



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO PLA/SBA-15, Y SU EVALUACIÓN SOBRE CULTIVOS 3D EN GOTA COLGANTE PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. OSMAR ALEJANDRO CHANES CUEVAS

TUTOR

Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A DIOS, A MIS PADRES, ALEJANDRO Y ROSALÍA, Y A MI HERMANO YADHIR QUE SIEMPRE ME HAN ACOMPAÑADO.

POR AQUELLOS QUE DEBIDO A LAS CIRCUNSTANCIAS ACTUALES SE ADELANTARON EN EL CAMINO, ESPECIALMENTE PARA:

MI TÍO JESÚS OCIEL BELLO CUEVAS

MI TÍO GILBERTO CUEVAS JIMÉNEZ

MI ABUELITA LUPITA JIMÉNEZ JIMÉNEZ

SU RECUERDO ME MOTIVA A CONTINUAR...

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, A LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA Y AL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

A LA DRA. ELBA ROSA LEYVA HUERTA POR SU CARÍÑO, ORIENTACIÓN, APOYO Y CONFIANZA DURANTE MI FORMACIÓN, NO TENGO FORMA DE AGRADECERLE.

A MI TUTOR, EL DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ POR ABRIRME LAS PUERTAS DEL LABORATORIO, POR SU AMISTAD, ENSEÑANZAS, APOYO Y GUÍA DURANTE MI FORMACIÓN.

A TODOS MIS COMPAÑEROS Y PROFESORES DEL LABORATORIO DE BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS, GRACIAS POR SU AMISTAD, CONVIVENCIA Y CONSEJOS.

AGRADEZCO A MI COMITÉ TUTOR, AL DR. CARLOS ANDRÉS ÁLVAREZ GAYOSSO Y AL DR. AMAURY DE JESÚS POZOS GUILLÉN POR SU TIEMPO, OBSERVACIONES Y APOYO DURANTE LAS EVALUACIONES SEMESTRALES A LO LARGO DEL DOCTORADO.

AL DR. FERNANDO SUASTE OLMOS POR LA ASESORÍA, ASÍ COMO EL EXCELENTE APOYO TÉCNICO QUE ME BRINDO DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

AL PERSONAL ACADÉMICO Y ADMINISTRATIVO QUE FORMA PARTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD POR SU DEDICACIÓN Y ENTREGA.

AGRADEZCO EL APOYO POR PARTE DEL PROGRAMA DGAPA-UNAM: PROYECTO IN213821 QUE HA PERMITIDO LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN.

AGRADEZCO EL APOYO POR PARTE DEL CONACYT A TRAVÉS DEL PROYECTO A1-S-9178 DEL PROGRAMA DEL FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN, QUE HA PERMITIDO LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN.

AL CONACYT POR LA BECA OTORGADA PARA MIS ESTUDIOS DE DOCTORADO (NÚMERO DE APOYO 463760 Y CVU 622709) EN EL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BET: Modelo Brunauer-Emmett-Teller

BSA: Albumina Suero Bovino

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FT-IR: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

g: gramos

GPa: Giga-Pascales

HA: Hidroxiapatita

hFOB: Células Osteoblásticas Humanas Fetales

HPG: Hilado por Propulsión a Gas

kJ: kilo Joule

MEC: Matriz Extracelular

mL: mililitro

mm: milimetro

mM: milimolar

MPa: Mega-Pascales

N: Newton (Unidad de Fuerza)

nm: Nanómetro

PBS: Buffer Fosfato Salino

PCL: Poli(Caprolactona)

PGA: Poli(ácido glicólico)

PLA: Poli(ácido láctico)

PLGA: Poli(ácido láctico-co-glicólico)

SBA-15: Cerámica Mesoporosa Santa Bárbara 15

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

SFB: Suero Fetal Bovino

SFS: Solución Fisiológica Simulada

TGA: Análisis Termogravimétrico

XPS: Espectroscopia de Fotoelectrones de Rayos X

XRD: Difracción de Rayos X

μl: Microlitro

RESUMEN

La capacidad del hueso para auto-regenerarse ha impulsado el estudio y la intriga desde los tiempos de Hipócrates y Galeno. A pesar de esto, las enfermedades congénitas y adquiridas relacionadas con este tejido que incluyen traumatismos, infecciones y/o neoplasias siguen siendo capaces de dejar a los pacientes con defectos óseos más allá de un tamaño crítico que el cuerpo no puede regenerar.

Por ello, en esta tesis doctoral se llevó a cabo la síntesis y caracterización de un andamio composite preparado mediante la técnica de hilado por propulsión de gas (HPG) para desarrollar fibras de poliácido láctico, dopado con cerámicas mesoporosas de SBA-15 a diferentes concentraciones (0.05, 0.1 y 0.15% p/p). La caracterización de las propiedades físicoquímicas de las fibras del PLA, de la cerámica mesoporosa SBA-15 y del composite PLA/SBA-15 se realizó mediante XRD, XPS, SEM, BET, FTIR, TGA, así como los ensayos de pruebas mecánicas. Por otro lado, se evaluó por medio de ensayos de biocompatibilidad, bioactividad y cinéticas de liberación las propiedades biológicas del composite sintetizado de PLA/SBA-15.

Nuestros resultados mostraron que por la técnica de HPG se logra sintetizar un andamio composite con fibras en orientación azarosa que permite mejorar las propiedades físicoquímicas. El diámetro de las fibras de PLA aumenta a medida que se incrementa la concentración de la cerámica mesoporosa de SBA-15, y las propiedades mecánicas dependen de dicha concentración. Asimismo, la caracterización de la cerámica mesoporosa de SBA-15, muestra la estructura

hexagonal característica bien ordenada con un tamaño de poro de 5.8 ± 0.2 nm y una superficie específica con un valor de 1042 ± 89 m²/g.

Los andamios de PLA y PLA/SBA-15 tienen una estabilidad térmica de hasta 300°C y una descomposición térmica en el rango de 316-367°C. Los resultados biológicos *in vitro* mostraron que los andamios de PLA/SBA-15 no son citotóxicos permitiendo una buena adhesión celular y un incremento en la proliferación celular. Sin embargo, el andamio composite que presento una concentración de SBA-15 de 0.05% en peso sobre la matriz de polímero es el que mejor respuesta celular mostro, así como un incremento en la bioactividad debido a que se depositó carbonato de calcio en su fase cristalina de calcita sobre el andamio sumergido a 30 días en SFS y presento mejores cinéticas de liberación.

Los hallazgos de esta tesis doctoral muestran que el andamio composite de PLA/SBA-15 puede ser utilizado como biomaterial y tener futuras aplicaciones biomédicas en las estrategias reconstructivas en la ingeniería de tejido óseo.

ABSTRACT

The ability of bone to self-regenerate has driven study and intrigue since the time of Hippocrates and Galen. Despite this, congenital and acquired pathologies related to this tissue including trauma, infection and/or neoplasia are still capable of leaving patients with bone defects beyond a critical size that the body cannot regenerate.

Therefore, in this doctoral thesis, the synthesis and characterization of a composite scaffold prepared by air jet spinning (AJS) technique was carried out to develop poly lactic acid fibers, doped with mesoporous SBA-15 ceramics at different concentrations (0.05, 0.1 and 0.15% w/w). The characterization of the physicochemical properties of PLA fibers, SBA-15 mesoporous ceramics and PLA/SBA-15 composite was performed by XRD, XPS, SEM, BET, FTIR, TGA, as well as mechanical testing. On the other hand, the biological properties of the PLA/SBA-15 composite were evaluated by biocompatibility, bioactivity and release kinetics tests.

Our results showed that by the AJS technique it is possible to synthesize a composite scaffold with randomly oriented fibers that allows improving the physicochemical properties. The diameter of the PLA fibers increases as the concentration of the mesoporous SBA-15 ceramic increases, and the mechanical properties depend on this concentration. Also, the characterization of the mesoporous SBA-15 ceramic shows the characteristic well-ordered hexagonal

structure with a pore size of 5.8 ± 0.2 nm and a specific surface area with a value of 1042 ± 89 m²/g.

PLA and PLA/SBA-15 scaffolds have thermal stability up to 300°C and thermal decomposition in the range of 316-367°C. On the other hand, in vitro biological results showed that PLA/SBA-15 scaffolds are not cytotoxic allowing good cell adhesion and increased cell proliferation. However, the composite scaffold that presented a SBA-15 concentration of 0.05% by weight on the polymer matrix showed the best cellular response, as well as an increase in bioactivity due to the deposition of calcium carbonate in its calcite crystalline phase on the scaffold submerged for 30 days in SFS and presented better release kinetics.

The findings of this doctoral thesis show that the PLA/SBA-15 composite scaffold can be used as a biomaterial and have future biomedical applications in reconstructive strategies in bone tissue engineering.

ÍNDICE

	PÁGINA
1.- ANTECEDENTES	
1.1 TEJIDO ÓSEO	12
1.1.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA	12
1.1.2 PROPIEDADES MECÁNICAS	14
1.1.3 DEMANDA CLÍNICA Y ESTRATEGIAS DE REGENERACIÓN ÓSEA	16
1.2 ANDAMIOS EN EL CAMPO DE INGENIERÍA DE TEJIDOS	18
1.2.1 GENERALIDADES	18
1.2.2 ANDAMIO COMPOSITE	20
1.2.3 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE ANDAMIOS	22
1.2.3.1 TÉCNICA DE HILADO POR PROPULSIÓN DE GAS	24
1.3 CULTIVO CELULAR 3D	26
1.3.1 CULTIVO CELULAR EN ESFEROIDE	27
2.- DISEÑO EXPERIMENTAL	
2.1 JUSTIFICACIÓN	32
2.2 HIPÓTESIS	32
2.3 OBJETIVO GENERAL	32
2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3.-METODOLOGÍA	34
4.- RESULTADOS	
4.1 ANDAMIOS FIBRILARES DE PLA Y PLA/SBA-15	45

4.1.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	46
4.1.2 DIÁMETRO DE FIBRA DE LOS ANDAMIOS	47
4.1.3 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO	48
4.1.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER	49
4.1.5 PROPIEDADES MECÁNICAS	51
4.1.6 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MTT	54
4.2 EVALUACIÓN DE BIOACTIVIDAD DE LOS ANDAMIOS PLA/SBA-15	55
4.2.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	55
4.2.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER	56
4.2.3 ESPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONES DE RAYOS X	57
4.2.4 DIFRACCIÓN DE RAYOS X	58
4.3 CINÉTICA DE CARGA Y LIBERACIÓN DE ALBUMINA EN EL ANDAMIO FIBRILAR PLA/SBA-15	59
4.4 ANÁLISIS DE RESPUESTA DE CULTIVOS CELULARES 3D	60
5.- DISCUSIÓN	62
6.- CONCLUSIONES	70
7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8.- PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	80

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.- ANTECEDENTES

1.1 Tejido Óseo

El tejido óseo es un tejido conjuntivo estructural y de soporte del cuerpo; considerado como un material compuesto complejo con al menos cinco niveles jerárquicos diferentes, es decir, nivel macroscópico, nivel arquitectónico, nivel tisular, nivel lamelar y nivel de ultra-estructural. A nivel microscópico estructural, el hueso se puede dividir en dos tipos: hueso esponjoso y hueso cortical. El hueso esponjoso (parte interna del hueso) tiene una estructura con porosidades variables entre el 50%-90% y consiste en un gran número de trabéculas. La trabécula crece naturalmente a lo largo de la dirección de la tensión, lo que permite que el hueso resista la carga máxima con una masa ósea mínima. El hueso cortical (capa densa externa del hueso) posee una porosidad inferior al 10%, sin embargo, es altamente compacto y ortotrópico debido a la naturaleza circular de los osteonas que forman su estructura [1].

1.1.1 Composición y Estructura

Los huesos son auténticas matrices de nano-compuestos, principalmente nanocristales de hidroxiapatita en una matriz rica de colágena, muy complejos y con formas altamente especializadas para dar soporte mecánico y también sirven de reserva de minerales, en particular de calcio y fosforo [2].

La matriz del hueso está compuesta por dos fases principales a escala nanométrica: orgánica (proteínas) e inorgánica (minerales), El mineral óseo está compuesto principalmente por hidroxiapatita y la parte proteínica de colágena.

La colágena actúa como base en la cual diminutos cristales planos de hidroxiapatita se unen para formar el hueso. La colágena del hueso tiene una estructura fibrosa típica, cuyo diámetro varía entre 50 y 500 nm. De manera similar, la hidroxiapatita en el mineral del hueso está en forma de nanocristales de dimensiones entre 4 x 50 x 50 nm [3]. Los minerales del hueso están también enriquecidos con algunos elementos sueltos para varias funciones metabólicas entre los que están los carbonatos, citratos, sodio, magnesio, fluoruros, cloruros y potasio. El principal papel de los minerales es dotar de dureza y rigidez al hueso, mientras que la colágena la dota de resistencia a la tracción y flexibilidad. Se piensa que la clave para la resistencia de los huesos es la compleja estructura jerárquica en la cual se organizan con un auto-ensamblado. Es importante puntualizar que los minerales no están directamente ligados a la colágena, sino ligados a través de las proteínas no colágenas. Las proteínas no colágenas suponen entre el 3-5 % de la composición del hueso, y proveen emplazamientos activos para la biomineralización y unión celular [4].

La cantidad de agua presente en los huesos es un factor importante para determinar su comportamiento mecánico. Los lípidos también son necesarios para las funciones celulares y suponen un 2 % del hueso, además juegan un papel importante en la biomineralización. El grado de biomineralización es el factor más importante para determinar las capacidades mecánicas del hueso. El hueso puede

ser considerado como la unión de varios niveles de unidades estructurales jerárquicas, diseñadas elegantemente en varias escalas, de macro a nano, para cumplir múltiples funciones [5]. Cuando el hueso se deposita inicialmente es estructuralmente débil y desorganizado. Pero al cabo de pocos días el hueso inmaduro se convierte en hueso laminar. A nivel macro-estructural el hueso laminar maduro se divide en compacto y esponjoso. Como indican sus nombres se diferencian por su densidad y se organizan con poros a múltiples niveles, de macro a nano, para el establecimiento de sus múltiples funciones, incluido el transporte de nutrientes, oxígeno y fluidos corporales. El hueso esponjoso o trabecular ocupa cerca del 20% del hueso total; es más ligero, tiene mayor porosidad y cantidad de vasos sanguíneos que el hueso compacto. El diámetro de los poros puede ser de micrómetros a milímetros; En cambio el hueso compacto es mucho más denso y ocupa el 80% del hueso total [6].

1.1.2 Propiedades Mecánicas del Hueso

El sistema esquelético tiene como función conferir al cuerpo humano una estructura que por un lado sea rígida, lo que le permite mantener la forma, y por otro esté articulada, facilitándole los movimientos. Así mismo sirve de punto de anclaje al sistema muscular permitiendo que éste realice su función. Está sometido a las fuerzas estáticas del peso del cuerpo y a las dinámicas de la acción muscular y los ligamentos. Compuesto por un elemento fuerte y variado

(hidroxiapatita) incrustado en uno débil y flexible (colágena). El sistema esquelético soporta cargas de diferentes tipos tanto compresivas como de tracción ó de cizalladura. Las propiedades mecánicas difieren en los dos tipos de hueso. El hueso cortical es más rígido que el hueso esponjoso, soportando mayor tensión pero menos deformación antes del colapso.

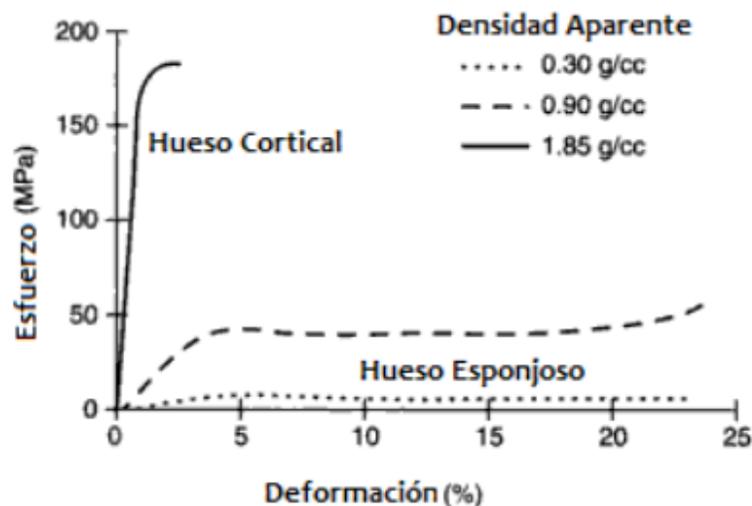


Figura 1.- Curva tensión-deformación del hueso cortical y esponjoso

El hueso esponjoso *in vitro* puede soportar hasta un 50% de deformación antes de empezar a tensionarse, mientras que el hueso cortical cede y se fractura cuando la deformación excede de 1.5 a 2.0 %. Debido a su estructura porosa, el hueso esponjoso tiene una gran capacidad para el almacenamiento de energía [7]. La diferencia física entre los dos tipos de tejidos óseos se cuantifica en términos de la densidad aparente del hueso, que se define como la masa de tejido óseo presente en una de volumen de hueso (gramos por centímetro cúbico [g/cm³]).

En la Figura 1 se detallan las cualidades típicas de tensión-deformación del hueso cortical y esponjoso con diferentes densidades óseas medidas bajo condiciones similares [5].

El hueso cortical humano es considerado como un material ortotrópico, la resistencia mecánica del hueso, depende de la dirección en la cual es cargado el hueso (flexión, compresión o tracción). La tabla-1 detalla un resumen de las propiedades mecánicas del hueso cortical y hueso esponjoso[8].

Tabla-1.- Propiedades mecánicas del hueso esponjoso y cortical.

	Tensión (MPa)	Flexión (MPa)	Compresión (MPa)	Porosidad (%)	Módulo elástico (GPa)
<i>Hueso esponjoso</i>	1-5	10-20	2-12	50-90	0.1-5
<i>Hueso Cortical</i>	100-150	135-193	100-150	5-10	10-20

1.1.3 Demanda clínica y estrategias de regeneración ósea

Cada año, millones de personas sufren de defectos óseos derivados de fracturas, osteoporosis, cáncer, periodontitis, y enfermedades infecciosas [9]. A nivel mundial, el tejido óseo es el segundo tejido más trasplantado, se calcula que anualmente se realizan entre dos y cuatro millones de procedimientos de reemplazo óseo [10]. Los tratamientos convencionales para los defectos óseos se realizan a través de autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos [1], sin embargo, las

desventajas de este tipo de tratamiento incluyen: la morbilidad del sitio donante así como la posibilidad de infecciones post-quirúrgicas; además, se ha reportado que la tasa de fracaso varía entre el 16 y 50% [9, 10].

Ante esta problemática ha cobrado interés dentro del campo de ingeniería de tejidos el desarrollo de biomateriales como los andamios composite (polímero/cerámica) a fin de combinar sus propiedades e imitar la MEC ósea proporcionando un soporte estructural para las células y regulando la proliferación, diferenciación y migración celular, permitiendo así la nueva formación de tejido mineral [11].

El poli (ácido láctico) (PLA) es un polímero ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas, aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) para aplicaciones en dispositivos ortopédicos [12], actualmente se ha utilizado como andamio para la regeneración del tejido óseo [13]. No obstante, su lenta cristalización, lenta degradación, baja estabilidad durante la degradación, y sus propiedades mecánicas relativamente bajas han limitado las aplicaciones de este polímero, en particular como material de soporte [14]. Una alternativa a estas limitaciones del PLA, es agregar una cerámica como SBA-15 que le permita funcionar como refuerzo inorgánico y mejorar las propiedades físico-mecánicas, así como obtener una mejor tasa de biodegradación [15]. Además se ha demostrado el comportamiento bioactivo del SBA-15 debido a la formación de capas de hidroxiapatita adjudicadas a la presencia de los grupos silanoles que originan sitios de nucleación en la superficie del SBA-15 favoreciendo así la unión e integración al tejido óseo [16].

1.2 Andamios en el campo de ingeniería de tejidos

1.2.1 Generalidades

En términos generales el diseño de andamios capaces de guiar el proceso de regeneración tisular representa uno de los objetivos más desafiantes. El andamio debe poseer un conjunto de señales químicas, bioquímicas y biofísicas capaces de controlar y promover eventos específicos a nivel celular y tisular. Claramente, un andamio debe satisfacer una serie de requisitos diferentes (Tabla-2). Debe fabricarse con materiales biodegradables o bioabsorbibles, e igualmente la arquitectura de un andamio debe ser porosa con una estructura interconectada para que pueda promover la integración y vascularización de los tejidos [17, 18]

Otro aspecto importante es que, debe tener propiedades mecánicas similares al tejido en el que se va a implantar, así como una química de superficie adecuada para promover la unión, diferenciación y proliferación celular. Además, el andamio no debe inducir reacciones adversas y, finalmente, debe poder fabricarse de manera sencilla en una variedad de formas y tamaños [19].

Tabla-2.- Resumen de las propiedades deseables del andamio

Característica del andamio	Características deseables
Biocompatibilidad	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Componentes del andamio no inflamatorios ▶ Productos de degradación no tóxicos
Biodegradabilidad	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Degradable por procesos enzimáticos o biológicos del huésped ▶ Permite que las células huésped invasoras produzcan su propia matriz extracelular
Bioactividad	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Materiales de andamio que pueden interactuar y unirse al tejido huésped ▶ Propiedades osteoconductoras y osteoinductoras
Arquitectura de andamios	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Poros interconectados que permiten la difusión y la migración celular. ▶ Microporosidad para presentar una gran área de superficie para interacciones célula-andamio ▶ Macroporosidad para permitir la migración celular y la invasión de la vasculatura
Propiedades mecánicas	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Resistencia a la compresión, elástica y a la fatiga comparable al tejido del huésped, lo que permite que ocurra la mecanorregulación celular y que la integridad estructural permanezca in vivo ▶ Material de andamio que se puede manipular fácilmente en el entorno clínico

1.2.2 Andamio Composite

El término "composite" se refiere generalmente a la combinación (a escala macroscópica) de dos o más materiales, que difieren en composición o morfología, con el fin de obtener propiedades químicas, físicas y mecánicas específicas [20]. La ventaja es que el material composite resultante puede poseer una combinación de las mejores propiedades de sus componentes y, a menudo, otras propiedades interesantes que no se ven reflejadas por el material de manera individual. Los materiales naturales, sintéticos e híbridos han sido ampliamente propuestos y probados como andamios para la regeneración de tejidos [21, 22]. Dentro de los materiales cerámicos inorgánicos naturales y sintéticos, la hidroxiapatita (HA) y el fosfato tricálcico se han considerado como los andamios candidatos para la ingeniería de tejidos óseos [23]; aunque estos materiales cerámicos se asemejan al componente inorgánico natural del hueso y poseen propiedades osteoconductoras [23, 24], presentan fragilidad y no pueden igualar adecuadamente las propiedades mecánicas del hueso. En consecuencia, los polímeros sintéticos y/o naturales pueden considerarse una alternativa atractiva para el crecimiento de la mayoría de los tejidos [23, 25, 26]. Los polímeros naturales principalmente utilizados en la ingeniería de tejidos incluyen: colágena, alginato, agarosa, quitosano, fibrina y ácido hialurónico; sin embargo, los polímeros sintéticos presentan varias ventajas sobre los polímeros naturales entre las cuales están: mejor flexibilidad y procesabilidad (diferentes tamaños y formas) [24]. Además, las propiedades físico-químicas de los polímeros sintéticos pueden modificarse fácilmente, y el comportamiento mecánico y la degradación pueden

modularse adecuadamente variando la composición química de la macromolécula. Con respecto a los polímeros sintéticos, los poliésteres alifáticos como el poli ácido láctico (PLA), poli ácido glicólico (PGA), sus copolímeros como el poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y policaprolactona (PCL) son los polímeros más utilizados para la fabricación de andamios en el campo de ingeniería de tejidos [20, 26, 27]. Cabe Señalar que, una de las principales ventajas de estos polímeros sintéticos es que los subproductos obtenidos de la degradación de éstos pueden eliminarse por vías metabólicas naturales. En un principio los andamios fueron fabricados inicialmente sólo con polímeros o sólo con cerámicas, sin embargo, los andamios poliméricos resultaron ser demasiado flexibles, mientras que los cerámicos tendieron a ser demasiado frágiles [24, 28]; en consecuencia, en los últimos años, los materiales composites que consisten en polímeros reforzados con rellenos cerámicos inorgánicos han atraído el interés de la investigación en el campo de la ingeniería de tejidos. En comparación con los polímeros puros, los materiales composites deben presentar propiedades mecánicas mejoradas y mejor flexibilidad e integridad estructural que los materiales cerámicos frágiles. Esto significa que se pueden obtener andamios porosos reforzados con bioactividad mejorada y tasas de reabsorción controladas combinando adecuadamente polímeros y cerámicas [11, 28]. Por lo tanto, los materiales composites han surgido como candidatos adecuados para aplicaciones de soporte de carga en varios campos. La matriz polimérica y su interacción con una fase de refuerzo representan uno de los principales factores de control en sus propiedades y se ha extendido rápidamente al diseño de andamios para la ingeniería de tejidos, con el objetivo de mejorar su funcionalidad.

1.2.3 Métodos de fabricación de andamios

Los andamios pueden fabricarse mediante numerosas técnicas que ofrecen adaptabilidad según la aplicación final es decir, si está enfocada para tejidos blandos o duros, o dependiendo de su ubicación (carga o no). Idealmente, el andamio debe proporcionar un entorno equilibrado entre propiedades mecánicas, alta área de superficie específica, buena difusión así como una interconectividad para soportar y mantener las funciones celulares.

En la tabla-3 se muestra una descripción general de los métodos de preparación de andamios utilizados con más frecuencia, junto con sus ventajas y limitaciones para las aplicaciones de ingeniería de tejidos [29].

Tabla-3.- Comparación de métodos de fabricación de andamios

Método	Ventajas	Limitaciones
Fundición de disolventes	Técnica sencilla que permite la creación de andamios con porosidad regular, composición controlada y tamaño de poro.	El uso de disolventes orgánicos impide que las células y biomoléculas se incorporen directamente en los andamios. Puede resultar difícil controlar la forma de los poros e interconectividad.
Espuma de gas	Elimina el uso de solventes químicos	Las altas presiones impiden la inclusión de células y moléculas bioactivas directamente en los andamios. Es difícil controlar el tamaño de los poros y garantizar la interconectividad.
Liofilización por emulsificación	No requiere el uso de porógenos sólidos	Tamaño de poro pequeño La porosidad suele ser irregular Largo tiempo de procesamiento
Separación de fases	Se puede combinar con otras técnicas fácilmente	Los tamaños de poro pequeños limitan el uso
Impresión 3D	Permite fabricar formas 3D complejas con alta resolución, tamaño y morfología de poros controlados y estructuras internas controladas.	Puede estar limitada por materiales imprimibles.
Electrospinning	Se obtiene un andamio con una gran superficie.	Propiedades mecánicas limitadas. La velocidad de obtención del andamio es lenta.
Hilado por propulsión de gas	Permite obtención de andamios de manera rápida y de un solo paso.	El diámetro de fibra es mayor a 100 nm. La orientación de fibra es limitada.

1.2.3.1 Técnica de hilado por propulsión de gas

La técnica de hilado por propulsión de gas (HPG) es un método sencillo y versátil que permite la producción de nano y micro-fibras. Si bien, el electrohilado es considerado un método estándar para la producción de fibras a nivel micro y nano-escala [30] con una alta área específica, además de permitir la incorporación de componentes inorgánicos a nano-escala; éste método se encuentra limitado, debido a que la tasa de producción de fibras es muy lenta, asimismo requiere una adecuada conductividad para poder formar el hilado del polímero.

La necesidad de tener una fuente de alto voltaje aumenta el costo y complejidad de la técnica. Existen pocas estrategias para ampliar la versatilidad del electrohilado; no obstante, la necesidad de métodos fiables para la fabricación de materiales híbridos (ej. polímero-cerámica) a nivel de micro- y nano- escala persiste. Es por ello que la técnica de HPG surge como una nueva estrategia en los últimos años para superar las limitaciones del electrohilado [31].

La técnica HPG es una técnica alternativa que permite revestir grandes áreas de manera rápida y también sobre una gran variedad de sustratos; a diferencia del electrohilado, el HPG no requiere un equipo sofisticado y tiene un bajo costo de funcionamiento [32]. Se basa totalmente en el uso de gas a presión dispensado a una velocidad extrema con el fin de estirar la solución de polímero en fibras finas por la salida de la boquilla de un aerógrafo (Figura 2); al mismo tiempo que está

siendo eyectada, el disolvente comienza a evaporarse y continúa haciéndolo después de que las fibras se depositan sobre un colector [31, 33].

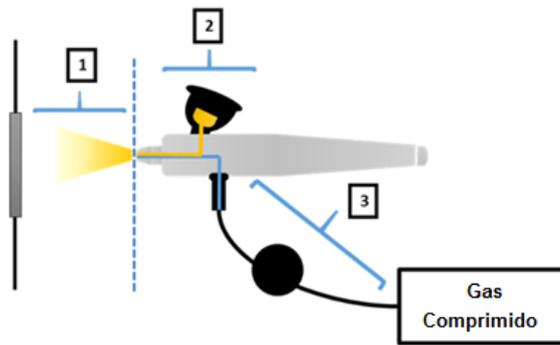


Figura 2.- Diagrama esquemático de la técnica de HPG. 1) Distancia de trabajo entre colector y boquilla, 2) Solución polimérica y 3) Regulación de presión de gas.

1.3 Cultivos celulares 3D

El cultivo celular en 3D ha estado emergiendo en los últimos años, convirtiéndose en una técnica esencial en múltiples áreas de la biología celular. Estos tipos de cultivo constituyen un paso imprescindible en campos como la ingeniería tisular y medicina regenerativa [34]. Si bien los cultivos celulares de monocapa tradicionales o bidimensionales (2D) que se mantienen en condiciones estáticas han proporcionado grandes avances en la comprensión de los procesos reguladores fisiológicos de las células [35], este tipo de cultivos en monocapa a menudo no reflejan la morfología y funcionalidad de sus fenotipos tridimensionales nativos [36, 37].

Estas limitantes han llevado al desarrollo de modelos de cultivo celular en 3D que permitan reproducir mejor la complejidad intrínseca de la señalización célula-célula así como la plasticidad en composición y estructura de la matriz extracelular (MEC). Se ha demostrado que los cultivos 3D favorecen el mantenimiento de fenotipos específicos de tejido con una citoarquitectura similar al tejido nativo. Son muchas las ventajas que aportan los cultivos en 3D, sin embargo también presentan desventajas, una de ellas es que no tienen tendencia a proliferar, y normalmente mantienen su diferenciación e interacción intercelular; otra limitante importante para el cultivo a largo plazo en tres dimensiones es la baja difusión de oxígeno y nutrientes el cual puede resultar en la formación de un núcleo central de células muertas. [38]

Las células cultivadas en 3D se comportan de manera similar a como lo hacen en sus organismos de origen. La calidad y cantidad de información obtenida es mayor en los ensayos de cultivo celular en 3D, debido a la gran similitud de la interacción celular con la arquitectura del tejido nativo. Las células cultivadas en ambientes 3D muestran diferencias, en comparación con las células cultivadas en ambientes 2D, en su metabolismo, diferenciación, expresión de genes y proteínas, proliferación, viabilidad y respuesta a diferentes estímulos.

La importancia del cultivo 3D reside en que las células se encuentran en un sistema que mantiene la integridad de un órgano, de forma que las interacciones célula-célula están garantizadas [39].

1.3.1 Cultivo celular en esferoides

Los orígenes de los esferoides como método de estudio 3D se remontan a los trabajos sobre morfogénesis realizados hacia los años cuarenta y siguientes por investigadores tales como Holtfreter (1944) o Moscona (1952, 1961), que utilizaron reagregados esferoidales de células, o por Sutherland y colaboradores (1971, 1988) que utilizaron esferoides multicelulares de células tumorales en sus estudios sobre la respuesta de estas células a agentes terapéuticos [40].

Actualmente los esferoides son un modelo de cultivo 3D que aprovecha la tendencia natural a agregarse que se observa en muchos tipos celulares, para crear masas multicelulares de forma esferoidal.

Este modelo puede ser utilizado en diferentes tipos de investigación biomédica, debido a que permite formar esferoides con cualquier tipo de célula [41]. Este tipo de cultivos constituyen un importante sistema de modelo de tejido 3D y se utilizan como modelos de órganos simples en la investigación básica. Actualmente, dos factores principales limitan escalar su aplicación a multitejidos más complejos: primero, la falta de perfusión adecuada que permita el suministro continuo de nutrientes para mantener a los esferoides sin pérdida funcional y en segundo lugar, los métodos convencionales de análisis, que actualmente están utilizados para cultivos 2D, deben modificarse o desarrollarse nuevos métodos con respecto a los nuevos formatos de tejidos en 3D y las nuevas configuraciones de cultivo relacionadas [42].

Un método sencillo para generar esferoides consiste en crear gotas de una suspensión celular (“método de la gota colgante”) sobre la cara inferior de una superficie de vidrio o plástico (placa de Petri) o utilizando placas de 96 pocillos de fondo horadado (Figura 3).

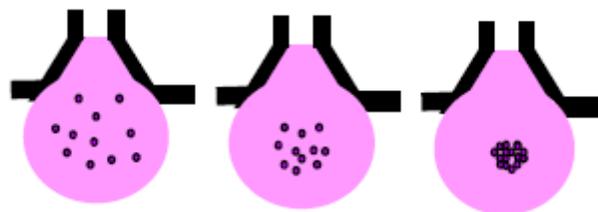


Figura 3.- Diagrama esquemático de la formación de esferoide por gota colgante.

En cada gota creada, las células se desplazan hacia el fondo de la misma, donde forman un agregado, que da origen finalmente una masa de forma esferoidal o esferoide [41].

Otro método simple para crear esferoides, en el estudio de tumores, consiste en sembrar un número definido de células tumorales en suspensión (1000-20000 células) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo o cónico, en medio de crecimiento estándar, y centrifugar durante 10 minutos a 1000 g.

El uso de esferoides, como modelo de cultivo 3D, ofrece importantes ventajas:

- 1) Las células del esferoide no se encuentran adheridas a un soporte, sino que forman un agregado celular de forma esferoidal en el interior de un líquido pipeteable durante todo el tiempo que dura el cultivo.
- 2) Las células del esferoide no requieren un andamiaje externo o interno para agregarse.
- 3) Las células del esferoide se pueden unir unas a otras, mimetizando un ambiente fisiológico similar al del tejido de procedencia.
- 4) Las células del esferoide pueden originar su propia matriz extracelular.
- 5) Las células del esferoide ven preservado su fenotipo celular específico característico de un tejido diferenciado [41].

Atendiendo al número de tipos celulares presentes en el esferoide, se pueden crear esferoides en forma de cultivo simple (esferoide monocelular) o como co-cultivos (esferoide multicelular). Cuando los esferoides se cultivan en placas de

Petri o biorreactores convencionales, la difusión restringida de nutrientes y oxígeno en los esferoides da como resultado un centro hipóxico y/o necrótico en construcciones mayores de 1 mm de tamaño lo que limita la funcionalidad y propiedades de las construcciones [43], por ello no es factible producir esferoides de más de 500-600 micrómetros de diámetro [40].

CAPÍTULO 2

DISEÑO

EXPERIMENTAL

2 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1 JUSTIFICACIÓN

Actualmente la reparación de defectos óseos en el campo de la ortopedia continúa siendo un desafío dado que las terapias convencionales con autoinjertos y aloinjertos presentan limitaciones. Los tratamientos alternativos como la administración local de inductores de crecimiento óseo han tenido poco éxito debido a la falta de un vehículo que les permita liberarlos de manera lenta y constante. El diseño de un andamio que mimetice la estructura del tejido óseo y permita una liberación controlada de inductores de crecimiento óseo puede ser la clave para la reparación de defectos óseos; Sin embargo las evaluaciones en cultivos celulares que por lo general se realizan en dos dimensiones (2D) o monocapas presentan limitantes. Por ello un nuevo enfoque en la ingeniería de tejidos es tratar de recrear microambientes que permitan un crecimiento tridimensional (3D) tratando de simular el microambiente del tejido nativo.

2.2 HIPÓTESIS

El andamio PLA/SBA-15 presenta una adecuada inducción de bioactividad así como buenas propiedades texturales lo que proporciona condiciones para implementar el cultivo 3D de gota colgante.

2.3 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar un andamio PLA/SBA-15 y evaluar su aplicación en un ambiente de cultivo celular 3D en gota colgante.

2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar el andamio PLA/SBA-15 con la técnica de hilado por propulsión de gas.
- Caracterizar el andamio PLA/SBA-15 mediante SEM, BET, XPS, FTIR, Pruebas Mecánicas, cinética de liberación y ensayos de viabilidad celular.
- Determinar la bioactividad del andamio PLA/SBA-15 para evaluar su efecto osteoinductor u osteoconductor.
- Implementar y Caracterizar los cultivos 3D de gota colgante sobre el andamio PLA/SBA-15.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.- METODOLOGÍA

3.1 Síntesis de los andamios fibrilares de PLA/SBA 15

3.1.1 Preparación de las soluciones PLA y PLA/SBA-15

La solución polimérica del poli ácido láctico (PLA) se preparó al 10% (p/v), mezclando 10 g de PLA en una solución 3:1 de cloroformo-acetona, bajo agitación magnética durante 12 h. Para los andamios PLA/SBA-15 se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito anteriormente; agregando la cerámica SBA-15 a diferentes concentraciones (0.05%, 0.1% y 0.15% p/p) al momento de disolver el PLA.

3.1.2 Obtención de andamios fibrilares PLA/SBA-15 mediante la técnica de hilado por propulsión de gas (HPG).

Para fabricar los andamios de tamaño nano-fibrilar, se utilizó un aerógrafo comercial (ADIR®, modelo 684, diámetro de boquilla de 0,3 mm) conectado a un tanque de Argón presurizado. La solución del PLA/SBA-15 0.05% (p/p) fue colocada dentro del depósito del aerógrafo y eyectada a una presión de 30 lb/in² (PSI), a una distancia constante de 11 cm entre la boquilla y el colector, el tiempo de depósito fue de 15 minutos a temperatura de 25°C y 30% de humedad para todos los experimentos. Posterior al depósito, las muestras se colocaron en una unidad de conservación hermética evitando el contacto directo con la luz de sol. Para los andamios PLA/SBA-15 (0.1% y 0.15% p/p) se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito.

3.2 Caracterización físico-química de los andamios de PLA/SBA-15

3.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Un microscopio electrónico de barrido marca JOEL JSM 7600F fue utilizado para obtener las micrografías SEM y poder observar la morfología de los andamios PLA y PLA/SBA-15. Los voltajes de operación fueron de 5, 10 y 20 kV; con distancias de trabajo de 5.7, 7.8 y 8.1 mm, utilizando electrones secundarios y retro-dispersados; las muestras fueron preparadas previo a su observación con un recubrimiento de película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma para favorecer la conductividad.

3.2.2 Diámetro de Fibra de los andamios

Las micrografías de SEM fueron utilizadas para medir el diámetro de las fibras de PLA y PLA/SBA-15, por medio del Software *Image J* se eligieron 100 fibras de forma aleatoria para obtener el diámetro promedio de fibras de los andamios.

3.2.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) de las muestras se realizó en un equipo Perkin Elmer Diamond entre 40° y 600°C con un flujo constante de 20 mL/min de nitrógeno y una rampa de calentamiento de 10°C/min. Para este ensayo se utilizó crisol de α -alúmina como referencia.

3.2.4 Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

Un espectrómetro Perkin Elmer Gladi ATR™ fue utilizado para realizar la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), las muestras fueron analizadas en el infrarrojo medio (400-4000 cm⁻¹) con 32 barridos mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR).

3.2.5 Propiedades Mecánicas

Se realizaron pruebas de tracción uni-axiales en la máquina de ensayo universal INSTRON modelo 5567 en condiciones ambientales (20°C y 50% rh). Los andamios PLA y PLA/SBA-15 fueron cortados en forma de “hueso” de acuerdo a la norma ASTM D1708-10 2011 con una sección estrecha de 5 mm. Se utilizó una velocidad de ensayo fija en 1 mm/min. Doce especímenes por grupo de cada composición fueron probados usando una celda de carga de 5000 N. La separación inicial de agarre fue medida para cada muestra (Lo). Se calculó la deformación de cedencia, esfuerzo de cedencia, deformación a la fractura, esfuerzo, módulo elástico, resiliencia, deformación última, esfuerzo último y tenacidad.

3.3 Caracterización biológica de los andamios fibrilares PLA, PLA/SBA-15

3.3.1 Ensayo de Viabilidad Celular (MTT)

Para realizar el ensayo se utilizaron células osteoblásticas humanas fetales (hFOB 1.19 ATCC® CRL-11372); inicialmente en una caja de 48 pozos se sembraron sobre los andamios PLA y PLA/SBA-15 (0.05, 0.10 y 0.15%) 3×10^3 células por pozo junto con 200 mL de medio de cultivo (DMEM), el cual fue suplementado previamente con 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador bajo una atmósfera con 5% CO₂. El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día. Se utilizó el reactivo MTT (5 mg/mL) y la medición de absorbancia fue realizada a 1, 3, 5 y 7 días en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

3.4 Evaluación de la bioactividad de los andamios PLA/SBA-15

Los andamios PLA y PLA/SBA-15 fueron sumergidos en una solución fisiológica simulada (SFS), con una concentración iónica milimolar (mM) similar al plasma sanguíneo humano [44] (Na⁺ : 142.0, K⁺ : 5.0, Ca²⁺ : 2.5 Mg²⁺ : 1.5 Cl⁻ : 147.8 HCO⁻³ : 4.2 HPO⁴⁻²⁻ : 1.0 SO⁴⁻²⁻ : 0.5) a pH 7.4, temperatura ambiente,

y a diferentes tiempos (10, 14, 21 y 30 días), posteriormente fueron caracterizados con SEM, FT-IR XPS y XRD.

3.4.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Un microscopio electrónico de barrido marca JOEL JSM 7600F fue utilizado para obtener las micrografías SEM y poder observar los depósitos formados sobre los andamios PLA y PLA/SBA-15. Las muestras fueron preparadas previamente a su observación con un recubrimiento de película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma para favorecer la conductividad.

3.4.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Un espectrómetro Perkin Elmer Gladi ATR™ fue utilizado para realizar la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), las muestras fueron analizadas en el infrarrojo medio ($400-4000\text{ cm}^{-1}$) con 32 barridos mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR).

3.4.3 Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS)

La espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) se realizó usando un espectrómetro Shimadza-Kratos Axis Ultra DLD para examinar la composición química de la superficie de los andamios PLA, PLA/SBA-15. Los espectros se analizaron usando rayos X Al K α monocromatizados ($h\nu = 1486,6\text{ eV}$) operando a

10 kV y 15 mA (150 W). Luego, la energía de unión obtenida sobre las muestras se comparó con la de C1s a 284,5 eV. Antes de la prueba XPS, las muestras fueron limpiadas con gas Argón. Durante el análisis, se utilizó un modo de lente híbrido (electrostático y magnético) con un área de análisis de 300 μm \times 700 μm .

3.4.4 Difracción de Rayos X (XRD)

Las muestras fueron analizadas por XRD con el fin de determinar si se había formado algún tipo de cristal sobre los andamios, las muestras fueron colocadas en un portamuestra y analizadas en un difractómetro de Rayos X Philips X'Pert con geometría Bragg-Brentano, operando la radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$).

3.5 Cinética de carga y liberación de albumina en el andamio fibrilar PLA/SBA-15

Se evaluó la capacidad de carga y liberación de albúmina (BSA) en los andamios PLA/SBA-15. La carga de BSA se realizó mediante el método de inmersión simple; se disolvieron 1000 mg de BSA en una solución buffer (pH 6.6), el andamio PLA/SBA-15 de forma circular con un área de 50 mm^2 fue sumergido en la solución por 48 horas bajo agitación magnética a temperatura ambiente, posterior al tiempo de carga las muestras fueron lavadas con agua des-ionizada y secadas. La medición de la liberación de BSA se realizó mediante el método de Bradford, el cual consiste en una unión no covalente del colorante azul de coomassie a la proteína de BSA. La cuantificación se hace midiendo la absorbancia en un

espectrofotómetro, a 595 nm, y graficando la absorbancia vs la concentración de proteínas, obteniendo una curva de calibración estándar de la proteína.

3.6 Cultivos Tridimensionales (3D) en gota colgante

3.6.1 Cultivo celular en monocapa

Se sembraron y expandieron células osteoblásticas humanas fetales (hFOB) en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/mL), estreptomina (100 µg/mL) y fungisona (0.3 µg/mL). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora bajo las condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

3.6.2 Cultivo Celular de Esferoides (3D)

Del cultivo de monocapa celular, se realizó el conteo celular de 5×10^3 células de hFOB en un volumen de 40 µL que se sembraron por pozo en un plato de 3D Perfecta Biomatrix, y se mantuvo 24 horas en cultivo para la formación del esferoide; se adicionaron 10 µL de medio fresco cada 2 días para evitar que la gota colgante se secará.

3.7 Análisis de la respuesta de cultivos celulares 3D

3.7.1 Interacción esferoide-material

Los esferoides obtenidos mediante la técnica de gota colgante descrita en el punto 3.6.2 fueron sembrados sobre los andamios hilados de PLA/SBA-15 al 0.05%. La interacción esferoide celular-material se examinó utilizando microscopía óptica (AMSCOPE) y SEM (JOEL JSM 7600F) después de 24 h de haber sembrado los esferoides sobre el andamio PLA/SBA-15. Para el análisis SEM, al final del tiempo de cultivo en incubación, los andamios se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con formaldehído al 4% durante 1 h y luego se deshidrataron con una serie graduada de etanol (25-100%) y se secaron al aire. Finalmente se recubrieron las muestras con película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma para favorecer la conductividad.

3.7.2 Ensayo de fluorescencia (CellTracker™)

El ensayo de microscopía por fluorescencia se realizó mediante el kit CellTracker™; antes de sembrar sobre los andamios fibrilares, el cultivo celular de hFOB fueron incubadas con CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) en un medio libre de rojo fenol a 37°C por 30 minutos, a continuación el cultivo celular fue lavado con PBS e incubado por una hora con medio completo. Posteriormente las células hFOB fueron tripsinizados, y

se contó hasta la concentración celular deseada (5×10^3 células/mL), Finalmente fueron sembradas con el método de gota colgante para obtener los esferoides y posteriormente sembrarlos sobre los andamios PLA/SBA-15.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1 Andamios fibrilares de PLA y PLA/SBA-15

El andamio fibrilar en forma de membrana es observado en la figura 4. Se puede apreciar el colector de aluminio utilizado para recibir la eyección hilada del polímero por la técnica hilado por propulsión de gas, la cual permite sintetizar capa por capa los andamios (*bottom up*).



Figura 4.- Imagen macroscópica de los andamios fibrilares PLA y PLA/SBA-15 obtenida por HPG.

4.1.1 Microscopia electrónica barrido (SEM)

Las micrografías por SEM de los andamios fibrilares PLA, PLA/SBA-15 al 0.05%, 0.10% y 0.15% son observados en la figura 5, en donde se puede ver la morfología fibrilar del polímero y la distribución de la cerámica SBA-15 a lo largo de las fibras de PLA. La figura 5-F es una micrografía SEM a 50, 000X que muestra la distribución de la cerámica SBA-15 dentro de las fibras de PLA.

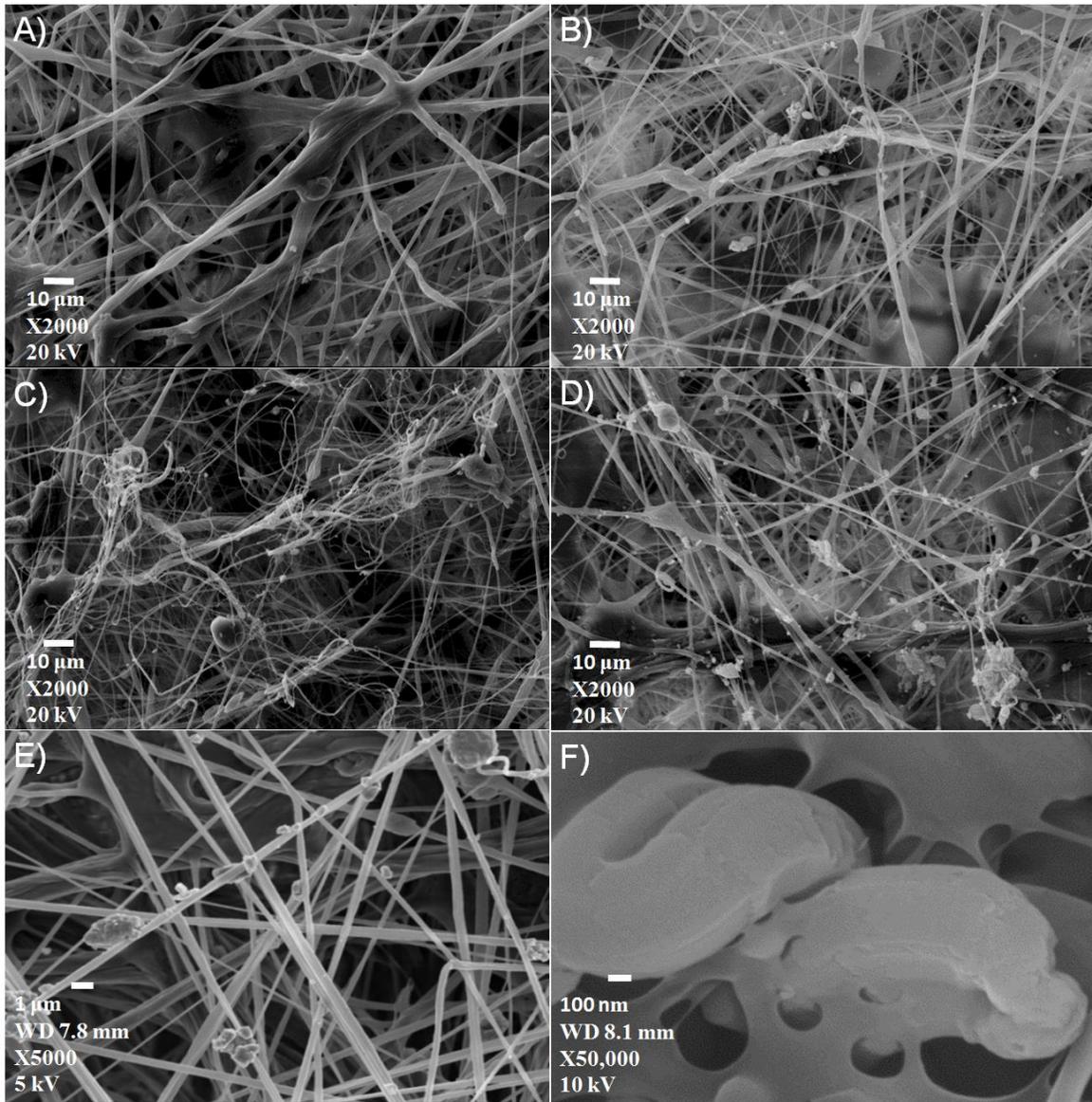


Figura 5.- Micrografías SEM de los andamios obtenidos por la técnica HPG: A) PLA 10%, B) PLA/SBA-15 0.05%, C) PLA/SBA-15 0.10%, D) PLA/SBA-15 0.15%, E) PLA/SBA-15 a 5000X. F) PLA/SBA-15 a 50.000X.

4.1.2 Diámetro de fibras de los andamios PLA y PLA/SBA-15

Mediante el Software “Image J” fueron insertadas las micrografías SEM de los andamios obtenidos (PLA 10%, PLA/SBA-15 0.05%, PLA/SBA-15 0.10% y PLA/SBA-15 0.15%), se eligieron 100 fibras al azar para realizar las mediciones y poder obtener el diámetro promedio de cada una (Figura 6). El diámetro promedio del PLA 10% fue de 424 ± 26 nm., mientras que se observó un aumento de diámetro con respecto al andamio PLA 10% para el andamio PLA / SBA-15 (0.05%) el cual fue de 477 ± 34 nm, para los andamios PLA/SBA-15 0.10% y PLA / SBA-15 0.15% se obtuvo un diámetro promedio de 522 ± 38 y 488 ± 35 nm respectivamente.

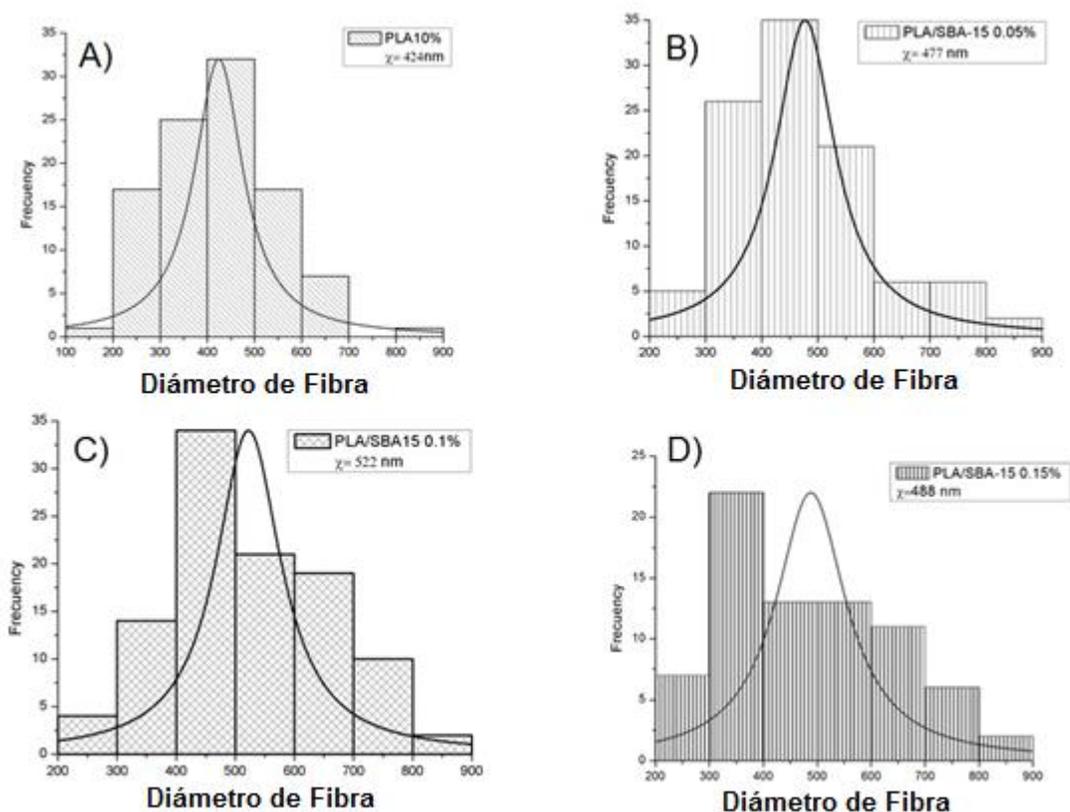


Figura 6.- Diámetro promedio de fibra de los andamios: A) PLA 424 nm, B) PLA/SBA-15 0.05% 477 nm, C) PLA/SBA-15 0.10% 522 nm y D) PLA/SBA 0.15% 488 nm.

4.1.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis gravimétrico térmico (TGA) para los andamios fibrilares de PLA y PLA/SBA-15 se muestra en la figura 7. En la curva TGA se observa que los andamios fibrilares de PLA (línea negra) comenzaron a descomponerse a partir de 340 ° C y se estabilizó después de 380 ° C, mientras que los andamios PLA/SBA-15 (línea verde) muestran una leve disminución en la estabilidad térmica, observándose que sufren una degradación de un solo paso hasta aproximadamente 300 ° C y se estabiliza después de 360 ° C.

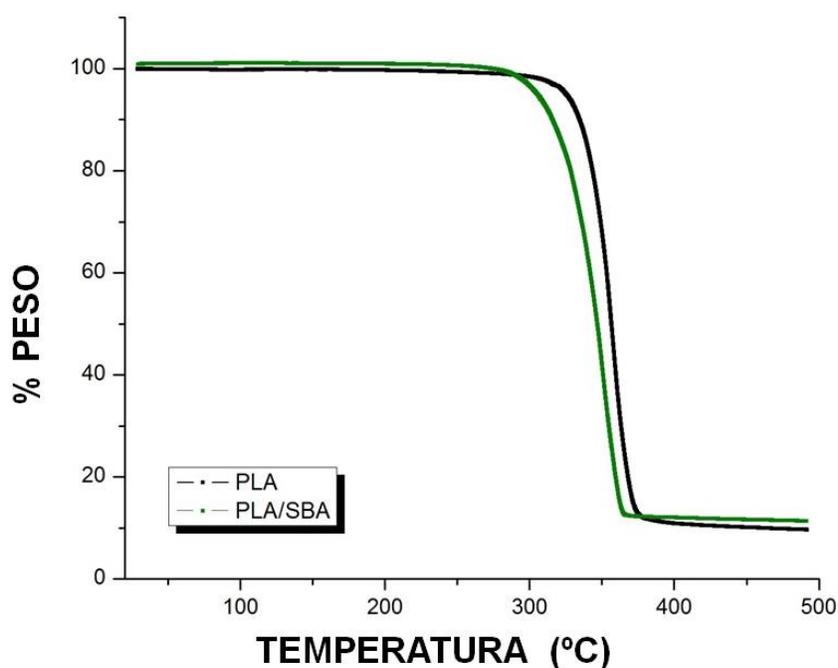


Figura 7.- TGA de los andamios de PLA (línea negro) y PLA/SBA15 (línea verde), se obtuvo entre 40 ° y 600 ° C, con una rampa de calentamiento de 10 °C/ min.

4.1.4 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La identificación de los grupos funcionales de los materiales SBA-15, PLA y PLA/SBA-15 fue evaluada por FT-IR (Figura 8). El espectro de la cerámica SBA-15 (Fig. 8-A) mostró una banda alrededor de 3400 cm^{-1} , típica de las vibraciones de estiramiento del enlace OH de los grupos silanol (Si-OH) y el agua que aún está incluida en la cerámica; la banda a 1080 cm^{-1} se atribuye a la vibración de elongación de los enlaces Si-O, mientras que las bandas observadas a 950 cm^{-1} se deben a vibraciones simétricas de los enlaces Si-OH. Finalmente, las bandas encontradas a 750 y 480 cm^{-1} corresponden a la vibración de flexión del enlace O-Si-O. Por otro lado, los andamios fibrilares de PLA (Fig. 8-B) presentan bandas de absorción características a 1749, 1460, 1183 y 1090 cm^{-1} , que se atribuyen a vibración de estiramiento C = O, vibración de deformación CH y vibración de estiramiento COC. Finalmente, el análisis por FT -IR del andamio fibrilar PLA / SBA-15 muestra la adsorción de bandas atribuidas principalmente al PLA y la adsorción de una nueva banda a 480 cm^{-1} atribuible a la vibración de flexión del enlace Si-O (Fig. 8-C).

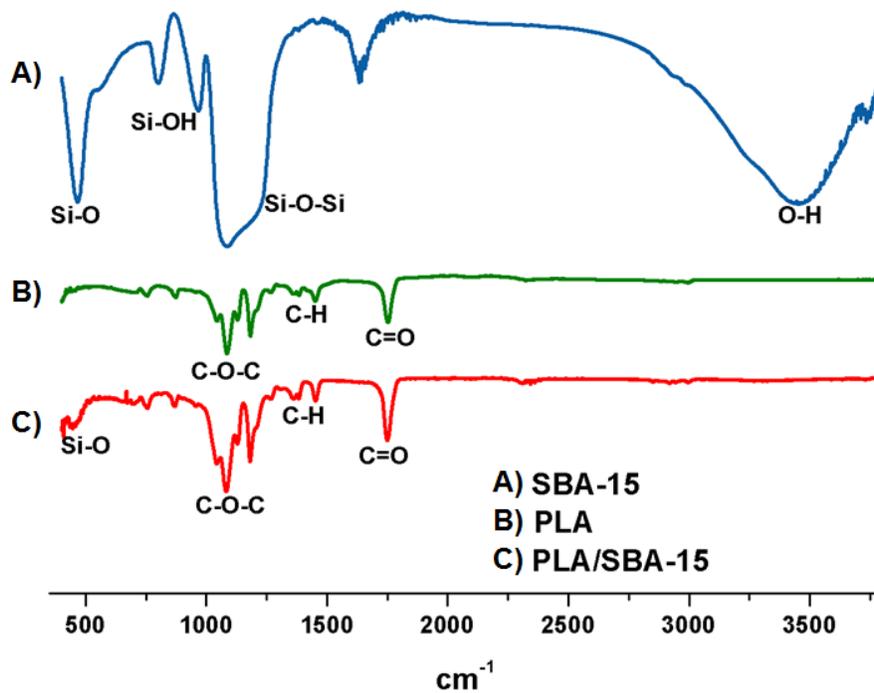


Figura 8.- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de: A) Cerámica SBA-15, B) Andamio fibrilar PLA y C) Andamio fibrilar PLA/SBA-15.

4.1.5 Pruebas mecánicas

La tabla-4 resume las propiedades mecánicas: deformación de cedencia, esfuerzo de cedencia, deformación a la fractura, esfuerzo, módulo elástico, resiliencia, deformación última, esfuerzo último y tenacidad, obtenidos de los andamios fibrilares: PLA, PLA/SBA-15 0.05%, PLA/SBA-15 0.10% y PLA/SBA-15 0.15%.

Tabla-4. Resumen de las propiedades mecánicas de los andamios de PLA, PLA/SBA-15 0.05%, PLA/SBA-15 0.10% y PLA/SBA-15 0.15%

		Concentración SBA-15 (%)			
		PLA	0.005%	0.010%	0.015%
Deformación Cedencia	mm/mm	0.009	0.006	0.009	0.008
Esfuerzo Cedencia	MPa	1.075	0.739	0.696	0.434
Deformación en la fractura	mm/mm	0.111	0.100	0.123	0.202
Esfuerzo Máximo	MPa	2.635	2.372	2.209	1.705
Módulo elástico	MPa	127	129	88	58
Resiliencia	kJ/m ³	5.4	2.4	3.7	1.9
Deformación última	mm/mm	0.211	0.120	0.140	0.229
Esfuerzo último	MPa	0.318	0.406	0.350	0.433
Tenacidad	kJ/m ³	242	183	209	262

Por otro lado, la curva típica de las propiedades mecánicas de los andamios de PLA, y de los andamios composites de PLA/SBA-15 con las diferentes concentraciones de 0.05%, 0.10% y 0.15% se ilustra en la figura 9.

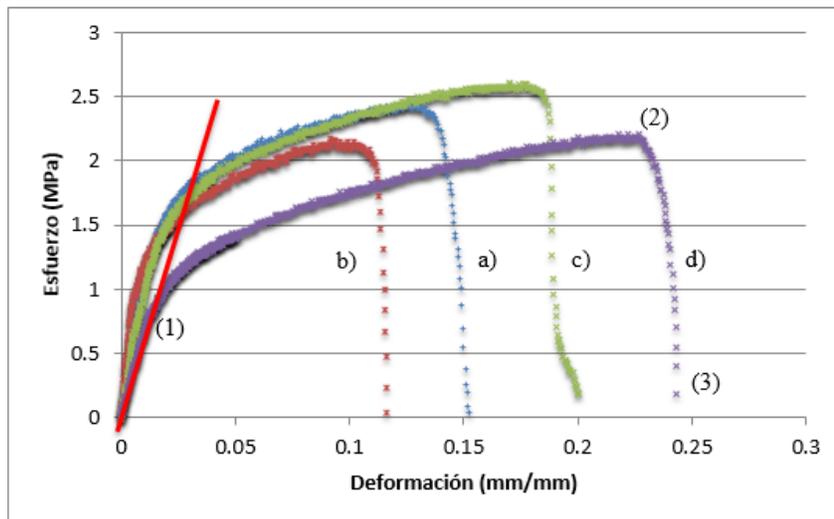


Figura 9. Curva típica de esfuerzo-deformación de los andamios: a) PLA, b) PLA/SBA-15 0.05%, c) PLA/SBA-15 0.10% y d) PLA/SBA-15 0.15%.

La figura 10, representa las propiedades mecánicas de los andamios preparados a diferentes concentraciones de SBA-15. El esfuerzo de cedencia (Figura 10-A), esfuerzo máximo (Figura 10-B) y resiliencia (Figura 10-C) disminuyen linealmente a medida que aumenta la concentración. La Figura 10-D muestra que el grupo PLA / SBA-15 (0.05%) tiene un aumento en el módulo elástico (~ 2%) con respecto al grupo PLA, sin embargo, a medida que aumenta la concentración, se produce una disminución gradual del módulo elástico. Las curvas de tensión-deformación mostraron zonas elásticas entre 0.006 y 0.009 mm / mm, como se muestra en la Tabla-4. En términos de deformación al inicio de la fractura, los andamios exhibieron una disminución del 10% con la concentración de 0.05% de SBA- 15, seguida de un aumento de 11% y 82% respectivamente para SBA-15 con concentraciones de 0.10% y 0.15% como se muestra en la Figura 10-E. El límite elástico, resiliencia y módulo elástico presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los andamios liberaron cantidades considerables de energía almacenada de 180 a 270 kJ / m³, como se ve en la Figura 10-F al comienzo de la rotura por resistencia, lo que permite una deformación final más significativa (Tabla-4).

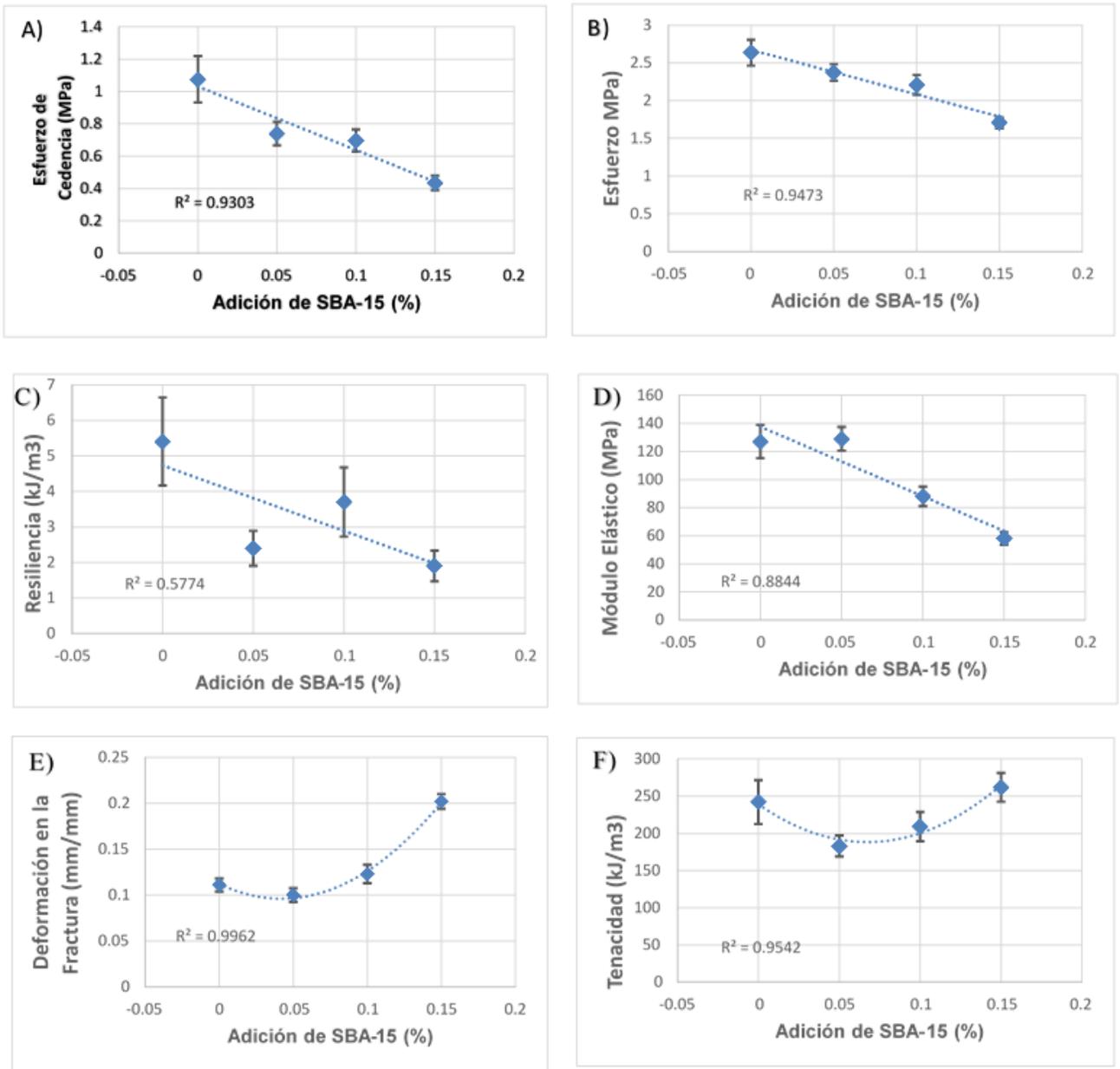


Figura 10.- Representación gráfica de las propiedades mecánicas de los andamios PLA, PLA/SBA-15 (0.05, 0.10 y 0.15%): A) Esfuerzo de cedencia, B) Esfuerzo máximo, C) Resiliencia, D) Módulo elástico, E) Deformación en la fractura y F) Tenacidad.

4.1.6 Ensayo de Viabilidad Celular (MTT)

La Figura 11 representa el porcentaje de viabilidad celular de osteoblastos fetales humanos (hFOB) después de sembrados sobre los andamios PLA/SBA-15 a diferentes concentraciones. En el día 1, hay una diferencia significativa en la respuesta del hFOB entre los andamios fibrilares de PLA y los andamios de PLA/SBA-15. El PLA/SBA-15 con 0.05% y con 0.15% mostraron una mayor viabilidad celular con $143 \pm 6.71\%$ y $134 \pm 15.43\%$ respectivamente, en comparación con el PLA/SBA-15 con 0.10% que mostró $80 \pm 8.46\%$. En los días 3, 5 y 7, el PLA / SBA-15 con 0.05% continuó mostrando mayor viabilidad celular en comparación con el PLA/SBA-15 con 0.10% y 0.15% que mostraron baja viabilidad celular, como se muestra en la Figura 11. Estos valores altos de viabilidad celular del PLA/SBA-15 con 0.05% indican que este andamio fue el que mejor condición presentó para las interacciones célula-material en las primeras 24 h y continuó siéndolo hasta el día 7.

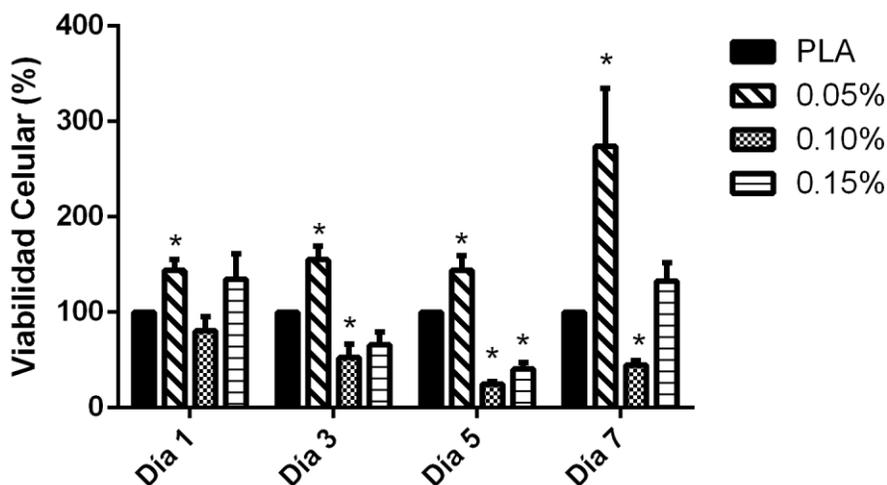


Figura 11.- Viabilidad Celular por MTT a los días 1, 3, 5 y 7 de los andamios: PLA, PLA/SBA-15 (0.05, 0.10 y 0.15%).

4.2 Evaluación de la bioactividad de los andamios PLA/SBA-15

4.2.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Los andamios fibrilares fueron sumergidos por 30 días en solución fisiológica simulada (SFS) similar al del plasma sanguíneo [44] para poder evaluar su bioactividad. La figura 11 muestra imágenes SEM de los andamios fibrilares antes y después de ser sumergidos en solución SFS. La figura 12 (A-B) muestra la morfología característica fibrilar de los andamios PLA y PLA/SBA-15 antes de ser sumergidos en SFS. Por otro lado, la Figura 12 (C-D) muestra los andamios después de haber sido sumergido en SFS; se observa que, mientras el andamio PLA (12-C) conservó las mismas características fibrilares, el andamio PLA/SBA-15 (12-D) mostró un tipo de precipitado mineral a lo largo de sus fibras.

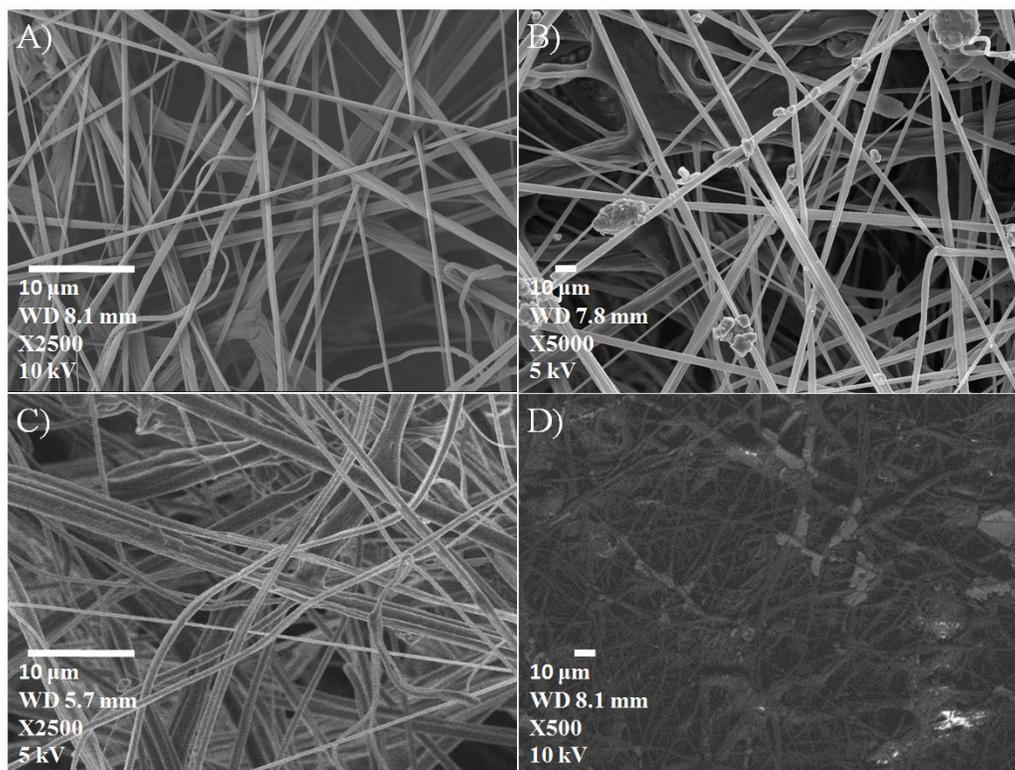


Figura 12.- Imágenes SEM de los andamios fibrilares antes (A-B) y después (C-D) de ser sumergidos en SFS. A) PLA inicial, B) PLA/SBA-15 (0.05%) inicial, C) PLA sumergido 30 días en SFS y D) PLA/SBA-15 (0.05%) sumergido 30 días en SFS.

4.2.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Se realizó un FT-IR de los andamios sumergidos a 30 días con el fin de identificar el tipo de depósito observado en la figura 13. Asumiendo que este depósito fuese un tipo de hidroxiapatita se colocó su espectro como referencia, (figura 13-C). Las bandas observadas en la figura 13 (A-B) corresponden a los andamios PLA y PLA/SBA-15 después de 30 días sumergidos en la solución fisiológica simulada, sin embargo, no se aprecia modificación y/o aparición de nuevas bandas, al contrario, las bandas observadas son las mismas de los andamios sin sumergir en SFS descritas en la figura 8. Entendiendo las limitaciones de esta técnica se optó por caracterizarlo con otras técnicas de identificación como XPS y XRD.

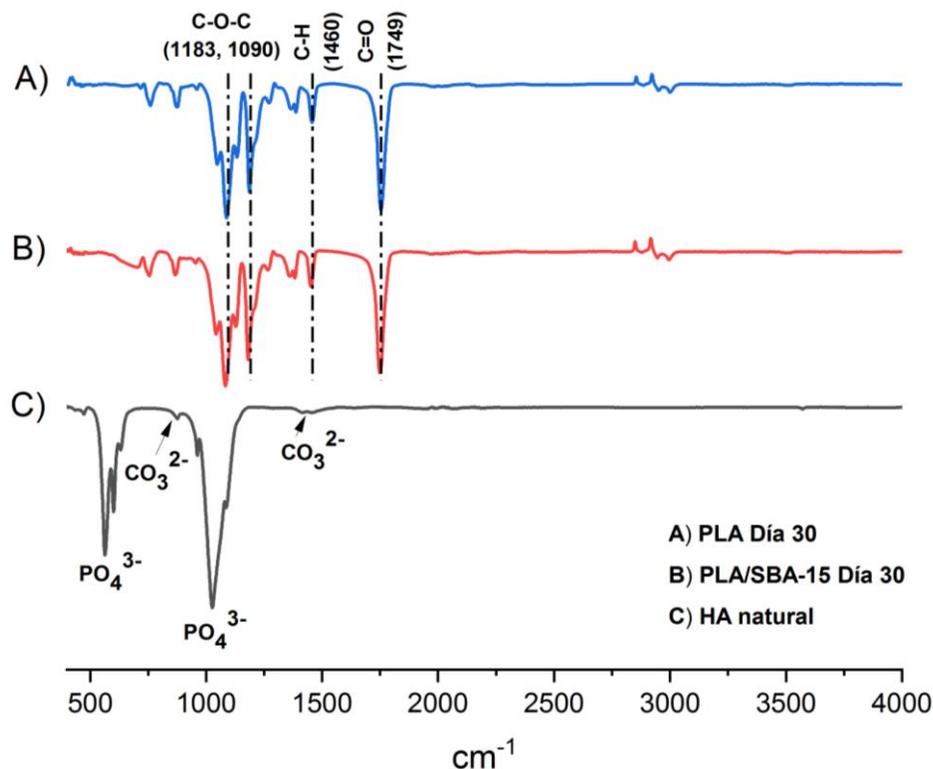


Figura 13. Espectroscopia infrarroja por transformado de Fourier: A) Andamio PLA sumergido 30 días en SFS, B) Andamio PLA/SBA-15 sumergido 30 días en SFS y C) HA natural.

4.2.3 Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos-X (XPS)

La figura 14 presenta los espectros XPS para los andamios: A) PLA sin sumergir, B, C y D) PLA/SBA-15 después de haber sido sumergidos a diferentes tiempos: 10, 20, 30 días respectivamente en solución fisiológica simulada, en los cuales se pueden identificar claramente los picos correspondientes a oxígeno, calcio, carbono, fósforo y silicio. En todos los casos las señales producidas se asume que pueden provenir de una fase inicial de formación de algún tipo de mineral.

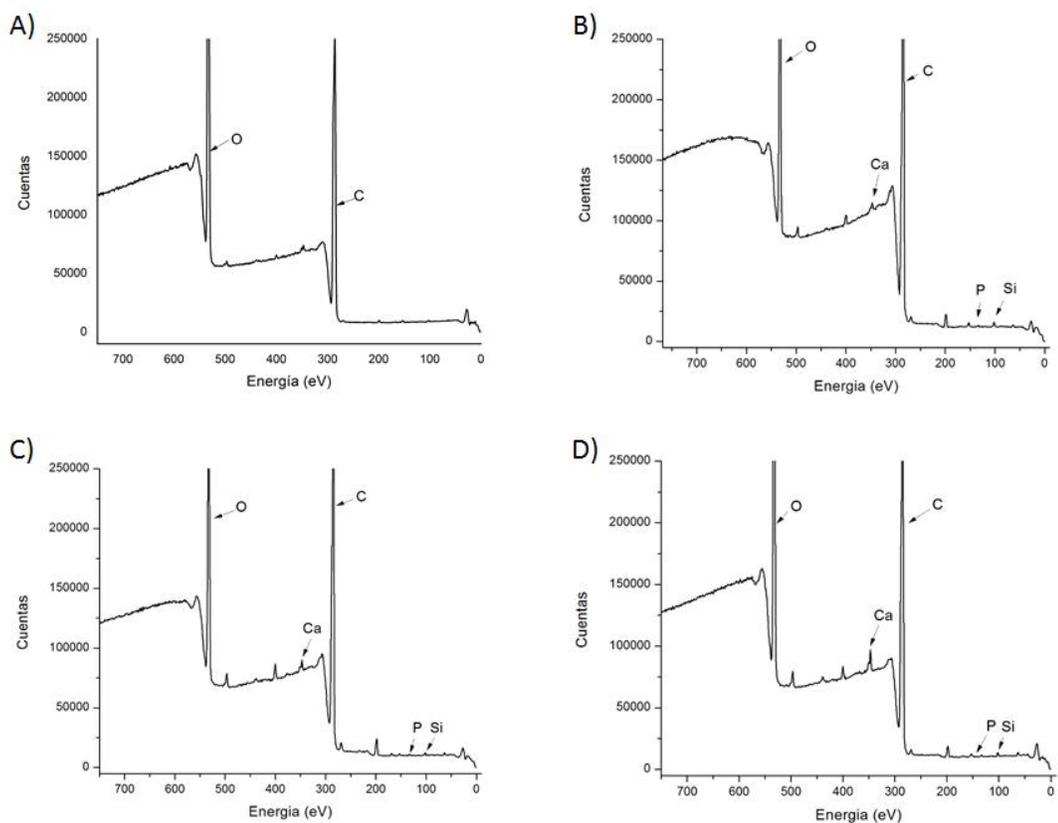


Figura 14. Espectros XPS de los andamios: A) PLA sin sumergir, B) PLA/SBA-15 sumergido 10 días, C) PLA/SBA-15 sumergido 20 días y D) PLA/SBA-15 sumergido 30 días.

4.2.4 Difracción de rayos-X (XRD)

La figura 15 muestra comparativamente los patrones de difracción de rayos-X de los andamios utilizados para la prueba de bioactividad: A) PLA sin sumergir en solución SFS y B, C, D) andamios PLA/SBA-15 a diferentes días de haber sido sumergidos en SFS a 10, 20 y 30 días respectivamente. En la figura 15 (B-D) se observa que el patrón de difracción va presentando mayor resolución y por lo tanto mejor cristalinidad conforme aumenta el tiempo de sumergido en comparación con el patrón de difracción inicial de PLA (Fig.15-A) que es amorfo.

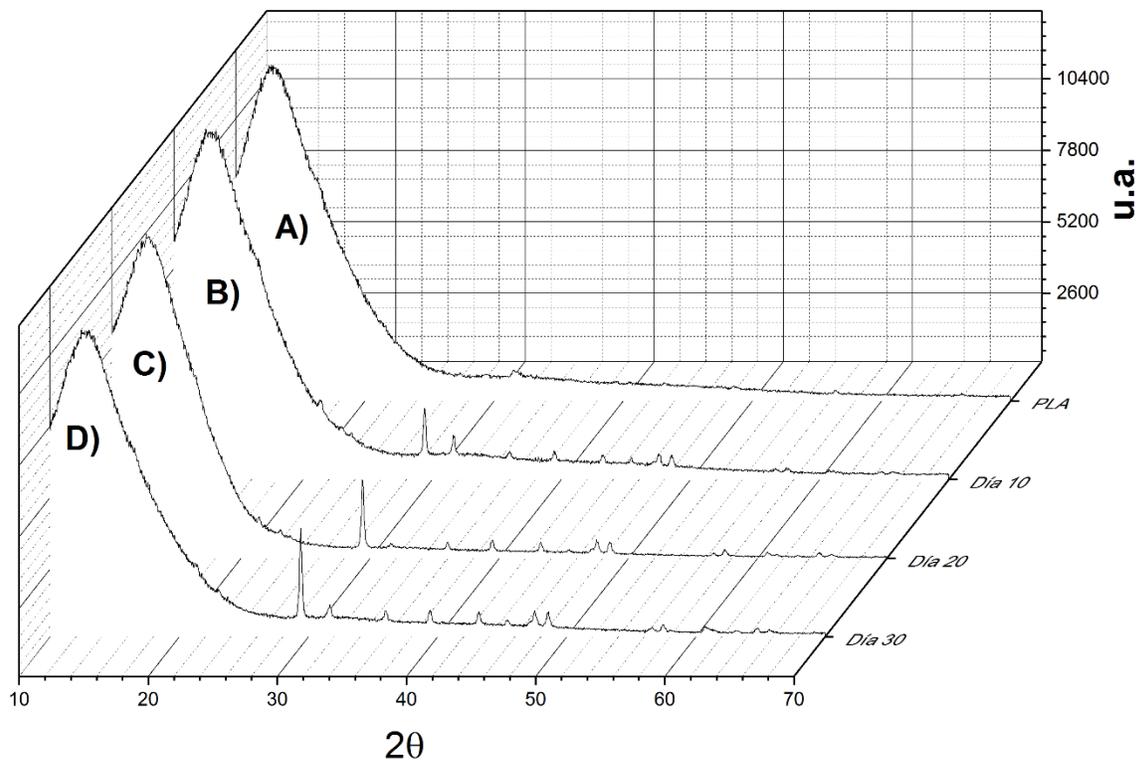


Figura 15.- Difracción de rayos X del andamio PLA/SBA-15 sumergido en SFS a diferentes días: A) PLA inicial, B) PLA/SBA-15 sumergido 10 días, C) PLA/SBA-15 sumergido 20 días y D) PLA/SBA-15 sumergido 30 días

4.3 Cinética de liberación de BSA sobre andamios PLA/SBA-15

Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como fármaco modelo y se cargó sobre los andamios fibrilares PLA/SBA-15 (0.05%) para medir la capacidad de liberación de los andamios compuestos. La capacidad de carga por inmersión simple fue de ~23%. En la figura 16 se muestra una cinética de liberación acumulada por difusión en dos fases; la primera fase de liberación por ráfaga inicial seguido de una fase de liberación más lenta y continua (4.7-5.08 mg/mm²) hasta un tiempo de detección de 96 h.

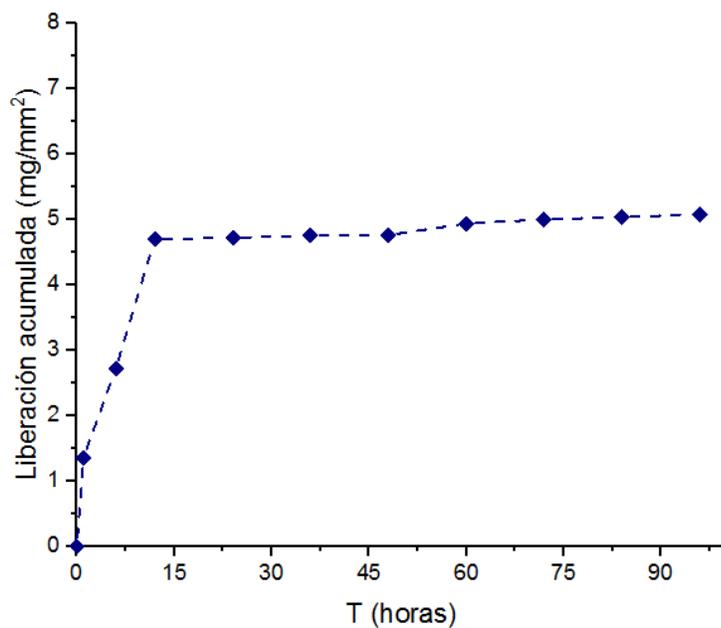


Figura 16.- Cinética de liberación de fármaco (BSA) sobre andamios PLA/SBA-15 (0.05%) durante un tiempo de 96 h.

4.4 Análisis de la respuesta de cultivos celulares 3D

La formación de esferoides se observa a las 24 horas después de haber sembrado una concentración de 5×10^3 células de hFOB en un volumen de 40 μL por pozo en el plato de 3D Perfecta Biomatrix (Figura 17).

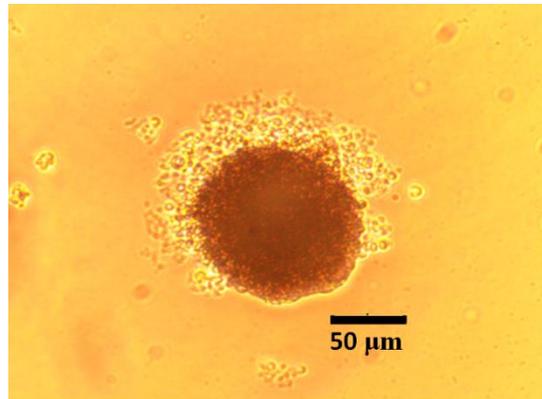


Figura 17.- Formación de esferoide en gota colgante después de 24 h de cultivo.

Posteriormente los esferoides son extraídos del plato 3D Perfecta Biomatrix y sembrados sobre los andamios fibrilares PLA/SBA-15 (0.05%) la cual fue elegida por la biocompatibilidad y propiedades mecánicas que presentó. La figura 18, muestra la interacción esferoides-material con diferentes técnicas de caracterización como: microscopía óptica, microscopía fluorescente (tinción Cell Tracker TM Green CMFDA) y microscopía electrónica de barrido. Los andamios nano-fibrilares se han desarrollado para crear un sistema similar a la matriz extracelular natural y han sido importantes para las estrategias de evaluación celular, debido principalmente a su amplia superficie de adhesión así como a su alta porosidad. Éstas características permiten el crecimiento, migración y diferenciación celular, confiriendo una mayor interacción de las células con las

nano-fibras. Como puede observarse los esferoides hFOB después de la siembra sobre los andamios PLA/SBA-15 mostraron una dispersión celular homogénea a través de la superficie del material (Figura 18-A), la evaluación de la viabilidad celular se pudo comprobar mediante la tinción Cell Tracker™ Green CMFDA (Figura 18-B). Por otro lado, se logró observar una proximidad y fusión de esferoides (Figura 18 E-F) aumentando así el contacto celular con la superficie de los andamios nano-fibrilares. La metodología desarrollada en este proyecto ha sido innovadora para la siembra de esferoides sobre andamios nano-fibrilares.

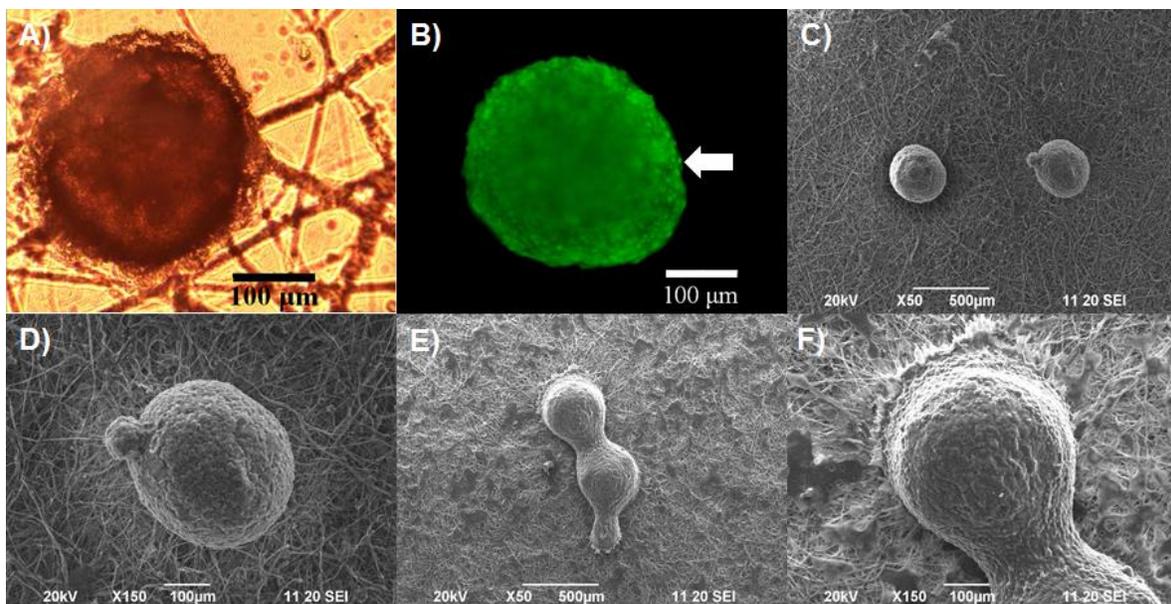


Figura 18.- Asociación de los esferoides hFOB sobre los andamios fibrilares PLA/SBA-15. A) Microscopia óptica del esferoide sembrado sobre el andamio fibrilar a las 24 h, B) La viabilidad celular (flecha blanca) de los esferoides mediante el colorante fluorescente Cell Tracker™ Green CMFDA a las 24 h de sembrado, C-D) Microscopia electrónica de barrido de esferoides adheridos al andamio PLA/SBA-15, E-F) Asociación de esferoides sobre el andamio fibrilar PLA/SBA-15 que muestran una etapa inicial de proximidad y fusión.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

Un andamio ideal es aquel constituido por un material biocompatible, biodegradable y con propiedades mecánicas similares al tejido en el que se va a implantar. Los andamios no pretenden ser implantados de manera permanente, sino más bien, permitir que las células huésped se adhieran y permitan la deposición de matriz extracelular y que, éste reemplace la estructura del andamio con el tiempo [29]. El compuesto de PLA/SBA-15 a diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.15%) fueron investigados; la mezcla de PLA / SBA-15 se realizó por adsorción física entre partículas de SBA-15 y la matriz de PLA, la Figura 5 muestra la dispersión homogénea de la cerámica SBA-15 sobre las fibras de PLA.

El diámetro de fibra promedio del andamio PLA 10% fue de 424 ± 26 nm, mientras que, para los andamios PLA/SBA-15 a 0.05%, 0.10% y 0.15% fueron de 477 ± 34 , 522 ± 38 y 488 ± 35 nm respectivamente; confirmado así que el método y técnica empleada para generar andamios fibrilares compuestos permite reproducir el diámetro promedio de fibras de colágena de la MEC ósea, la cual varía entre 50-500 nm [3].

En cuanto a la evaluación térmica, en la figura 7 se muestra el TGA del andamio PLA y PLA/SBA-15, donde se observa que el andamio PLA (línea negra) comenzó a descomponerse a partir de 340 °C y se estabiliza alrededor de los 380 °C mientras que en el andamio PLA/SBA-15 (línea verde) se observa una leve disminución en la estabilidad térmica ya que sufre degradación de un solo paso aproximadamente a 300 °C y se estabiliza hasta los 360°C, este efecto puede deberse al agregado del relleno inorgánico (cerámica SBA-15) ya que provoca

disminución del peso molecular por parte del polímero; esto implica también que las interacciones de interfaz entre las fibras poliméricas y las partículas cerámicas son factores clave que influyen en las propiedades físicas de la matriz polimérica [45, 46].

La identificación de grupos funcionales del PLA y PLA/SBA-15 fue evaluado mediante espectroscopia infrarroja (Figura 8). El espectro de la cerámica SBA-15 (Figura 8-A) mostró las bandas características reportadas en otros estudios [14, 47, 48] las cuales son: vibraciones de estiramiento del enlace OH alrededor de 3400 cm^{-1} , otra banda a 1080 cm^{-1} atribuible a la vibración de elongación de los enlaces Si-O, mientras que las bandas 950 cm^{-1} , 750 y 480 cm^{-1} corresponden a las vibraciones Si-OH y O-Si-O respectivamente; por otro lado el espectro del andamio PLA también presenta bandas de absorción características a 1749, 1460, 1183 y 1090 cm^{-1} , que se atribuyen a vibración de estiramiento C=O, vibración de deformación CH y vibración de estiramiento COC respectivamente [49, 50]. Finalmente, el PLA / SBA-15 muestra la adsorción de bandas atribuidas principalmente al PLA y a la adsorción de una nueva banda aproximadamente a 480 cm^{-1} correspondiente a la vibración de flexión del enlace Si-O, indicando así la presencia e incorporación del SBA-15 sobre la morfología de las fibras [47, 49]. En términos de soporte de carga, las propiedades mecánicas son fundamentales ya que influyen en la regeneración tisular; un andamio ideal tendría las propiedades semejantes a la del tejido nativo [8, 26].

La figura 10 representa las propiedades mecánicas de los andamios preparados con diferentes concentraciones de SBA-15. Principalmente se observa que el esfuerzo de cedencia, esfuerzo máximo y resiliencia (Fig.10 A-C) disminuyen

linealmente a medida que aumenta la concentración de la cerámica. La Figura 10-D muestra que el grupo PLA / SBA-15 al 0.05% tiene un aumento en el módulo elástico de alrededor del 2% con respecto al grupo PLA, no obstante, el módulo elástico disminuye gradualmente a medida que aumenta la concentración del SBA-15. La resistencia a la tracción o tensión del hueso esponjoso está entre 1 y 5 MPa con un módulo de elasticidad entre 100 MPa y 5 GPa [8]. El uso de la cerámica SBA-15 como material de relleno en la matriz PLA presentó valores de tensión entre 1.7 y 2.37 MPa así como un módulo elástico de tracción entre 58 y 129 MPa; esto significa que las mezclas al 0.05% y 0.10% fueron las más próximas a las propiedades mecánicas del hueso esponjoso por lo que podrían considerarse adecuadas para implantarse como andamio y permitir que las células osteoblásticas formen tejido nuevo.

La síntesis del andamio fibrilar PLA/SBA-15 tiene como objetivo imitar la MEC ósea. La figura 11 representa el porcentaje de viabilidad celular de osteoblastos fetales humanos (hFOB) después de haber sido sembrados sobre los andamios PLA y PLA/SBA-15 (0.05%, 0.10% y 0.15%). En el día 1 se observa una diferencia significativa en la respuesta de hFOB entre el andamio PLA y los andamios PLA/SBA-15 a diferentes concentraciones (0.05%, 0.10% y 0.15%). Para los días 3, 5 y 7 el andamio PLA/SBA-15 0.05% continua mostrando la mayor viabilidad celular en comparación con los otros grupos de estudio. Estos valores altos de viabilidad celular mostrados por parte del grupo PLA / SBA-15 con 0.05% indican que fue más favorable para las interacciones célula-material durante las primeras 24 h, donde su superficie topográfica podría ser clave para la proliferación de osteoblastos, debido a que primero permite la adhesión celular la cual constituye

un requisito previo de biocompatibilidad del material y posteriormente favoreció la proliferación de las células; este efecto coincide con diferentes reportes que indican que es crucial incorporar componentes cerámicos en andamios para estimular la biocompatibilidad celular y mejorar la capacidad del andamio para guiar las células osteoprogenitoras que conducen a la formación de hueso nuevo [51–53].

La bioactividad es otro punto importante en los andamios ya que les permite interactuar o unirse a los tejidos vivos [29]; se han publicado diversos trabajos sobre la formación de una capa tipo hidroxiapatita en diferentes materiales mesoporosos de sílice. Izquierdo-Baraba et al. estudiaron la bioactividad de tres materiales mesoporosos diferentes (SBA-15, MCM-41, MCM-48) por inmersión en solución fisiológica simulada (SFS) y reportaron que se formó una apatita carbonatada en SBA-15 después de 30 días de inmersión en SFS [54], la imagen SEM del PLA/SBA-15 que fue sumergido 30 días en una SFS se muestra en la figura (Fig.12-D) donde se observa una precipitación a lo largo de las fibras, que se atribuye a una capa de apatita carbonata, este depósito fue caracterizado por FT-IR.

La figura 13, muestra los espectros de los andamios sumergidos 30 días en SFS; sin embargo sólo permitió observar bandas características que corresponden al PLA [49, 50]. Debido a que la caracterización por FT-IR fue limitada se emplearon análisis complementarios como XPS y XRD que proveerá información relacionada con la composición, orientación, y conformación [55] del precipitado observado en la figura 12-D. En la figura 14-A se observa el análisis por XPS del andamio sin sumergir en SFS que muestra la señal de elementos de oxígeno y carbono

correspondiente al PLA [56], mientras que los andamios compuestos sumergidos a diferentes tiempos (10, 20 y 30 días) en SFS (Fig. 14 B-D) se pueden identificar claramente los picos correspondientes a oxígeno, calcio, carbono, fósforo y silicio desde el día 10 de haber sido sumergido en SFS. En todos los casos las señales producidas se asume que puede provenir de la formación de algún mineral como fosfato de calcio y/o carbonato de calcio [57, 58]. Por otra parte el XRD es una técnica que permite identificar las diferentes fases cristalinas de un material [59]. La Figura 15 muestra las difracciones de rayos X (XRD) del andamio PLA sin sumergir (Fig. 15-A) y de los andamios composites PLA/SBA-15 sumergidos a 10, 20 y 30 días (Fig. 15 B-D), en el cual se observa que el patrón de difracción va presentando mayor resolución y por lo tanto mejor cristalinidad conforme aumenta el tiempo sumergido. Las posiciones de los picos de 2θ presentes en la figura 15-D coinciden bien con los cristales estándar de carbonato de calcio en su fase de calcita reportados en otros estudios [57, 60]. La presencia de un mineral tipo apatita en el andamio PLA/SBA-15 permitiría un mejor crecimiento de células óseas (osteoconducción), así como la estimulación de células huésped inmaduras para que se conviertan en células osteogénicas (osteoinducción).

Los materiales mesoporosos se han investigado ampliamente para controlar principalmente la liberación de fármacos [61], la unión de PLA-SBA-15 parecen ser prometedores, ya que permitiría administrar fármacos o factores de crecimiento de manera local; además, el material presentaría una integración ósea por el comportamiento bioactivo del SBA-15. En la figura 16 se muestra una liberación continua de BSA (4.7-5.08 mm/mm²) cargado en el andamio de PLA/SBA-15 hasta

96 horas de detección confirmando que el andamio compuesto puede también ser utilizado como sistema de liberación controlada.

A pesar de presentar buenos resultados físico-químicos, los ensayos biológicos se realizaron en un modelo bidimensional (2D), el cual no replica el micro-entorno nativo del tejido [62], por lo que, algunas interacciones importantes célula-célula y célula-microambiente pueden ignorarse en una plataforma de este tipo [63], por tanto cuando se obtienen resultados prometedores y se traslada hacia una aplicación clínica, frecuentemente no presentan el mismo resultado. Se ha reportado que un entorno de cultivo en 3D promueve el agrupamiento celular y mejora las interacciones entre células [64].

Se ha reportado que los esferoides se forman a través de un proceso llamado autoensamblaje; en el cual las células permanecen en contacto directo entre sí para formar agregados debido a las largas fibras de la matriz extracelular con múltiples motivos de ácido arginil-glicil-aspártico (RGD) que interactúan estrechamente con la integrina en las superficies de las membranas celulares; este contacto directo (célula-célula) da como resultado una regulación positiva de la expresión de N-cadherina. La acumulación de N-cadherina en la superficie de la membrana impulsa la compactación, lo que resulta en esferoides [65]; en la figura 17 puede confirmarse que el método de gota colgante permitió la formación de esferoides a las 24 horas, mientras que la figura 18-A muestra que el esferoide es capaz de adaptarse al andamio fibrilar una vez que es sembrado en ella.

Por otro lado estudios mencionan que los esferoides mayores a 500-600 μm restringen la difusión de nutrientes y oxígeno dando como resultado un centro hipóxico-necrótico [40, 43], En la figura 18-B se observa que el colorante

fluorescente Cell Tracker demostró la integridad de las membranas celulares que componen el esferoide, esto debido a que el diámetro promedio del esferoide es inferior a 500 μm permitiendo así una correcta difusión de nutrientes.

Los esferoides optimizan la señalización intracelular, mejorando el proceso de diferenciación, permitiendo que las células se organicen en una estructura más similar de tejidos *in vivo*. Además, en los esferoides, los receptores y moléculas de adhesión se propagan de forma más natural [62]. En las figuras 18 (C-F) se muestran micrografías SEM de la adherencia y asociación de los esferoides sobre el andamio fibrilar PLA/SBA-15, también se puede observar una etapa de proximidad y fusión entre esferoides sobre los andamios (Figura 18-E, F); este resultado puede deberse a dos factores: 1) la influencia de las propiedades del andamio fibrilar como: área superficial, arquitectura fibrilar y porosidad y 2) la capacidad intrínseca de los esferoides de fusionarse entre sí [35, 62, 66].

La asociación de esferoides con andamios es un enfoque prometedor para la ingeniería de tejidos; se prevé que los cultivos 3D en los andamios PLA/SBA-15 contribuyan a la formación de un micro-entorno bioquímico y biofísico semejante al tejido nativo óseo y por tanto obtener resultados más cercanos a evaluaciones *in vivo*.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

- La técnica de hilado por propulsión a gas permitió la síntesis de un andamio fibrilar de PLA/SBA-15 con un diámetro similar a las fibras de colágena de la MEC ósea.
- Las concentraciones bajas de SBA-15 (0.05% y 0.1% p/p) mejoraron las propiedades mecánicas del andamio, siendo la concentración de 0.05% el más cercano a las propiedades mecánicas del hueso esponjoso.
- La concentración de SBA-15 (0.05%) presentó el mejor porcentaje de viabilidad celular a través del ensayo de MTT.
- Se logró identificar la bioactividad del andamio PLA/SBA-15 0.05% a través de la formación de carbonato de calcio en su fase cristalina de calcita sobre el andamio sumergido a 30 días en SFS.
- El andamio fibrilar PLA/SBA-15 0.05% funcionó como sistema de liberación controlada de BSA hasta 96 horas.
- El plato de cultivo celular por gota colgante (Perfecta 3D Biomatrix) permitió la obtención de esferoides consolidados a partir de las 24 horas.
- La integridad de las membranas celulares del esferoide fue comprobada mediante el colorante fluorescente Cell Tracker.
- Se logró implementar y observar la interacción esferoide-andamio a través de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhang X-Y, Fang G, Zhou J (2017) Additively Manufactured Scaffolds for Bone Tissue Engineering and the Prediction of their Mechanical Behavior: A Review. *Materials (Basel, Switzerland)* 10:50.
2. Murugan R, Ramakrishna S (2005) Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology* 65:2385–2406.
3. Zimmermann EA, Ritchie RO (2015) Bone as a Structural Material. *Advanced Healthcare Materials* 4:1287–1304.
4. Young MF (2003) Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis International* 14:35–42.
5. Nordin M, Frankel VH (2004) *Biomechanica basica del sistema musculoesqueletico 3 Ed* (McGraw-Hill Interamericana) Available at: <https://books.google.com.mx/books?id=bM4fAAAACAAJ>.
6. Wiesmann HP, Joos U, Meyer U (2004) Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering: Part II. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 33:523–530.
7. Robling AG, Castillo AB, Turner CH (2006) BIOMECHANICAL AND MOLECULAR REGULATION OF BONE REMODELING. *Annual Review of Biomedical Engineering* 8:455–498.
8. Fu Q, Saiz E, Rahaman MN, Tomsia AP (2011) Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials Science and Engineering: C* 31:1245–1256.
9. Rezvani Z, Venugopal JR, Urbanska AM, Mills DK, Ramakrishna S, Mozafari

- M (2016) A bird's eye view on the use of electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering: Current state-of-the-art, emerging directions and future trends. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12:2181–2200.
10. Mishra R, Bishop T, Valerio IL, Fisher JP, Dean D (2016) The potential impact of bone tissue engineering in the clinic. *Regenerative medicine* 11:571–587.
 11. McMahon RE, Wang L, Skoracki R, Mathur AB (2013) Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 101 B:387–397.
 12. Middleton JC, Tipton AJ (2000) Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21:2335–2346.
 13. BaoLin G, Ma PX (2014) Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China Chemistry* 57:490–500.
 14. Gudiño-rivera J, Medellín-rodríguez FJ, Ávila-orta C, Palestino-escobedo AG, Sánchez-valdés S (2013) Structure / Property Relationships of Poly (L-lactic Acid)/ Mesoporous Silica Nanocomposites. *Journal of Polymers* 2013. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/162603>.
 15. Yu X, Tang X, Gohil S V, Laurencin CT (2015) Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Advanced healthcare materials* 4:1268–1285.
 16. Vallet-Regí M, Colilla M, Izquierdo-Barba I (2008) *Bioactive Mesoporous Silicas as Controlled Delivery Systems: Application in Bone Tissue Regeneration* doi:10.4028/0-87849-395-6.1.
 17. Causa F, Netti PA, Ambrosio L (2007) A multi-functional scaffold for tissue

- regeneration: The need to engineer a tissue analogue. *Biomaterials* 28:5093–5099.
18. Hutmacher DW (2001) Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 12:107–124.
 19. Loh QL, Choong C (2013) Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 19:485–502.
 20. Raquez J-M, Habibi Y, Murariu M, Dubois P (2013) Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Progress in Polymer Science* 38:1504–1542.
 21. Kyriakidou K, Lucarini G, Zizzi A, Salvolini E, Mattioli-Belmonte M, Mollica F, Gloria A, Ambrosio L (2008) Dynamic Co-Seeding of Osteoblast and Endothelial Cells on 3D Polycaprolactone Scaffolds for Enhanced Bone Tissue Engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 23. doi:10.1177/0883911508091905.
 22. Griffith LG (2000) Polymeric biomaterials. *Acta Materialia* 48:263–277.
 23. Tajbakhsh S, Hajjali F (2016) A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 10:897–912.
 24. Abdulghani S, Mitchell GR (2019) Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. *Biomolecules* 9:750.
 25. Gloria A, Russo T, De Santis R, Ambrosio L (2009) 3d Fiber Deposition Technique to Make Multifunctional and Tailor-Made Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*

7:141–152.

26. Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny JM (2010) Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability* 95:2126–2146.
27. Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR (2006) Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27:3413–3431.
28. Mathieu LM, Mueller TL, Bourban P-E, Pioletti DP, Müller R, Månson J-AE (2006) Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27:905–916.
29. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, Li B, Shu W (2018) 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials* 3:278–314.
30. Abdal-hay A, Hamdy AS, Lim JH (2014) Facile preparation of titanium dioxide micro/nanofibers and tubular structures by air jet spinning. *Ceramics International* 40:15403–15409.
31. Abdal-hay A, Sheikh FA, Lim JK (2013) Air jet spinning of hydroxyapatite/poly(lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102:635–643.
32. Tutak W, Sarkar S, Lin-Gibson S, Farooque TM, Jyotsnendu G, Wang D, Kohn J, Bolikal D, Simon CG (2013) The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds. *Biomaterials* 34:2389–2398.
33. Vázquez-Vázquez FC, Hernández-Tapia LG, Chanes-Cuevas OA, Alvarez-

- Pérez MA, Pozos-Guillén AJ (2018) *Airflow electrofluidodynamics* doi:10.1016/B978-0-08-101745-6.00007-4.
34. Lin R-Z, Chang H-Y (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology journal* 3:1172–1184.
 35. Han H-W, Asano S, Hsu S (2019) Cellular Spheroids of Mesenchymal Stem Cells and Their Perspectives in Future Healthcare. *Applied Sciences* 9:627.
 36. Kim J-Y, Fluri DA, Marchan R, Boonen K, Mohanty S, Singh P, Hammad S, Landuyt B, Hengstler JG, Kelm JM, Hierlemann A, Frey O (2015) 3D spherical microtissues and microfluidic technology for multi-tissue experiments and analysis. *Journal of Biotechnology* 205:24–35.
 37. Charbe N, McCarron PA, Tambuwala MM (2017) Three-dimensional bio-printing: A new frontier in oncology research. *World journal of clinical oncology* 8:21–36.
 38. Morabito C, Steimberg N, Mazzoleni G, Guarnieri S, fanò-illic G, Marigiò M (2015) RCCS Bioreactor-Based Modelled Microgravity Induces Significant Changes on In Vitro 3D Neuroglial Cell Cultures. *BioMed Research International* 2015:1–14.
 39. García SC (2013) Cultivo de células en 3D: la nueva dimensión de los cultivos celulares.
 40. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2007) Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology* 83:849–871.
 41. Meseguer J, Abad MÁE, Méndez VFM, Peñafiel AC, Cortés MPS (2015)

Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. *Eubacteria*, nº34, 2015. Available at: <http://hdl.handle.net/10201/48162>.

42. Frey O, Misun PM, Rothe J, Hierlemann A (2014) Real-time In-situ Lactate Monitoring in 3D Multi-cellular Spheroid Cultures by Using Enzyme-based Biosensors in Hanging Drop Networks. *Procedia Engineering* 87:96–99.
43. Barzegari A, Saei AA (2012) An update to space biomedical research: tissue engineering in microgravity bioreactors. *BioImpacts : BI* 2:23–32.
44. Kokubo T, Takadama H (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27:2907–2915.
45. Liu X, Wang T, Chow LC, Yang M, Mitchell JW (2014) Effects of Inorganic Fillers on the Thermal and Mechanical Properties of Poly(lactic acid). *International journal of polymer science* 2014:827028.
46. Zhao Y, Qiu Z, Yang W (2008) Effect of Functionalization of Multiwalled Nanotubes on the Crystallization and Hydrolytic Degradation of Biodegradable Poly(l-lactide). *The Journal of Physical Chemistry B* 112:16461–16468.
47. Manzano M, Lamberti G, Galdi I, Vallet-Regí M (2011) Anti-osteoporotic drug release from ordered mesoporous bioceramics: experiments and modeling. *AAPS PharmSciTech* 12:1193–1199.
48. Nanaki S, Siafaka PI, Zachariadou D, Nerantzaki M, Giliopoulos DJ, Triantafyllidis KS, Kostoglou M, Nikolakaki E, Bikiaris DN (2017) PLGA/SBA-15 mesoporous silica composite microparticles loaded with paclitaxel for local chemotherapy. *European journal of pharmaceutical sciences : official*

journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences 99:32–44.

49. Nagarwal RC, Kumar R, Dhanawat M, Pandit JK (2011) Modified PLA nano in situ gel: a potential ophthalmic drug delivery system. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 86:28–34.
50. Albayati TM, Salih IK, Alazzawi HF (2019) Synthesis and characterization of a modified surface of SBA-15 mesoporous silica for a chloramphenicol drug delivery system. *Heliyon* 5:e02539–e02539.
51. Li G, Li P, Chen Q, Mani MP, Jaganathan SK (2019) Enhanced mechanical, thermal and biocompatible nature of dual component electrospun nanocomposite for bone tissue engineering. *PeerJ* 7:e6986–e6986.
52. Montjovent M-O, Mark S, Mathieu L, Scaletta C, Scherberich A, Delabarde C, Zambelli P-Y, Bourban P-E, Applegate LA, Pioletti DP (2008) Human fetal bone cells associated with ceramic reinforced PLA scaffolds for tissue engineering. *Bone* 42:554–564.
53. Apalangya VA, Rangari VK, Tiimob BJ, Jeelani S, Samuel T (2019) Eggshell Based Nano-Engineered Hydroxyapatite and Poly(lactic) Acid Electrospun Fibers as Potential Tissue Scaffold. *International Journal of Biomaterials* 2019:6762575.
54. Izquierdo-Barba I, Ruiz-González L, Doadrio JC, González-Calbet JM, Vallet-Regí M (2005) Tissue regeneration: A new property of mesoporous materials. *Solid State Sciences* 7:983–989.
55. Mendoza-Barrera C (2005) Estudio de interacciones de Estaterina con superficies de hidroxiapatita: Análisis de superficie. *Superficies y Vacío* 18:31–34.

56. Stloukal P, Novak I, Mičušík M, Prochazka M, Kucharczyk P, Chodák I, Lehocký M, Sedlarik V (2017) The Effect of Plasma Treatment on the Release Kinetics of a Chemotherapy Drug from Biodegradable Polyester Films and Polyester-Urethane Films. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 67. doi:10.1080/00914037.2017.1309543.
57. Ni M, Ratner BD (2008) Differentiating calcium carbonate polymorphs by surface analysis techniques—an XPS and TOF-SIMS study. *Surface and Interface Analysis* 40:1356–1361.
58. Lu HB, Campbell CT, Graham DJ, Ratner BD (2000) Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS. *Analytical chemistry* 72:2886–2894.
59. Kontoyannis C, Vagenas N (2000) Calcium Carbonate Phase Analysis Using XRD and FT–Raman Spectroscopy. *Analyst* 125:251–255.
60. Widyastuti S, P. IAK (2017) Synthesis and characterization of CaCO₃ (calcite) nano particles from cockle shells (*Anadara granosa* Linn) by precipitation method. *AIP Conference Proceedings* 1855:30018.
61. Gonzalez G, Sagarzazu A, Cordova A, Gomes ME, Salas J, Contreras L, Noris-Suarez K, Lascano L (2018) Comparative study of two silica mesoporous materials (SBA-16 and SBA-15) modified with a hydroxyapatite layer for clindamycin controlled delivery. *Microporous and Mesoporous Materials* 256:251–265.
62. Knight E, Przyborski S (2015) Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of anatomy*

227:746–756.

63. Fang Y, Eglén RM (2017) Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D* 22:456–472.
64. Pao S-I, Chien K-H, Lin H-T, Tai M-C, Chen J-T, Liang C-M (2017) Effect of microgravity on the mesenchymal stem cell characteristics of limbal fibroblasts. *Journal of the Chinese Medical Association* 80:595–607.
65. McMillen P, Holley SA (2015) Integration of cell–cell and cell–ECM adhesion in vertebrate morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 36:48–53.
66. Baptista LS, Kronemberger GS, Côrtes I, Charelli LE, Matsui RAM, Palhares TN, Sohier J, Rossi AM, Granjeiro JM (2018) Adult Stem Cells Spheroids to Optimize Cell Colonization in Scaffolds for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *International journal of molecular sciences* 19:1285.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

8.- PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DURANTE EL DOCTORADO

8.1- PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Año

- 2017 Vargas-Osorio, Z., **Chanes-Cuevas O. A.**, Pérez-Soria, A., García-Hipolito, M., Alvarez-Fregoso, O. and Alvarez-Perez, M.A. (2017), Physicochemical effects of amino- or sulfur-functional groups onto SBA-15 sol-gel synthesized mesoporous ceramic material. *Phys. Status Solidi C*, 14: 1600099.
- 2018 Mendieta-Barrañon I. DDS, **Chanes-Cuevas O. A.** DDS, MSc, Álvarez-Pérez M. A. PhD, González-Alva P. DDS, PhD, Medina L. A. PhD, Aguilar-Franco M. MSc, & Serrano-Bello J. DDS, MSc, PhD. (2018). Physicochemical and Tissue Response of PLA Nanofiber Scaffolds Sterilized by Different Techniques. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, 21(3), 77-88.
- 2018 **Chanes-Cuevas O. A.**; Pérez Soria A.; Cruz-Maya I.; Guarino V.; Alvarez-Perez M. A. (2018) Macro-, micro- and mesoporous materials for tissue engineering applications. *AIMS Materials Science* 5(6):1124–40.
- 2019 Vazquez-Vazquez F. C., **Chanes-Cuevas O. A.**, Masuoka D., Alatorre J. A., Chavarria- Bolanos D., Vega-Baudrit J. R., Serrano-Bello J., Alvarez-Perez M. A. (2019). Biocompatibility of Developing 3D-Printed Tubular Scaffold Coated with Nanofibers for Bone Applications. *Journal of Nanomaterials*.
- 2020 **Chanes-Cuevas O.A.** et al. (2020) Synthesis of PLA/SBA-15 Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Mat. Res.*, vol.23, n.5, e20200211. ISSN 1980-5373.

8.2- CAPÍTULOS DE LIBROS

Año

- 2018 Vázquez-Vázquez F., Hernández-Tapia L., **Chanes-Cuevas O. A.**, Álvarez-Pérez M. A., Pozos-Guillen A. Chapter 7- Airflow electrofluidodynamics In book: *Electrofluidodynamic Technologies (EFDTs) for Biomaterials and Medical Devices*
Edit. Woodhead Publishing, (2018) Pages 123-138, ISBN 9780081017456.
- 2020 **Chanes-Cuevas O.A.**, Barrera-Bernal J.L., Gaitàn-S I., Masuoka D. Chapter 4- Calcium Phosphate and Bioactive Glasses. In book: *Current Advances in Oral and Craniofacial Tissue Engineering*
Edit. CRC Press, (2020) Pages 48-60, ISBN 1138390917, 9781138390911.
- 2020 Suaste-Olmos F., González-Àlva P., Vega-Jimenez A., **Chanes-Cuevas O.A.** Chapter 12- Gene Therapy in Oral Tissue Regeneration. In book: *Current Advances in Oral and Craniofacial Tissue Engineering*
Edit. CRC Press, (2020) Pages 182-196, ISBN 1138390917, 9781138390911.

8.3- ASISTENCIAS Y PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Año

- 2017 May Cancún, Quintana Roo, México. XXIX Congreso Nacional e Internacional de Posgrado e Investigación en Odontología y Congreso Anual de Alumnos de Diplomados. Facultad de Odontología, UNAM.
- 2017 May Cancún, Quintana Roo, México. Encuentro Académico de la División Mexicana de la International Association for Dental Research

- (IADR). Facultad de Odontología, UNAM.
- 2017** Nov Zacatecas, México. XXV Encuentro Nacional y XVI Iberoamericano de Investigación en Odontología y las IV Jornadas de Investigación en Odontología de la UAO/UAZ. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- 2018** Nov León, Guanajuato, México. XXVI Encuentro Nacional y XVII Iberoamericano de Investigación en Odontología. UNAM, ENES-LEÓN.
- 2019** May Cancún, Quintana Roo, México. Encuentro Académico de la División Mexicana de la International Association for Dental Research (IADR). Facultad de Odontología, UNAM.
- 2019** Nov Jalisco, México. XXVI Encuentro Nacional y XVII Iberoamericano de Investigación en Odontología. Universidad Autónoma de Guadalajara, Facultad de Odontología.