



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ANDAMIOS TUBULARES:
UN NUEVO ENFOQUE PARA LA REGENERACIÓN DE
TEJIDO OSEO

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

FEBE CAROLINA VÁZQUEZ VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

POSGRADO DE ODONTOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

ENERO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice general

Índice general	I
Índice de figuras	V
Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Abstract	XI
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
2.1. Tejido Óseo	3
2.1.1. Estructura Macroscópica del Hueso	4
2.1.2. Estructura Microscópica del Hueso	5
2.1.3. Células de Hueso	5
2.1.4. Colágenas y Proteínas de Hueso	7
2.1.5. Proteínas no colagénicas	8
2.1.6. Estructura Jerárquica	10
2.2. Ingeniería de Tejidos	11
2.2.1. Impresión 3D	14
2.2.2. Hilado por propulsión de gas	17
2.2.3. Andamios Biohíbridos	19
3. Justificación	23
4. Hipótesis	25

5. Objetivos	25
5.1. Objetivo General	25
5.2. Objetivos Específicos	25
6. Metodología	27
6.1. Síntesis del conducto tubular en 3D	27
6.2. Caracterización de las propiedades de los Andamios Biohíbridos en 3D .	28
6.3. Cultivo Celular y Ensayos Biológicos	29
6.3.1. Cultivo celular	29
6.3.2. Ensamblaje para fabricar tubos de tejido	29
6.3.3. Ensayo de adhesión celular	31
6.3.4. Ensayo de proliferación celular	32
6.3.5. Interacción célula-material por MEB	32
6.3.6. Interacción célula-material por fluorescencia	33
6.3.7. Análisis estadístico	34
7. Resultados	35
7.1. Síntesis del conducto tubular en 3D	35
7.2. Caracterización de los conductos tubulares híbridos en 3D	36
7.2.1. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	36
7.2.2. Termogravimetría	39
7.2.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	40
7.2.4. Perfilometría	43
7.2.5. Análisis Mecánico Dinámico (DMA)	45
7.2.6. Difracción de Rayos X (RX)	46
7.2.7. Espectroscopia Infrarroja (FTIR)	47
7.2.8. Análisis Mecánicos	47
7.3. Ensayos Biológicos	49

7.3.1. Ensayo de Adhesión y Proliferación Celular	49
7.3.2. Interacción Célula–Material por Microscopia Electrónica de Barrido	51
7.3.3. Interacción Célula–Material por Microscopia de Fluorescencia . .	54
8. Discusión	57
9. Conclusiones	67
10. Perspectivas del estudio	69
11. Anexo	71
11.1. Técnicas de Caracterización	71
11.2. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	71
11.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	72
11.4. Termogravimetría (TGA)	73
11.5. Perfilometría	73
11.6. Difracción de Rayos X (RX)	75
11.7. Espectroscopia Infrarroja (FTIR)	75
11.8. Análisis Mecánicos	75
11.9. Análisis Mecánico Dinámico (DMA)	76
12. Referencias	79

Índice de figuras

1.	Niveles de organización del tejido óseo.	12
2.	Triada de la Bioingeniería de Tejidos.	13
3.	Hilado por propulsión de Gas.	19
4.	Diseño y Síntesis del conducto tubular en 3D.	27
5.	Ensamblaje de tubos 3D de 9×35 mm con hFOB.	30
6.	Ensamblaje de tubos 3D de 5×20 mm con hFOB.	31
7.	Tubos impresos en 3D con y son recubrimiento de fibras de PLA al 7%.	35
8.	Tubo de 9×35 mm. (a) y (b) Tubo 3D sin recubrimiento. (c) y (d) Tubo 3D recubierto con fibras de PLA al 7%	36
9.	Tubo de 5×20 mm. (a) y (b) Tubo 3D sin recubrimiento. (c) y (d) Tubo 3D recubierto con fibras de PLA al 7%	38
10.	Termogravimetría del Tubo 3D de 9×35 mm con y sin fibras de PLA al 7%. Como control el filamento de PLA puro.	39
11.	Termogravimetría del Tubo 3D de 5×20 mm con y sin fibras de PLA al 7%. Como control el filamento de PLA puro.	41
12.	Temperatura de transición vítrea y temperatura de fusión del filamento de PLA, el Tubo 3D de PLA y el Tubo 3D PLA recubierto de 9×35 mm.	42
13.	Temperatura de transición vítrea y temperatura de fusión del filamento de PLA, el Tubo 3D de PLA y el Tubo 3D PLA recubierto de 5×20 mm.	43
14.	Perfilometría. (a) corresponde a la superficie de los tubos 3D sin fibras y (b) corresponde a la superficie del Tubo 3D recubierto con fibras del PLA.	44
15.	Perfilometría. (a) corresponde a la superficie de los tubos 3D sin fibras y (b) corresponde a la superficie del Tubo 3D recubierto con fibras del PLA.	44
16.	Análisis Mecánico Dinámico (DMA). Se tomó como control el Filamento de PLA, comparando el Tubo 3D PLA y el Tubo PLA.	45

17.	Difracción de Rayos X. Se tomó como control el Filamento de PLA, comparando el Tubo 3D PLA y el Tubo PLA Recubierto.	46
18.	FTIR. Se tomó como control el Filamento de PLA, comparando el Tubo 3D PLA y el Tubo PLA.	48
19.	El módulo de Young se llevó a cabo mediante una curva de esfuerzo-deformación; la prueba de Esfuerzo mediante una prueba de respuesta a la tracción.	48
20.	Ensayo de Adhesión celular a las 4 y 24 h posteriores al cultivo con hFOB.	50
21.	Ensayo de proliferación celular a los 3, 5, 7 y 9 días posteriores al cultivo con hFOB.	50
22.	Ensayo de Adhesión celular a las 4 y 24 h posteriores al cultivo con hFOB.	52
23.	Ensayo de proliferación celular a los 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días posteriores al cultivo con hFOB.	52
24.	MEB a las 24 horas posteriores al cultivo de hFOB sobre los tubos 3D sin recubrimiento de fibras.	53
25.	MEB a las 24 horas posteriores al cultivo de hFOB sobre los tubos 3D con recubrimiento de fibras de PLA al 7%.	54
26.	Fluorescencia a las 24 horas posteriores al cultivo de hFOB sobre los tubos 3D sin fibras.	56
27.	Fluorescencia a las 24 horas posteriores al cultivo de hFOB sobre los tubos 3D con fibras de PLA al 7%.	56

Agradecimientos

Agradezco el apoyo por parte de DGAPA-UNAM: proyecto PAPIIT IT203618 que ha permitido la realización de esta investigación.

Agradezco el apoyo por parte del CONACYT del proyecto A1-S-9178 del programa del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, que ha permitido la realización de esta investigación.

A mi tutor, el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y aprender de él durante la maestría y el doctorado, por estar siempre al pendiente del proyecto y por todo el apoyo recibido tanto en el ámbito académico como en el personal.

Agradezco a mi comité tutor; al Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre y la Dra. Ana María Fernández Presas, que estuvieron presentes durante todas las evaluaciones semestrales a lo largo de todo el doctorado, por su tiempo, sus observaciones y su apoyo.

A los doctores que apoyaron el proyecto y el artículo publicado desde sus respectivas universidades Dr. Daniel Chavarría Bolaños y Dr. David Masuoka Ito.

Al Dr. Amaury Pozos Guillen por su apoyo, su amistad y su consejo, siempre animándome a seguir, a escribir y escribir.

A mis amigos que ya no están en el laboratorio, principalmente a Iriczalli Cruz Maya y los que siguen en él, los profesores y colaboradores del laboratorio que siempre están dispuestos a resolver dudas y apoyar a los estudiantes, en especial la Dra. Patricia Gonzales Álva y la Dra. Janeth Serrano Bello.

Se agradece la asesoría técnica y académica del Dr. Fernando Suaste Olmos durante la realización del presente trabajo.

A mi compañero de vida, Saúl, gracias por tu paciencia y cariño, sobre todo en los días en que los experimentos no salían y las cosas no parecían ir bien.

A mi familia de sangre y por elección; y a mi sobrina Emma que llegó a alegrarme la vida.

A Dios, porque de él, por él y para él son todas las cosas.

Resumen

La ingeniería de Tejido Óseo está orientada al desarrollo de materiales capaces de facilitar la regeneración de un defecto de tamaño crítico causado por un trauma o enfermedad, sin los inconvenientes que generan los tratamientos actuales.

Para lograr lo anterior; esta área multidisciplinaria se ha enfocado en diseñar y sintetizar andamios biocompatibles que logren imitar las características del tejido nativo, en cuanto a su estructura macroscópica y sus características micro- y nanométricas, y así obtener andamios con propiedades adecuadas para el crecimiento celular y la posterior regeneración del tejido dañado.

El ácido poli láctico (PLA) es un polímero sintético aprobado por la FDA que, por sus características mecánicas, su alto punto de fusión y su biocompatibilidad ha sido ampliamente estudiado en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, así como aplicaciones comerciales, industriales y ambientales. Este polímero ha sido usado en la síntesis de andamios para la ingeniería de tejidos, una de estas técnicas de síntesis es el hilado por propulsión de gas, que permite usar la solución de este polímero a diferentes concentraciones para formar fibras de rangos micro- y nano-métricos que permitan imitar la estructura de la matriz extracelular y que en combinación con la técnica de impresión 3D pueda estimular la regeneración de tejidos con características y formas definidas.

En el presente estudio se sintetizó un andamio híbrido, tomando al PLA como el polímero de elección y usando una combinación de las técnicas de síntesis como el hilado por propulsión de gas y la impresión 3D para obtener las mejores características de cada técnica y lograr sintetizar un andamio jerárquico con características apropiadas para guiar la regeneración del tejido óseo. Una vez obtenido el andamio, se caracterizó la morfología superficial, sus características fisicoquímicas, mecánicas, y posteriormente se llevó a cabo la evaluación biológica con osteoblastos fetales humanos (hFOB). Los resultados del presente estudio muestran que los andamios recubiertos tienen una mejor adhesión y proliferación celular y que las fibras nano y micro fibrilares sirven como una plataforma para guiar el crecimiento celular, observando la importancia de la síntesis de andamios jerárquicos que imiten la estructura del tejido y así obtener substitutos que puedan guiar la regeneración del tejido óseo.

Con lo anterior se concluye que la combinación de las técnicas de síntesis nos permitió obtener un andamio tubular 3D con características micro y macrométricas apropiadas,

aprovechando las mejores propiedades de cada técnica de síntesis y así se logró obtener un andamio que a futuro podría ser usado como una alternativa de tratamiento para defectos óseos.

Abstract

Bone tissue engineering is oriented to design biomaterials that could allow regulate the regeneration process onto critical size defects injures caused by trauma or disease, without the inconveniences of the standard of current treatments.

To achieve the above, bone tissue engineering has focused on designing and synthesizing biocompatible scaffolds that could mimic the extracellular matrix (ECM) characteristics of the native tissue, in terms of its macro-, micro- and nanometric structure with adequate properties for cell growth and subsequent regeneration of the damaged tissue.

Poly(lactic acid) (PLA) is a synthetic polymer approved by the FDA, due to its mechanical characteristics, its high melting point and biocompatibility. PLA has been widely studied in biomedical and pharmaceutical applications, as well as commercial, industrial and environmental applications. This polymer has been used in the synthesis of scaffolds in the tissue engineering field by several techniques. For example, air jet spinning allow to use the solution of PLA polymer at different concentrations to form fibers at micro- and nanometric ranges that allow to mimic the structure of the ECM and in combination with other technological approach as 3D printing can stimulate the regeneration of tissue with defined characteristics of geometry and shapes.

In the present study a hybrid scaffold was synthesized, taking PLA as the polymer of choice and using a combination of synthesis as air jet spinning and 3D printing to obtain the best characteristics of each technique and to design a hierarchical scaffold with appropriate topographical characteristics to guide the bone tissue regeneration.

The design scaffold was characterized of its surface morphology, physicochemical, and mechanical characteristics, as well its potential biological respond with human fetal osteoblast (hFOB).

Our results shows the additive manufacturing has been successfully used for the fabrication of a 3D scaffold with a defined tubular shape scaffolds coated with submicrometric fibers allow hFOB cells to adhere and proliferate better than uncoated 3D tubular scaffolds showing that the fibers work as a platform to improve cell biocompatibility (being not toxic to cells) and provide support to colonization and cell growth by the osteoblast cells. Moreover, the 3D tubular scaffold coated with fibers needs more studies as a biomineralization process for it to have a potential future use in bone tissue engineering or for

it to have an application in the vascularization process. In conclusion the combination of AJS and printing technology allow us to obtain a 3D tubular scaffold with appropriate characteristics to guide the bone tissue.

1 Introducción

La Ingeniería de Tejidos también denominada medicina regenerativa, es la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y las ciencias biológicas, para lograr entender la relación entre la estructura y función de los tejidos; y por medio esto desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos dañados o enfermos. La triada de la Ingeniería de Tejidos se compone de los andamios, las células y los factores de crecimiento o moléculas de funcionalización. Todo esto con la finalidad de poder diseñar, obtener y caracterizar un andamio que se capaz de sustituir un tejido dañado o faltante, sin generar una respuesta inmune y/o sin las complicaciones que genera la donación de tejidos a través de aloinjertos o auto injertos.

El objetivo de desarrollar terapias basadas en células, capaces de inducir la regeneración de un tejido con características específicas y al mismo tiempo estimuladas por el microambiente que las rodea, es evitar las complicaciones actuales de los tratamientos como son la falta de donadores, morbilidad de la zona donante o una respuesta inmune o rechazo.

Los andamios deben de facilitar la localización y distribución de las células a sitios específicos del cuerpo, mantener una arquitectura tridimensional que permita y guíe la formación de nuevos tejidos con la función apropiada. Para lograr esto, los andamios deben de cumplir diferentes características como la de ser biocompatibles, no deben ser tóxicos, deben de tener propiedades físicas y mecánicas optimas, además de las características del tejido nativo desde su estructura nanométricas hasta la macrométrica.

Los andamios tridimensionales juegan un papel fundamental en la Ingeniería de Tejidos al actuar como un alojamiento temporal para las células que se unen, crecen y secretan su propia matriz, para eventualmente formar un sistema de tejido organizado.

Las células carecen de la capacidad de crecer en orientaciones 3D por si mismas, los andamios tridimensionales pueden definir la forma anatómica del tejido y guiar el crecimiento celular.

Además de una estructura tridimensional, una capa de recubrimiento adecuado mejoraría las propiedades del andamio, mejorando muchas funciones críticas, al proporcionar una superficie nanométrica adecuada para la unión, proliferación y diferenciación celular al proporcionar una red abierta y porosa para una distribución celular uniforme y un

adecuado transporte de moléculas de señalización, nutrientes y desechos metabólicos.

En este proyecto, proponemos el diseño e implementación de un sistema combinado para el diseño de un material en 3D, el cual será obtenido por medio de impresión y diseño 3D y con el recubrimiento del andamio con la técnica de hilado por propulsión de gas. Con esta técnica será posible modular las propiedades morfológicas y funcionales del dispositivo en relación con la funcionalidad requerida para cada capa en términos de la interacción célula-material, permeabilidad, morfología y respuesta mecánica del andamio. El diseño de andamios tubulares de PLA en 3D podría imitar o ser un análogo de las unidades estructurales de la matriz extracelular del hueso y de las denominadas osteonas; en la cual se agrupan capas laminares de MEC con lagunas conteniendo células óseas, ya sean progenitoras; osteocitos u osteoblastos.

El diseño del estudio propuesto consistió en la optimización de los procesos de fabricación del conducto tubular óseo en 3D de PLA con una técnica combinada, su caracterización estructural, mecánica y fisicoquímica, y la respuesta biológica del andamio con células de hueso.

2 Marco Teórico

El esqueleto humano tiene la capacidad de combinar la ligereza de los huesos con su dureza, esto es posible debido a que los huesos poseen mecanismos celulares que permiten detectar cargas mecánicas y estas son transformadas en señales biológicas que a su vez dirigen la formación y resorción ósea. La masa ósea y su estructura se ve afectada por cargas mecánicas externas ejercidas durante la actividad física diaria y su modificación se logra mediante un proceso de estímulos mecánicos repetidos, debido a esto la adaptación y remodelación ósea son el resultado de un proceso celular de regulación auto organizado muy importante para mantener la homeostasis en el cuerpo. [1]

2.1. Tejido Óseo

El hueso es un tejido conectivo vascular complejo que presenta una estructura jerárquica, que conforma al esqueleto, que a su vez es el sistema de soporte estructural para los vertebrados. Los huesos también sirven como reservorio de minerales inorgánicos y mantienen el balance de calcio/fosfato en el cuerpo. Poseen un mecanismo que les permite tener un crecimiento y remodelación continua a lo largo de la vida y esto involucra dos procesos muy importantes que son la resorción y remodelación ósea, que se deben de llevarse a cabo de manera simultánea para mantener el equilibrio en el cuerpo. Cuenta con mecanismos para crecer y cambiar de forma y tamaño y así poder adaptarse a diferentes factores de estrés y resistir las fuerzas mecánicas.

Los componentes orgánicos de la matriz ósea constituyen aproximadamente el 40 % del peso total, está constituida mayormente por colágena tipo I, que es sintetizada intracelularmente como tropocolágeno y posteriormente exportada como fibrillas. La porción inorgánica está compuesta mayormente de sales de fosfato de calcio, presentes en forma de hidroxiapatita, sin embargo, también contiene carbonato, fluoruro, fosfato ácido, magnesio y citrato, que componen aproximadamente el 60 % del peso total de la matriz ósea, también están presentes las células propias del hueso y el agua, las proporciones en volumen de hidroxiapatita–colágeno–células–agua y la fracción en peso no son siempre constantes. [2, 3]

2.1.1. Estructura Macroscópica del Hueso

En términos generales el hueso puede clasificarse en cinco tipos: huesos largos, huesos cortos, huesos planos, huesos de forma irregular y huesos sesamoideos. Estos huesos se forman mediante diferentes mecanismos durante el desarrollo embrionario. Los huesos largos tienen una formación endocondral mientras que los huesos planos tienen una formación intramembranosa, ambos tipos de hueso tienen en su parte externa una capa de hueso densa y compacta a la que se le conoce como corteza o hueso cortical. Dentro de esta corteza se encuentra la cavidad medular que contiene elementos hematopoyéticos, grasa y espículas de hueso. Las espículas constituyen la parte trabecular del hueso que se conoce como hueso esponjoso o trabeculado.

El hueso compacto o cortical se caracteriza por ser un hueso denso y calcificado que forma el recubrimiento externo del hueso que rodea la cavidad medular. Este tipo de hueso tiene pocos espacios y está compuesto por agregaciones densas de hueso lamelar, sin embargo, contiene canales de Havers y Volkman para su suministro vascular y está rodeado externa e internamente por el periostio y el endostio, respectivamente.

El hueso trabecular también llamado hueso esponjoso, está conformado por espículas delgadas y entrecruzadas de hueso que están separadas por espacios medulares y llenan el interior de los huesos largos, la región metafisiaria y los extremos epifisarios. Las trabéculas forman una red en forma de placa que sirve como andamio para la cavidad medular, permite aligerar los huesos y deja espacio para los vasos sanguíneos y la medula, las espículas que forman las trabéculas están constituidas a su vez por varias láminas de tejido óseo conformando así una estructura jerárquica. [3]

El hueso también puede clasificarse de acuerdo con la disposición de las fibras de colágena en dos tipos: hueso entretejido o inmaduro y hueso laminar o maduro.

El hueso tejido está conformado por fibras de colágena orientadas al azar, con un gran número de osteoblastos y células osteoprogenitoras. Tiene una estructura desordenada que contrasta con la homogeneidad del hueso laminar y también contiene más células por unidad de área que el hueso maduro, es el principal tipo de hueso durante el desarrollo del feto, aunque también hay áreas de hueso inmaduro durante la edad adulta, sobre todo en las áreas que están sufriendo algún tipo de remodelación. Este tipo de hueso también se encuentra presente en el alveolo dental en los adultos y en las zonas donde los tendones se insertan a los huesos, a excepción de estas zonas.

El hueso laminar es la forma madura del hueso y se caracteriza por tener una disposición en líneas paralelas y fibras de colágeno bien organizado, la tasa de deposición es lenta y

siempre se forma sobre hueso preexistente. Su organización secundaria lo caracteriza, en la corteza está compuesto por laminillas que tienen un arreglo circunferencial parecido a un tubo, esta disposición tubular se conoce como osteona, la parte central del tubo se conoce como Canal de Havers y contiene sangre, vasos linfáticos y nervios. Las osteonas juegan un papel muy importante en las propiedades mecánicas del hueso cortical permitiendo la deformación y evitando la fractura. [3, 4]

2.1.2. Estructura Microscópica del Hueso

Las células más importantes en el tejido óseo son los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos son las células responsables de la formación y mineralización de hueso u osteogénesis, mientras que los osteoclastos se encargan de la reabsorción. Los osteoblastos y osteocitos son células que se diferencian de las células troncales mesenquimales, mientras que los osteoclastos se derivan de las células troncales hematopoyéticas.

2.1.3. Células de Hueso

Osteoblastos

Los osteoblastos se diferencian a partir de células troncales mesenquimales que tienen la capacidad de dar lugar a diferentes tejidos y tipos celulares como son los osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, células musculares o adipocitos, dependiendo de la naturaleza de los estímulos que reciban y del microambiente local.

Las células osteoprogenitoras pueden encontrarse en la capa interna del periostio, en el revestimiento del endostio de la cavidad medular, en las osteonas o canales de Havers, en los canales de Volkman y en el tejido perivascular del hueso. Los osteoblastos tienen una forma cuboidal o columnar y generan líneas de aposición ósea en los sitios activos de formación de hueso durante el desarrollo o en la reparación de alguna fractura, también son los responsables de la producción de colágena tipo 1 y de los proteoglicanos (glucosaminoglicanos) que son los mayores componentes de la matriz ósea y matriz osteoide y están involucrados en la mineralización de la matriz mediante el almacenamiento y la liberación de calcio, fosfato y vesículas. Los osteoblastos están unidos mediante uniones adherentes tipo desmosomas y encontramos a las cadherinas como las proteínas transmembranales que se integran a las uniones adherentes y se encargan de unir las células a través de su citoesqueleto. [3]

Las características fenotípicas de los osteoblastos dependen de su estado de diferen-

ciación, uno de los marcadores tempranos para evaluar su diferenciación es la actividad de la fosfatasa alcalina; además de colágeno tipo 1 y proteoglicanos; otros marcadores que se presentan de forma temporal durante el proceso de diferenciación son proteínas no colagénicas como la osteocalcina, osteopontina, osteonectina y sialoproteína ósea. Los osteoblastos secretan una variedad de citocinas y factores estimuladores de colonia (CSF), como la interleucina 6 y 11, factor estimulante de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF) y factor estimulante de colonia de macrófago (M-CSF). También secretan numerosos factores de crecimiento entre los que encontramos el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGFB), proteínas morfogénicas de hueso (BMPs), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFs) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGFs). Los osteoblastos maduros poseen receptores para la hormona paratiroidea (PTH) y 1,25-hidroxivitamina D, dos hormonas que juegan un rol importante en la regulación del metabolismo y la homeostasis del hueso. [3]

El estrés mecánico constante es esencial para el mantenimiento de la masa y fuerza ósea, que se lleva a cabo mediante las funciones conjuntas de los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Sin embargo, los osteoblastos responden a los estímulos mecánicos mediante cambios en su tamaño y en su forma, mientras que la diferenciación de los osteoblastos está regulada también por numerosos factores incluyendo el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), proteína morfogénica de hueso (BMPs), factor de crecimiento fibroblástico (FGFs) entre otros.

Los sistemas de cultivo celular de osteoblastos son ampliamente usados para evaluar diferentes sistemas in vitro y en general pasan por 3 estados de diferenciación, la proliferación de las células, la producción y maduración; y la mineralización de la matriz. En la fase de la proliferación celular se presenta la expresión del ciclo celular y los genes, después se presenta la expresión de genes asociados con la formación de la matriz ósea como la colágena tipo 1 y la fosfatasa alcalina y finalmente se presentan los genes asociados con la mineralización de la matriz como son la osteocalcina y la sialoproteína ósea. [3]

Osteocitos

En contraste con las células de superficie como son los osteoblastos, los osteocitos son células que viven dentro de la sustancia del hueso, estas células constituyen el 90-95 % del total de las células de hueso, se derivan de los osteoblastos y quedan atrapados y rodeados por la matriz ósea que ellos mismos producen. Los espacios que ocupan se conocen como lagunas y están involucradas en la señalización celular y mantenimiento de la viabilidad

de la matriz ósea. La forma de comunicación entre osteocitos y osteoblastos es a través de una red de canalículos, los osteocitos adyacentes están unidos mediante uniones gap y de este modo se forma una red muy amplia para la comunicación entre sí y con las células que están fuera de la matriz ósea, también se cree que los osteocitos son importantes en la transducción de cargas mecánicas a eventos celulares como la formación y remodelación ósea, otra de sus funciones es actuar como células mecanosensoriales, mediante su cuerpo celular que está rodeado por una delgada capa de matriz no mineralizada, que permite el flujo del líquido intersticial sobre su superficie, la capacidad de su receptor mecanosensorial se ha demostrado en estudios que examinan la facilitación de la carga en la difusión de macromoléculas.

Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas que generalmente contienen de 3-25 núcleos por célula y a pesar de que los linajes de los osteoblastos y los osteoclastos son independientes entre sí, el origen de los osteoclastos requiere de la presencia de los osteoblastos junto con una variedad de citoquinas hematopoyéticas como las interleucinas (IL) 1, 3, 6 y 11, factor de necrosis tumoral (TNF), factor estimulante de colonias (CSF), factor de células madre y otros. Se requieren factores estimulantes de colonia para la proliferación y diferenciación de células progenitoras de osteoclastos. Después de que se forma el osteoclasto se requieren otras citoquinas para su activación y resorción ósea. La hormona paratiroidea (PTH), 1,25 dihidroxivitamina D₃, factor de crecimiento transformante alfa (TGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) actúan para estimular la osteoclastogénesis, mientras que la calcitonina inhibe su formación. Los osteoclastos son las células primarias de reabsorción ósea y se encuentran en sitios donde la resorción está tomando lugar o si ya se ha producido una resorción activa, se encuentran en cavidades conocidas como “Lagunas de Howship” que también tienen la capacidad de hacer túneles a través del hueso cortical creando canales para su comunicación.

2.1.4. Colágenas y Proteínas de Hueso

El tejido óseo contiene diferentes cantidades de colágena, elastina, glucosaminoglicanos y proteoglicanos, de estos, la colágena es la más abundante y su síntesis y función han sido ampliamente estudiadas. Las colágenas son una clase de proteína con características comunes como lo es su estructura de triple hélice compuesta de cadenas alfa polipeptídicas; sin embargo, existen varios subtipos (tipos I-XIII), cada uno es el resul-

tado de diferentes genes y difieren entre sí en su estructura bioquímica. La colágena tipo I, es la más abundante en la mayoría de los tejidos conectivos.

El colágeno tipo I es un tipo de colágeno fibrilar y se encuentra en el hueso, la piel, los meniscos, tendones, ligamentos y capsulas articulares, alrededor del 90 % de la matriz ósea se compone de esta colágena y existen varios subtipos. La colágena tipo I de hueso se compone de galactosil-hidroxisilina, a diferencia de los aminoácidos encontrados en la piel que son los glucosil-galatosil-hidroxisilina. La hidroxilación y glucosilación son eventos postraduccionales que modifican la colágena y son específicas para el hueso, estas modificaciones explican parte del porque la mineralización sólo ocurre en los huesos y no en otras zonas del cuerpo. La estructura básica del colágena tipo I está compuesta por una repetición de la secuencia tripeptídica que forma una hélice, esta hélice se encuentra super enrollada, lo que le proporciona una enorme fuerza. [3, 4]

Las colágenas II, III, V y XI, también son colágenas fibrilares. La colágena tipo II se encuentra en la mayoría de cartílagos articulares, fibrocartílago, en el humor vítreo del ojo y en el núcleo pulposo de los discos intervertebrales. La colágena tipo III está presente en tejidos de reparación, en vasos sanguíneos grandes y en otros tejidos en asociación con el tipo I. La colágena tipo V está presente en vasos sanguíneos largos, cornea, hueso y algunos otros tejidos conectivos mientras que el tipo XI está presente únicamente en cartílago articular.

La síntesis de colágena está bajo el control de alrededor de 20 genes, la biosíntesis del colágena, su secreción y agregación es un proceso complicado, las unidades fundamentales de las fibrillas de colágena son tres cadenas de polipéptidos dispuestas en forma helicoidal, estas cadenas se agregan en unidades de tres para formar tropocolágena, éste a su vez se agrega de forma escalonada para formar una microfibrilla de colágena, las fibras se componen de varias de estas microfibrillas. La estructura de la colágena se estabiliza mediante el entrecruzamiento y mediante su interacción con proteoglicanos, el proceso de entrecruzamiento es importante para la estabilización e integridad estructural; se da en el espacio extracelular y se producen interacciones específicas entre el colágeno y otras macromoléculas extracelulares como la fibronectina, osteonectina y los proteoglicanos. [3]

2.1.5. Proteínas no colagénicas

Hasta ahora se conocen tres sialoproteínas óseas o BSP, incluyen a la BSP I, BSP II y la glicoproteína ácida ósea 75 o BAG-75.

La sialoproteína ósea o BSP, constituye aproximadamente el 12 % de las proteínas no

colagénicas de hueso, se une principalmente al calcio e hidroxiapatita, las células y las colágenas. El gen para la sialoproteína de unión a integrina ósea, IBSP se encuentra en el cromosoma 4. El gen de aproximadamente 15kb incluye siete exones y el promotor contiene motivos que determinan la regulación del desarrollo y la expresión específica del tejido y su expresión génica es más limitada que la de osteopontina. El gen IBSP está expresado por condrocitos hipertróficos en la placa de crecimiento, en un subconjunto de osteoblastos al inicio de la mineralización de la matriz y en los osteoclastos. Fuera del esqueleto, el IBSP se expresa en odontoblastos y cementoblastos dentales y en trofoblastos de placenta. [5]

Otra proteína no colagénica de la matriz ósea es la glicoproteína ácida de hueso 75 o BAG75, que es una glicoproteína ácida de 75kDa en tamaño aparente que tiene un elevado contenido de Asp/Glu (29%), ácido siálico, y fosfato unido covalentemente. Los estudios actuales indican que BAG-75 está restringido en su expresión para formar hueso primario y dentina. El BAG-75 purificado muestra una fuerte tendencia a auto asociarse en complejos esféricos supramoleculares compuestos por microfibrillas de 10-12nm de diámetro. Complejos electronegativos compuestos de BAG-75 pueden secuestrar cantidades milimolares de iones fosfato que están disponibles para reacciones de nucleación de cristales, mientras que los complejos multiméricos de BAG-75 existen *in vivo* en sitios de nueva formación ósea primaria. También se expresa de forma temprana en modelos de formación de hueso intramembranoso *in vivo*.

La sialoproteína ósea se acumula dentro de las áreas de la matriz enriquecida con glicoproteína ácida ósea 75 en una etapa posterior. Esta proteína se une a los pequeños proteoglicanos óseos y existe una reacción cruzada de anticuerpos con osteopontina en algunas especies. La caracterización completa de esta proteína aún no se ha completado. [5, 6]

La osteopontina se une al receptor de integrina en los osteoclastos, esta unión conduce a la activación de la ruta de la fosfolipasa C y resulta en un aumento intracelular del calcio. La inmunolocalización de la osteopontina muestra que existen grandes cantidades en la matriz extracelular y en el desarrollo de los huesos endocondrales e intramembranosos, su localización dentro de las células incluye osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células precursoras, condrocitos y fibroblastos. [4]

Las fosfoproteínas tienen un rol importante en la formación de calcio extracelular, formación y mineralización de hidroxiapatita, una de estas proteínas fosforiladas es la osteonectina, que se une al Ca^{2+} al colágeno tipo I, hidroxiapatita y trombospondina, y así inicia y promueve el crecimiento del cristal. [5]

El gen de la osteonectina se ha localizado en el cromosoma 5 y se ha encontrado su presencia en diversos tejidos, su concentración es muy alta en el tejido óseo, 10,000 veces más que en otros tejidos, por lo tanto, se considera a la osteonectina como la proteína no colagénica más abundante en el hueso y que juega un papel importante en la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular.

La osteocalcina es secretada por los osteoblastos y odontoblastos en respuesta a la 1,25 dihidroxivitamina D, se secreta dentro de la matriz osteoide después de que se inicia la mineralización y sirve como un marcador de aumento del recambio óseo, en particular de mayor actividad osteoblástica. Los niveles séricos de osteocalcina no siempre corresponden con los niveles de fosfatasa alcalina sérica, sugiriendo que estos dos marcadores pueden ser sintetizados por osteoblastos en diferentes etapas del desarrollo.

El papel de la osteocalcina en el cuerpo no está claro, pero tiene una función en la mineralización y remodelado óseo, también puede actuar como un quimioatrayente para las células osteoclásticas progenitoras. Su secreción está bajo el control de muchos factores incluyendo la vitamina D, TGF- β , PTH y otros. La osteocalcina al tener afinidad por el Ca²⁺ puede jugar un papel importante en la regulación de crecimiento de cristales y reclutamiento de osteoclastos, la literatura reporta que se requiere de su estímulo para la maduración mineral. Toda la estructura de la osteocalcina se ha determinado mediante secuenciación y el gen se localiza en el cromosoma 1 en humanos. [6]

2.1.6. Estructura Jerárquica

La estructura jerárquica del hueso en siete niveles de organización, son un esquema que fue propuesto por Weiner y Wangner, este esquema se ha ido adaptando a lo largo del tiempo y se ha observado que los niveles de organización I, II, III, son comunes para todos los tipos de hueso. El nivel I se compone de la fase mineral compuesta principalmente por Hidroxiapatita (HA), colágenas, proteínas no colagénicas (NCPs), proteoglicanos (GSGs) y agua. El nivel II consta de componentes estructurales, las moléculas de colágeno se organizan en fibras de 80-120nm de diámetro y comienza la mineralización de las fibras. En el nivel III comienza el autoensamblaje de las fibras de colágena tipo I para la formación de matrices, los diámetros de estas matrices pueden variar entre menos de una micra a varias micras. El nivel IV las matrices fibrilares se organizan en una variedad de formas y patrones y las fibras de sharpey comienzan la mineralización. El nivel V se considera una super estructura por la formación del hueso fibrolamelar y lamelar, las fibrillas de colágeno tienen una disposición unidireccional y un diámetro entre 1-3 micras.

En el nivel VI están presentes paquetes de fibras de colágeno mineralizadas organizadas capa por capa y de forma paralela que constituyen el hueso fibrolamelar, este tipo de hueso está compuesto por una serie de lamelas en una disposición ordenada y sus canalículos, el grosor de cada lamela oscila entre 3-7 micras. En el nivel VII encontramos a las osteonas, y se clasifican en primarias y secundarias, las osteonas secundarias o sistemas de Havers, son estructuras rugosas y cilíndricas con un diámetro de 100-200 micras con un canal central de 30-40 micras de diámetro. Los niveles VIII y IX constituyen el hueso completo, como tejido y órgano, todos los huesos tienen una capa externa de hueso compacto, el hueso trabecular puede llenar el volumen completo del hueso o estar presente sólo en algunas zonas, estructuralmente tanto el hueso compacto como el trabecular están compuestos de láminas y una comparación de las estructuras 3D hasta el nivel VI muestra únicamente diferencias sutiles. [7]

Las estructuras en espiral se reflejan en varios niveles jerárquicos del hueso laminar, las moléculas de triple hélice de colágeno y las fibrillas de colágeno, las matrices fibrilares dentro de las lamelas en una osteona, los canalículos que tienen una conformación tubular en 3D y los canales de Havers a lo largo del hueso. Los niveles jerárquicos comienzan en diámetros desde 1-3 micras y se conforman hasta llegar a la estructura en 3D. Un esquema de la estructura jerárquica nos ayuda a definir la relación entre la estructura y función del hueso. [7] Ver Figura 1.

2.2. Ingeniería de Tejidos

El hueso es un tejido metabólicamente activo capaz de adaptar su estructura a estímulos mecánicos y reparar el daño estructural a través del proceso de remodelación ósea. Es un tipo de material nanocompuesto muy complejo, que tiene la capacidad de proporcionar una gran rigidez y dureza para soportar cargas muy grandes y a su vez genera señales fisicoquímicas y mecano químicas para mantener la bioactividad de las células. Sin embargo, en el caso de un daño o enfermedad grave como son la artritis, un trauma o infección; el tejido óseo pierde su capacidad de auto-regeneración, lo que genera una necesidad de implantes o sustitutos óseos. Desde la primera definición por Langer en 1993, la ingeniería de tejidos se ha enfocado en el uso de biomateriales artificiales para la regeneración de los tejidos dañados o enfermos. [8]

La ingeniería de tejidos está conformada por una triada que involucra las células, los andamios y factores de crecimiento, a los andamios se les incorporan células para llevar a cabo pruebas biológicas *in vitro* y posteriormente ser evaluadas *in vivo* para guiar la

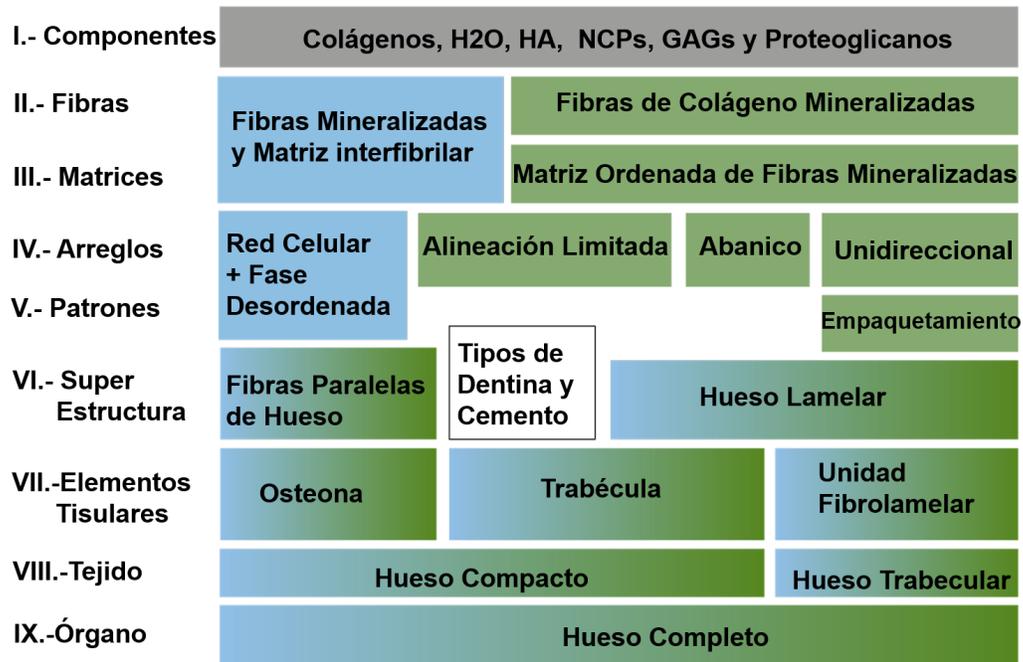


Figura 1: Niveles de organización del tejido óseo.

regeneración del tejido óseo, durante los últimos años todos los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de un andamio que imite el mecanismo natural de la regeneración ósea. Ver Figura 2.

Se han estudiado cuatro formas en las cuales los biomateriales influyen en la regeneración ósea.

1. Un biomaterial con una composición apropiada puede proporcionar una nutrición continua al hueso para mejorar la mineralización.
2. Las propiedades nanométricas de los biomateriales pueden mediar los comportamientos celulares como son la adhesión y proliferación celular, así como la osteointegración, las nanoestructuras por sí mismas tienen la capacidad de mejorar la resistencia del hueso nuevo.
3. Los biomateriales deben presentar una arquitectura jerárquica que abarque una estructura macro-, micro- y nano- porosa, que permita la permeabilidad celular, el transporte de nutrientes y residuos, el crecimiento óseo y la vascularización.
4. El uso de nanoestructuras puede mejorar la forma en que se liberan los factores de crecimiento y permitir que los andamios aceleren la formación de hueso y vasos san-

guíneos, la relación interdependiente entre los materiales y las funciones biológicas nos hace ver que es muy importante su diseño desde la perspectiva de su impacto en el comportamiento biológico en todos los niveles jerárquicos del hueso.

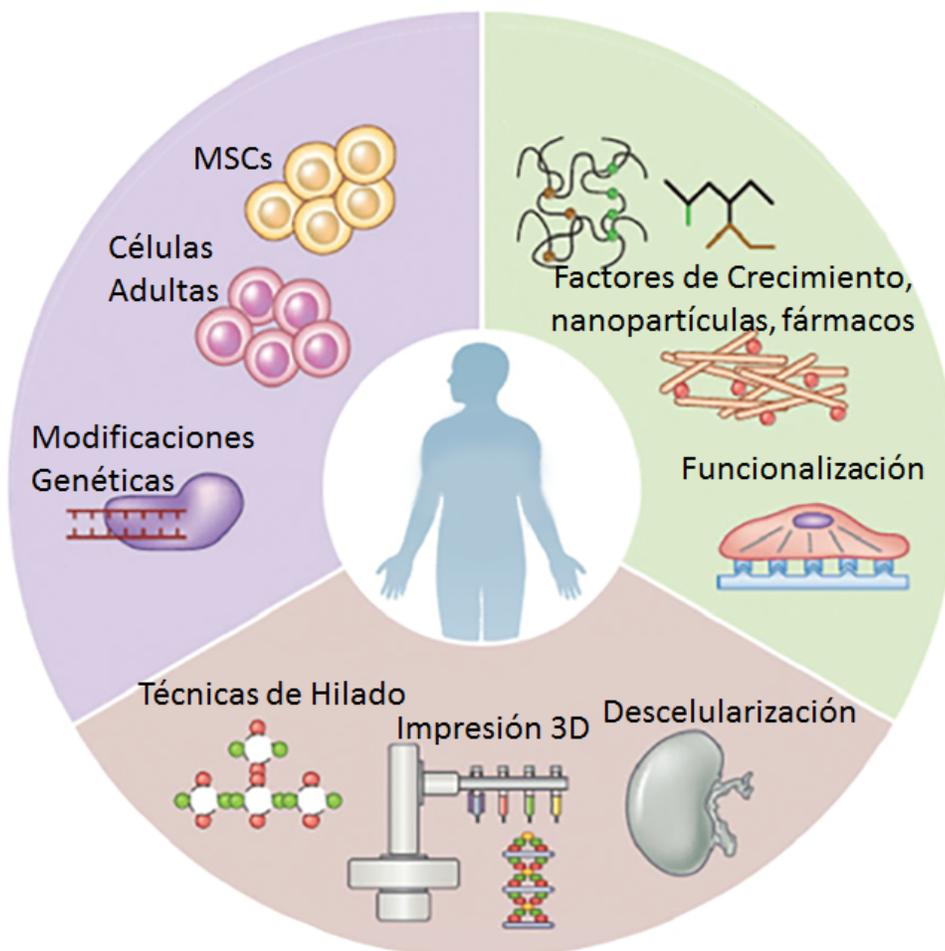


Figura 2: Triada de la Bioingeniería de Tejidos.

Los andamios deben proporcionar apoyo estructural en el sitio del defecto en la etapa inicial de la implantación y así la presencia de nanoestructuras en la composición de los andamios puede mejorar y guiar la regeneración del hueso, el uso de nanopartículas, factores de crecimiento y fármacos permite que diferentes materiales puedan ser incorporados al andamio y mejoren sus propiedades, la topografía superficial de los andamios también juega un papel muy importante porque tiene un impacto en la diferenciación de las células mediante la mecanotransducción y la señalización intracelular. [8]

Mientras que las superficies nanométricas proveen una mayor área de superficie que

promueve la adhesión celular y la afinidad de las proteínas, también los patrones de superficie tienen un impacto en la diferenciación celular y en la distribución de las células en el andamio. La estructura en 3D imita las condiciones reales en tamaño y forma del defecto, y se busca que genere el microentorno apropiado para el intercambio de nutrientes, desecho de residuos, migración celular, proliferación, diferenciación, angiogénesis y vascularización. La macroporosidad interconectada con un diámetro $>100 \mu\text{m}$ es un requisito para el crecimiento óseo, la migración celular y el transporte de nutrientes, los andamios con poros entre $200\text{-}300 \mu\text{m}$ han favorecido la extensión y elongación de las células, por lo tanto; los andamios con estructuras macro, micro y nano pueden generar un efecto sinérgico y mejorar su efecto en el tejido dañado que se busca regenerar. [8]

La arquitectura jerárquica de un material tiene la capacidad de generar un microambiente adecuado para el desarrollo de las actividades celulares, esta arquitectura puede ser obtenida mediante una o más técnicas de síntesis a fin de crear microambientes que permitan una adecuada composición, estructura y funciones biológicas con capacidad regenerativa para la obtención de una regeneración ósea *in situ*. [8]

2.2.1. Impresión 3D

A pesar de que el hueso tiene mecanismos para llevar a cabo una remodelación dinámica y la auto-reparación de heridas, un defecto óseo de tamaño crítico requiere intervenciones externas o algunos tratamientos para reparar y regenerar el defecto. [9, 10]

Los autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos e injertos aloplásticos, son diferentes tipos de injertos óseos; cada tipo de injerto tiene sus propias ventajas, desventajas y limitaciones. Los injertos óseos sintéticos actuales carecen de propiedades osteogénicas y osteoconductoras, pero dentro de sus ventajas está el control preciso de la composición estructural y la porosidad, la falta de transmisión de enfermedades y el hecho de que se evita la morbilidad del sitio donante; debido a estas ventajas, en las últimas dos décadas los estudios se han centrado en el desarrollo de tejidos óseos sintéticos. [10]

La ingeniería de tejidos ha surgido como una solución prometedora para satisfacer la creciente demanda de sustitutos de tejidos, una de las ramas de la ingeniería de tejidos de vanguardia y muy prometedora es la impresión tridimensional (3D) de tejidos y órganos. Usando una técnica de deposición capa por capa, la impresión 3D se desarrolla para posicionar los biomateriales y las biomoléculas de manera precisa en 3D que semeja la matriz extracelular (ECM) de los tejidos. [10]

La impresión 3D se define como un método de manufactura aditiva para la fabricación

de estructuras 3D mediante la deposición capa por capa de un material determinado. La tecnología 3D se desarrolla mediante el uso de impresoras 3D, materiales de impresión y diseños con programas específicos para la aplicación requerida. Fue descrita por primera vez en 1984 y los grandes avances que se han tenido desde entonces en esta tecnología y su capacidad de crear complejas formas en 3D con una variedad de materiales y con una distribución espacial y arreglo jerárquicos la ha llevado a el aumento de su uso en el área de los biomateriales. [9]

Se conocen más de 40 técnicas de impresión 3D, entre los que encontramos el modelado por deposición fundida (FDM), estereolitografía (SLA), sinterización selectiva por láser (SLS), por inyección fotopolimérica (PPJ) y por inyección aglomerante en polvo (PBJ).

Por otro lado, la impresión 3D de microambientes celulares se han usado diversos materiales como biotintas entre los que encontramos materiales naturales como gelatina, alginato, colágeno, fibrina, ácido hialurónico e hidroxiapatita, los biomateriales sintéticos usados son el polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PCL), ácido poli láctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli láctico co-glicólico (PLGA) y biomateriales híbridos. [10]

Debido a que la impresión 3D ha permitido el control de la forma, tamaño y distribución de poros interconectados, se han encontrado muchas aplicaciones en la construcción de sustitutos de tejido óseo, los materiales más utilizados son vidrios bioactivos, hidroxiapatita (HA), brushita, monetita, fosfato tricálcico (β -TCP), fosfato tetracalcico (TTCP), fosfato de calcio bifásico (BCP), policaprolactona y ácido poliláctico; el problema de la falta de la osteoconductividad de los materiales se ha compensado con un diseño adecuado del andamio y con la adición de factores de crecimiento y otras biomoléculas que en conjunto generan un microambiente adecuando para el crecimiento celular. [10]

La impresión 3D ha permitido el desarrollo de sustitutos óseos funcionales, sin embargo, todavía está en desarrollo y enfrenta diversos desafíos; entre los principales retos encontramos la resistencia mecánica, la complejidad del diseño de las estructuras, la porosidad y la falta de vascularización. Un andamio con una resistencia inadecuada podría ser usado únicamente en defectos que no estén sometidos a ningún tipo de carga; la composición química, el diseño estructural, las condiciones de síntesis y modificaciones post procesamiento, son las condiciones que determinan las propiedades mecánicas que tendrá el andamio. Muchos esfuerzos se han llevado a cabo para mejorar la resistencia de los andamios 3D para hueso mediante modificaciones químicas y estructurales del material y optimización de los procesos de síntesis e impresión. Un andamio debe tener una estructura porosa, el tamaño de poro que se necesita para una adecuada adhesión y

proliferación celular esta entre los 100-150 μm , los poros mayores a 300 μm han mostrado mejorar la formación de hueso nuevo y la vascularización, pero a su vez estos rangos de poro disminuyen la resistencia de los andamios, el volumen, la distribución, geometría y los parámetros de poro afectan la cinética de resistencia, el tiempo de degradación del andamio y la respuesta del tejido. La impresión 3D tiene la ventaja de poder modular los parámetros de impresión y así obtener andamios jerárquicos con macroporos en un rango de 250 μm y microporos en un rango de 5-30 μm que permitan una resistencia a la compresión similar a la de los huesos trabeculares. [10]

La síntesis o fabricación de sustitutos óseos de forma anatómica y específica para el paciente, es uno de los mayores retos, debido a las grandes variaciones anatómicas y los cambios en el tamaño, forma y zona de los defectos óseos; la impresión 3D es un método prometedor para lograr este objetivo, debido a que tiene el potencial de ser combinado con técnicas de imagen médica y adquirir los datos anatómicos necesarios para fabricar sustitutos de hueso personalizado, ofrece un amplio control sobre las micro y macro arquitecturas y permite crear estructuras complejas y jerárquicas. [10] Estas características combinadas con otro tipo de técnica de recubrimiento que nos permite obtener rangos nanométricos dentro de la misma estructura, es el enfoque que se busca para poder generar andamios miméticos a la MEC y a la estructura del tejido óseo.

Por otra parte, está reportado que se requiere un suministro de sangre abundante para satisfacer las necesidades nutricionales de las células óseas y la eliminación de sus productos de desecho, por lo tanto; la función exitosa de los sustitutos óseos depende de que estos permitan la formación de redes vasculares a lo largo del constructo, la vascularización es un factor determinante en la integración de sustitutos óseos dentro del defecto, muchos estudios se han centrado en mejorar la vascularización de los sustitutos óseos mediante la liberación de factores de crecimiento, co-cultivo, estimulación mecánica, utilización de materiales angiogénicos y mediante la fabricación de constructos biomiméticos, éstos han sido las estrategias más utilizadas para la regeneración de sustitutos óseos vascularizados.

Una de las áreas más innovadoras en la impresión 3D son las biotintas, este enfoque tiene como objetivo la impresión directa de andamios cargados de células. Las biotintas son una mezcla de materiales biológicos, biomoléculas y células vivas que se imprimen con base en el modelo diseñado por la computadora; comparado con los métodos tradicionales de impresión, las biotintas permiten un mejor control sobre la distribución celular dentro del andamio, además de que permite la fabricación de bloques de tejido y organoides, facilitando así la construcción de sustitutos de tejidos y órganos que puedan ser usados en

aplicaciones clínicas, los principales inconvenientes de la bioimpresión son las elecciones limitadas de biotintas y la posibilidad que existe de reducir la viabilidad de las células durante el proceso de impresión. [10]

Entre los diferentes tipos de impresión 3D las técnicas más usadas son la de fusión capa por capa, inyección de tinta, micro extrusión y bioimpresión asistida por láser, con estas técnicas se han hecho diversos esfuerzos por fabricar vasos sanguíneos, tejidos neuronales, hígado, piel, cartílago y huesos. [10] Con el incremento en la esperanza de vida de las poblaciones, irá en aumento la demanda de sustitutos óseos, la impresión 3D tiene el potencial de generar sustitutos óseos específicos para los pacientes, a pesar de que aun enfrentan diversos desafíos en la fabricación de sustitutos de hueso funcional, con el avance en la resolución de estos desafíos los procesos de fabricación podrían realizarse a gran escala y hacer posible la producción en masa de sustitutos óseos funcionales y específicos para el paciente. [10]

2.2.2. Hilado por propulsión de gas

Los andamios hilados nanofibrilares han tomado importancia en el área de la ingeniería de tejidos debido a que imitan la nanoestructura fibrilar de la matriz extracelular nativa. Las células en su microambiente crecen en una matriz fibrilar compuesta en gran parte por colágena, que forma un extenso entrecruzado natural de nanofibras que van desde los 200 nm de diámetro hasta varias micras, a pesar de que en los últimos años el electrospinning ha sido el método más usado para sintetizar andamios fibrilares, también ha ido en aumento el uso de gas comprimido para eyectar soluciones poliméricas por medio de una diferencia de presión y así obtener fibras con un proceso que se llama hilado por propulsión de gas. [11]

Formhals patentó la técnica de electrospinning en 1934, mientras que Norton patentó el primer dispositivo de soplado en 1936, mientras que Srinivasan encontró que el aerógrafo, comúnmente utilizado para pintar, podía ser cargado con una solución polimérica y utilizarlo para “aerografía de fibras”. [11]

El uso de un aerógrafo para la síntesis de andamios ha sido toda una revelación ya que es más fácil de usar y menos costoso de configurar que el electrospinning, además de que un aerógrafo también puede ser usado para “pintar” o recubrir una gama más amplia de dispositivos y tiene la ventaja de poder usar una amplia gama de polímeros biomédicos. [12]

La técnica de hilado por propulsión de gas se ha popularizado para la fabricación

de andamios debido a que puede usarse con diferentes objetivos como recubrimientos o rellenos, además de que se pueden obtener empaquetamientos de fibras alineadas o desordenadas, mientras que con el electrospinning se producen fibras individuales depositadas de manera aleatoria. [12]

La técnica de hilado por propulsión de gas permite una alta tasa de producción y reproducibilidad; y su fundamento consiste en la eyección de una solución polimérica desde la punta del aerografo hasta la superficie colectora por medio de una alta presión de gas (30-50 psi), el depósito y solidificación del material eyectado lleva a la formación de fibras en rangos que van de los nanómetros a los micrómetros. A diferencia de la técnica de electrospinning que se basa en las interacciones electrostáticas, las fuerzas que están presentes en la técnica de hilado por propulsión de gas son las diferencias de presión y la interfaz que se genera entre el gas y la solución. Se ha reportado que el hilado por propulsión de gas es una técnica de síntesis segura, diez veces más rápida que otras técnicas de síntesis, también es cien veces más barato y capaz de eyectar micro y nano fibras en un rango más amplio de formas y tamaños que el electrospinning. [13]

La técnica de AJS permite tener fibras de tamaño micro- y nanométrico, formando una interfaz con el andamio con estructura 3D, además de que su alta tasa de producción (5 mL/min) permite obtener un recubrimiento adecuado en un tiempo de síntesis corto y de que el proceso es en un solo paso lo que permite que el solvente sea eliminado por completo mediante el secado de las fibras en la superficie sintetizada. [14]

Los recubrimientos a base de polímeros se plantean como una alternativa de capa adhesiva fuerte o fibras nano compuestas que formen una interfaz que mejore la respuesta celular en conjunto con el andamio 3D, con el objetivo de mimetizar el tejido para guiar la regeneración del tejido óseo. [14]

En primer lugar, un recubrimiento de fibras micro y nanométricas beneficiará la adhesión, proliferación y diferenciación celular, en segundo lugar, proporcionaría una red abierta y porosa para una distribución uniforme de las células durante el sembrado y para la distribución de moléculas de señalización solubles, nutrientes y desechos metabólicos. [14]

La Técnica de Hilado por propulsión de gas permite el recubrimiento de diferentes estructuras con un arreglo fibrilar que puede servir de material de sacrificio en la degradación y sustitución gradual de la matriz extracelular del tejido que se busca regenerar, un recubrimiento fibrilar también permitirá mejorar la migración celular hacia el centro del andamio, mejorando sus características. [15] Ver Figura 3.

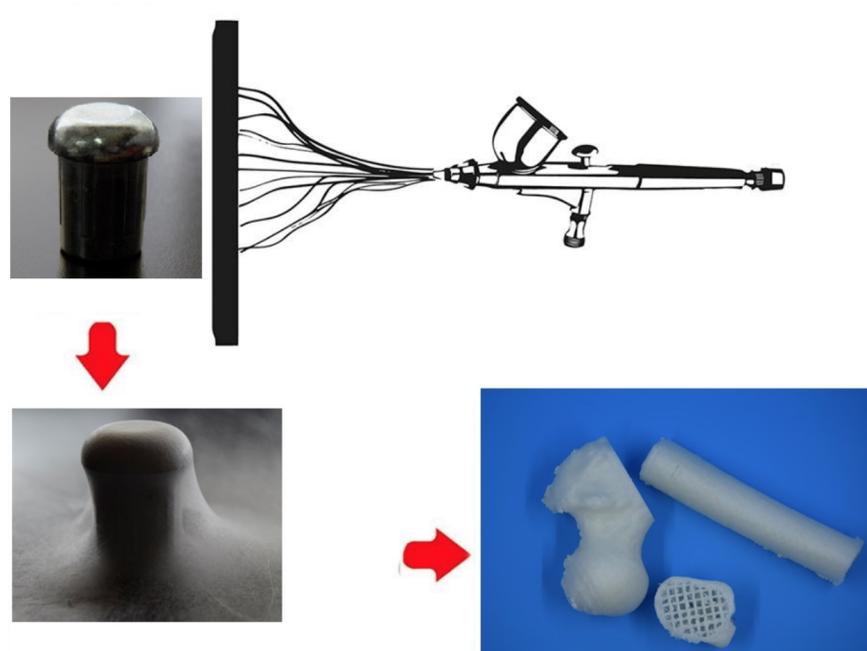


Figura 3: Hilado por propulsión de Gas.

2.2.3. Andamios Biohíbridos

Un enfoque importante en la ingeniería de tejidos es construir sustitutos de tejidos funcionales con el objetivo de reparar los tejidos perdidos o dañado, utilizando diversos sistemas 3D como son los biorreactores, organoides o andamios en 3D que buscan imitar el entorno celular *in vitro*.

Uno de los mayores desafíos es proporcionar un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes a las células cultivadas en una estructura diseñada en tres dimensiones. [15]

Los andamios 3D juegan un papel importante en la ingeniería de tejidos al funcionar como una matriz temporal donde las células pueden adherirse, proliferar y secretar su propia matriz extracelular para que eventualmente se forme un tejido organizado.

Las células por sí mismas carecen de la capacidad de crecer en orientaciones 3D, los andamios porosos pueden ayudar a definir la forma anatómica del tejido y guiar las células durante su crecimiento, para que este proceso se lleve a cabo es necesario que las propiedades mecánicas y estructurales del andamio, así como su arquitectura y la resistencia a la compresión, sean adecuadas y se vuelven críticas. En la ingeniería de tejidos los andamios deben poder imitar las características del tejido nativo con el fin de optimizar la respuesta celular. [16]

Los andamios deben tener una resistencia mecánica adecuada para soportar la deformación contra presiones pulsátiles y el estrés en un medio ambiente fisiológico *in vivo*, mientras mantiene su forma y el microambiente adecuado para la formación del tejido nuevo, aunado a esto, existen varios tejidos en el cuerpo humano que poseen propiedades de sistemas anisotrópicos no lineales que pueden ser difíciles de replicar artificialmente, estas propiedades pueden variar con la edad y el género; debido a esto se requiere de un diseño y proceso de síntesis del andamio específico para cada tejido y órgano.

Los métodos de síntesis que se han usado hasta la fecha para fabricar andamios porosos que logren imitar el tejido nativo han tenido limitaciones en la arquitectura resultante y se han obtenido estructuras que no cubren los parámetros requeridos, en los últimos años la ingeniería de tejido óseo se ha enfocado en sintetizar andamios reproducibles, con una forma y geometría específica del paciente, teniendo mayor control sobre las características de la estructura resultante. Al integrar dos técnicas de síntesis, la ingeniería de tejidos busca disminuir las limitaciones y explotar las mejores características que ofrece cada una y así obtener un andamio que logre mimetizar el tejido dañado o perdido; las ventajas serían flexibilidad en la forma, personalización, geometrías más complejas y combinación de materiales para mejorar la resistencia y composición. [16]

La impresión 3D es una técnica que ha empezado a usarse en el campo de la ingeniería de tejidos para fabricar andamios biomiméticos, con diseños específicos y complejos, que están en los rangos de micrómetros y conforman una estructura macrométrica, las impresiones 3D personalizadas se proyectan a futuro como una alternativa de tratamiento para la regeneración de tejidos como hueso, cartílago o vasos, etc., sin embargo, al igual que otras técnicas, aún tiene algunas limitaciones en cuanto a la resolución de impresión y a su influencia estructural a nivel nanométrico. Para poder resolver estas limitaciones se han combinado dos técnicas de síntesis para sacar el mejor provecho de cada una de ellas y a la vez mejorar sus puntos débiles, como es el caso de la combinación de la estereolitografía y el electrospinning para obtener una estructura porosa y complementarla con fibras alineadas integradas, o la impresión 3D y el hilado por propulsión de gas, que permiten obtener una estructura macrométrica con una deposición capa por capa y un recubrimiento con fibras adheridas en rangos nanométricos.

Usar dos tipos de técnicas de síntesis permite la combinación de materiales naturales y sintéticos, mejorar la composición, biocompatibilidad y propiedades mecánicas, se ha reportado que las fibras depositadas sobre otro andamio son capaces de mejorar la adhesión y la proliferación celular, además de que se ha observado que también dirigen el crecimiento celular. [17]

Se han llevado a cabo diferentes esfuerzos para poder obtener un andamio biomimético capaz de remplazar las actuales opciones de tratamiento para defectos óseos que se busca regenerar. La idea de combinar dos técnicas nace a partir de las limitaciones observadas en cada una de ellas, la impresión 3D permite crear andamios microporosos en tres dimensiones, en tamaños micro- y macrométricos, con una técnica de adhesión capa por capa, obteniendo así andamios mecánicamente estables, por otro lado, la técnica de hilado por propulsión de gas es muy versátil y permite la síntesis de fibras en rangos micro- y nano métricos con diferentes tipos de soluciones poliméricas donde las fibras pueden crear un microambiente adecuado para las células y al mismo tiempo guiar el crecimiento y la diferenciación celular a lo largo de la fibra; a pesar de que cada técnica de síntesis tiene muy buenas características, cada una de ellas también tiene sus limitaciones. [17]

La literatura reporta una combinación exitosa de impresión con biotintas y la técnica de hilado por propulsión de gas, logrando así mejorar las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad del andamio biohíbrido, comparado con una técnica de impresión convencional, los objetivos que se buscan al combinar dos técnicas de impresión son los siguientes, el primero es evaluar la mejora que pueda tener un andamio con una estructura jerárquica que vaya desde lo macro hasta lo nanométricos y el segundo es examinar la influencia que pueda tener en la capacidad de proliferación y diferenciación de las células sin ningún otro estímulo. [17]

En cuanto a los materiales de impresión existe una gran variedad de polímeros y composites que han sido usados para la síntesis de fibras hiladas ya que se ha visto su capacidad para imitar la estructura innata de la matriz extracelular tanto en su estructura como en su composición.

El PLA es un polímero natural, bioreabsorbible, aprobado por la FDA para su uso en diversos dispositivos médicos, tiene un tiempo de degradación de 1-2 años y sus características mecánicas son similares a las del tejido óseo, debido a esto se ha usado para sintetizar andamios para este fin, con diferentes técnicas de impresión. [17]

Tomando en consideración que la MEC del hueso no es solo una sustancia de soporte y crecimiento para las células, sino es un sistema tridimensional dinámico donde las células interactúan con fibras en 3D que dan señales e instrucciones fisicoquímicas, mecano-estructurales y biológicas, en este proyecto, se propuso el diseño e implementación de un sistema 3D llamado "conducto tubular óseo" que será obtenido por la deposición de polímero fundido y depositado capa por capa por medio de una impresora 3D y posteriormente recubierto con fibras sintetizadas por la técnica de hilado por propulsión de gas, para proveer al andamio de una arquitectura jerárquica que va desde los nanómetros

con la deposición de las fibra hasta la estructura macrométrica con el diseño e impresión en 3D. Siguiendo un enfoque de abajo hacia arriba (bottom-up), será posible modular las propiedades morfológicas y funcionales del dispositivo en relación con la funcionalidad requerida para cada capa en términos de la interacción célula-material, permeabilidad, morfología y respuesta mecánica del andamio. El diseño de andamios tubulares de PLA de diferentes diámetros podría imitar o ser un análogo de las unidades estructurales del hueso denominadas osteonas; en la cual se agrupan capas laminares de MEC con lagunas conteniendo células óseas, ya sean progenitoras; osteocitos u osteoblastos.

Las principales motivaciones del presente proyecto de investigación consistieron en la construcción de un sistema de andamiaje a manera de capas tubulares compuestas por:

- Una capa interna capaz de promover los mecanismos de interacción celular en virtud de las propiedades específicas de la fibra (por ejemplo, tamaño, composición y señales bioactivas), que podrían dar respuestas celulares mejoradas a las de andamios tradicionales.
- Una capa externa de la que dependerán las propiedades estructurales del dispositivo que tendrá la función de confinar espacialmente la conducción del proceso de regeneración ósea, así como guiar la secuencia de eventos celulares a través de la estimulación de las señales bioquímicas ad hoc transmitidos por las propiedades fisicoquímicas del andamio y de las características morfológicas de las capas fibrilares más externas.

El estudio propuesto consistió en el diseño e impresión del andamio 3D en una primera fase y la optimización del recubrimiento de este mediante la técnica de hilado por propulsión de gas para lograr conjuntar los procesos de fabricación del conducto tubular óseo en 3D de PLA, su caracterización estructural, mecánica y fisicoquímica.

Posteriormente; se llevó a cabo la caracterización de la respuesta biológica en cultivos celulares in vitro de los prototipos tubulares diseñados para evaluar la biocompatibilidad celular de los osteoblastos fetales humanos por medio de ensayos de adhesión celular, viabilidad y proliferación celular como parte de una segunda fase del proyecto.

Por último, se analizaron los eventos moleculares y génicos de la biosíntesis y remodelación de la matriz extracelular depositada por las células del tejido en cuestión (hueso) con la consecuente caracterización de las condiciones óptimas para el crecimiento del tejido *ex novo*.

3 Justificación

El aumento de la esperanza de vida de la población, la actividad física y los accidentes y patologías son algunas de las causas de pérdida de hueso en el cuerpo humano, además de los defectos óseos o fracturas relacionados con algún tipo de trauma. Todo esto aunado al envejecimiento, las enfermedades y los tumores que requieren de la intervención quirúrgica generan un problema debido a que los donadores y los trasplantes se vuelven escasos; lo que acarrea severos problemas de salud y de daño a la integridad física del paciente.

Cada año, más de 10 millones de personas sufren alguna fractura de huesos largos incluidos los afectados por osteoporosis y cerca del 30 % de estas fracturas óseas no llegan a sanar adecuadamente debido a la oferta limitada de autoinjertos que son el estándar de oro actualmente y los aloinjertos.

Debido a esto se requieren de terapias y/o estrategias alternativas que puedan reemplazar los tratamientos convencionales y que lleven a mejorar o acelerar la regeneración ósea.

Una nueva tendencia en la ingeniería de tejidos es el diseño de andamios que imiten la estructura jerárquica del tejido a regenerar desde sus rangos nanométricos hasta su estructura macrométrica, además de ser biocompatible, biodegradable y reproducible a grandes escalas.

Por ello; en el campo de la regeneración de tejido óseo, se propone como una alternativa de tratamiento el diseño de un andamio 3D a manera de tubo, que pueda optimizar la regeneración ósea y con ello guiar una respuesta concertada en el sitio dañado por un trauma o enfermedad.

Para lograr lo anterior; se propone una técnica combinada de impresión 3D y una técnica de hilatura por propulsión de gas que es una técnica de bajo costo, rápida y con la cual se pueden obtener fibras de diferente diámetro con diversos materiales sintéticos y naturales con una estructura nanométrica que es capaz de manipularse para lograr recubrir estructuras macrométricas en 3D y que logren imitar la estructura jerárquica del hueso.¹⁸

Por lo que proponemos en este trabajo de investigación la síntesis de andamios tubulares de PLA como una alternativa terapéutica a los defectos de tejido óseo. Se propone el PLA considerando que es un polímero que presenta excelente biocompatibilidad y bio-

degradabilidad, así como porosidad suficiente para transporte de nutrientes y desechos al ser sintetizado por la técnica de hilado. También presenta una gran capacidad para poder ser moldeado en diferentes tamaños y formas con una alta porosidad estructurada con rigidez sintonizable para promover una respuesta celular.

4 Hipótesis

La fabricación de conductos tubulares Biohíbridos 3D de PLA, debe conducir a la obtención de materiales con propiedades fisicoquímicas y superficiales que permitan el crecimiento guiado de los osteoblastos fetales humanos.

5 Objetivos

5.1. Objetivo General

Diseñar conductos tubulares biohíbridos 3D de PLA para guiar la regeneración de tejido óseo.

5.2. Objetivos Específicos

1. Proponer una técnica combinada de impresión 3D, con hilatura por propulsión de gas como herramienta para el diseño de conductos tubulares en tres dimensiones.
2. Sintetizar y fabricar los conductos tubulares por impresión 3D y realizar un recubrimiento de fibras hiladas de PLA.
3. Evaluar el efecto de la morfología superficial de los conductos tubulares 3D de PLA en la respuesta de biocompatibilidad de osteoblastos fetales humanos.
4. Correlacionar el papel regulador de los patrones de fibra (anisotropía, escala del tamaño, porosidad e interconexión) de los conductos tubulares hilados en 3D sobre la respuesta celular de osteoblastos fetales humanos.

6 Metodología

6.1. Síntesis del conducto tubular en 3D

Para llevar a cabo el diseño del andamio se usó el programa Cura 3D Slicer software 4.3.0. Se diseñaron dos grupos de tubos de diferente largo y diámetro, los tubos grandes con un largo de 35 mm y 9 mm de diámetro; y tubos pequeños con un largo de 20 mm y un diámetro de 5 mm. Para imprimir los tubos se utilizó la impresora 3D Modular MM1 (Makermex, León) y un rollo de PLA F174. Posteriormente los dos grupos se subdividieron en tubos sin recubrimiento y tubos recubiertos con fibras.

El recubrimiento se llevó a cabo por medio de la técnica de Hilado por propulsión de gas (AJS) con una solución de PLA al 7% (p/v). El sistema de hilado por propulsión de gas se encuentra dentro de una cámara Plexiglass para aislar el sistema de campos externos y evitar cambios en las condiciones durante el proceso de hilado, que se llevó a cabo con un aerógrafo de acción doble con copa superior y depósito de gravedad fijo. El proceso de elaboración del recubrimiento con fibras de PLA se llevó a cabo con una solución polimérica que se disolvió en cloroformo (CHCl_3) bajo agitación magnética a 30°C toda la noche y transcurrido este tiempo se le agregó acetona para obtener una relación 3:1. Para generar los conductos tubulares la solución fue puesta en el aerógrafo con una aguja de diámetro de 0.3 mm, con una presión de gas de 30 psi a una distancia de 10 cm de la punta de la jeringa al tubo impreso de PLA. Ver Figura 4.

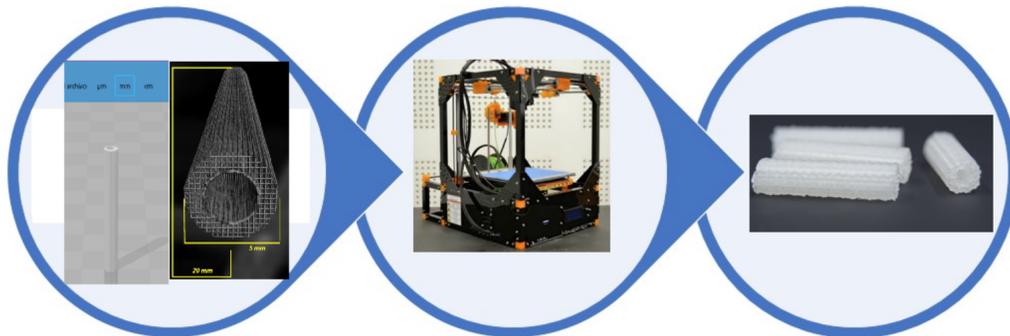


Figura 4: Diseño y Síntesis del conducto tubular en 3D.

6.2. Caracterización de las propiedades de los Andamios Biohíbridos en 3D

Los andamios 3D fueron caracterizados por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM), Difracción de Rayos X (XRD), Espectroscopia Infrarroja (FTIR), análisis topográficos y mecánico dinámicos, Calorimetría Diferencia de Barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA).

La morfología y estructura del andamio tubular 3D fue observada mediante microscopia de emisión de campo (JEOL JSM-7600F FE-SEM). Las muestras fueron recubiertas con la técnica de “sputteting” con 5 nm de una fina capa de oro (EMS 150R, Quorum, EE. UU.) para analizar las superficies internas y externas. Se realizaron observaciones específicas para analizar la interfase entre las nanofibras y el material del centro del andamio. Las estructuras del andamio se determinaron mediante DRX empleando un difractorómetro Bruker AXS D8 FOCUS con radiación Cu-K α en el rango 2θ entre 5° y 50°.

La estructura química de los andamios tubulares 3D fue analizada por FTIR empleando el IRAffinity-1S (Shimadzu, Kyoto, Japón) dentro del rango de 400-4,000 cm⁻¹. Las imágenes topográficas se tomaron con un perfilómetro de contacto (Bruker Dektak XT, EE. UU.). Se usó una punta de aguja de radio de 2 μm . El eje de barrido se tomó con una fuerza aplicada de 4 mg, y la resolución se ajustó a 0.033 μm / punto (correspondiente a una velocidad de punta de aguja de 10 $\mu\text{m/s}$ que cubre un área total de 500 \times 500 μm). La imagen se construyó uniendo 500 escaneos con una separación de 1 μm . Los valores de rugosidad se evaluaron utilizando toda el área medida para determinar la rugosidad promedio (R_a) y las depresiones máximas promedio (R_q).

TGA y DSC evaluaron la respuesta térmica. TGA (TGA Q500, TA instrumentos, Delaware, EE. UU.) se realizó con 4-6 mg de cada muestra, ejecutando una rampa de 25 °C a 1000 °C, con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. Se calcularon el punto de inicio (T_0), los puntos de inflexión (T_p) y el punto de pérdida de masa máxima (T_{max}).

El DSC (DSC Q200, instrumentos TA, Delaware, EE. UU.) Se realizó con 2.5-3 mg de cada muestra, con una rampa de 25 °C a 250 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Se calcularon la temperatura de transición vítrea (T_g) y el punto de fusión (T_m). La T_g se confirmó calculando el tan (δ) con un análisis mecánico dinámico (DMA) de las muestras. El análisis de DMA comenzó a 20 °C, y se utilizó una rampa de 3 °C/min con un nivel de deformación de 0.1 % y una frecuencia angular de 6.28 rad/s.

Además de esto, se llevaron a cabo pruebas de esfuerzo y de módulo de Young a los tubos mediante un ensayo de compresión con una Máquina Universal para pruebas mecánicas, Instron 1125, con sistema para su manejo por medio de ordenador, Versión de la Series IX 8.30.00.

6.3. Cultivo Celular y Ensayos Biológicos

Para evaluar el efecto de la estructura con impresión en 3D y los patrones de fibra (es decir, la anisotropía y/o escala del tamaño de la fibra) que se han fabricado mediante la técnica de hilado por propulsión de gas para formar el recubrimiento de los andamios tubulares en 3D de PLA, se llevaron a cabo los ensayos biológicos por medio de la adhesión, proliferación y diferenciación celular de los cultivos 3D con células fetales de osteoblasto humanos (ATCC línea hFOB 1.19).

6.3.1. Cultivo celular

La línea celular de osteoblastos hFOB 1.19; se mantuvieron en medio de cultivo D-MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 μ g/ml) y fungisona (0.3 μ g/ml). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C a una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂ en un ambiente con 100 % de humedad que son las condiciones estándares de cultivo.

6.3.2. Ensamblaje para fabricar tubos de tejido

Obtuvimos dos grupos de tubos sintetizados con la impresora 3D y recubiertos con hilado por propulsión de gas. Para el diseño de los cultivos 3D con los tubos con diámetro de 9 mm se necesitó un molde con pozos anulares con un diámetro al poste central de 2 mm. Para generar el molde se preparó una solución de 2 % de agarosa disuelta en medio de DMEM y se sometió a autoclave por 30 min. Se colocó el molde en una superficie plana y se llenó de agarosa fundida. Posteriormente se permite que la agarosa solidifique durante 15 minutos y a continuación se obtuvieron los moldes de agarosa y se colocaron en los pozos de una placa de cultivo de 12 pocillos. Para generar el cultivo 3D al llegar los cultivos (hFOB) al 90 % de confluencia se tripsinizaron y se llevaron a un conteo celular para sembrar en los conductos tubulares de PLA que se han colocado en el poste central una concentración de 5×10^6 células/ml con un movimiento circular para aplicar las células

a cada ensamblaje tubular. Cuidadosamente las placas se colocan en la incubadora para permitir que se empiece el proceso de generar los cultivos 3D durante 24 horas.

Como cultivos control que permitirán monitorear que las células se han formado en cultivos 3D se sembraron en los pocillos de agarosa sin presencia de los andamios tubulares de PLA.

Una vez que se ha logrado el cultivo 3D se retiraron los conductos tubulares de PLA/tejido del soporte de agarosa utilizando pinzas para deslizar los tubos fuera y se mantuvieron en los medios de cultivo para iniciar los ensayos biológicos. Ver Figura 5.

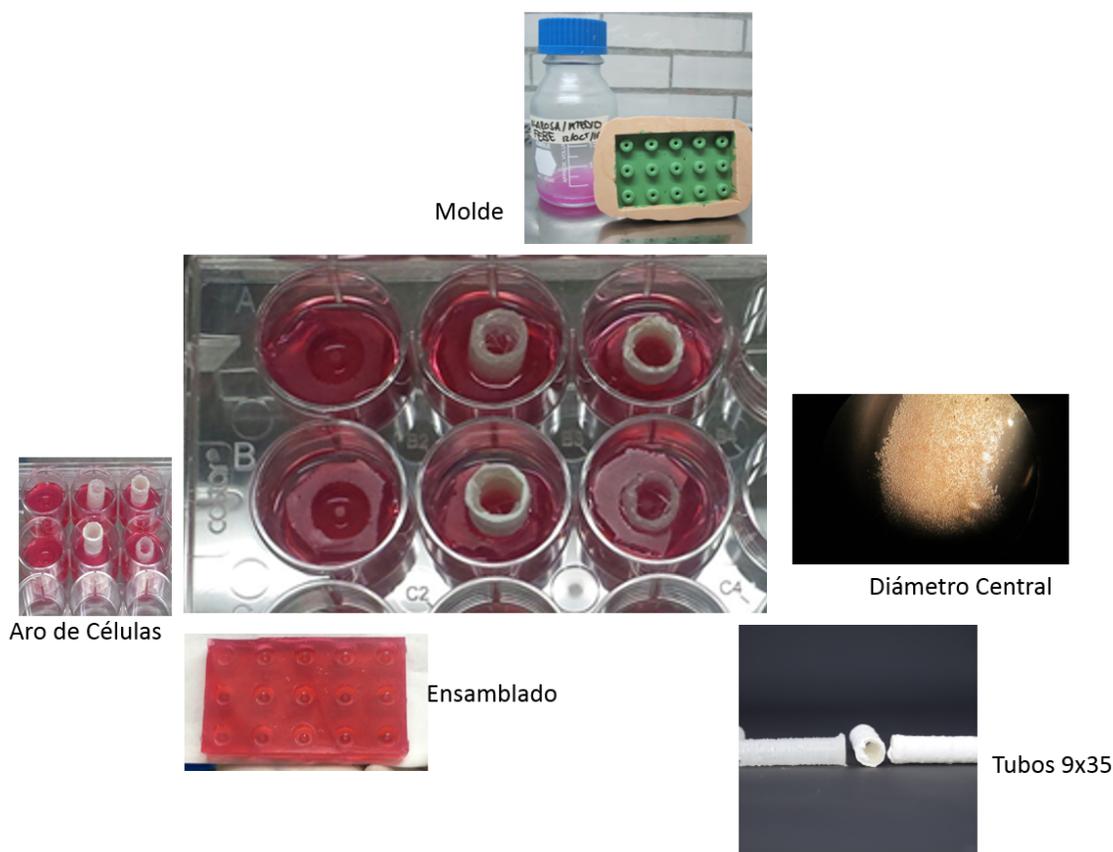


Figura 5: Ensamblaje de tubos 3D de 9×35 mm con hFOB.

En el caso de los tubos con el diámetro menor de 5 mm, una vez recubiertos y esterilizados se colocaron sobre una cama de agarosa al 2% aun sin solidificar, los tubos fueron colocados de forma vertical y una vez que la agarosa solidificó, se realizó un corte alrededor de forma circular obteniendo así los tubos montados. Posteriormente en los conductos tubulares de PLA tanto en la parte interna como en la superficie del tubo se sembró una concentración de 5×10^6 células/ml. Cuidadosamente las placas se colocaron

en la incubadora para permitir que se empezara el proceso de generar los cultivos 3D durante 24 horas. Como cultivos control se mantuvieron los andamios tubulares de PLA sin células. Una vez que se ha logrado el cultivo 3D, se mantuvieron en los medios de cultivo para dar inicio a los ensayos biológicos. Ver Figura 6.

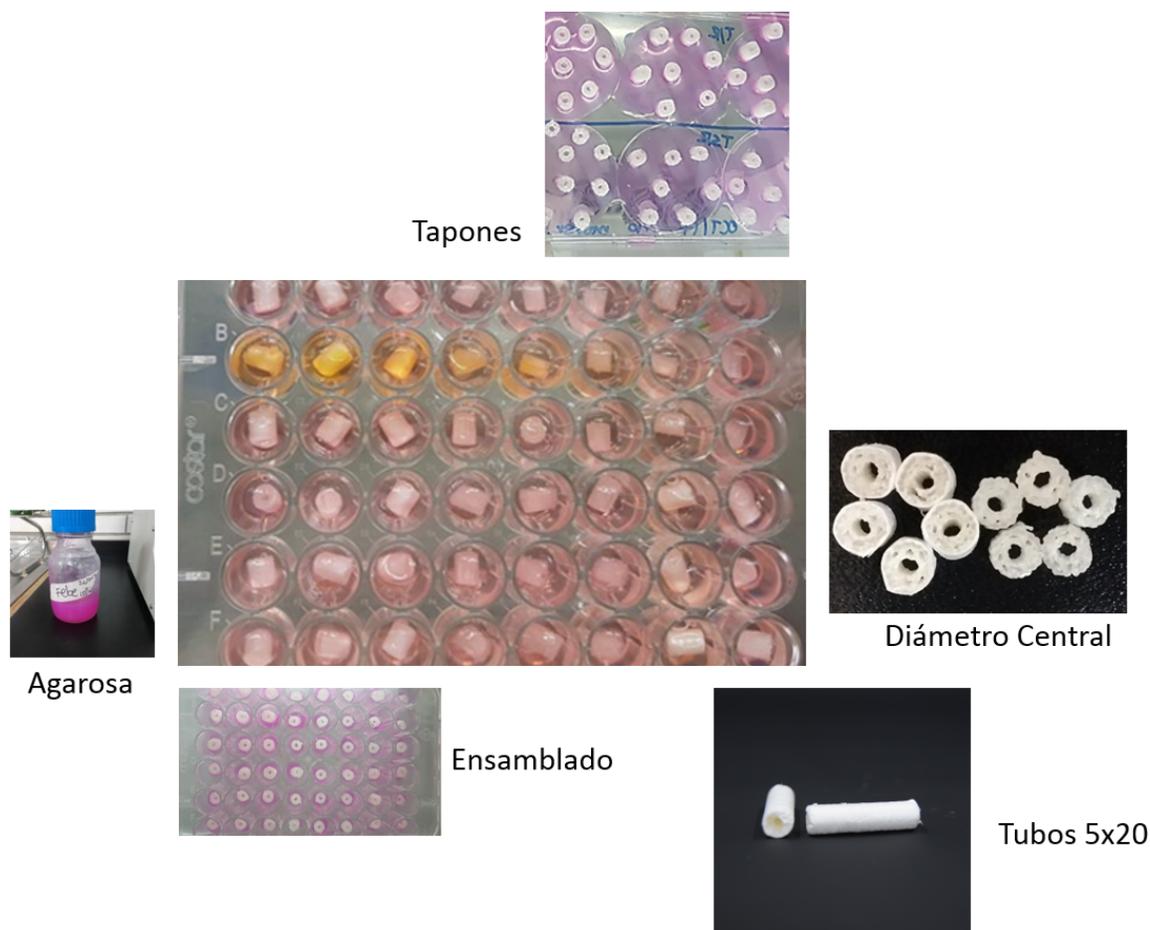


Figura 6: Ensamblaje de tubos 3D de 5×20 mm con hFOB.

6.3.3. Ensayo de adhesión celular

Para determinar la influencia que presentan la anisotropía de los andamios tubulares hilados en 3D de PLA sobre la adhesión de las células hFOB se utilizó el ensayo de cristal violeta, tanto en los cultivos control como experimentales. Los andamios fueron esterilizados con etanol al 70 % con antibiótico durante 30 min y posteriormente se dejaron secar durante toda la noche. Se sembraron células hFBO en 1×10^4 células/ml en andamios tubulares 3D con y sin el recubrimiento de la capa de fibra colocados en placas de cultivo de 24 pocillos y se dejó adherir en un cultivo celular estándar durante 4 y 24 h.

Después del tiempo prescrito, los andamios tubulares 3D fueron enjuagado tres veces empleando PBS para eliminar las células no adherentes. La evaluación de la unión celular se realizó según un ensayo de cristal violeta, este método detecta las células que se mantienen adheridas a la placa de cultivo debido a que el colorante se une a la cromatina y al núcleo de las células. Las células no viables no muestran afinidad por el colorante.¹⁹

Las células adherentes se fijaron con paraformaldehído al 4% y se incubaron con Solución de cristal violeta al 0.1% durante 15 min. Luego, el colorante se extrajo con 0.1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), de la solución obtenida se tomaron 200 μ l que se colocaron en una placa de 96 pozos y la absorción óptica se cuantificó por espectrofotometría a 545 nm con un lector de placas (ChroMate, Awareness Technology). Los experimentos se realizaron por triplicado, repitiéndose dos veces.

6.3.4. Ensayo de proliferación celular

El ensayo WST-1 verificó la viabilidad celular de las células hFOB en placas a una concentración de 1×10^4 células/ml por triplicado en andamios tubulares 3D con y sin recubrimiento de capa de fibra durante 1, 3, 7, 14 y 21 días de cultura. Este ensayo se basa en la capacidad de la succinato-tetrazolio reductasa mitocondrial de las células vivas para reducir una sal WST-1 [4-(3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benceno disulfonato] para producir un producto colorante de formazán soluble en agua que se genera a partir del metabolismo de las células activas, la acción de la enzima deshidrogenasa genera una reducción de los equivalentes del NADH y NADPH. [20, 21]

La concentración del producto de formazán es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. Las células hFOB sembradas en un andamio tubular 3D en los tiempos prescritos se lavaron con PBS y se incubaron con 400 μ l de medio de cultivo fresco que contenía 40 μ l del reactivo de proliferación celular WST-1 durante 4 a 37 °C. Luego, se retiraron 200 μ l del sobrenadante, y la absorbancia se cuantificó por espectrofotometría a 450 nm con un lector de placas (ChroMate, Awareness Technology). Durante el tiempo experimental, el medio de cultivo se intercambiaba cada dos días con medio nuevo.

6.3.5. Interacción célula-material por MEB

La morfología celular, el patrón de propagación y la interacción entre el material y las células hFOB sembradas a 1×10^4 células/ml, en andamios tubulares 3D con y sin

un recubrimiento de fibra se examinaron utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) después de 24 hrs de cultivo celular. Para el análisis SEM, al final del tiempo de cultivo de incubación, los andamios tubulares 3D se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 1 hr, y luego se deshidrataron con una serie graduada de etanol (25 – 100%); finalmente, las muestras fueron sometidas a un punto crítico de secado. El punto crítico aprovecha el hecho de que un fluido pasa imperceptiblemente de líquido a gas sin límites visibles y sin fuerzas de distorsión, es decir que a cierta temperatura y presión un fluido se comporta como dos fases, líquido y vapor están en equilibrio. Por eliminación de tensiones superficiales en punto crítico se evitan los cambios superficiales de las estructuras biológicas durante la desecación ofreciendo finalmente el microscopio electrónico de barrido una imagen real de las mismas. Las muestras se recubrieron con una capa delgada de oro-paladio y se examinaron mediante SEM.

6.3.6. Interacción célula-material por fluorescencia

Las células hFOB sembradas a 1×10^4 células/ml en andamios tubulares 3D con y sin un recubrimiento de fibras se examinaron usando microscopía de fluorescencia (AMSCOPE) después de 24 hrs de cultivo celular. Para la microscopía de fluorescencia, antes de sembrar en andamios tubulares 3D, las células de cultivo hFOB se incubaron con CellTrackerTM Green CMFDA (diacetato de 5-clorometilfluoresceína) Dye C7025 (ThermoFisher) en medio libre de rojo fenol a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, el cultivo celular se lavó con PBS y se incubó durante 1 hora en medio completo. Después de la recuperación, las células hFOB se tripsinizaron y se contaron hasta la concentración celular deseada (1×10^4 células/ml) y se incubaron durante 24 hrs en andamios tubulares 3D y se evaluó la propagación celular y su interacción con el material.

CellTrackerTM Green es un colorante fluorescente que nos permite observar el movimiento de las células o su ubicación, está diseñado para atravesar libremente las membranas celulares donde se transforma en un producto fluorescente impermeabilizante de membranas celulares, la calceína fue la enzima usada para determinar la viabilidad de las células. El tinte de CMFDA se ha diseñado para mostrar fluorescencia durante al menos 72 horas y presenta unas propiedades de seguimiento idóneas: es estable, no tóxico en concentraciones de trabajo, se conserva bien en las células y muestra un brillo fluorescente con pH fisiológico, su espectro de excitación/emisión verde (máximo de 492/517 nm) y su baja citotoxicidad que no afecta a la viabilidad ni a la proliferación.

6.3.7. Análisis estadístico

Todos los datos cuantitativos fueron expresados como el promedio \pm error estándar de la media. Los datos numéricos se analizaron mediante la prueba t de Student para determinar las diferencias entre los grupos. La significación estadística se consideró en $p < 0.05$.

7 Resultados

7.1. Síntesis del conducto tubular en 3D

Se obtuvieron dos grupos de tubos de diferente largo y diámetro, los tubos grandes con un largo de 35 mm y 9 mm de diámetro, los tubos pequeños con un largo de 20 mm y un diámetro de 5 mm. Posteriormente los dos grupos se subdividieron en tubos sin recubrimiento y tubos recubiertos con fibras, el recubrimiento se llevó a cabo por medio de la técnica AJIS con una solución de PLA al 7%. Quedando así conformados nuestros grupos de estudio. Ver Figura 7.

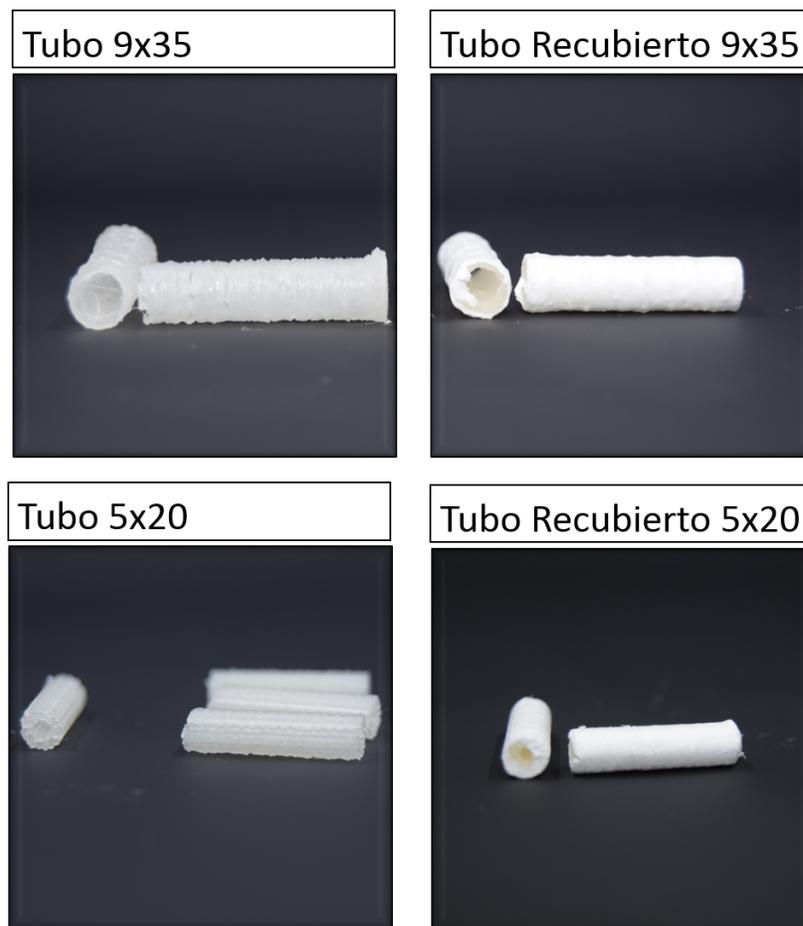


Figura 7: Tubos impresos en 3D con y son recubrimiento de fibras de PLA al 7%.

7.2. Caracterización de los conductos tubulares híbridos en 3D

Los andamios en 3D fueron caracterizados por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Calorimetría Diferencia de Barrido (DSC), Termogravimetría (TGA), Perfilometría, Difracción de Rayos X (RX), Espectroscopia Infrarroja (FTIR), Análisis Mecánico Dinámico (DMA) y se llevaron a cabo pruebas de esfuerzo y módulo de Young.

7.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Los tubos de 35 mm de largo y 9 mm de diámetro se subdividieron en dos grupos, el tubo impreso en 3D y el tubo impreso con recubrimiento de fibras de PLA al 7% con la técnica de hilado por propulsión de gas, de los dos grupos se obtuvieron microfotografías y se observaron las diferencias. Ver Figura 8.

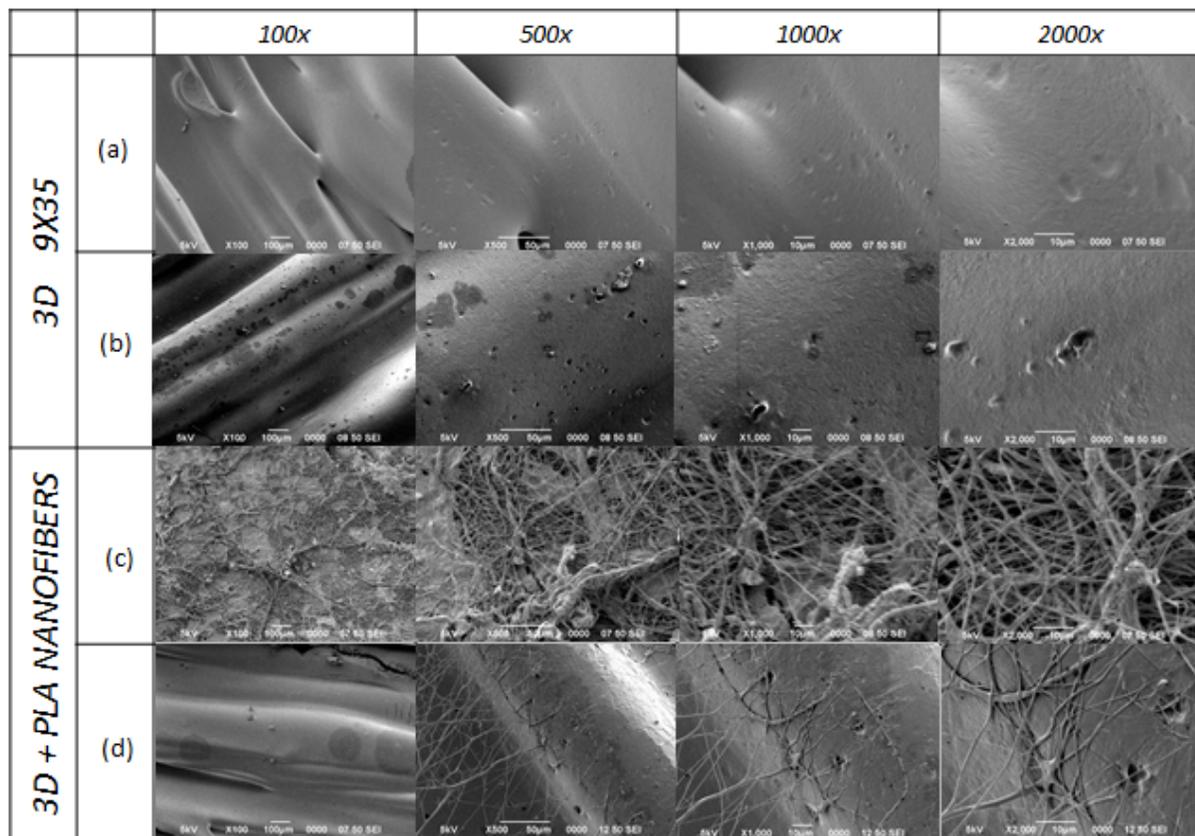


Figura 8: Tubo de 9×35 mm. (a) y (b) Tubo 3D sin recubrimiento. (c) y (d) Tubo 3D recubierto con fibras de PLA al 7%

En la Figura 8 podemos observar a diferentes ampliaciones, 100X,500X,1000X y

2000X las características de la topografía del andamio 3D con y sin fibras como recubrimiento. Las líneas (a) y (b) corresponden al tubo sin recubrimiento. En la línea (a) se observa la cara externa e interna del andamio impreso en 3D, y como la deposición capa por capa del polímero fundido se termina convirtiendo en una superficie homogénea. En la línea (b) se observa la topografía que se obtiene de la técnica de deposición capa por capa y que estas capas antes de solidificarse se unen para formar una superficie continua y estable.

Las líneas (c) y (d) corresponden al tubo 3D con recubrimiento de fibras de PLA al 7%. En la línea (c) se observa la superficie del andamio 3D con fibras depositadas sobre su cara externa, las fibras se encuentran de forma desordenada y adheridas a la superficie, formando una interfaz tubo 3D fibras. La línea (d) muestra el andamio con fibras en su cara externa e interna, se observan fibras desordenadas y entrecruzadas que asemejan la estructura fibrilar de la matriz extracelular y que al formar una interfaz con el andamio 3D le confieren una estructura jerárquica, que era uno de los objetivos de usar la técnica combinada de impresión 3D–hilado por propulsión de gas.

En la Figura 9 se muestran los andamios 3D de 5×20 mm, los cuales se dividieron en dos grupos de estudio, los andamios 3D sin recubrimiento y los andamios 3D recubiertos con fibras de PLA con la técnica de hilado por propulsión de gas.

De igual forma, en la Figura 9 podemos observar a diferentes ampliaciones, 100X, 500X, 1000X y 2000X las características de la topografía del andamio 3D con y sin fibras como recubrimiento. Las líneas (a) y (b) corresponden al tubo 3D sin recubrimiento. En la línea (a) se observa como la deposición del polímero fundido forma un entramado y que las capas depositadas se unen para formar una superficie porosa con una estructura escalonada. En la línea (b) se observó la estructura que tiene el andamio en su parte interna que asemeja a la estructura que tienen las osteonas en el tejido óseo y los poros de diferente tamaño que se forman con la impresión 3D y que la deposición de polímero capa por capa se llevó a cabo de forma homogénea, este tubo al ser más pequeño permite una mayor superficie de contacto a las células y una mayor similitud a la topografía del hueso en su escala micro y nanométrica.

Las líneas (c) y (d) corresponden al tubo 3D con recubrimiento. En la línea (c) se observa el recubierto de fibras en la parte externa del tubo y una ampliación de la interfaz que se forma entre el andamio 3D y las fibras entrecruzadas y adheridas, que dan lugar a una estructura y jerárquica que va desde los rangos de nanómetros hasta los micrométricos. En la línea (d) se observa la interacción e interfaz que se genera entre el tubo 3D y las fibras depositadas sobre su superficie, el entrecruzado de las fibras y los

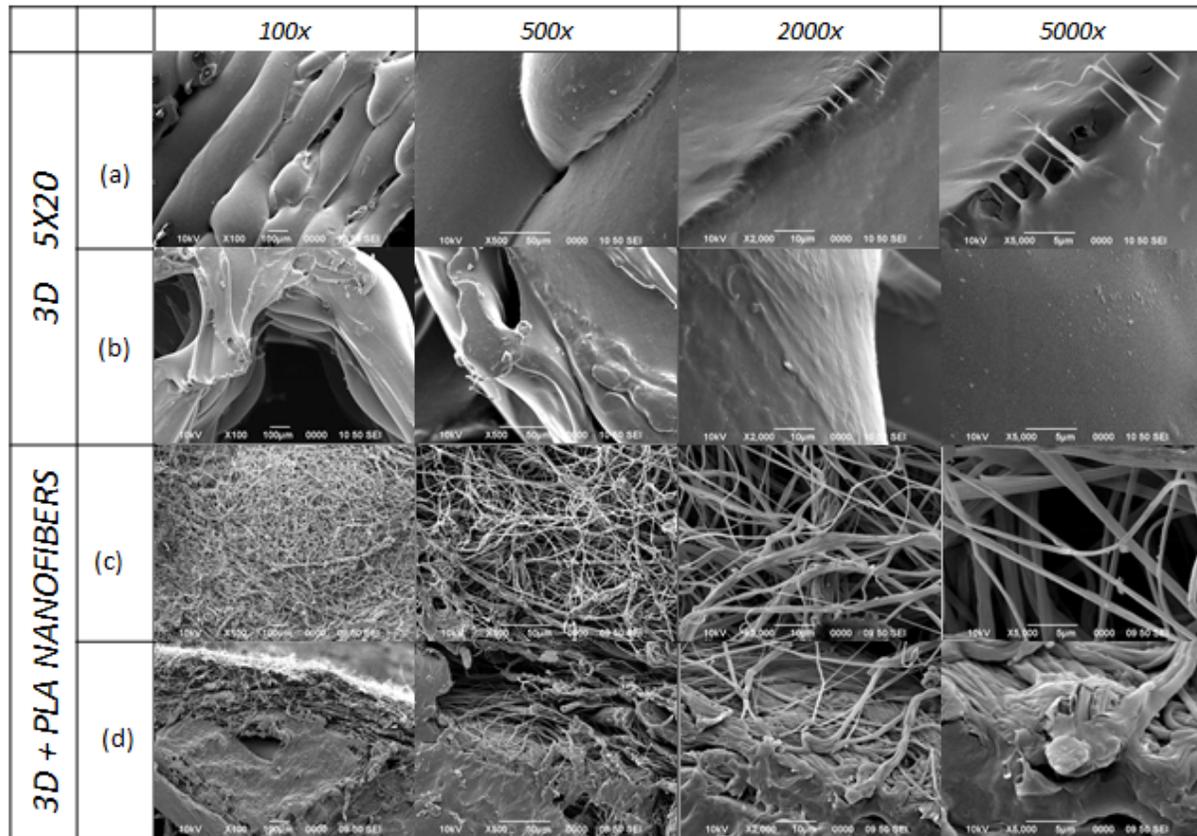


Figura 9: Tubo de 5×20 mm. (a) y (b) Tubo 3D sin recubrimiento. (c) y (d) Tubo 3D recubierto con fibras de PLA al 7%

poros de diferente tamaño que se generan y que asemejan la estructura fibrilar de la matriz extracelular que está conformada principalmente por fibras de colágena entrecruzadas en rangos micro y nanométricos; y se complementan con la estructura macrométrica del tubo 3D, logrando así una similitud a la estructura del hueso, que va desde los nanómetros hasta la estructura macrométrica.

La microscopía electrónica de barrido nos proporcionó información acerca de las características superficiales del material, además de que nos permitió ver las diferencias que se generan en la estructura con la disminución del tamaño del tubo y así como la interfaz que se genera con las fibras. Concluyendo que los tubos de 5X20 mm muestran mejores características topográficas respecto a los tubos de 9x35 mm.

7.2.2. Termogravimetría

La termogravimetría (TGA) es un análisis que mide la cinética de reacción donde la masa de la muestra se mide contra el tiempo y la temperatura, este análisis permitió determinar el *onset point* (T_0) que es la temperatura que da comienzo a la pérdida de peso, el *inflection point* (T_p) que es el punto más grande de pérdida de peso y la temperatura máxima que soporta el polímero antes de descomponerse (T_{max}).

En la Figura 10 se muestran los andamios 3D de 9×35 mm, los cuales se dividieron en dos grupos de estudio, los andamios 3D sin recubrimiento y los andamios 3D recubiertos con fibras de PLA al 7%, el control siempre fue el filamento de PLA puro.

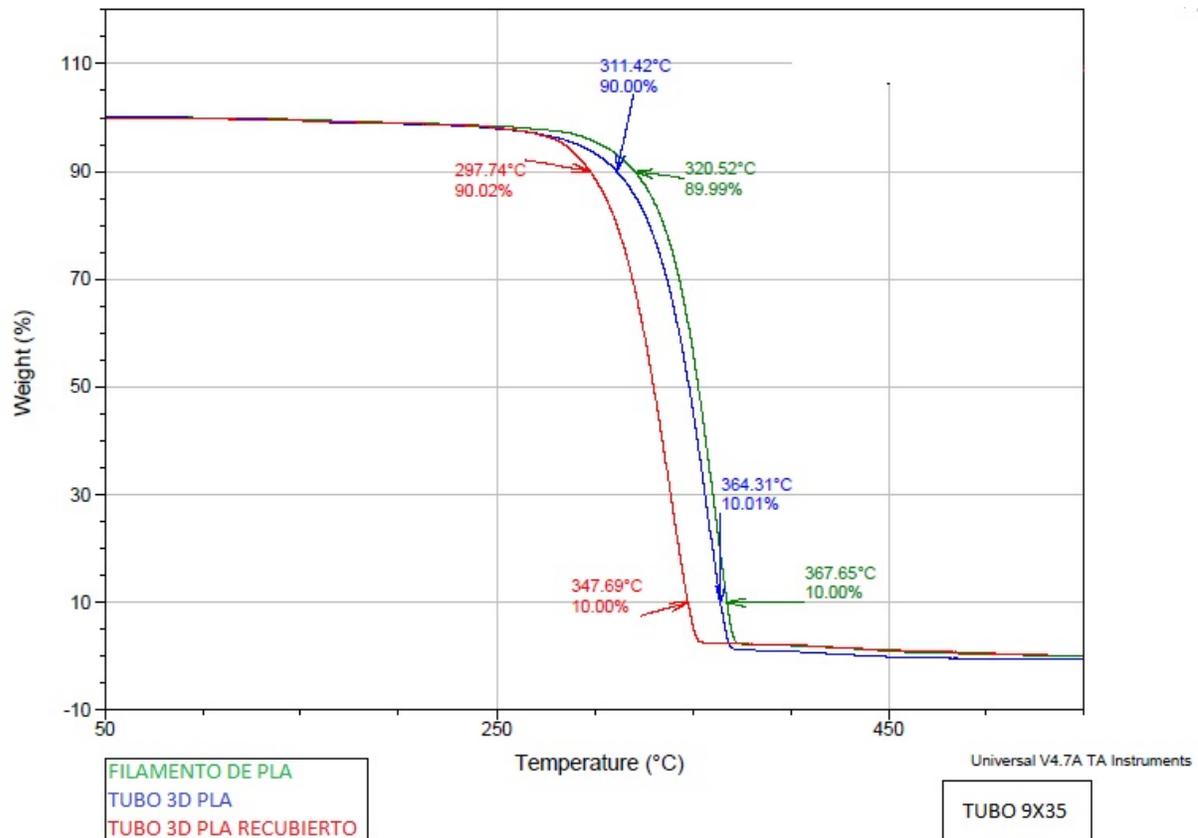


Figura 10: Termogravimetría del Tubo 3D de 9×35 mm con y sin fibras de PLA al 7%. Como control el filamento de PLA puro.

De igual forma, en la Figura 10 se señala las temperaturas donde inicia la pérdida de peso (T_0) 320.52 °C para el filamento de PLA, 311.42 °C para el Tubo 3D de PLA y 397.74 °C para el Tubo 3D recubierto. La temperatura máxima que soporta el polímero antes de ser degradado (T_{max}) 355.31 °C para el filamento de PLA, 369.01 °C para el

Tubo 3D de PLA y 394.09 °C para el Tubo 3D recubierto. La Figura también muestra la temperatura en la que se llevó a cabo la mayor pérdida de peso (T_p) 367.65 °C para el filamento de PLA, 364.31 °C para el tubo 3D de PLA y 347.69 °C para el Tubo 3D recubierto. Observando una menor resistencia en el inicio de la pérdida de peso en el tubo 3D de PLA y un aumento en esa resistencia en el tubo impreso con el recubrimiento de fibras. Esta situación se invierte en las temperaturas de mayor pérdida de peso, que fueron a menor temperatura en los tubos recubiertos y a mayor temperatura en los tubos 3D y este comportamiento se conserva para las temperaturas a las que el polímero se degrada por completo.

Las fibras les confieren a los tubos mayor resistencia a las temperaturas, por lo que su pérdida de peso y su degradación final requieran una temperatura más alta respecto a la del grupo sin recubrimiento y respecto al control.

En la Figura 11 se muestran los andamios 3D de 5×20 mm, los cuales se dividieron en dos grupos de estudio, los andamios 3D sin recubrimiento y los andamios 3D recubiertos con fibras de PLA, el control fue el filamento de PLA.

De igual forma, en la Figura 11 se señala las temperaturas donde inicia la pérdida de peso (T_0) 327.71 °C para el filamento de PLA, 336.03 °C para el Tubo 3D de PLA y 325.27 °C para el Tubo 3D recubierto. La Figura también muestra la temperatura en la que se llevó a cabo la mayor pérdida de peso (T_p). 340.81 °C para el filamento de PLA, 361.28 °C para el tubo 3D de PLA y 357.49 °C para el Tubo 3D recubierto. Observando que la temperatura de inicio de pérdida de peso es menor para el tubo recubierto y mayor para el tubo 3D y este comportamiento es constante para la temperatura donde se observa la mayor pérdida de peso del polímero.

En este grupo de tubos se necesitó menor temperatura para iniciar la pérdida de peso que en el grupo de tubos recubierto con fibras y se continuó con el mismo comportamiento para la temperatura de mayor pérdida de peso, respecto al grupo sin fibras y acercándose mucho a las temperaturas del grupo control. Los cambios en el comportamiento del polímero son mínimos respecto al control y se les atribuye a las dimensiones más pequeñas del andamio impreso y a su estructura porosa, lo que nos sugiere una mejor degradación de andamio impreso 3D con el recubrimiento de fibras de 5×20 mm.

7.2.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es una técnica termo analítica que nos permite observar la temperatura a la que nuestro material sufre un cambio en sus pro-

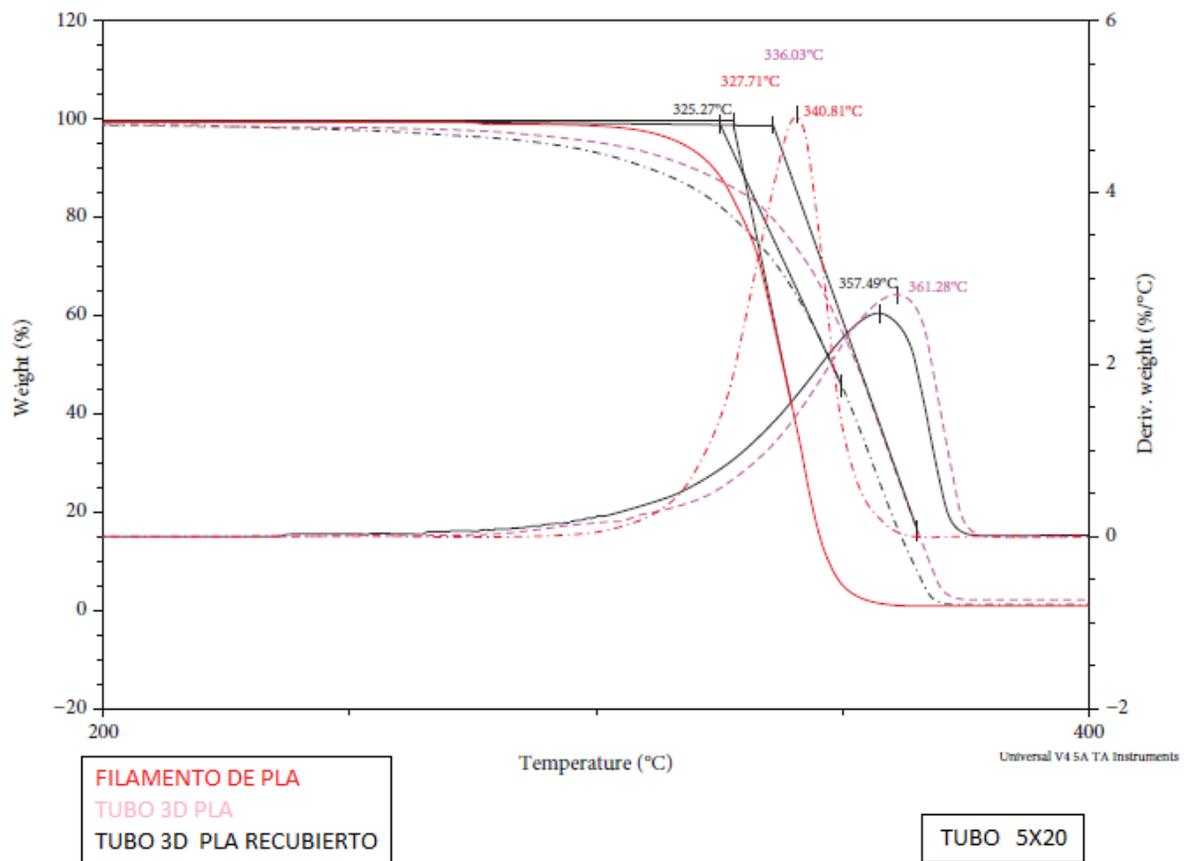


Figura 11: Termogravimetría del Tubo 3D de 5×20 mm con y sin fibras de PLA al 7%. Como control el filamento de PLA puro.

propiedades físicas y mecánicas debido a los movimientos internos de las cadenas que lo componen. Con esta técnica pudimos observar la temperatura de transición vítrea (T_g) que se presenta cuando se da una pseudo transición termodinámica en materiales vítreos. Y la temperatura de fusión (T_m) es en la que el polímero se funde por completo.

En la Figura 12 se muestran los andamios tubulares 3D de 9×35 mm, los cuales se dividieron en dos grupos de estudio, los andamios 3D sin recubrimiento y los andamios 3D recubiertos con fibras de PLA, el control siempre fue el filamento de PLA. La Figura 12 nos muestra la temperatura de transición vítrea (T_g) del filamento de PLA 62.01 °C, el tubo 3D de PLA 61.12 °C y para el tubo 3D recubierto 61.93 °C, y la Temperatura de Fusión (T_m) para el filamento de PLA 169.40 °C, para el tubo 3D de PLA 164.83 °C y para el tubo 3D de PLA recubierto 167.98 °C. Observando que las temperaturas de transición vítrea se mantienen constantes en los grupos experimentales respecto al control, mientras que las temperaturas de fusión bajan en los grupos experimentales respecto al control.

Concluyendo que los grupos experimentales necesitan una menor temperatura para llegar a la fusión que el filamento de PLA puro, este comportamiento se atribuye a la estructura del andamio impreso.

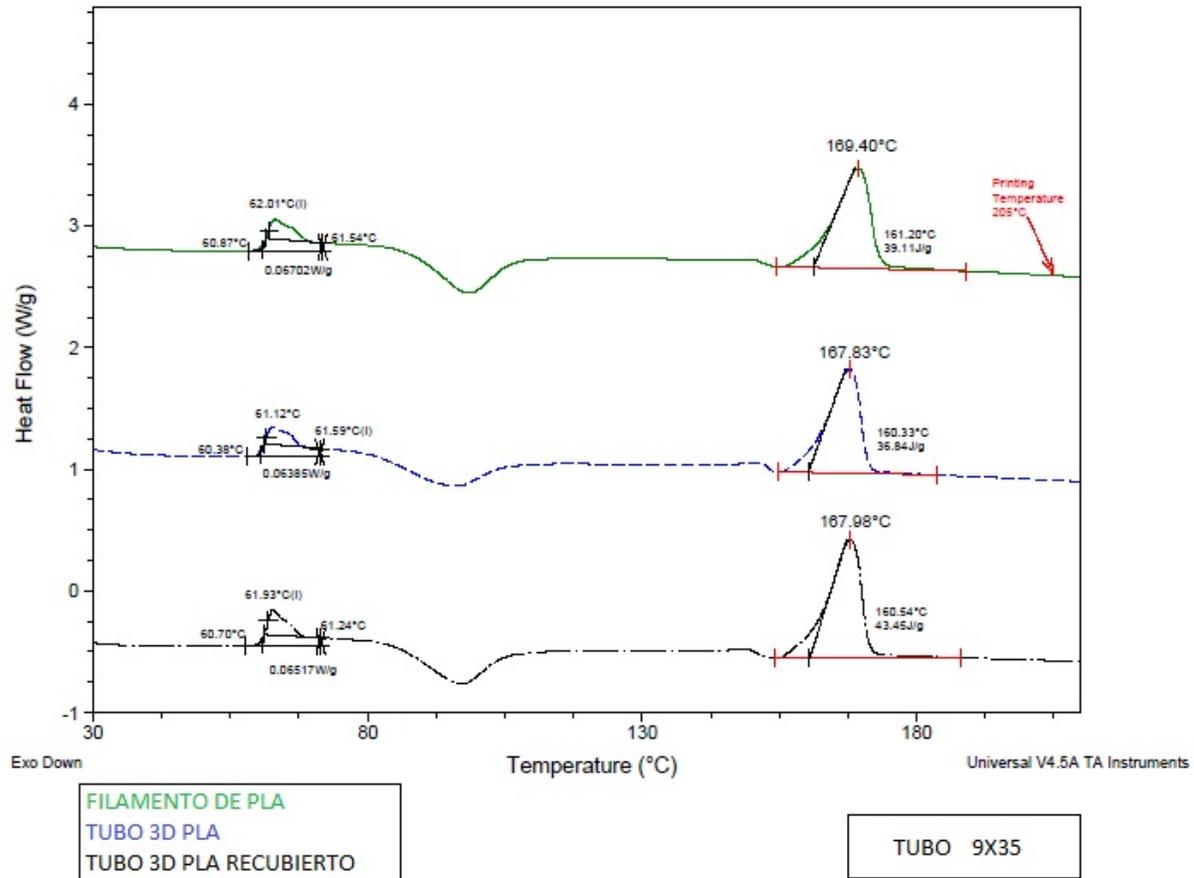


Figura 12: Temperatura de transición vítrea y temperatura de fusión del filamento de PLA, el Tubo 3D de PLA y el Tubo 3D PLA recubierto de 9×35 mm.

En la Figura 13 se muestran los andamios tubulares 3D de 5×20 mm, los cuales se dividieron en dos grupos de estudio, los andamios 3D sin recubrimiento y los andamios 3D recubiertos con fibras de PLA, el control siempre fue el filamento de PLA. La Figura 13 nos muestra la temperatura de transición vítrea (T_g) del filamento de PLA 57.62 °C, el tubo 3D de PLA 61.45 °C y para el tubo 3D recubierto 62.28 °C, y la Temperatura de Fusión (T_m) para el filamento de PLA 169.02 °C, para el tubo 3D de PLA 168.31 °C y para el tubo 3D de PLA recubierto 168.48 °C. Observando que la temperatura de transición vítrea es más alta para el tubo 3D recubierto, mientras que observamos que las temperaturas de fusión se mantienen constantes entre los grupos.

Concluimos que la pseudo transición que se da a mayor temperatura en el Tubo de

PLA recubierto se atribuye al recubrimiento de fibras que presenta el tubo.

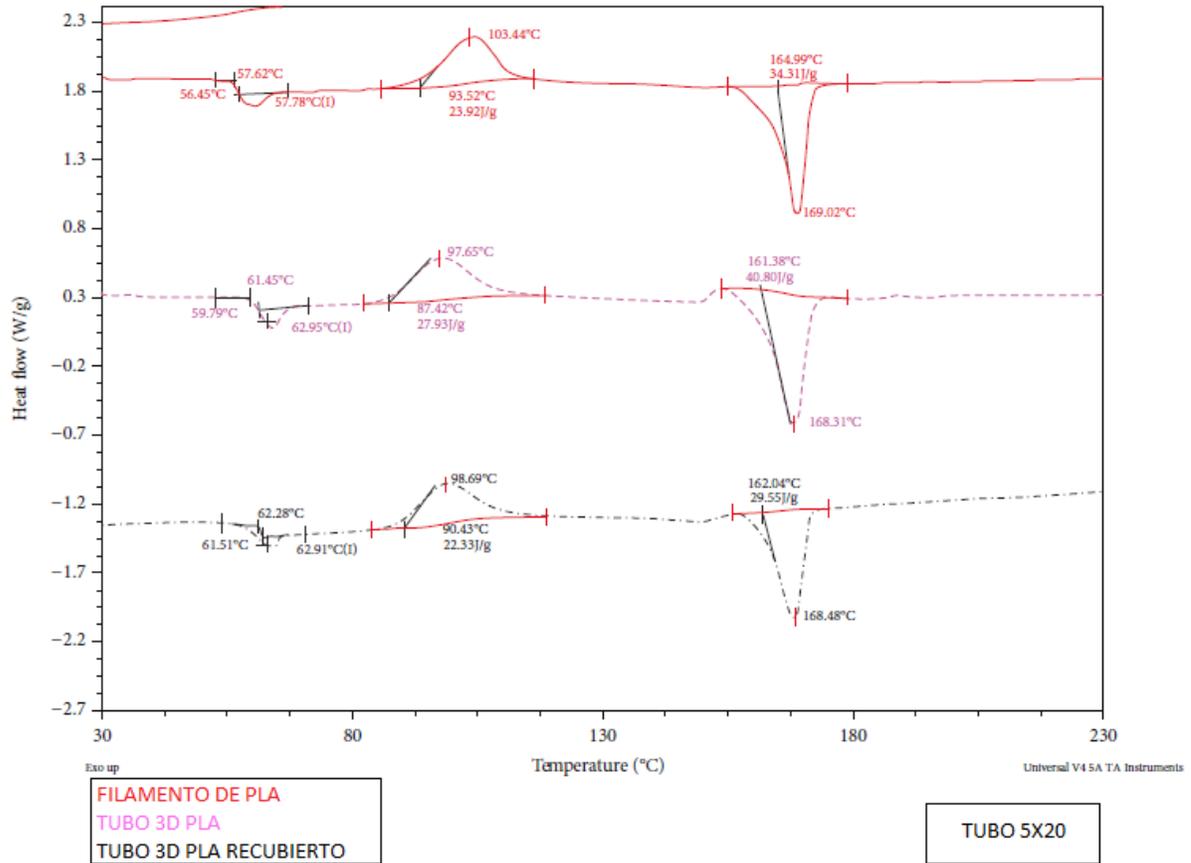


Figura 13: Temperatura de transición vítrea y temperatura de fusión del filamento de PLA, el Tubo 3D de PLA y el Tubo 3D PLA recubierto de 5×20 mm.

7.2.4. Perfilometría

La rugosidad de los andamios fue evaluada por la técnica de perfilometría, obteniendo así los promedios de rugosidad. En la Figura 14 se muestran los andamios 3D de 5×20 mm, los cuales se dividieron en dos grupos de estudio, los tubos 3D de PLA sin recubrimiento y los tubos 3D recubiertos con fibras de PLA.

La Figura 14 en su parte (a), muestra la imagen del tubo sin recubrimiento y la (b) el tubo recubierto. El valor de la rugosidad media (R_a) del tubo 3D de PLA es de 0.049 μm y para el tubo 3D recubierto el valor de rugosidad es de 0.586 μm . Los andamios con fibras tienen un valor de rugosidad más alto.

En la Figura 15 se muestran los andamios 3D de 9×35 mm, los cuales se dividieron en

dos grupos de estudio, los tubos 3D de PLA sin recubrimiento y los tubos 3D recubiertos con fibras.

La Figura 15 en su parte (a), muestra la imagen del tubo sin recubrimiento y la (b) el tubo recubierto. El valor de la rugosidad media (R_a) del tubo 3D de PLA es de $0.028 \mu\text{m}$ y para el tubo 3D recubierto el valor de rugosidad es de $0.2 \mu\text{m}$. Los andamios con fibras tienen un valor de rugosidad más alto pero el grupo de tubos de $9 \times 35 \text{ mm}$ muestra una rugosidad menor comparado con el tubo de $5 \times 20 \text{ mm}$.

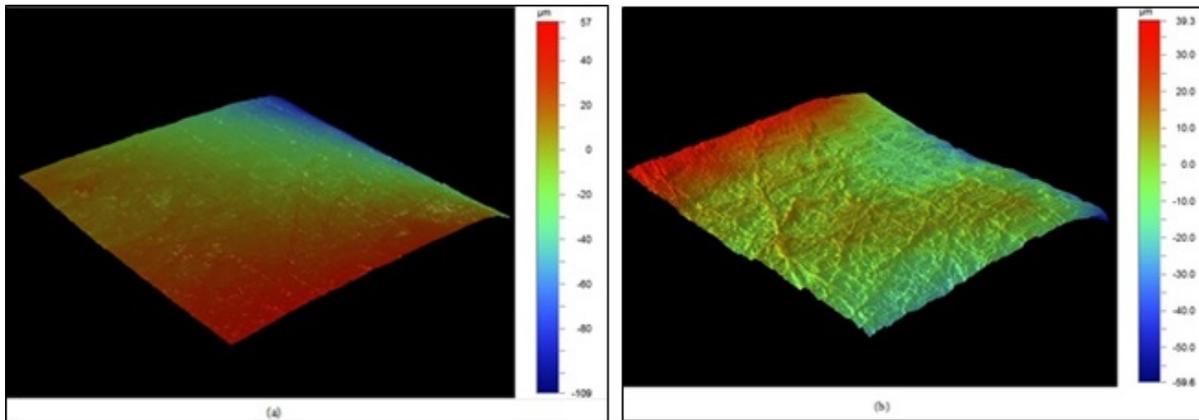


Figura 14: Perfilometría. (a) corresponde a la superficie de los tubos 3D sin fibras y (b) corresponde a la superficie del Tubo 3D recubierto con fibras del PLA.

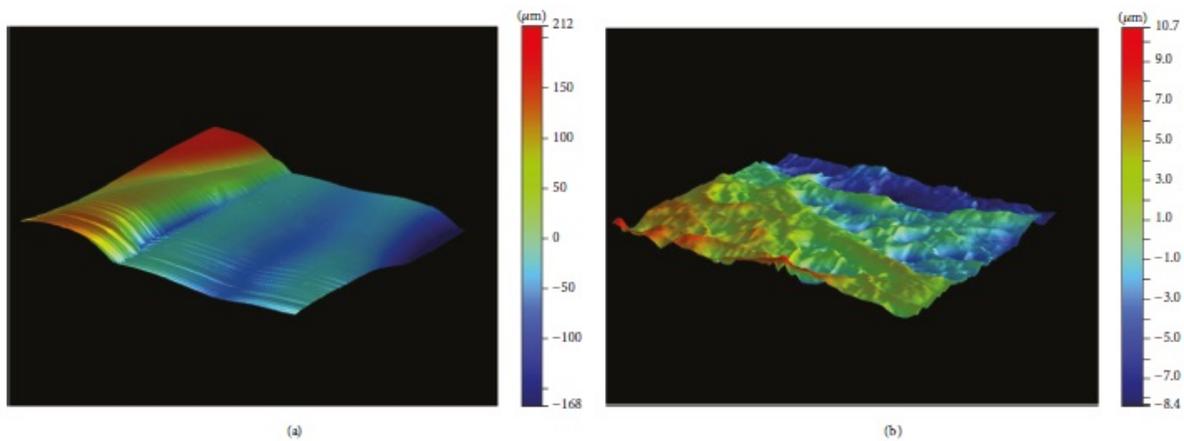


Figura 15: Perfilometría. (a) corresponde a la superficie de los tubos 3D sin fibras y (b) corresponde a la superficie del Tubo 3D recubierto con fibras del PLA.

El grupo de tubos de $5 \times 20 \text{ mm}$ tienen el valor de rugosidad más alto respecto a los tubos de $9 \times 35 \text{ mm}$, esto se les atribuyó a las dimensiones más pequeñas y al diseño, lo que

puede representar una característica positiva en las evaluaciones a nivel de la respuesta celular de estas superficies.

7.2.5. Análisis Mecánico Dinámico (DMA)

Los análisis del DMA respaldan los resultados obtenidos por las técnicas termogravimétricas. El Filamento de PLA mostró una $\tan(\delta)$ de 70.4 °C, mientras que el andamio tubular 3D y el andamio 3D recubierto con fibras, muestran un incremento a una $\tan(\delta)$ de 76 °C. El comportamiento térmico de los materiales analizados es consistente con lo que está reportado en la literatura respecto a que los parámetros de síntesis no generan cambios térmicos significativos en el material posterior a las síntesis de los andamios. Ver Figura 16.

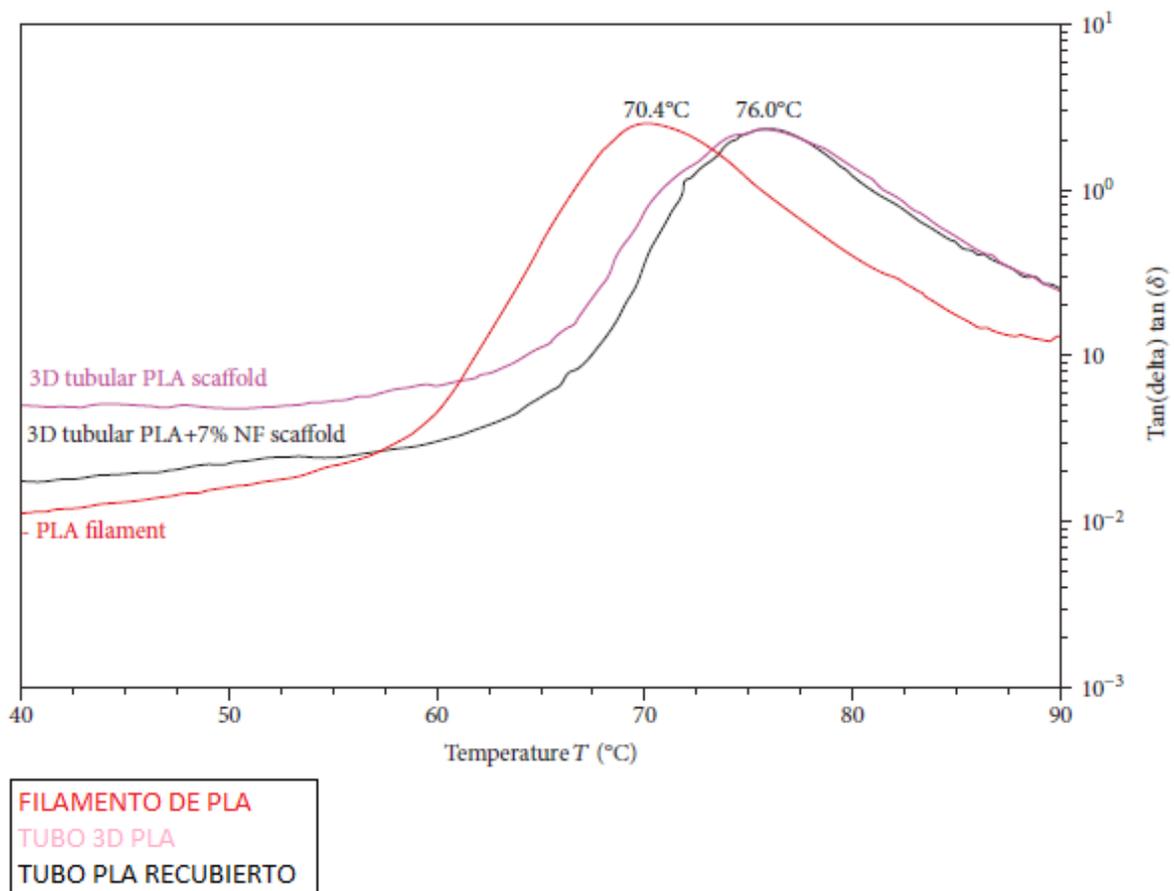


Figura 16: Análisis Mecánico Dinámico (DMA). Se tomó como control el Filamento de PLA, comparando el Tubo 3D PLA y el Tubo PLA.

7.2.6. Difracción de Rayos X (RX)

La comparación de la estructura Cristalina del Filamento de PLA respecto al andamio tubular con y sin fibras se llevó a cabo por medio de la difracción de rayos X. Los difractogramas mostraron que ambos andamios tubulares 3D con y sin recubrimiento tienen una señal con el mismo valor de una banda ancha que corresponde a la característica de un pico amorfo, y que es significativamente más alta comparado con el del filamento de PLA que es de menos intensidad. Estos resultados concuerdan con la literatura que reporta el estado amorfo del PLA y que este sufre algunas variaciones en su estructura dependiendo del entrecruzamiento del polímero, los dopantes o los parámetros de impresión. Ver Figura 17.

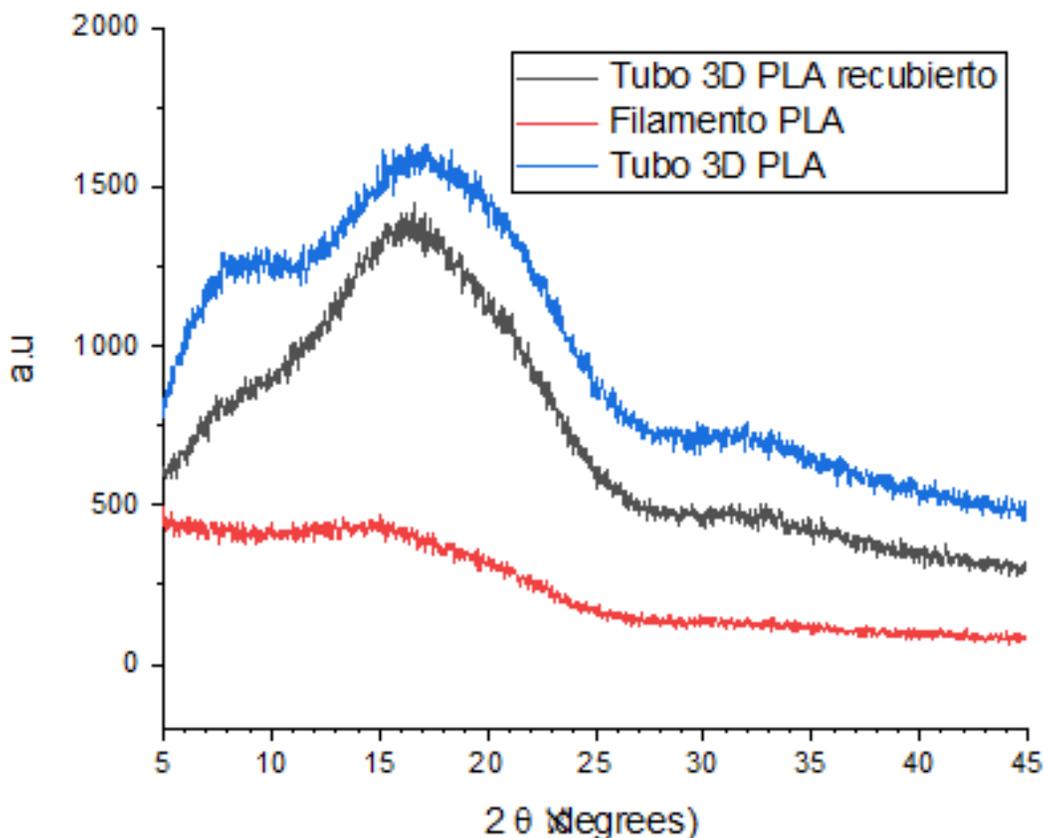


Figura 17: Difracción de Rayos X. Se tomó como control el Filamento de PLA, comparando el Tubo 3D PLA y el Tubo PLA Recubierto.

7.2.7. Espectroscopia Infrarroja (FTIR)

Para poder interpretar y determinar los grupos funcionales que componen el filamento de PLA y los grupos experimentales de 5×20 mm y 9×35 mm se llevó a cabo la espectroscopia infrarroja. Para poder comparar los andamios impresos, se usaron como controles el filamento de PLA puro y las fibras de PLA al 7% sintetizadas por hilado por propulsión de gas. El pico que se observó a 2922 cm^{-1} es la vibración de estiramiento de $C-H$. Los picos que se observaron a 758 y 873 cm^{-1} son los que corresponden a la vibración por flexión de $-CH$. Los picos a 1043 y 1182 cm^{-1} corresponden a la vibración por estiramiento de $C-O$. El pico en 1450 cm^{-1} corresponde a la vibración por flexión de $-CH_3$ y el pico de 1751 cm^{-1} corresponde a la vibración por estiramiento del $C=O$ en el grupo éster.

Se observó una ligera diferencia entre todos los espectros infrarrojos obtenidos de los grupos y los resultados coinciden con los reportados en la literatura respecto a las características estructurales de las muestras respecto al filamento, antes y después de la extrusión del filamento y también analizar la presencia de algún residuo de solvente presente en los andamios impresos. Ver Figura 18.

7.2.8. Análisis Mecánicos

Las pruebas mecánicas se llevaron a cabo con una maquina universal para pruebas mecánicas, Instron 1125 con sistema para su manejo por medio de ordenador. Mediante la evaluación de las curvas de esfuerzo y deformación se determinó que el polímero tenía el comportamiento de un elastómero en esta curva, lo que le confiere una mayor capacidad de deformación. En cuanto a la prueba de respuesta a la tracción se comporta como un polímero semicristalino, lo que coincide con las pruebas realizadas en difracción de rayos X.

Este comportamiento indica que las cadenas del polímero están entrecruzadas y amorfas, lo que le permite tener una deformación reversible y le da una mayor resistencia a la fractura. Se compararon los dos grupos experimentales y no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Ver Figura 19.

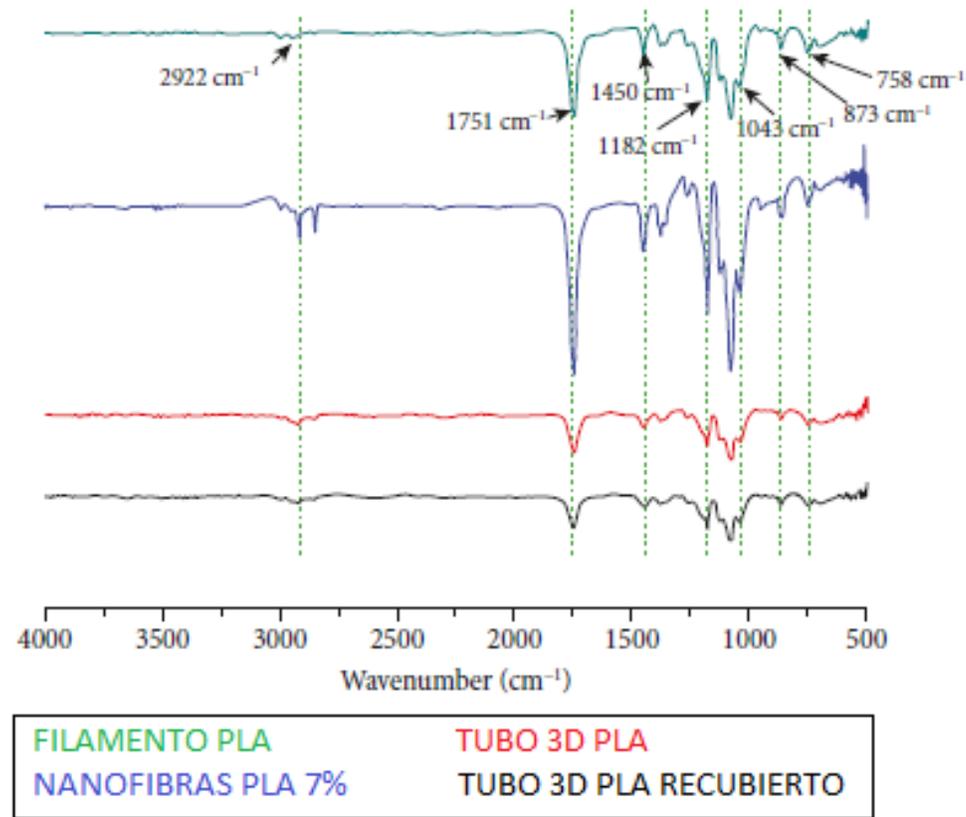


Figura 18: FTIR. Se tomó como control el Filamento de PLA, comparando el Tubo 3D PLA y el Tubo PLA.

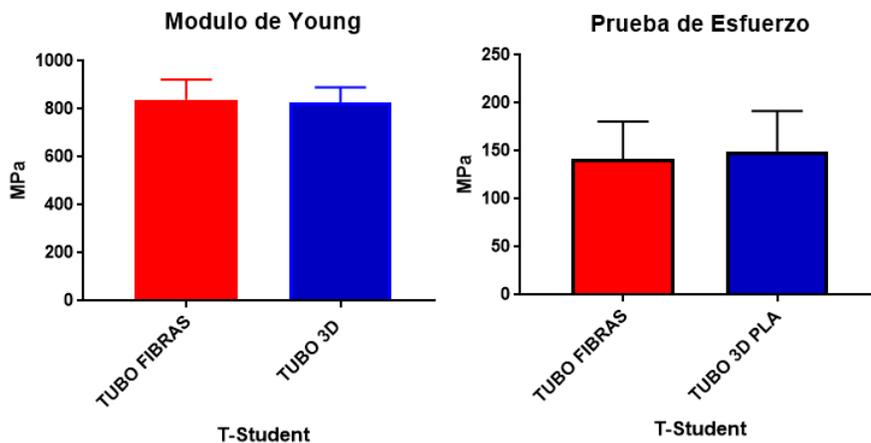


Figura 19: El módulo de Young se llevó a cabo mediante una curva de esfuerzo-deformación; la prueba de Esfuerzo mediante una prueba de respuesta a la tracción.

Se dio por concluida la fase de caracterización del material obteniendo resultados positivos en cuanto a las técnicas de síntesis, encontrando que no generaban un cambio significativo en las propiedades estructurales, físicas y químicas de los andamios obtenidos. Existen diferencias en cuanto a dimensiones y estructura en nuestros grupos experimentales y se realizaron los ensayos biológicos para determinar si estas diferencias generaban una respuesta favorable a nivel celular, la modificaban o la mejoraban, para lo que se llevaron a cabo diversos ensayos que se presentan a continuación.

7.3. Ensayos Biológicos

Se realizaron los ensayos biológicos de adhesión y proliferación celular para los dos grupos. Los tubos de 9×35 mm y los de 5×20 mm.

7.3.1. Ensayo de Adhesión y Proliferación Celular

En la Figura 20 encontramos las gráficas de adhesión celular con el ensayo de cristal violeta para los tubos de 9x35 mm las 4 y 24 horas posteriores al cultivo con hFOB, con diferencias significativas entre el control y el tubo 3D de PLA respecto al Tubo 3D recubierto con fibras de PLA al 7% a los dos tiempos de evaluación. En estas dimensiones el recubrimiento de fibras de PLA genera una diferencia significativa con una $p < 0.05$ en la adhesión de las células al andamio recubierto al darles una mayor superficie de contacto y una mejor red para intercambio de señales y desecho de residuos.

En la Figura 21 se muestra la gráfica de proliferación celular con el ensayo de MTT para los tubos de 9×35 mm a los 3, 5, 7, y 9 días posteriores al cultivo con las células hFOB. Las lecturas en los días 3 y 5 de cultivo celular no mostraron una diferencia significativa $p < 0.05$ entre los grupos experimentales respecto al control. Al día 7 posterior al cultivo encontramos diferencias significativas $p < 0.05$ entre los grupos experimentales respecto al control y también entre los dos grupos experimentales, teniendo mejores resultados en el tubo recubierto con fibras. Al día 9 del experimento se mantuvo este comportamiento, aumentando la diferencia entre los experimentales y el control y entre los dos grupos experimentales, manteniendo el mejor comportamiento el Tubo 3D recubierto con fibras. Este comportamiento se atribuye a que en las dimensiones de 9×35 mm las fibras al generar una interfaz entre el tubo y las fibras permiten una mejor adhesión y que estas células puedan seguir con su ciclo celular con las señales adecuadas para la proliferación sobre la superficie del andamio.

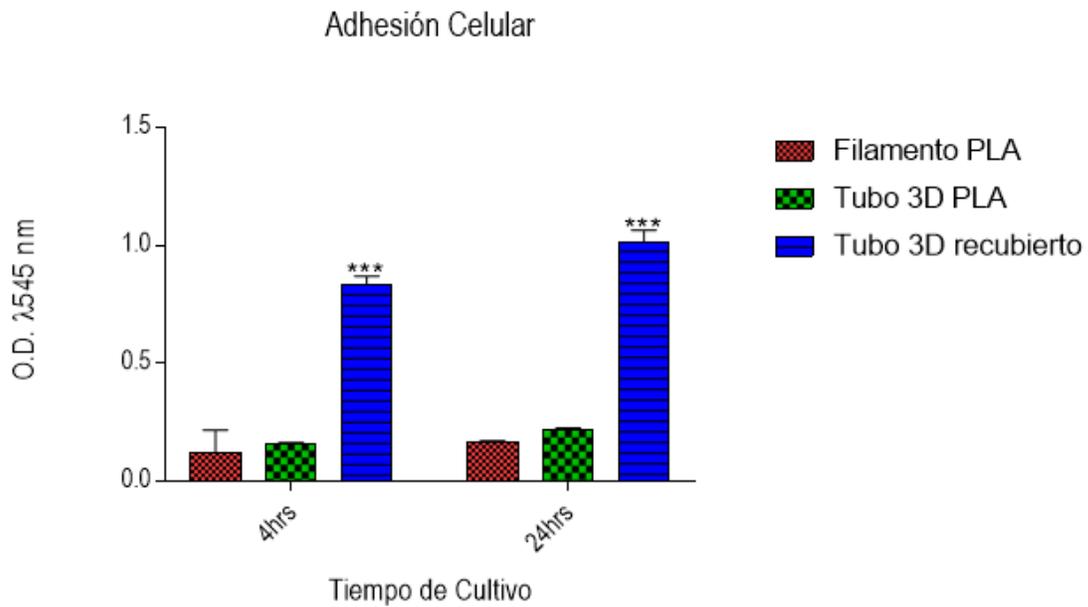


Figura 20: Ensayo de Adhesión celular a las 4 y 24 h posteriores al cultivo con hFOB.

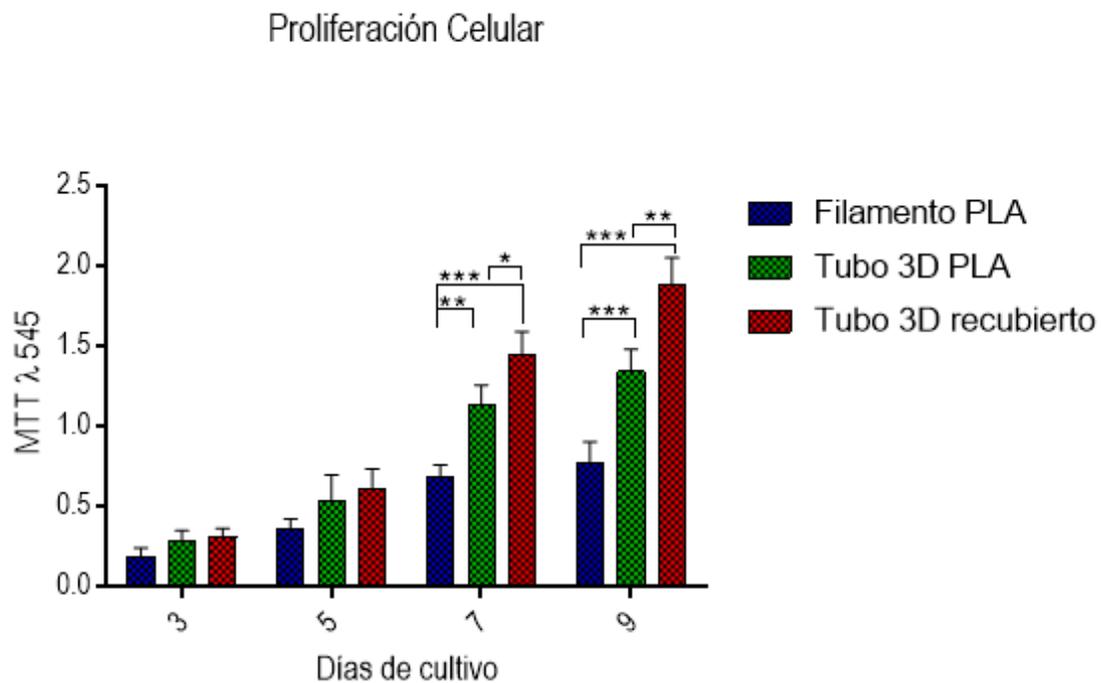


Figura 21: Ensayo de proliferación celular a los 3, 5, 7 y 9 días posteriores al cultivo con hFOB.

En la Figura 22 encontramos las gráficas de adhesión celular con el ensayo de cristal violeta para los tubos de 5×20 mm a las 4 y 24 horas posteriores al cultivo con hFOB, con diferencias significativas entre el control y los dos grupos experimentales con una $p < 0.05$ y este comportamiento se mantuvo en los dos tiempos de evaluación. Los dos grupos experimentales al tener una menor dimensión y una estructura concéntrica que forma poros permite una adecuada adhesión celular y las fibras si mejoran está adhesión en los tubos, pero no es lo suficientemente grande para generar una diferencia significativa entre los grupos. Este comportamiento de las células nos hace concluir que la estructura del andamio juega un papel fundamental en la adhesión de las células sobre la superficie del andamio sobre el cual son sembradas, sin embargo, estas características pueden ser mejoradas con una técnica híbrida de síntesis.

En la Figura 23 se muestra la gráfica de proliferación celular con el ensayo de WST-1 para los tubos de 5×20 mm a los 1, 3, 5, 7, 14, y 21 días posteriores al cultivo con hFOB. En todas las lecturas de los tiempos experimentales se encontraron diferencias significativas $p < 0.05$ entre los grupos experimentales respecto al control. A los días 1 y 3 posteriores al cultivo encontramos diferencias significativas $p < 0.05$ entre los grupos experimentales con y sin fibras, sin embargo, esas diferencias desaparecen a los días 7, 14, y 21, manteniendo el mismo crecimiento celular los dos grupos experimentales. Se atribuye este comportamiento de crecimiento celular a la estructura y dimensiones del andamio, que a pesar de no estar recubierto proporciona una buena superficie de contacto y un microambiente poroso que permite el crecimiento celular al igual que los tubos recubiertos por lo que no se encuentran diferencias entre los grupos.

7.3.2. Interacción Célula–Material por Microscopia Electrónica de Barrido

Después de evaluar las características morfológicas, fisicoquímicas, estructurales y biológicas de los andamios, se evaluó cómo se adhieren, se comportan e interactúan las células sobre el material con microfotografías de SEM y análisis por fluorescencia, para lo cual se llevó a cabo un cultivo celular con hFOB a las 24 horas.

En la Figura 24 se observan los andamios tubulares 3D sin fibras a diferentes ampliaciones, donde se pueden observar células aisladas y cúmulos de células adheridas a las capas del polímero que componen el andamio. Esto muestra que el polímero no es citotóxico para la célula y que la estructura de la superficie le permite adherirse y empezar a presentar sus extensiones citoplasmáticas como son los lamelipodios. La parte cóncava interna del tubo permite el cúmulo de células y la parte externa permite que la

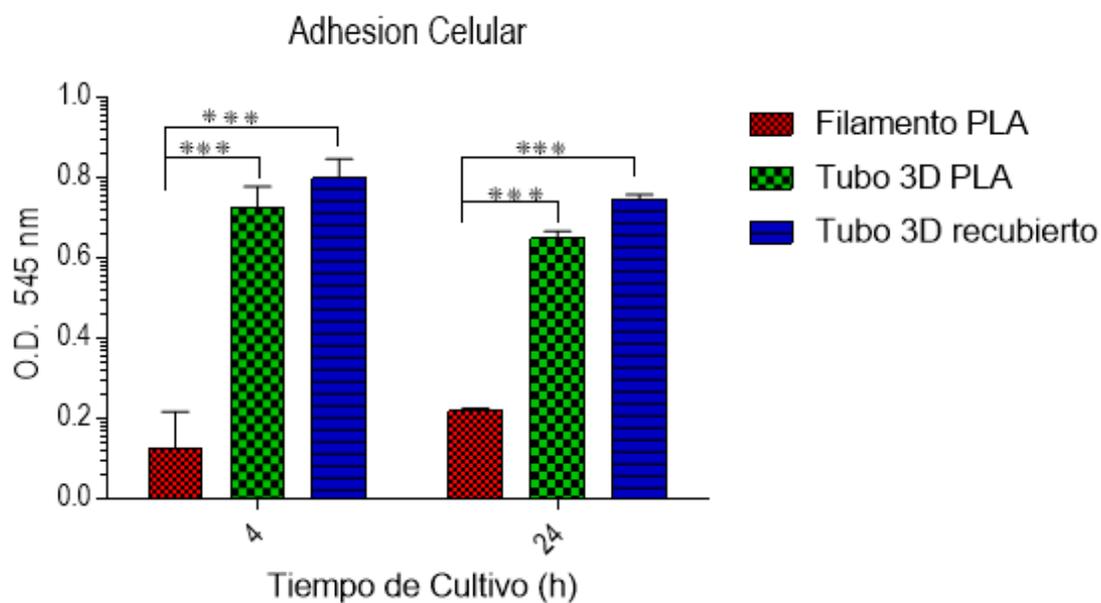


Figura 22: Ensayo de Adhesión celular a las 4 y 24 h posteriores al cultivo con hFOB.

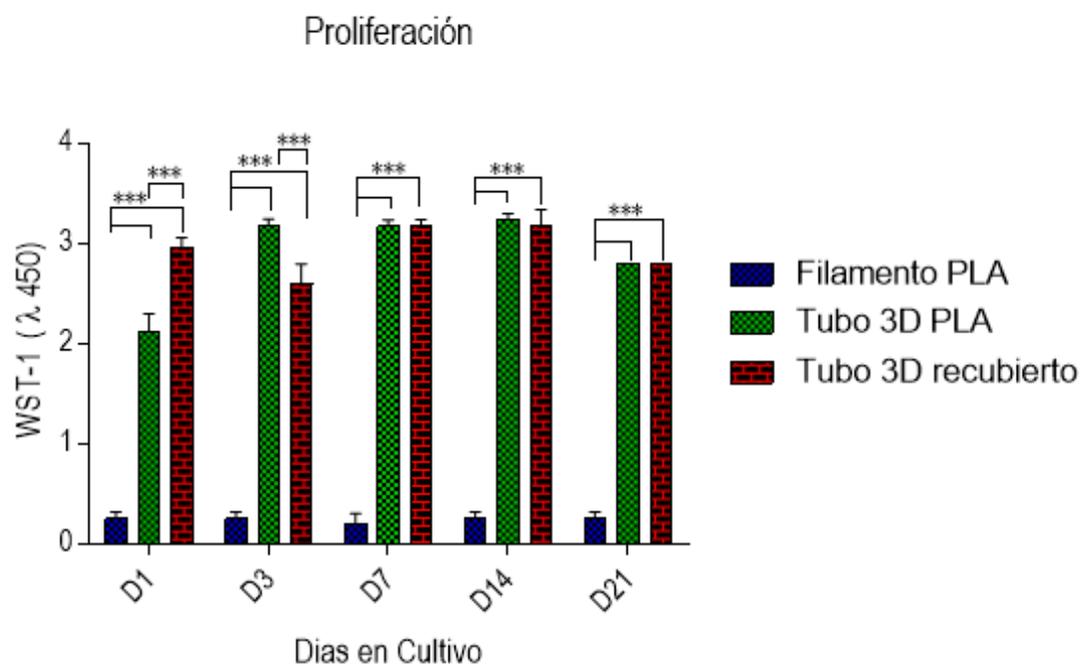


Figura 23: Ensayo de proliferación celular a los 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días posteriores al cultivo con hFOB.

topografía en 3D brinde a las células una superficie adecuada para comenzar a migrar y proliferar.

En la Figura 25 se observan los andamios tubulares recubiertos con fibras, 24 horas posteriores al cultivo de hFOB. Las células están adheridas a la superficie interna y cóncava del andamio y la superficie externa que esta recubierta por fibras se encuentra totalmente cubierta por células adheridas a la superficie de las fibras y las prolongaciones citoplasmáticas de las células, se observan como lamelipodios interaccionando con las células vecinas. Ni el material impreso en 3D ni las nanofibras son citotóxicas para las células, permiten su crecimiento y la morfología hexagonal característica de los osteoblastos está presente.

Esto sugiere que la nanotopografía tiene un impacto positivo a nivel celular al crear un microambiente jerárquico adecuado para la adhesión, proliferación y diferenciación celular que asemeja la estructura de la matriz extracelular nativa.

Las células muestran afinidad por el andamio y una morfología y crecimiento adecuado para poder proponer un andamio híbrido como la mejor técnica para la síntesis de andamios encaminado a guiar la regeneración del tejido óseo.

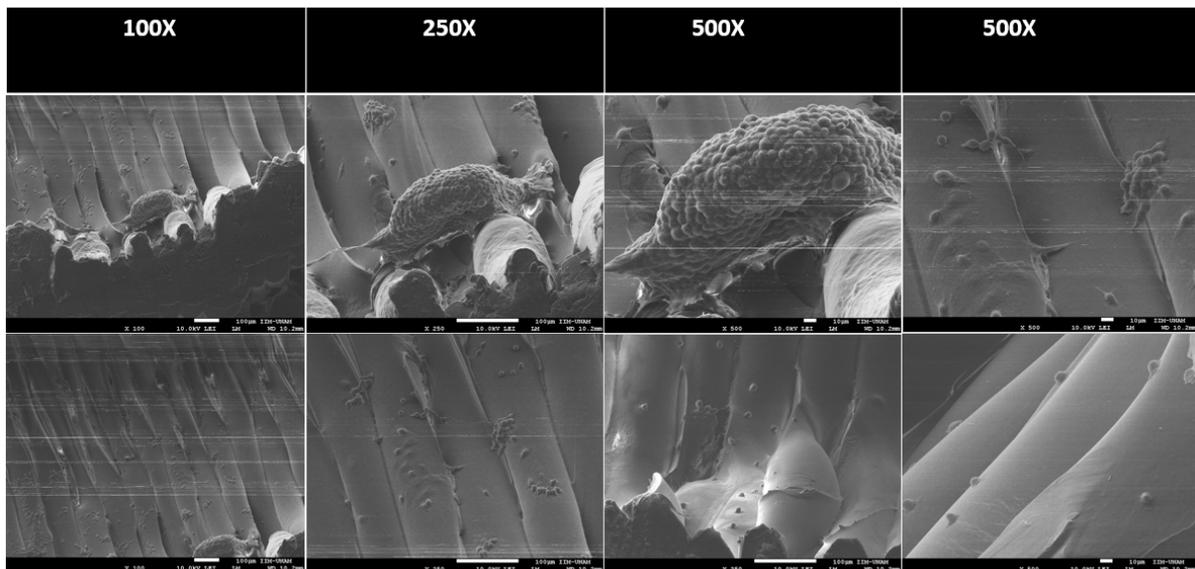


Figura 24: MEB a las 24 horas posteriores al cultivo de hFOB sobre los tubos 3D sin recubrimiento de fibras.

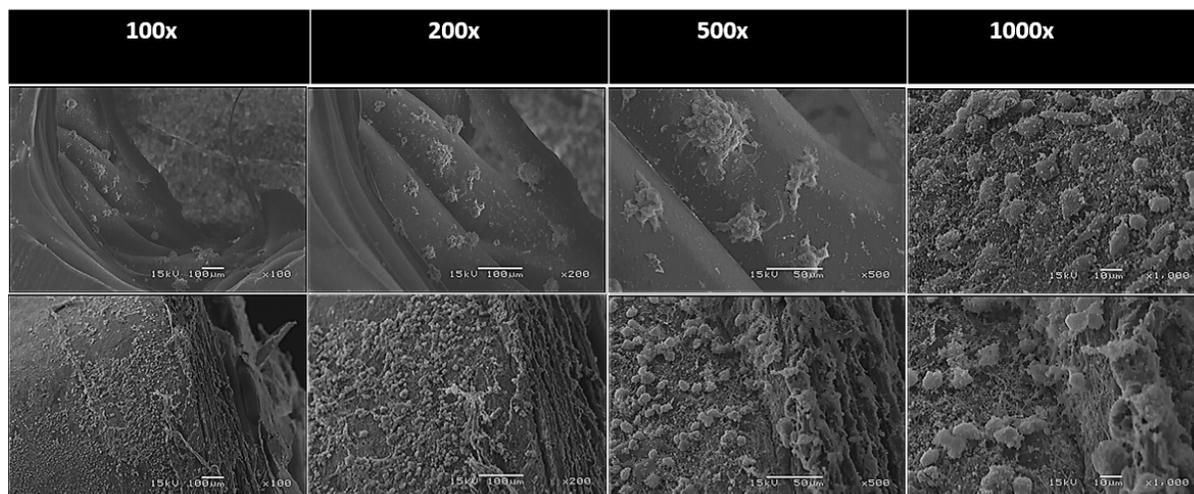


Figura 25: MEB a las 24 horas posteriores al cultivo de hFOB sobre los tubos 3D con recubrimiento de fibras de PLA al 7 %.

7.3.3. Interacción Célula–Material por Microscopia de Fluorescencia

La técnica de fluorescencia por cell-tracker permite evaluar no solamente la distribución de las células sobre el andamio sino también la viabilidad, debió a que este kit tiene afinidad por los lípidos, la tinción se llevara a cabo solamente en una membrana celular intacta que es lo que caracteriza a una célula viable.

En la Figura 26 observamos la presencia y viabilidad de las células a las 24 horas posteriores al cultivo con hFOB, que permiten identificar la posición de las células en la superficie del andamio y su morfología sobre las capas del andamio y en la interfaz que se genera entre capa y capa. Además de que se comprobó que el andamio no es citotóxico y permite un adecuado crecimiento celular, también se observó que la deposición capa por capa del polímero permite que las células crezcan siguiendo esas líneas, dándoles información para crecer de forma ordenada y guiada por el andamio. Esta característica proporciona una ventaja sobre la manipulación de las células y confiere al andamio características apropiadas para guiar la regeneración del tejido.

En la Figura 27 se observa el cultivo de hFOB a las 24 horas con la tinción de cell-tracker sobre los tubos recubiertos de fibras de PLA al 7 %. Se observa la distribución de las células sobre toda la superficie del andamio, pero una mayor cantidad se encuentra presenta en el área correspondiente al recubrimiento de las fibras. Las fibras le dan al andamio la estructura a nivel nanométrico que permite una mayor presencia celular y manda la información para que las células crezcan en forma ordenada siguiendo la

deposición de las fibras. También se observa la morfología hexagonal característica de los osteoblastos y sus prolongaciones citoplasmáticas para empezar a interactuar con las células vecinas por medio de los lamelipodios, así como su presencia en los poros del andamio.

La estructura jerárquica que tiene el andamio híbrido con la combinación de técnicas permite una mejor adhesión, crecimiento y manipulación celular, debido a que las células tienen la capacidad de sentir la superficie donde son cultivadas y mandar la información al núcleo celular para crecer en forma ordenada y así poder guiar la regeneración del tejido con las mejores características.

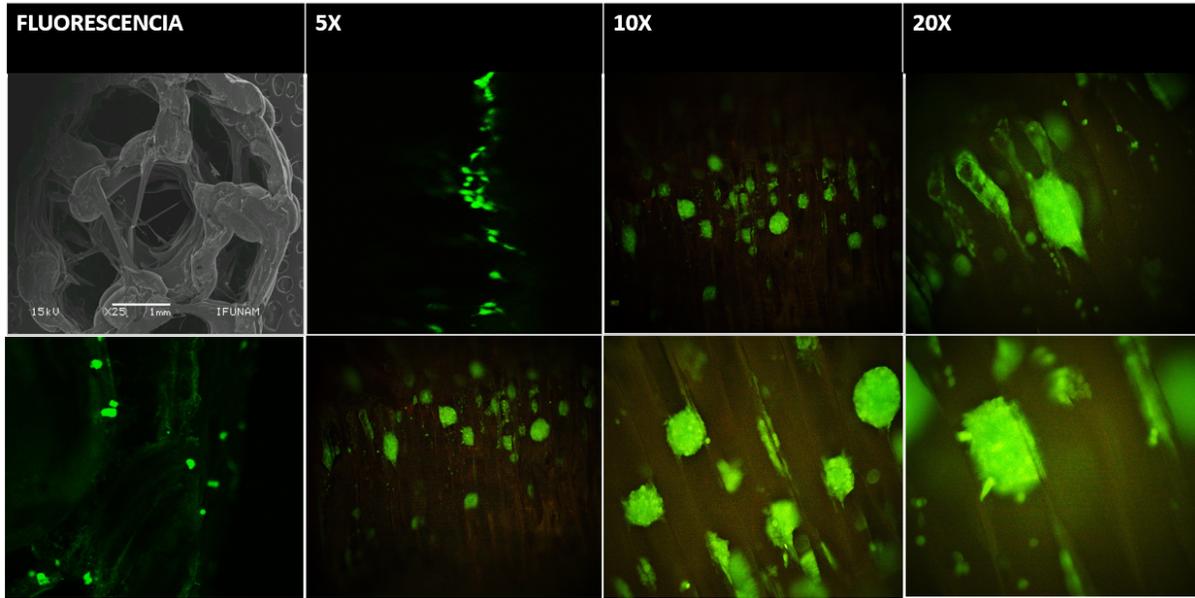


Figura 26: Fluorescencia a las 24 horas posteriores al cultivo de hFOB sobre los tubos 3D sin fibras.

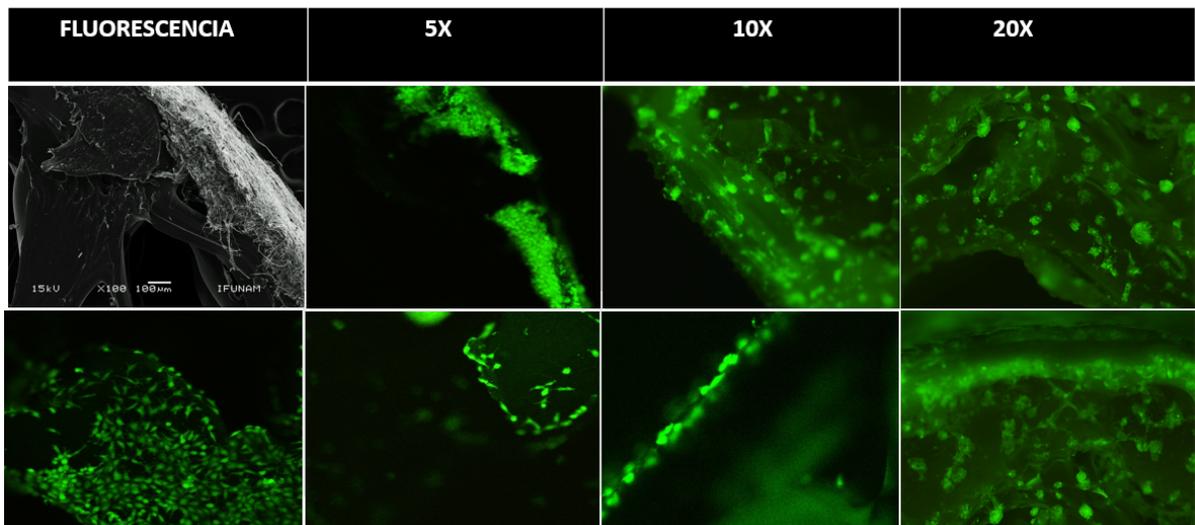


Figura 27: Fluorescencia a las 24 horas posteriores al cultivo de hFOB sobre los tubos 3D con fibras de PLA al 7%.

8 Discusión

La ingeniería de tejidos óseo se ha propuesto como una alternativa prometedora a la regeneración o remplazo de defectos óseos de tamaño crítico con la ventaja de no generar las complicaciones asociadas con las técnicas tradicionales.

Se han llevado a cabo extensas revisiones de la evolución que han tenido los materiales en este campo, así como las técnicas de síntesis y las características que debe cumplir un andamio para optimizar el tratamiento de los defectos óseos. Se ha reportado que la ingeniería de tejido óseo tiene el potencial para superar las limitaciones y desventajas asociadas con el uso del injerto óseo autólogo que es el estándar de oro actualmente. [26] Para lograr este objetivo se tienen que optimizar la interacción de células, andamios, factores locales y sistémicos que conformaran un proceso complejo caracterizado por un conjunto de variables interdependientes.

El objetivo de este estudio fue crear un andamio híbrido con la combinación de dos técnicas de síntesis, la técnica de impresión 3D para obtener el diseño y tamaño deseado y el hilado por propulsión de gas como recubrimiento del andamio al que le confiere la estructura fibrilar en rangos nanométricos, con el fin de tomar las mejores características de cada técnica y obtener un andamio jerárquico que logre imitar el estándar de oro para defectos óseos de tamaño crítico que se usa actualmente, se evaluaron las características morfológicas, fisicoquímicas y biológicas del andamio para valorar las ventajas que se obtienen de un andamio polimérico híbrido.

Para lograr imitar la estructura ósea se llevó a cabo la síntesis del núcleo del andamio que fueron tubos de dos dimensiones 9×35 mm y 5×20 mm por medio de impresión por fusión de material fundido con PLA, para así obtener la estructura macrométrica deseada y las propiedades mecánicas necesarias para un sustituto de hueso. Posteriormente se llevó a cabo el recubrimiento de los tubos con las fibras de PLA al 7% sintetizadas con la técnica de hilado por propulsión de gas para lograr imitar las fibras de Sharpey presentes en el periostio de los huesos y lograr imitar la estructura fibrilar que presenta la matriz extracelular en el tejido óseo. Así se llevó a cabo la funcionalización, creando una nanoarquitectura sobre la superficie externa del andamio 3D.

La caracterización morfológica de la superficie se llevó a cabo por medio de MEB. Se obtuvieron microfotografías a diferentes ampliaciones que muestran la fusión capa por capa del polímero con pequeños espacios extruidos entre capa y capa, en las amplifica-

ciones más altas se observa una superficie homogénea y lisa y con una macroestructura y geometría similar en los dos grupos de tubos y con una microestructura porosa al centro en el tubo de 5×20 mm esto en los tubos sin recubrimiento. Mientras que los andamios tubulares 3D recubiertos con fibras muestran la interfaz que se genera entre el andamio impreso y las fibras depositadas sobre su superficie que le confiere al andamio una mayor rugosidad y superficie de contacto, lo que confirma la diferencia en la topografía de la superficie de los dos andamios. Además, las ampliaciones más altas nos permitieron observar la distribución y morfología del recubrimiento de las fibras depositadas, obteniendo así un diámetro de fibra promedio de $0.430 \pm 0.205 \mu\text{m}$ con una distribución aleatoria y uniforme sobre toda la superficie del andamio impreso en 3D y que le confiere una marcada rugosidad en comparación con el andamio solo.

Estos resultados permitieron demostrar la idoneidad de la combinación de dos técnicas de síntesis, en este caso la impresión 3D y el hilado por propulsión de gas para obtener un recubrimiento fibrilar con una dispersión aleatoria, homogénea y bien adaptado a la superficie del andamio 3D, con espesores de fibra submicrométricos y homogéneos. Esto concuerda con los estudios que han evaluado la producción de fibras por medio de hilado por propulsión de gas para la formación de redes porosas interconectadas en rangos submicrométricos y que se han evaluado por MEB. [23]

Al igual que los estudios que han concluido que la estructura del hueso lamelar, que es el tipo de hueso más común en humanos, está compuesto por un material ordenado y uno desordenado común en la estructura jerárquica, compuesta por fibras de colágena, que es lo que se logró reproducir con la combinación de las dos técnicas de este estudio. [24]

La caracterización estructural de los andamios se llevó a cabo por medio de difracción de rayos X, FTIR, perfilometría y pruebas de mecánicas. Al realizar las pruebas de difracción de rayos X, se comparó la estructura amorfa del filamento de PLA contra los experimentales que fueron los andamios tubulares 3D solos y con recubrimiento de fibras de PLA al 7%. Los difractogramas muestran que los dos grupos experimentales tienen una señal parecida, con una banda ancha característica de un pico amorfo que tiene un aumento considerable respecto al filamento de PLA que tiene un pico de menor intensidad. Estos resultados están en concordancia con estudios que reportan que el PLA es en polímero amorfo y sus características varían dependiendo el grado de entrecruzamiento, dopantes o parámetros de impresión a los que es sometido.

El PLA tiene un punto de fusión relativamente bajo (150–160 °C) por lo que se requiere menor temperatura durante el proceso de impresión, lo que representa una ventaja en las

propiedades del material debido a que sufren menos cambios durante el proceso de síntesis. Se ha reportado que la cristalización del PLA da inicio cuando se eleva su temperatura sobre la temperatura de transición vítrea pero debajo de su temperatura de fusión y esto no afecta sus propiedades si no que mejorara su estabilidad térmica. Se ha reposado que el PLA tiene un porcentaje de cristalinidad del 0-1 % y esto está acorde a los resultados obtenidos en este estudio. Además, se reporta que la incorporación de agentes como colorantes, fibras o dopantes, puede modificar la tasa de cristalización y los resultados en este trabajo sugieren que las fibras modificaron la cristalización del PLA, como se observa en el difractograma. [25]

Para poder identificar y determinar la identidad y características químicas de los grupos funcionales presentes en el PLA, se llevó a cabo el análisis por FTIR, para poder llevar a cabo las comparaciones de los espectros entre los andamios, se analizó el PLA puro, las fibras por separado y el andamio tubular posterior a la síntesis. El Pico que se observa a 2922cm^{-1} corresponde a la absorción de vibración de estiramiento de $C - H$, también se observaron picos a 758 y 873^{-1} corresponde a la vibración por flexión de $-CH$, 1043 y 1182^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de $C - O$, 1450^{-1} vibración de flexión de $-CH_3$ y 1751^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del grupo éster de $C = O$.

El FTIR es ampliamente utilizado para interpretar y determinar los grupos funcionales y elementos estructurales presentes antes y después de aplicar alguna técnica de síntesis a un material determinado. Los resultados presentados en este trabajo son compatibles con los reportados en la literatura donde se utiliza el FTIR para conocer las características estructurales del PLA antes y después de ser sometidas a un proceso de síntesis y para evaluar que no contuvieran contaminantes significativos. [26]

La identidad química del andamio se comprobó con los espectros obtenidos de las muestras, que coinciden con los ya reportados para el PLA y también se comprobó que no tenía contaminantes significativos presentes que son los parámetros necesarios para llevar a cabo las evaluaciones biológicas en el andamio. [27]

Se evaluó la rugosidad de los andamios tubulares 3D por medio de la perfilometría. Se analizaron las topografías superficiales de los andamios tubulares 3D con y sin recubrimiento de fibras. Los resultados mostraron que el andamio que no tenía un recubrimiento fibrilar poseía una superficie homogénea con una rugosidad promedio (R_a) de $0.049 \mu\text{m}$ y un promedio de depresión (R_q) máxima de $0.064 \mu\text{m}$. Esto se comparó con los valores obtenidos en el andamio tubular recubierto, se observó la influencia de las nanofibras en la rugosidad del andamio, obteniendo una rugosidad promedio (R_a) $0.586 \mu\text{m}$ y la depresión máxima promedio (R_q) de $0.727 \mu\text{m}$. Estos resultados coinciden con los que

obtuvimos en la evaluación de las superficies en la MEB y con estudios que reportan las modificaciones que sufren en las propiedades morfológicas, estructurales y en su superficie los andamios híbridos o dopados, aumentando su rugosidad y la presencia de crestas y valles. [28]

No solo la arquitectura total del andamio es de crucial importancia, sino también sus propiedades superficiales y la rugosidad para poder generar una adecuada interacción entre las células y el material y tener un andamio con las características deseadas. En este estudio la combinación de las dos técnicas de síntesis incrementó la rugosidad del PLA y como se ha reportado previamente la capa depositada sobre la estructura del andamio forma un interfaz fuerte que llega a influir en las propiedades biológicas del andamio. [29]

Para analizar la estabilidad térmica de los andamios se llevó a cabo el análisis de termogravimetría (TGA) para medir el cambio de peso de los andamios en función a la temperatura en una atmosfera controlada. El análisis termogravimétrico derivado (DGT) se utilizó para evaluar la descomposición de los andamios 3D. Se llevó a cabo la determinación del punto de inicio (T_0), el punto de inflexión (T_p) y la temperatura de la pérdida de masa (Tmax) de los andamios tubulares 3D con y sin recubrimiento de fibras y se compararon con el filamento de PLA puro a partir de los espectros. El T_0 más alto lo obtuvo el andamio tubular 3D recubierto con una temperatura de 331 °C, el andamio 3D sin recubrimiento y el filamento comenzaron su pérdida de masa a los 327 °C. Sin embargo, el andamio tubular 3D con recubrimiento se degrado por completo a los 369 °C mientras que el andamio sin recubrimiento se degrado a los 394 °C y el filamento de PLA puro a los 355 °C. Las curvas de DGT que están relacionadas con los puntos de inflexión del andamio tubular 3D mostró un aumento de la curva TGA de 21 °C en comparación con el andamio tubular 3D recubierto que mostró un aumento de 17 °C, sin embargo, ambos andamios mostraron un aumento con respecto al PLA puro, que se tomó como control. Basado en las curvas de TGA y DGT la incorporación del recubrimiento de fibras mediante la técnica de hilado por propulsión de gas sobre la superficie del andamio tubular en 3D influyó en la temperatura de degradación que logró mejorar la estabilidad térmica del andamio. Estos resultados coinciden con otros estudios que usan TGA para analizar el proceso de fabricación de los andamios considerando que la matriz polimérica está sujeta a altas temperaturas. Los resultados también muestran que el polímero no sufre cambios en sus propiedades y esto evita cualquier fenómeno de degradación debido al proceso de síntesis, los compuestos muestran un aumento en las propiedades de estabilidad térmica de los andamios y el proceso de extrusión no tiene ninguna influencia en las propiedades

químicas de los andamios 3D. [30] Los resultados obtenidos en la calorimetría diferencial de barrido (DSC) muestran el cambio en las propiedades térmicas de los andamios y coincidieron con los ya presentados en el TGA. El análisis de las curvas obtenidas en el DSC mostró un comportamiento similar para las tres muestras, los andamios tubulares 3D recubiertos y sin recubrir y el filamento de PLA, con una temperatura de transición vítrea (T_g) entre los 56 y 62 °C, seguido de una reacción exotérmica y un punto de fusión (T_m) alrededor de los 169 °C. Al comparar los grupos experimentales contra el control, el filamento de PLA puro mostró una (T_g) más baja y una (T_m) más alta, lo que indica que el PLA puro o en bulto, requiere mayor flujo de calor para alcanzar un estado físico diferente. Es posible que el PLA impreso con estructuras en rangos micrométricos y nanométricos y especialmente las que se funcionalizan como es el caso de las fibras, pueden distribuir el flujo de calor de forma más eficiente, alcanzando un punto de fusión con mayor rapidez.

La temperatura de transición vítrea de un material depende de las características moleculares, composición y compatibilidad de los componentes con el composite. Una mala compatibilidad con los dopantes o componentes añadidos pueden disminuir la temperatura de transición vítrea. En este estudio se usó el mismo polímero para los dos tipos de síntesis, por lo que las variantes en la temperatura de transición vítrea no son significativas y se atribuyen a la estructura de los andamios, lo que coincide con los resultados obtenidos en el DSC. [31]

Otro análisis que soporta estos resultados es la evaluación por DMA, donde se observó el mismo comportamiento. El filamento de PLA puro mostró una $\tan(\delta)$ de 70.4 °C, mientras que los andamios tubulares funcionalizados con y sin fibras mostraron un incremento en su $\tan(\delta)$ a 76 °C. El comportamiento térmico de los materiales analizados es consistente con lo encontrado en la literatura donde se reporta que los parámetros de síntesis usados para los andamios no inducen cambios térmicos significativos en términos de temperatura y la variación no es sustancial como para afirmar la descomposición del material. Sin embargo, la cristalización del material podría ser el resultado de la reorganización laminar del polímero, que depende de sus características moleculares y su composición, así como a la reorganización de las regiones menos cristalinas, lo que resulta en la expansión de las áreas amorfas. Esto también coincide con los resultados obtenidos en la difracción de rayos X.

Se ha reportado que los polímeros no modificados no son la mejor opción para el uso de la tecnología 3D y que la funcionalización u optimización permitiría explotar las mejores características de los materiales y las técnicas usadas en impresión 3D. [32]

El análisis mecánico de los andamios se llevó a cabo con pruebas de Módulo de Young y prueba de esfuerzo para saber si la combinación de técnicas permite al andamio tubular 3D tener mejores características mecánicas y físicas. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales, pero se observó que el PLA tiene un comportamiento termoplástico que mejora su resistencia a la deformación y por ende su resistencia a la fractura. Se ha reportado que existe una relación entre la morfología del andamio, los componentes y la resistencia a la fractura y que algunos materiales que se han usado para funcionalizar andamios han mostrado aumentar la resistencia a la fractura y mejorar las características mecánicas en general, como son las nanopartículas, fibras y dopantes, proporcionando también mayor estabilidad térmica, coeficiente de expansión térmica y resistencia a la descomposición. Los resultados obtenidos concuerdan con estas características reportadas. [33]

La estrategia de combinar dos técnicas de síntesis para poder solventar las deficiencias que tiene cada una de ellas permite el desarrollo de nuevos sistemas de materiales con mejores características físicas, químicas y mecánicas. El desarrollo de andamios híbridos se propone para obtener las características a nivel macro, micro y nanométrico requerido en la bioingeniería de tejidos. Se evaluó también si estas características lograban mejoras en la adhesión, proliferación y en la interacción célula-material por medio de ensayos biológicos y poder proponer un andamio como el idóneo para guiar la regeneración de tejido óseo.

Para poder plantear el uso de un andamio como una alternativa a la terapia convencional este debe ser biocompatible y no debe ser tóxico. Las células deben adherirse, mostrar una morfología típica, proliferar, diferenciarse y producir matriz nueva, y los productos de degradación no deben ser tóxicos y deben excretarse por vías metabólicas sin dañar ningún órgano.

El objetivo de este trabajo fue diseñar un andamio híbrido que promoviera la adhesión celular, una adecuada migración y que por medio de la estructura se pudiera guiar a las células y formar un microambiente adecuado para guiar la regeneración del tejido óseo.

Se llevaron a cabo las evaluaciones biológicas con los osteoblastos fetales humanos sembrados en los andamios tubulares 3D, la evaluación de la biocompatibilidad de las células sobre la superficie de un andamio es un punto clave para la regeneración del tejido óseo y para su aplicación. Por esta razón la respuesta de la adhesión celular de los hFOB que fueron sembradas sobre los andamios tubulares 3D con y sin recubrimiento fue analizada por medio del ensayo de cristal violeta a los dos tiempos estándares de adhesión celular establecidos, 4 y 24 horas posteriores al cultivo. Se observó que un

mayor número de células se adherían a los andamios tubulares 3D con recubrimiento fibrilar, sin embargo, los andamios sin recubrimiento también presentaron una adhesión células alta con respecto al filamento de PLA que se tomó como control. [34]

Se realizaron pruebas estadísticas y se observó que en los ensayos de adhesión que el andamio tubular 3D recubierto con fibras tenía un 13 % mayor de crecimiento respecto al que no tenía fibras a las 4 horas y un 15 % más de crecimiento a las 24 horas posteriores al cultivo. Estos resultados sugieren que las nano fibras hiladas al aumentar la superficie de contacto y formar una interfaz con la superficie del andamio rugoso, por lo que resalta la importancia de la estructura del andamio, ya que las células son capaces de censar las superficies sobre las cuales son cultivadas y esta información llega directamente al núcleo por medio de cascadas de señalización intracelular. Estos resultados se refuerzan con las microscopias de fluorescencia y electrónica de barrido.

La viabilidad de los hFOB que fueron cultivados sobre los andamios tubulares 3D con y sin recubrimiento fibrilar se evaluaron a los 1, 3, 5 ,7 ,14 y 21 posteriores al cultivo mediante el ensayo de WST-1 y los resultados muestran que al día 1 de cultivo, la viabilidad de los hFOB cultivados sobre el andamio tubular en 3D es más alta que el control de PLA, lo que concuerda con los resultados obtenidos a las 4 y 24 horas posteriores al cultivo en el ensayo de adhesión.

El crecimiento celular fue constante y fue en aumento durante los diferentes tiempos de incubación. La viabilidad celular se incrementó en los andamios tubulares en 3D durante los periodos de experimentación y se observó que no había diferencias estadísticamente significativas en la respuesta celular entre los andamios entre los 7 y 21 días de cultivo. Con estos resultados podemos comprobar que los andamios impresos no inducen ningún efecto de citotoxicidad en los osteoblastos fetales humanos y que el recubrimiento fibrilar mejora la viabilidad de las células.

Las pruebas de adhesión y proliferación *in vitro* con los hFOB fueron de utilidad para caracterizar la actividad celular, la citotoxicidad del material y evaluar como las células comenzaban su interacción con el material, todo esto para tener resultados preliminares de las pruebas preclínicas tratando de reproducir las condiciones *in vivo*. [34]

Para poder determinar cómo las células se adherían, crecían y proliferaban en interacción con los andamios tubulares en 3D, se llevaron a cabo los análisis de fluorescencia para poder observar la localización y la forma que tienen los hFOB sembrados sobre la superficie de los andamios tubulares 3D con y sin recubrimiento fibrilar. Se llevó a cabo una comparación de imágenes obtenidas mediante MEB de la superficie de los andamios

recubiertos y sin recubrir respecto a las imágenes obtenidas mediante Fluorescencia.

En las imágenes de fluorescencia pudimos observar claramente la forma de las células y su disposición. En el caso de los andamios sin fibras se observó que las células tienen una distribución en todo el andamio, pero se encuentran acomodadas en las capas del polímero que se fundió durante la impresión 3D y a pesar de las pocas horas de cultivo, las células empiezan a tomar su morfología típica. Como ya se ha reportado, las células poseen diversos mecanismos de mecanosensibilidad que transducen las señales mecánicas en cascadas bioquímicas. Durante la adhesión de las células a la MEC una red compleja de moléculas se acopla mecánicamente a la matriz, el citoesqueleto y el núcleo-esqueleto. Esta red comprende receptores, proteínas transmembranales y adhesiones focales que unen la MEC al citoesqueleto. Algunos estudios señalan que durante la adhesión celular se presentan cambios conformacionales que son inducidos simultáneamente y celerados por las fuerzas transmitidas por los ligandos.³⁵ Debido a esto la superficie de los materiales u andamios sintetizados toma una gran importancia, ya que se ha estudiado que las células tienen la capacidad de sentir la superficie sobre la cual son sembradas y esta superficie influye en el comportamiento y la señalización de las mismas y esto es lo que se reflejó en los resultados obtenidos en la microscopia de fluorescencia.

Este mismo comportamiento se observó en los andamios tubulares en 3D recubiertos con fibras, las células se distribuyeron en todo el andamio, pero el recubrimiento fibrilar logró atraer un mayor número de células a su superficie además de que les dio dirección. Se observó una gran cantidad de células distribuidas y direccionadas a lo largo de la fibra, lo que muestra que el recubrimiento y la interfaz entre el andamio y el material tienen un impacto positivo en el comportamiento celular. Esto también se comprobó al observar a las células tomar su morfología típica hexagonal a las 24 horas posteriores al cultivo, lo que muestra que sus prolongaciones citoplasmáticas empiezan a presentarse.

Como la mecanotransducción depende de las propiedades del material es muy importante tomar en cuenta la rigidez, la forma y la rugosidad del andamio, debido a que la superficie tiene un impacto en las células nivel celular y subcelular. Y los resultados en este estudio coinciden con los datos reportados. [36]

La evaluación de la MEB con las células hFOB a las 24 horas posteriores al cultivo mostraron las células adheridas y creciendo sobre la superficie del andamio. Los osteoblastos se observan acoplados al andamio tubular en 3D y las fibras mejoran la cantidad y forma de las células adheridas a la superficie del andamio tubular 3D recubierto, al observar lamelipodios y prolongaciones citoplásmicas que comienzan a interactuar con las células circundantes a las pocas horas posteriores al cultivo lo que puede contribuir a la

formación de tejido depositado. La diferencia en la morfología de las células en los andamios tubulares 3D con y sin fibras, se observan las células con extensiones citoplásmicas que comienzan a extenderse al contacto con las células cercanas manteniendo una morfología poligonal en la superficie con fibras y comparada con el andamio sin recubrimiento fibrilar, las células presentan una adhesión adecuada en el andamio y una distribución de grupos pequeños de células aislados a lo largo del andamio y que presentan un citoplasma redondeado con pocas extensiones y con una morfología plana.

Mediante las fluorescencias y microfotografías se analizó si la interacción célula-material no afecta la forma y extensión de las células hFOB y se observó que no se induce un cambio visible en la morfología y que no se presenta citotoxicidad al evaluar el andamio en un ambiente biológico, se observó que la nanotopografía superficial tiene un impacto favorable en la extensión de las prolongaciones de los osteoblastos lo que también se observó en los análisis de adhesión y proliferación donde los andamios con recubrimiento de fibras mostraron un mayor número de células adheridas y proliferando a los diferentes días de cultivo, a comparación de los andamios que no tenían recubrimiento fibrilar.

Mediante la combinación de las técnicas de impresión se le dio al andamio una estructura jerárquica que va desde los rangos nanométricos hasta una estructura micrométrica la cual es muy importante en la bioingeniería del tejido óseo debido a que para obtener una inducción exitosa del tejido óseo que se busca regenerar en defectos de tamaño crítico, se requiere que el andamio tenga un diseño específico y con geometrías controladas, es decir un microambiente específico que brinde una topografía superficial que mejore la respuesta biológica al material promoviendo la actividad celular de los osteoblastos y la formación de depósitos óseos.

Son muchos los parámetros que deben ser considerados para fabricar un andamio 3D para regenerar tejido óseo. Se ha observado que un solo material o una sola técnica de síntesis no logra un efecto osteopromotor para la regeneración de hueso. [37]

Se han logrado desarrollar prototipos con propiedades mecánicas adecuadas para la regeneración del tejido óseo; a pesar de que es un campo nuevo, su potencial se ha comprobado en pocos años debido a que se ha restableciendo la dinámica del microambiente del hueso nativo en 3D y aunque se ha tenido éxito en las evaluaciones *in vitro*, manteniendo la viabilidad, proliferación celular y sugiriendo un potencial de diferenciación celular, aun son necesarias pruebas preclínicas para evaluar estabilidad, carga mecánica, respuesta inmune y el potencial osteointegrativo. [38]

Las propiedades del hueso se ven influenciadas principalmente por los materiales que lo

componen y los elementos geométricos y topológicos que le dan estructura y resistencia, por eso es de gran importancia diseñar un andamio con los materiales adecuados que no generen respuestas inmunes, permitan el crecimiento celular y puedan ser eliminados por vías metabólicas y que, en combinación con un adecuado diseño y síntesis, brinde las mejores características físicas y mecánicas. [39]

El andamio tubular sintetizado en el presente trabajo con los resultados previamente presentados nos permite esperar la diferenciación de hFOB a osteoblastos maduros debido a que el recubrimiento fibrilar de los andamios tubulares puede imitar las funciones estructurales y bioquímicas de la matriz extracelular del hueso. Lograr imitar estructuras desde los rangos nanométricos fue importante para mejorar la adhesión y proliferación celular como lo mencionamos previamente, sin embargo, también podría estimular a la diferenciación y mineralización de los hFOB.

Las características superficiales del andamio podrían inducir una diferenciación que comenzaría con la inducción de un marcador común de osteoblastos como es la fosfatasa alcalina, que es un marcador temprano de formación ósea y posteriormente las células podrían comunicarse con las células circundantes a lo largo del andamio para la expresión de proteínas no colagénicas que regularían el depósito de tejido mineral, así como la inducción de un marcador tardío de formación de hueso.

Además, considerando los resultados obtenidos a lo largo del estudio, se propone que el andamio tubular presentado es un material prometedor que podría facilitar la mineralización para aplicaciones a futuro de regeneración ósea guiada.

Sin embargo, deben realizarse más estudios acerca de la capacidad de diferenciación que puede tener el andamio tubular en 3D.

9 Conclusiones

En el presente trabajo se obtuvieron andamios tubulares en 3D con una estructura macrométrica e interna controlada, se diseñaron dos grupos de tubos de diferente diámetro, 9×35 mm y 5×20 mm. A pesar de que los andamios tenían una estructura con una rigidez, forma y porosidad adecuada, se complementaron con un recubrimiento homogéneo de fibras en rangos submicrométricos que se obtuvieron mediante la técnica de hilado por propulsión de gas, aprovechando así las mejores características de las dos técnicas de síntesis y obteniendo como resultado final un andamio híbrido con una estructura jerárquica que va desde los rangos nanométricos hasta una estructura macrométrica 3D.

Se caracterizaron por microscopia electrónica de barrido y se observó la diferencia en la topografía superficial de los andamios 3D con y sin fibras, concluyendo que la estructura ideal era la de los tubos de 5×20 mm con recubrimiento fibrilar.

Mediante la técnica de indentación, se determinó que el valor de la rugosidad media de los tubos se incrementaba con la incorporación del recubrimiento con las fibras hiladas, en ambos grupos de estudio.

Se obtuvieron los datos de temperatura para el PLA puro y los grupos experimentales, observando que el polímero aumenta su resistencia a la temperatura después del proceso de síntesis, pero no se altera su composición. Las pruebas mecánicas muestran que en los grupos con y sin recubrimiento, no existen diferencias mecánicas significativas y que la presencia de fibras no modifica estos parámetros.

En la evaluación biológica, los andamios recubiertos con fibras submicrométricas mostraron una mejor adhesión de los hFOB, lo que también se vio reflejado en un aumento en la proliferación celular respecto a los andamios tubulares en 3D sin recubrimiento, lo que muestra que las fibras funcionan como una plataforma para mejorar la biocompatibilidad celular, sin ser citotóxicas y proporcionan apoyo para la colonización, el intercambio de fluidos y la intercomunicación celular.

En la evaluación mediante microscopia electrónica y fluorescencia se observó que el recubrimiento fibrilar puede ser censado por las células ya que mostraron un crecimiento direccionado y ordenado, lo que sugiere que las fibras logran modificaciones en el comportamiento celular y una señalización que llega al citoesqueleto.

El andamio tubular en 3D con recubrimiento fibrilar presenta las mejores característi-

cas mecánicas y biológicas, sin embargo, se necesitan más estudios para determinar el proceso de mineralización de las células sobre esta superficie y se pueda proyectar como un andamio 3D con potencial para su uso en la bioingeniería de tejido óseo o con una aplicación en la vascularización de tejidos.

10 Perspectivas del estudio

Los resultados del presente estudio permiten proponer los andamios tubulares 3D con recubrimiento fibrilar para los estudios *in vivo* y posibles aplicaciones clínicas a futuro.

Evaluar la capacidad de mineralización que tienen los andamios tubulares con células mesenquimales, con y sin medio inductor a tejido óseo. Se plantearía la evaluación de un diseño de estudio *in vivo* en fémur de rata *Wistar*, generando un defecto óseo de tamaño crítico e implantando el andamio tubular como sustituto óseo que ayude a dirigir la regeneración del hueso.

Las aplicaciones clínicas a futuro en cavidad bucal podrían proyectarse como un sustituto de hueso en defectos mandibulares en bloque, que ayude a dirigir la regeneración del hueso sin la necesidad de una segunda intervención quirúrgica para retirarlo.

11 Anexo

11.1. Técnicas de Caracterización

La caracterización de los materiales a través de microscopias y técnicas espectroscópicas y térmicas se utiliza para obtener información de la estructura superficial y acerca de los parámetros de temperatura y composición de estos. Así, además de observar la estructura superficial se pueden analizar las especies químicas presentes en el compuesto y es posible obtener datos sobre el orden de los polímeros en cuanto a la orientación de sus cadenas, cristalinidad, fases cristalinas, temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión. [40] Estas técnicas también permiten seguir la evolución de los anteriores parámetros, al realizar diferentes procesos sobre los materiales, como la aplicación de tensiones, tratamientos térmicos, degradaciones y pruebas biológicas. Además, la microscopia de fluorescencia nos permite observar las células y su localización con técnicas no tóxicas que nos permiten llevar un seguimiento del experimento.

11.2. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido (MEB) es uno de los instrumentos más versátiles disponibles para el examen y análisis de la morfología de la microestructura y caracterización de materiales poliméricos. [15] La microscopia óptica permite ampliar el ángulo visual a través de la lente óptica, en la década de 1980 se llevaron a cabo diversos experimentos que permitieron el descubrimiento de que los electrones pueden ser desviados a través de un campo magnético, lo que permitió el desarrollo de la microscopia electrónica que se ha desarrollado al sustituir la fuente de luz con un rayo de electrones con alta energía. El MEB utiliza un haz de electrones enfocado para escanear la superficie de la muestra sistemáticamente, produciendo un gran número de señales que se convierte finalmente en una señal visual que se muestra en un tubo de rayos catódicos (CRT), la formación final de imágenes en MEB depende de la adquisición de señales producidas a partir de la interacción del haz de electrones y la muestra. [41]

La MEB consiste básicamente en hacer incidir un haz de electrones sobre la muestra, este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales, que captadas con detectores específicos proporcionarían información acerca de la naturaleza de la muestra,

la señal que emiten los electrones secundarios es la que se usa generalmente para obtener una imagen de la muestra y se considera un electrón secundario a aquel que emerge de la superficie de la muestra con una energía inferior a 50 electronvoltios (eV) mientras que la señal de electrones retrodispersos está compuesta por aquellos electrones que emergen de la muestra con una energía superior a 50 eV.

La emisión de electrones conforma una de las formas básicas del MEB para proporcionar una imagen tridimensional de las estructuras biológicas. Un Haz de electrones desprendido del filamento de tungsteno choca con el objeto a analizar excitando cierto número de electrones secundarios de tal forma que originan una señal, este fenómeno es posible gracias al recubrimiento que se le da a la muestra biológica aplicando una fina capa de metal para prevenir o reducir el efecto de carga eléctrica que ocasiona el haz de electrones sobre esa muestra, este recubrimiento se hace al alto vacío, uno de los mayores factores que afectan el recubrimiento y la uniformidad de la capa fina es el tipo de material usado. Los metales más utilizados son el oro, paladio, carbón o las combinaciones de ellos, el oro es el de uso más generalizado debido a su fácil adquisición de forma pura o combinada, es fácilmente evaporado desde un filamento de tungsteno y tiene un alto coeficiente de emisión de electrones secundarios, debido a esto es el material de elección para la preparación de muestras biológicas.

11.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido o DSC es una técnica experimental dinámica que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe una sustancia cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante en un determinado intervalo de temperaturas. La calorimetría diferencial de barrido se ha revelado como una técnica importante en el campo de la Ciencia de Materiales debido a su elevado grado de sensibilidad y a su rápida velocidad de análisis.

En la mayoría de los casos para identificar el tipo de transformación que tiene lugar a una determinada temperatura, es preciso acudir, la mayoría de las veces a técnicas experimentales complementarias que nos permitan ratificar la validez de las conclusiones extraídas de las curvas de DSC.

En los últimos años se ha puesto especial interés a la importancia de los estudios por DSC para caracterizar materiales preparados por métodos no convencionales en fase cris-

talina ordenada o desordenada y en fase amorfa. En particular en el caso de materiales amorfos como los polímeros, la técnica de DSC es muy útil para establecer la estabilidad térmica de la fase amorfa. Asimismo, en el caso de materiales cristalinos obtenidos por técnicas de solidificación rápida o ultrarrápida, la presencia y aniquilación de tensiones mecánicas puede detectarse fácilmente si conlleva un fenómeno energético. Cualquier proceso que pueda activarse térmicamente puede estudiarse por DSC y llegar a caracterizar la cinética de transformación. Todas estas características hacen de esta técnica indispensable para la caracterización de materiales. [42]

11.4. Termogravimetría (TGA)

La termogravimetría es parte de un conjunto de análisis térmicos que han sido desarrollados para identificar y medir los cambios físicos y químicos que sufren los materiales cuando son expuestos a variaciones controladas de temperatura. Estos análisis se han desarrollado específicamente para el estudio de las reacciones primarias en la descomposición de materiales sólidos y líquidos. Con la termogravimetría se analizan procesos de desorción, adsorción y reacciones de descomposición en un ambiente de gas inerte o en presencia de oxígeno. Por medio de este método no se puede conocer la composición química del material en estudio ni tampoco identificar los cambios térmicos que no están asociados con variaciones de masa como la cristalización o la transición vítrea.

El análisis termogravimétrico consiste en registrar continuamente la variación de la masa del material en estudio conforme se varia la temperatura a una tasa térmica constante (cambio de temperatura lineal). Este tipo de procedimiento termogravimétrico se conoce como análisis dinámico. Existe la opción de hacer un análisis termogravimétrico isotérmico, en el cual se mantiene la temperatura constante por un periodo establecido. Como resultado del análisis termogravimétrico se obtienen los datos de cambio de masa con respecto a la temperatura o al tiempo y un termograma, que representa gráficamente las variaciones porcentuales de la masa. Este tipo de técnica es ampliamente utilizada en la caracterización cuantitativa y cinética de polímeros, carbón y arcillas, entre otros materiales. [43]

11.5. Perfilometría

La rugosidad de una superficie se determina por medio de técnicas que exploran la superficie del objeto y obtienen un perfil 2D (perfilómetros), o una representación 3D. La

forma más sencilla, pero que aporta una información subjetiva, es la inspección visual y táctil. También el uso de lupas binoculares o del microscopio óptico de polarización con la preparación de láminas delgadas que, confeccionadas perpendicularmente a la superficie, permiten determinar la rugosidad superficial del material, pudiendo, junto con los perfilómetros, tener representaciones en 2D de la rugosidad. Los rugosímetros pueden clasificarse en aquellos de contacto (perfilómetros), y de no contacto (rugosímetros ópticos). [44] Por medio de técnicas microscópicas de alta resolución se puede medir la rugosidad de la superficie de los materiales como son la microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y de efecto túnel (STM). Los perfilómetros y los rugosímetros ópticos miden la rugosidad a escala micrométrica, presentando la ventaja de ser técnicas no destructivas y portátiles, mientras que las técnicas como el AFM, SEM y STM tienen una resolución mayor y ofrecen datos a escala nanométrica; tienen como desventaja que las medidas deben realizarse con equipamientos más sofisticados y de un costo mucho más elevado.

Dentro de los rugosímetros de contacto se encuentran los perfilómetros; en ellos, una fina punta recorre la superficie del objeto controlando la velocidad de desplazamiento y transformando las variaciones de altura en impulsos eléctricos que son registrados gráficamente, dando lugar al perfil de la rugosidad. Según cómo se obtenga la señal eléctrica procedente del movimiento de la punta (palpador), este tipo de equipos pueden ser: Perfilómetros inductivos: el movimiento vertical de la punta generado por la rugosidad modifica la longitud del circuito magnético, y con ello el flujo de campo magnético que lo atraviesa, generando una señal eléctrica.

Perfilómetros capacitivos: el desplazamiento vertical une las dos láminas de un condensador, modificando su capacidad y con ella la señal eléctrica.

Perfilómetros piezoeléctricos: el desplazamiento del palpador deforma una lámina piezoeléctrica generando una señal eléctrica.

El diámetro de la punta o palpador es el que determina la sensibilidad de las medidas, no pudiendo medir rugosidades de dimensión inferior a la de la punta utilizada. Este diámetro suele ser de 2.5 o 10 μm , recorriendo una longitud de muestreo entre 0.08, 0.25, 0.8, 8 y 25 mm. En general la longitud de muestreo suele ser suficiente para obtener resultados representativos de la rugosidad del material. El perfil obtenido (perfil denominado P) se filtra (perfil R) para eliminar las ondulaciones y defectos que no sean los propios de la rugosidad. Estos rugosímetros únicamente pueden realizar mediciones en 2 dimensiones (2D). Esto es debido a que el palpador se puede mover vertical y horizontalmente según una línea.

11.6. Difracción de Rayos X (RX)

Los rayos X pueden ser analizados de diferentes formas y se pueden clasificar en tres tipos de análisis. El primero sería Radiográfico, que se basa en la absorción diferencial de los rayos X, por la forma en la que penetran el material y tiene un extenso uso en medicina y salud, además del área de metalurgia. El segundo tipo de análisis es la difracción de rayos X que se basa en la interferencia constructiva de una red cristalina con una fuente de rayos X de longitud de onda conocida. Y finalmente la espectroscopia de rayos X, que es el estudio y análisis del espectro de rayos X por medio de la dispersión o separación del espectro en componentes individuales, su uso esta principalmente en la identificación y cuantificación de elementos. [45]

11.7. Espectroscopia Infrarroja (FTIR)

La radiación infrarroja fue descubierta en 1800 por William Hersheld pero fue hasta 1900 cuando comenzó la investigación de la absorción infrarroja en materiales, siendo hasta a finales de la segunda guerra mundial cuando estuvo disponible el primer espectrómetro infrarrojo. La espectroscopia infrarroja es probablemente el método más extensamente usado para la investigación de estructuras de polímeros y el análisis de grupos funcionales. Esta espectroscopia se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando la energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula, las moléculas empiezan a vibrar de una manera determinada gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja. [46]

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. La espectroscopia infrarroja puede ser usada para estudiar muestras en estado gaseoso, líquido y solido dependiendo de los tipos de accesorios empleados.

11.8. Análisis Mecánicos

Es importante conocer cómo se comportan los materiales al ser sometidos a fuerzas o cargas y esto depende del diseño y las características del material, de tal forma que los esfuerzos a los que vaya a estar sometido no sean excesivos y el material no se fracture.

Las respuestas de un material a fuerzas internas o externas pueden variar considerablemente dependiendo de la magnitud de la fuerza aplicada y las características del material. La respuesta de un material a una carga uniaxial es determinada generalmente mediante la realización de pruebas de tensión, en esta prueba un material es generalmente deformado a una velocidad específica y la fuerza requerida para causar la deformación es medida en una celda de carga y la deformación es medida por un extensómetro.

El módulo elástico de un material puede ser medido por un procedimiento semejante, aunque para realizarse requiere de una medición exacta de la extensión o deformación desde la tensión elástica lineal.

En pruebas de carga constante el material es sujeto a una carga y la deformación es medida como una función del tiempo. La elongación puede ser medida a intervalos de tiempo usando un catetómetro y las mediciones pueden realizarse en una cama ambiental.

Las pruebas de ruptura son echas principalmente en tensión, pero también pueden realizarse experimentos de ruptura en hoja, torsión, flexión o compresión, los datos de la ruptura proveen información importante para elección de un polímero que pueda sostener mucha carga por largos periodos.

En las pruebas de relajación de la elongación, la muestra es extendida a una cantidad específica y el esfuerzo requerido para mantener esta deformación constante es medido como una función de tiempo, el esfuerzo requerido para mantener la deformación constante decae con el tiempo; cuando este esfuerzo es dividido por la deformación constante, la razón resultante es el módulo de relajación, el cual es una función del tiempo y la temperatura. El dato de relajación de la deformación provee información útil a cerca de la naturaleza visco elástica de los polímeros. [46]

11.9. Análisis Mecánico Dinámico (DMA)

El DMA puede describirse como la aplicación de una fuerza oscilante a una muestra y el análisis del material en respuesta a esa muestra, a partir de esto, se pueden calcular las propiedades de viscosidad y rigidez, así como la capacidad de resiliencia de la muestra. Estas propiedades también se describen como la capacidad de los materiales de perder energía en forma de calor y la capacidad de recuperarse de la deformación. Una forma de describir esto es con base a la relajación de las cadenas poliméricas. La fuerza aplicada se denomina tensión y se denota con la letra griega σ . Cuando el material es sometido a tensión presentara una deformación que se representa con la letra griega γ . Así se obtiene

el módulo de viscosidad en función de la temperatura.

El módulo que se mide en el DMA no es el mismo que se mide en el módulo de Young con la curva esfuerzo-deformación. En DMA un módulo complejo (E^*), un módulo elástico (E'), y un módulo imaginario (perdida) (E'') se calculan a partir de la respuesta del material a la onda sinusoidal. Estos módulos permiten una mejor caracterización del material, que permiten examinar la capacidad del material para devolver o almacenar energía (E'), su capacidad de perder energía (E'') y la relación de estos efectos ($\tan \delta$) que se denomina amortiguación.

El DMA aplica una fuerza oscilatoria, causando una tensión sinusoidal que se aplica a la muestra, midiendo tanto la amplitud de la deformación en el pico de la onda sinusoidal como el retraso entre ondas sinusoidales y así tanto el módulo, la viscosidad y la amortiguación del material pueden ser calculados.

En el área de los materiales el DMA se usa para determinar las propiedades mecánicas de materiales viscoelásticos en función del tiempo, temperatura o frecuencia y se desarrolla aplicando una fuerza oscilatoria periódica para el material (estrés mecánico sinusoidal).

Cómo características tienen la medición de fuerza y desplazamiento, un amplio rango de fuerzas que van desde 1mN hasta 40N, un amplio rango de frecuencia de 0.001 a 1000Hz y de rigidez. Esto le permite ser muy preciso para determinar el módulo de elasticidad y la opción de medir muestras rígidas y no tan rígidas con un ajuste preciso en la temperatura, todo esto supone condiciones reales lo que permite medidas desde la fase vítrea hasta líquida en el mismo dispositivo de muestra. [47]

12 Referencias

1. J. Klein-Nulend, A. D. Bakker, R. G. Bacabac et al., “Mechanosensation and transduction in osteocytes”, *Bone*, Vol 54, pp.182-190, 2013.
2. J. Vuong, C. Hellmich, “Bone fibrillogenesis and mineralization: Quantitative analysis and implications for tissue elasticity”, *Journal of Theoretical Biology*, Vol 287, pp.115-130, 2011.
3. F.F. Safadi, M.F. Barbe, S.M Abdelmagid, et al. “Bone Structure, Development and Bone Biology”, *Bone Pathology*, pp.1-50, 2009.
4. M. D. McKee, W. G. Cole, “Chapter 2 Bone Matrix and Mineralization”, *Pediatric Bone*, Academic Press, pp.9-37, 2012.
5. R. J. Midura, A. Wang, D. Lovitch, et al., “”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, pp. 25464–25473, 2004.
6. R. J. Midura, A. Wang, D. Lovitch, et al., “Extracellular Bone Acidic Glycoprotein-75 Defines Condensed Mesenchyme Regions to be Mineralized and Localizes with Bone Sialoprotein during Intramembranous Bone Formation”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, pp. 25455–25463, 2004.
7. N. Reznikov, R. Shahar, S. Weiner,”Bone hierarchical structure in three dimensions”, *Acta Biomaterialia*, Vol 10, pp. 3815-3826, 2014.
8. Y. Li, C. Liu, “Nanomaterial-based bone regeneration”, *Nanoscale*, Vol 9, pp.4862-487, 2017.
9. J. Choi, O. Kwon, W. Jo et al., “4D Printing Technology: A Review”,*3D Printing and Additive Manufacturing*, Vol 2, no. 4, 2015.
10. R. Masaeli, K. Zandsalimi, M. Rasoulianboroujeni et al., “Challenges in 3D printing of Bone Substitutes”, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, pp.1-36, 2019.
11. R.A. Angelova,” *Advances in Yarn Spinning Technology*”, In *Woodhead Publishing Series in Textiles*, Woodhead Publishing, pp.315-344,2010.

12. W. Tutak, S. Sarkar, S. Lin-Gibson et al., "The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds", *Biomaterials*, Volume 34, no. 10, pp. 2389-2398, 2013.
13. A. Abdal-hay, A. S. Hamdy, J. H. Lim, "Facile preparation of titanium dioxide micro/nanofibers and tubular structures by air jet spinning", *Ceramics International*, Vol 40, no. 10, pp.15403-15409, 2014.
14. A. Abdal-hay, A. S. Hamdy, K. A. Khalil, et al., "A novel simple one-step air jet spinning approach for deposition of poly(vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants", *Materials Science and Engineering: C*, Vol 49, pp.681-690, 2015.
15. Y. Sun, Y. Liu, S. Li et al., "Novel Compound-Forming Technology Using Bioprinting and Electrospinning for Patterning a 3D Scaffold Construct with Multiscale Channels", *Micromachines*, Vol 7, p.238, 2016.
16. P. Sheshadri, R. A. Shirwaiker, "Characterization of Material- Process- Structure Interactions in the 3D Bioplotting of Polycaprolactone", *3D Printing and Additive Manufacturing*, Vol 2, no.1, 2015.
17. S.J. Lee, M. Nowicki, B. Harris et al., "Fabrication of a Highly Aligned Neural Scaffold via a Table Top Stereolithography 3D Printing and Electrospinning", *Tissue Engineering Part A*, Vol 23, no.11-12, 2017.
18. A. Abdal-hay, F. A. Sheikh, J. K. Lim, "Air jet spinning of hydroxyapatite/poly(lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol 102, pp. 635-643, 2013.
19. M. Feoktistova, P. Geserick, M. Leverkus, "Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Vol 4, 2016.
20. M. Ishiyama, H. Tominaga, M. Shiga, "A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol 19, no.11, 1996.
21. L. Escobar, A. Rivera, F. A. Aristizábal, "Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas", *Revista de la facultad de química farmacéutica*, Vol 17, pp. 67-74, 2010.

22. J. Henkel, M. A. Woodruff, D. R. Epari et al., “Bone regeneration based on tissue engineering conceptions—a 21st century perspective,” *Bone Research*, vol. 1, no. 3, pp. 216–248, 2013.
23. L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta et al., “Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 78, pp. 1246–1262, 2017.
24. N. Reznikov, R. Shahar, S. Weiner, “Three-dimensional structure of human lamellar bone: The presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization”, *Bone*, vol 59, pp.93-104, 2014.
25. B. Wittbrodt and J. M. Pearce, “The effects of PLA color on material properties of 3-D printed components,” *Additive Manufacturing*, vol. 8, pp. 110–116, 2015.
26. R. Revati, M. S. Abdul Majid, M. J. M. Ridzuan et al., “Mechanical, thermal and morphological characterisation of 3D porous *Pennisetum purpureum*/PLA biocomposites scaffold,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 75, pp. 752–759, 2017.
27. A. Gregor, E. Filová, M. Novák et al., “Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer,” *Journal of Biological Engineering*, vol. 11, no. 1, 2017.
28. T. Serra, J. A. Planell, and M. Navarro, “High-resolution PLA based composite scaffolds via 3-D printing technology,” *Acta Biomaterialia*, vol. 9, no. 3, pp. 5521–5530, 2013.
29. R. H. Sanatgar, C. Campagne, and V. Nierstrasz, “Investigation of the adhesion properties of direct 3D printing of polymers and nanocomposites on textiles: effect of FDM printing process parameters,” *Applied Surface Science*, vol. 403, pp. 551–563, 2017.
30. G. Cicala, G. Saccullo, I. Blanco et al., “Polylactide/lignin blends: effects of processing conditions on structure and thermo-mechanical properties,” *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 130, no. 1, pp. 515–524, 2017.
31. Y. Tao, H. Wang, Z. Li, P. Li, and S. Q. Shi, “Development and application of wood flour-filled polylactic acid composite filament for 3d printing,” *Materials*, vol. 10, no. 4, p. 339, 2017.

32. G. Cicala, D. Giordano, C. Tosto, G. Filippone, A. Recca, and I. Blanco, "Polylactide (PLA) filaments a biobased solution for additive manufacturing: correlating rheology and thermomechanical properties with printing quality," *Materials*, vol. 11, no. 7, p. 1191, 2018.
33. A. R. T. Perez, D. A. Roberson, and R. B. Wicker, Fracture Surface Analysis of 3D-Printed Tensile Specimens of Novel ABS-Based Materials, *J. Fail. Anal. Prev.* 14(3) (2014) 343–353.
34. L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta et al., "Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives", *Materials Science and Engineering: C*, vol 78, pp. 1246-1262, 2017.
35. Z. Jahed, H. Shams, M. Mehrbod et al., "Chapter Five - Mechanotransduction Pathways Linking the Extracellular Matrix to the Nucleus", *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol 310, pp. 171-220, 2014.
36. A. Shuaib, D. Motan, P. Bhattacharya, "Heterogeneity in The Mechanical Properties of Integrins Determines Mechanotransduction Dynamics in Bone Osteoblasts", *Scientific Reports*, vol 9, no.1, 2019.
37. J. Babilotte, V. Guduric, D. Le Nihouannen, A. Naveau, J. C. Fricain, and S. Carlos, "3D printed polymer-mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: fabrication and characterization," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 00B, pp. 1–17, 2019.
38. S. Midha, M. Dalela, D. Sybil, P. Patra, and S. Mohanty, "Advances in 3D bioprinting of bone: progress and challenges," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, pp. 1–21, 2019.
39. H.P. Schwarcz, D. Abueidda, I. Jasiuk, "The Ultrastructure of Bone and Its Relevance to Mechanical Properties", *Frontiers in Physics*, vol 5, pp. 39, 2017.
40. J.M. Pastor, T. Jawhari, J.C. Merino, "Caracterización de Materiales Polímeros Mediante la Utilización de la Microespectroscopia Vibracional (Raman, FTIR Y FT-RAMAN)", *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol 4(3), 2003.
41. W. Zhou, R. P. Apkarian, Z. L. Wang et al., "Fundamentals of Scanning Electron Microscopy", *Scanning Microscopy for Nanotechnology*, pp.1-40, 2006.

42. S. Suriñach, B.S. Bordas, n. Clavaguera et al., “La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de Materiales”, BIO.SOC.ESP.CERAM.VIDR., Vol 31, no.1, 1992.
43. E. Rodríguez, E. Villegas, “Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico”, Métodos y Materiales, vol 2, no.1, pp.25-32, 2010.
44. R.E. Ferrel, G.G. Paulson, “Energy Dispersive Analysis of X-Ray Spectra Generate in the Sem”, Materiales Evaluation Laboratory Incorporated, pp.1-49, 1973.
45. F. González, R. Álvarez, M. Vázquez et al., “Análisis de la microrugosidad mediante técnicas portátiles: aplicaciones y casos de estudio en patrimonio”, DIGITAL.CSIC., pp. 198-216, 2013.
46. <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/20837/antecedentes.pdf>
47. K. P. Menard, N, Menard, “Dynamic Mechanical Analysis, A Practical Introduction”, Polymers and Rubbers, pp. 1-205, 2017.