro* descritos, parece que la biocompatibilidad de los andamios de NTC como soportes para el crecimiento de la línea celular BM-MSK es buena, a pesar de que existen datos controversiales de los efectos citotóxicos de los nanotubos de carbono. En 2010 Holy estudió la adhesión y proliferación celular de células troncales de carcinoma de ratón P19 sembradas sobre sustratos recubiertos con MWCNT y encontró que había un incremento de las células que se encontraban cultivadas en presencia de nanotubos de carbono respecto al control (Holy, 2010).

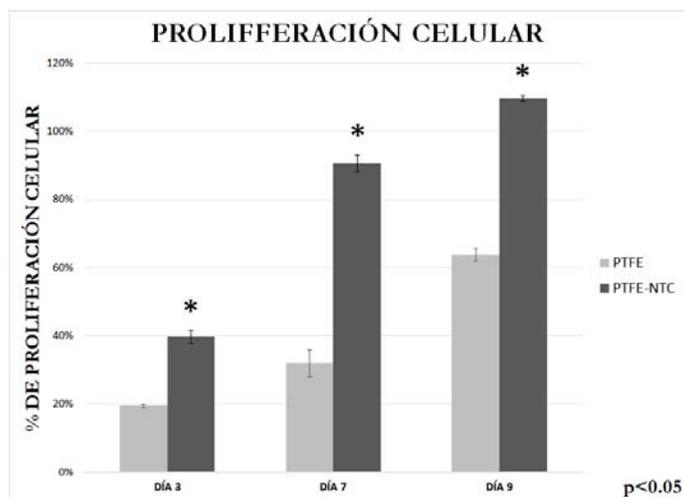


Figura 35. Porcentaje de proliferación celular respecto al control donde se compara el teflón con el material de nanotubos de carbono (PTFE-NTC). Las barras representan la desviación estándar y la significancia se estimó a través de un análisis de Tukey $p < 0.05$.

Ensayos de bioactividad celular

Actividad de fosfatasa alcalina

Una manera de evaluar la bioactividad de un biomaterial con aplicaciones en el área de la ingeniería de tejidos mineralizados es evaluando el comportamiento de la enzima fosfatasa alcalina, debido a que es un importante indicador de formación ósea y un marcador fenotípico de células osteoblásticas y un buen candidato cuando se trabaja con cambios de fenotipo de células troncales como las BM-MSC. Además, se ha demostrado que la fosfatasa alcalina es una enzima expresada en las fases tempranas de la mineralización y estimula al tejido para formar matriz mineralizada en terapias de regeneración. La determinación cuantitativa del promedio de actividad ALP mostró una diferencia significativa entre los andamios PTFE-NTC y el tratamiento a través del tiempo ($p < 0.05$). Como se puede observar en la Figura 36 la expresión de ALP es dependiente del tiempo. Cuando comparamos la respuesta de las células BM-MSC sembradas sobre los andamios con medio osteogénico y sin ningún inductor de la mineralización nuestros resultados indican que la cinética de expresión de ALP presenta una menor actividad a los 3 y 5 días de cultivo sin embargo esta actividad se incrementa a partir del día 7 hasta llegar a un pico máximo a los 21 días de cultivo celular bajo condiciones de inducción hacia un linaje osteogénico. Por otro lado, la respuesta de la cinética de ALP para nuestros cultivos control presenta menor actividad a los 3 y 5 días de cultivo, llegando a un ligero aumento al día 7 y disminuyendo hacia el día 21. Lo cual nos revela que las células BM-MSC tienen una actividad baja de ALP aún sin medio inductor.

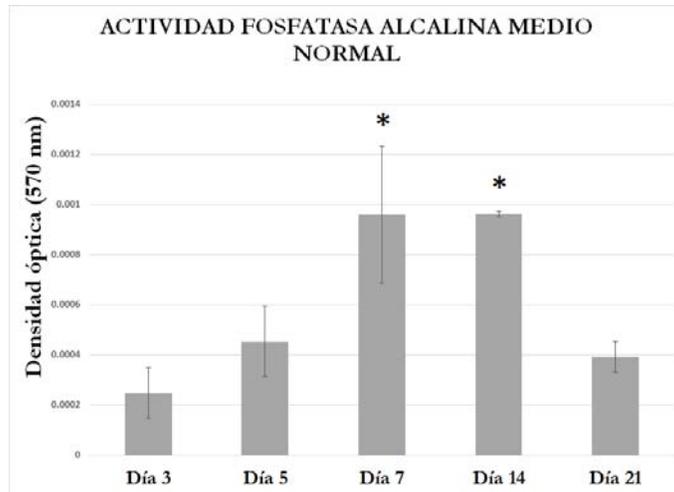


Figura 36. Actividad de fosfatasa alcalina de las células sembradas sobre el sustrato PTFE-NTC en presencia de un medio normal. Las barras representan la desviación estándar estándar y la significancia estadística se reporta con $p < 0.05$ por medio de un análisis de Tukey.

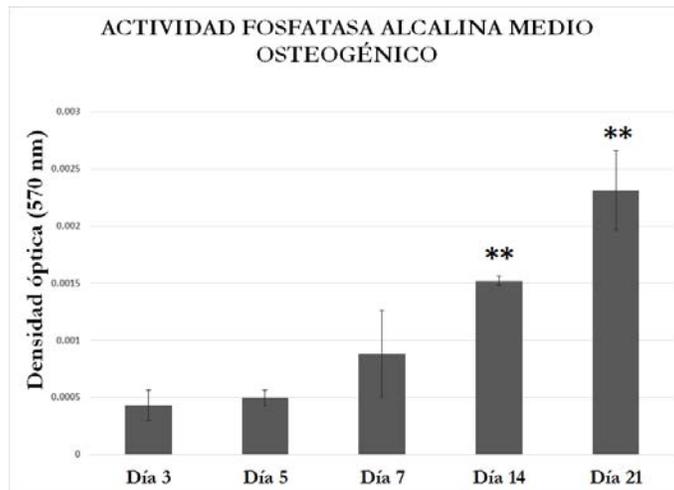


Figura 37. Actividad de fosfatasa alcalina en células sembradas sobre el sustrato PTFE-NTC a diferentes días en presencia de un medio osteogénico. Las barras representan la desviación estándar y la significancia estadística se reporta con $p < 0.05$ por medio de un análisis de Tukey.

Nayak y *cols* dirigió un estudio utilizando un andamio de polietilenglicol (PEG) y nanotubos de carbono (MWCNT) y descubrió que este biomaterial promueve la diferenciación de células troncales mesenquimales y la mineralización de la matriz extracelular, esto en ausencia de cualquier otro inductor químico (Nayak, 2010). En otro estudio realizado por Bhattacharya y *cols* en 2010 utilizando un andamio de titanio con NTC y osteoblastos fetales humanos, se demostró que la actividad de la fosfatasa alcalina aumentaba respecto al control positivo que era el pozo de cultivo pero la proliferación celular en el grupo experimental era menor y se asociaba a que las células comienzan a diferenciarse antes respecto al control positivo. Adicionalmente en el estudio se midió el contenido de calcio en el medio y se encontró un contenido significativamente mayor en el compuesto de NTC (Bhattacharya, 2010). En otro estudio en 2007 de Abarrategi y *cols* fabricaron un biomaterial de MWCNT y quitosán, al evaluarse la actividad de ALP observado un incremento de su actividad respecto al grupo control (Abarrategi, 2007). Los avances en el conocimiento y la tecnología de la ingeniería de tejido óseo y de la química de los NTC pueden permitir el desarrollo de andamios que puedan superar los límites de las opciones de tratamiento actuales. En el tejido óseo se cree que los NTC pueden funcionar como fibras de colágeno durante la deposición de la matriz ósea, el control de eventos de la nucleación y el crecimiento cristalino del componente inorgánico. Los estudios actuales han demostrado que ayudan al crecimiento de osteoblastos y la formación de hueso. Narita y *cols* en 2009 indicó que los MWCNT inhiben la resorción ósea osteoclástica *in vivo*. Dado que los NTC no son biodegradables se comportan como una matriz inerte en el que las células pueden proliferar y depositar nuevo material (Narita, 2009). Actualmente se trabaja en el desarrollo de varios compuestos a base de nanotubos de carbono que puedan actuar como andamios para mejorar la reparación y regeneración de tejido óseo. Un análisis de diversos estudios apunta a que el uso de NTC mejora la biocompatibilidad, propiedades mecánicas de andamios, diferenciación celular y proliferación, así como la deposición de tejido óseo (Martins-Júnior, 2013).

Caracterización de tejido mineral depositado

Como ya se ha indicado, en la preparación de soportes para regeneración de tejidos lo que se pretende es imitar las propiedades del tejido original para poder restablecer su organización y funciones propias. Por ello evaluamos el tejido depositado sobre la superficie de los NTC por parte de las células BM-MSC con y sin presencia de inductores de la mineralización. Como se puede observar en la Figura 38 y 39 correspondientes a los cultivos controles de las BM-MSC en ausencia de inductores de la mineralización no se observaron nódulos de mineralización mientras que las BM-MSC después de 21 días de cultivo celular siguen proliferando y depositando matriz extracelular. Por otro lado en los cultivos experimentales donde se utilizaron los inductores de mineralización (Figuras 40 y 41) se puede observar la disposición del tejido mineral consiste de una delgada capa homogénea que cubre toda la superficie del andamio de NTC que se observan crecimientos minerales granulares, aglomeraciones de tipo nodular con una alta presencia de matriz extracelular.

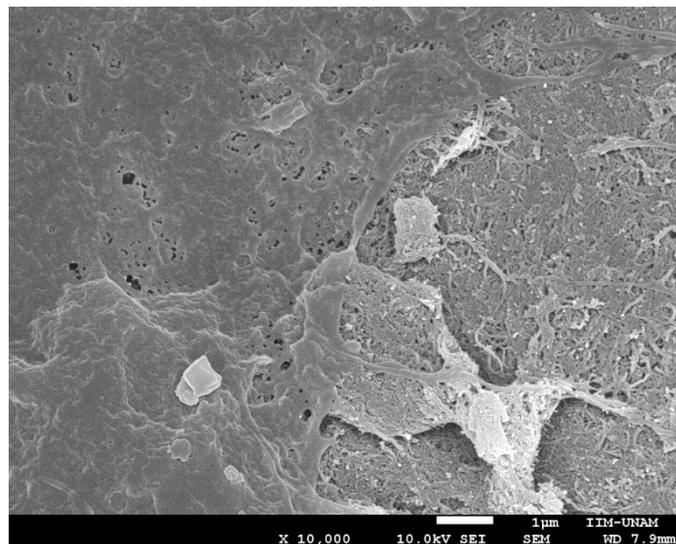


Figura 38. Microfotografía de matriz extracelular mineralizada a los 21 días de cultivo celular en presencia de un medio normal.

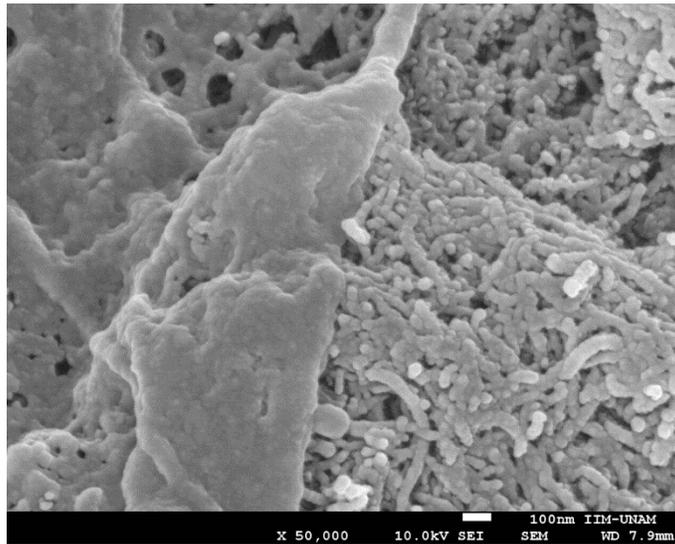


Figura 39. Acercamiento de imagen (50,000X) donde observamos la diferencia de los nanotubos de carbono que componen nuestro híbrido y la presencia de una matriz extracelular aparentemente mineralizada.

Posteriormente en la Figura 40 observamos la presencia de matriz a los 21 días de cultivo pero en presencia de un medio osteogénico, es evidente la deposición de esta matriz sobre los nanotubos que pueden observarse en un segundo plano y cuya morfología es distinta. Esta matriz mineralizada tiene un tono de gris coincidente a través de la imagen con acumulaciones de mayor densidad en algunas zonas. Por otro lado tenemos a los nanotubos de carbono se observaron al fondo de la imagen a través de pequeños poros de esta matriz, un acercamiento en la Figura 41 nos permite visualizar con mayor detenimiento la presencia de este tejido.

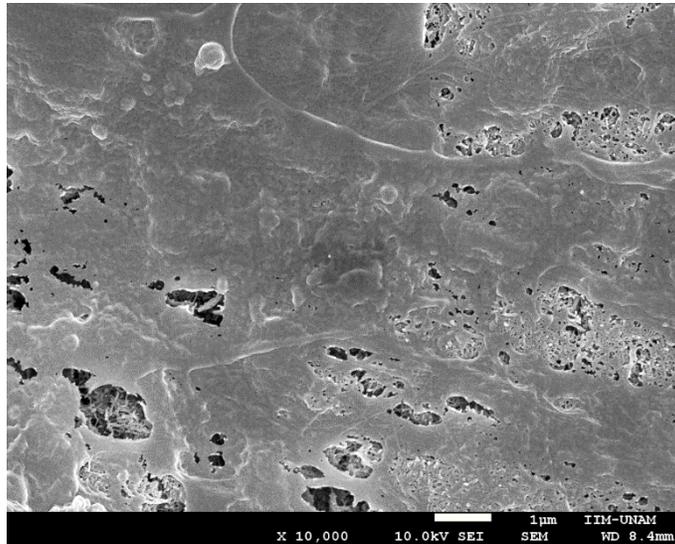


Figura 40. Microfotografía a los 21 días de cultivo celular sobre el híbrido PTFE-NTC en presencia de un medio osteogénico.

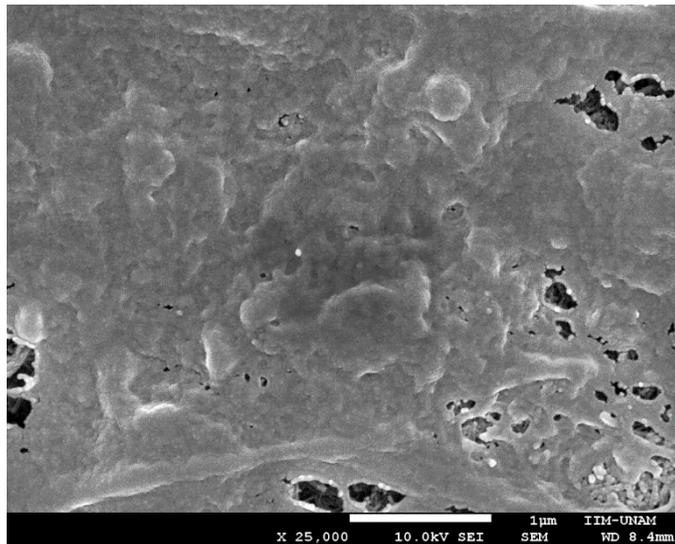


Figura 41. Acercamiento de la matriz extracelular aparentemente mineralizada y la presencia de nanotubos de carbono en segundo plano.

En diversos estudios se utiliza el análisis cualitativo de SEM para determinar si existe algún cambio en las células sembradas en diferentes andamios. En el caso de los NTC y su utilización como biomaterial, se ha encontrado la presencia de matriz mineralizada cuando

las células (troncales u osteoblastos) son sembradas sobre estos andamios, un análisis de EDS puede determinar la presencia de Ca y P (Usui, 2008) (Pan, 2012). Bhattacharya demostró la presencia de estos elementos en compositos de Titanio y NTC, realizando un análisis de EDS y localizando las zonas de cristales de calcio, siendo significativamente mayor la presencia de estos en el composito que contenía NTC (Bhattacharya, 2010).

9. CONCLUSIONES

El uso de radiación por microondas permitió la síntesis de un andamio de PTFE-NTC donde los nanotubos de carbono permanecieran adheridos a la superficie de teflón, a partir de esto se obtuvo un biomaterial que fue utilizado para diferentes ensayos biológicos.

Las pruebas de adhesión y proliferación celular indican que en este modelo *in vitro* los nanotubos de carbono no son tóxicos para las células troncales y permiten su crecimiento bajo condiciones estándar de cultivo celular.

El análisis del comportamiento célula-material permitió observar gran cantidad de filopodios y lamelopodios que unen a la célula a los nanotubos de carbono.

En un modelo de diferenciación celular es posible observar el incremento de la actividad de la ALP (enzima indicadora de procesos de mineralización) en nuestro andamio de NTC. Lo anterior se logra relacionar con la observación de una matriz posiblemente mineralizada a través de SEM. Para poder afirmar que existe un proceso de mineralización posterior al cultivo celular sobre los andamios, es necesario al menos realizar un análisis EDS para corroborar la presencia de Ca y P.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abarrategi, A. G. (2007). Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials* , 94-102.
2. Ali, S. V. (2012). Functionalized Carbon Nanotubes: Biomedical Applications. *International Journal of Nanomedicine*, 5361-5374.
3. Ansón, A. (2005). *Nanotubos de carbono: estructura porosa y sus implicaciones en el campo de la energía*. España.
4. Argibay, P. (2005). *Medicina regenerativa y stem cells*. Buenos Aires: Universidad Nacional Quilmes.
5. Atta, A. A. (2013). Structural and Thermal Properties of PTFE Films by Argon and Oxygen plasma. *Arab Journal of Nuclear Science and Applications*, 106-114.
6. Bala, Y. D. (2011). Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior : An instrumented indentation study. *Journal of the mechanical behavior of mechanical materials*, 1473-1482.
7. Bala, Y. F. (2013). Bone mineralization : from tissue to crystal in normal and pathological contexts. *Osteoporos Int*, 2153-2166.
8. Becerra, J. A. (2001). Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Medicina clínica (Barc)*, 23-34.
9. Bhat, S. (2002). *Biomaterials*. U.K: Alpha Science International Ltd.
10. Bhat, S. (2013). Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter*.
11. Bhattacharya, M. (2010). Bone formation on carbon nanotube composite. *Wiley Periodicals*, 75-82.
12. Birla, R. (2014). *Introduction to tissue engineering: Applications and challenges*. Wiley.
13. Bradamante, S. B. (2014). Stem Cells toward the Future: The Space Challenge. *Life*, 267-280.
14. Bronzino, J. (s.f.). *Tissue engineering and artificial organs*.

15. Cheng, X. Z. (2011). Characterization of multiwall carbon nanotubes dispersing in water and association with biological effects. . *Journal of Nanomaterials*.
16. Chuo, T.-W. W.-C. (2013). Electrically Driven Biofouling Release of a Poly(tetrafluoroethylene) membrane modified with electrically induced reversibly cross-linked polymer. *Applied materials and interfaces*, 9918-9925.
17. Courtney, E. K. (2010). Mechanistical studies on the electron-induced degradation of polymers: polyethylene, polytetrafluoroethylene, and polystyrene. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14884-14901.
18. Dalby, M. G. (2014). Harnessing nanotopography and integrin–matrix interactions to influence stem cell fate. *Nature materials*, 558-569.
19. Das, R. Z. (2014). A Review of the effects of the cells enviroment psysicochemical nanoarchitecture on stem cell commitment. *Biomaterials*, 5278-5293.
20. Deligianni, D. (2014). Multiwalled carbon nanotubes enhance human bone marrow mesenchymal ste cell’s spreading but delay their proliferation in the direction of differentiation acceleration. *Cell adhesion and migration*, 558-562.
21. Dong, C. C. (2012). Effects of acid treatment on structure, properties and biocompatibility of carbon nanotubes. *Appied surface science*, 261-268.
22. Fakhry, M. H. (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World Journal of stem cells* , 136-148.
23. Fraczek, A. M. (2008). Comparative in vivo biocompatibility study of singleand and multi-wall carbon nanotubes. *Acta Biomaterialia*, 1593-1602.
24. Friedenstein, A. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Ebryol Exp Morphol*, 381-390.
25. Gheith, M. (2006). Stimulation of neural cells by lateral layer by layer films of songle walled currents in conductive carbon nanotubes. *Advanced materials*, 2975-2979.
26. Govey, P. L. (2013). Biophysical Regulation of Stem Cell Differentiation. *Curr Osteoporos Rep*, 83-91.
27. Guilak, F. C. (2009). Control of Stem Cell Fate by Physical interactions with extracellular matrix . *Cell stem cell* , 17-26.
28. Hayman, M. (2005). Growth human stem cell-derived neurons on solid three dimensional polymers. *J. Biochem. Biophys Methods*.

29. Heister, E. B. (2013). Are Carbon Nanotubes a Natural solution? Applications in biology and medicine. *Applied materials and interfaces*, 1870-1891.
30. Herrero-Latorre, C. Á.-M. (2015). Characterization of carbon nanotubes and analytical methods for their determination in environmental and biological samples: A review. *Analytica Chimica Acta* , 77-94.
31. Ho Kim, D. P. (2012). Matrix nanotopography as a regulator of cell function. *The Journal of cell biology*, 351-360.
32. Holy, J. P. (2010). Adhesion, proliferation and differentiation of pluripotent stem cells on multi walled carbon nanotubes . *Nanobiotechnology*, 41-46.
33. Holzapfel, B. M. (2013). How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Review*, 581-603.
34. Hopley, E. S. (2014). Carbon nanotubes leading the way forward in new generation 3D tissue engineering. *Biotechnology advances*, 1000-1014.
35. Iijima, S. (1992). Growth model for carbon nanotubes. *Physical Review Letters*.
36. Karl, C. (2011). Nanotubes. *Annu. Rep. Prog. Chem, Sect.*, 490-504.
37. Khanderi, J. (2010). Binary Au/MWCNT and ternary Au/ZnO/MWCNT nanocomposites: synthesis, characterization and catalytic performance. *Chemistry European Journal*, 2300-2308.
38. Kroustalli, A. Z. (2013). Carbon nanotubes reinforced chitosan films: mechanical, properties and cells response of a novel biomaterial for cardiovascular tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med*, 2889–2896.
39. Küster, S. L. (2008). Thin PTFE-like membranes allow characterizing germination and mechanical penetration competence of pathogenic fungi. *Acta Biomaterialia*, 1809-1818.
40. Laird, E. B. (2013). Carbon Nanotube-Directed Polytetrafluoroethylene Crystal Growth via Initiated Chemical Vapor Deposition. *Macromolecular rapid communications*, 251-256.
41. Laird, E. D. (2013). Carbon nanotube directed Polytetrafluorethylene crystal growth via initiated chemical vapor deposition. *Macromolecular rapid communications* , 251-256.
42. Lehman, J. T. (2011). Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. *Carbon*, 2581-2602.

43. Liu, Z. T. (2009). Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo detection imaging, and drug delivery. *Nano Ressearch*, 85-120.
44. Lu, L.-Q. Z. (2012). Hydrophobic Teflon films as concentrators for single-molecule SERS detection. *Journal of Materials Chemistry*.
45. Madani, S. M. (2013). A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano reviews*.
46. Martins-Júnior, P. (2013). Carbon nanotubes: directions and perspectives in oral regenerative medicine. *Journal of dental research*.
47. Meredith, J. C. (2013). Biomedical applications of carbon nanotubes composites. *Frontiers in Bioscience*, 610-621.
48. Mihály, J. S. (2006). FTIR and FT-Raman Spectroscopic Study on Polymer Based High pressure digestion vessels. *CROATICA CHEMICA ACTA*, 497-501.
49. Narita, N. (2009). Multiwalled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. *Nanno Letters*, 1406-1413.
50. Nayak, T. (2010). Thin films of functionalized multiwalled carbon nanotubes as suitable scaffold materials for stem cells proliferation and bone formation. *ACS Nano*, 7717-77725.
51. Orecchioni, M. B. (2014). Impact of carbon nanotubes and graphene on immune cells. *Journal of translational medicine* |.
52. Oryan, A. A. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research*.
53. Pan, L. P. (2012). Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Biointerfaces*, 226-234.
54. Poole, C. (2003). *Introducción a la nanotecnología*. Barcelona: Reverté.
55. Rafique Alí, M. M. (2011). Production of Carbon Nanotubes by Different Route a Review. *Scientific Research*, 29-34.
56. Rahmany Maria, V. D. (2012). Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review. *Acta Biomaterialia*, 5431-5437.
57. Russell, M. J. (2013). Biomedical applications of carbon-nanotube composites. *Frontiers in bioscience* , 610-621.
58. Salmasi, S. (2015). Role of nanotopography in the development of tissue engineering 3D organs and tissues using mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells* , 266-280.

59. Song, M. (2012). Mapping the mechanome of live stem cells using a novel method to measure local strain fields in situ at the fluid cell interface. *PLoS One*.
60. Stephanie, R. B. (2004). BIOMATERIALS:Where We Have Been and Where we are going? *Annu. Rev. Biomed*, 41-65.
61. Takeuchi, N. (2009). *Nanociencia y nanotecnología*. D.F: Fondo de Cultura Económica.
62. Tu, C.-Y. L.-L. (2006). Effects of Polymer Architecture and composition on the adhesion of Poly(tetrafluorethylene). *Chem Pub Soc Europe* , 1355-1360.
63. Usui, Y. A. (2008). Carbon Nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects. *Biocompatible materials*, 240-246.
64. Zhang, X. L. (2012). Recent advances in microwave initiated sythesis of nanocarbon materials . *Nanoscale*.