



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

**Desarrollo de andamios por la técnica de
electrofluidodinámica integrada para su aplicación
en la regeneración de tejidos dentales**

Tesis

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en ciencias

PRESENTA:

Mtro. en Ciencias Rodrigo Alberto Osorio Arciniega

TUTOR:

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, NOVIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**
(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción 1 y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado "Desarrollo de andamios por la técnica de electrofluidodinámica integrada para su aplicación en la regeneración de tejidos dentales" que presenté para obtener el grado de Doctorado en Ciencias es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Rodrigo Alberto Osorio Arciniega

Número de cuenta: 411091020

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Vo. Bo. Tutor principal

Dedicatoria

A mi querida madre, Dra. Ma. Del Rosario Arciniega Prieto, cuyo amor infinito e incondicional me ha guiado hacia la realización de mis sueños, y cuya resiliencia y enseñanzas me han moldeado como ser humano.

A mi padre, Dr. Carlos Alberto Osorio Aranda, siento tu amor y protección a pesar de la distancia que nos separa; sé que te hubiera llenado de orgullo compartir este logro conmigo.

A mi apreciada hermana, Mta. Ma. Ariadne Osorio Arciniega, por ser mi confidente y por tu generosidad, abriéndome el camino para lograr mis metas. Tus momentos de reflexión y serenidad han sido un pilar en mi vida.

A mi futura esposa, MVZ. Leticia Cabrera Mexicano, por ser el pilar fundamental de mi vida, por tu apoyo inquebrantable, tu amor profundo y persistente en cada paso que doy.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, quien más allá de ser un asesor, ha sido un amigo y mentor durante mi trayectoria doctoral, brindándome la oportunidad de alcanzar mis objetivos siempre con palabras de aliento y consejos.

A mis sinodales, Dra. Laura Susana Acosta Torres, Dra. Genoveva Hernández Padrón, Dra. Janneth Serrano Bello, Dr. Manuel García Hipólito, y al Dr. Octavio Álvarez Fregoso, por su invaluable ayuda, contribuciones intelectuales y materiales que han enriquecido significativamente mi proyecto doctoral.

A mis compañeros de laboratorio Lucy, Diana, Íñigo, Adrián, Moisés, Fernanda, Cristian, David, Febe por su ayuda incansable y su apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis dedicados alumnos del Instituto Tecnológico Purépecha -Cherán Michoacán: Magy, Ramiro, Xcaret, Christian, Vianney y Karla, por resaltar la importancia de la educación y hacerme sentir orgulloso al verlos conquistar sus sueños.

Finalmente, a CONAHCYT, por su beca (número: 613415) otorgada durante mis estudios de Doctorado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud en la UNAM. a los centros IIM, ICAT -UNAM y a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las oportunidades y recursos necesarios para realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco el apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM: PAPIIT IN213821 que ha permitido la realización de esta investigación.

Agradezco el apoyo por parte del CONAHCYT 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 de tesis de Doctorado.

Gracias a todos por ser una parte fundamental de mi vida y por contribuir a mi crecimiento personal y académico. Cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en mi corazón.

Contenido de la tesis

Páginas

Resumen	6
Abstract	7
2 Capítulo 1. Introducción	8
1.1 El hueso.....	8
1.2 Composición ósea	9
1.2.1 Células óseas	9
1.2.2 Osteoblastos.....	10
1.2.3 Osteonas y osteocitos	11
1.2.4 Osteoclastos	13
1.2.5 Matriz ósea	15
1.3 Fisiología ósea.....	16
1.3.1 Mineralización.....	16
1.3.2 Formación ósea	17
1.3.3 Crecimiento y modelado óseo.....	18
1.3.4 Remodelación ósea.....	19
1.3.5 Defectos óseos	20
1.3.6 Ingeniería de tejidos.....	21
1.3.7 Tipos de injertos.....	23
1.4 Antecedentes.....	25
1.4.1 Andamios para regeneración ósea	25
1.4.2 Técnicas para la fabricación de andamios para regeneración ósea.....	26
1.4.3 Biopolímeros.....	27
1.4.4 Polímero ácido poliláctico	28
1.4.5 Nanocristales luminiscentes (LNCs)	30
1.4.6 Granate de óxido de itrio-aluminio (YAG)	31
1.5 Justificación	34
1.6 Hipótesis	34
1.7 Objetivos.....	34
1.7.1 Objetivo General	34
1.7.2 Objetivo Específicos	35
3 Capítulo 2. Metodología	36
3.1 Síntesis de nanopartículas luminiscentes YAG:Ce ³⁺ , YAG:Eu ³⁺ , YAG:Tm ³⁺ , YAG:Merge por el método de sol-gel.....	36
3.2 Síntesis de nano/microfibras dopadas con nanocristales luminiscentes	38
3.3 Técnicas de caracterización de los nanocristales luminiscentes (LNCs)	39
3.4 Difracción de rayos-X (XRD)	39
3.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	40

3.6	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	40
3.7	Dispersión dinámica de luz (DLS)	41
3.8	Análisis espectroscópico mediante infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y técnica de reflectancia total atenuada (ATR)	41
3.9	Espectroscopía Raman	42
3.10	Estudios de fotoluminiscencia (PL)	42
3.11	Técnicas de caracterización de las fibras poliméricas	43
3.12	Microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM).....	43
3.13	Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	43
3.14	Análisis de humectabilidad	44
3.15	Pruebas mecánicas	44
3.16	Caracterización biológica <i>in vitro</i>	44
3.17	Cultivo celular	45
3.18	Interacción celular con andamios composites	45
3.19	Viabilidad celular	45
3.20	Adhesión celular	46
3.21	Tinción de alizarina roja	46
3.22	Diseño del estudio en modelo animal	47
3.23	Declaración ética	47
3.24	Ensayo <i>in vivo</i> : implantación de andamios	48
3.25	Análisis fotoluminiscentes <i>in situ</i> de andamios implantados	49
3.26	Diagnóstico histopatológico de andamios preparados <i>ex vivo</i>	49
3.27	Clasificación de la enfermedad del injerto contra el huésped aguda por severidad (GHVD)	49
3.28	Análisis estadístico	50
4	Capítulo 3. Discusión y resultados	51
4.1	Caracterización de nanocristales luminiscentes (LNCs) de YAG: Ce ³⁺ / YAG: Eu ³⁺ / YAG: Tm ³⁺ y YAG:Merge	51
4.1.1	Difracción de rayos-X (XRD).....	51
4.1.2	Evaluación de fotoluminiscencia y pruebas visuales	54
4.1.3	Caracterización morfológica y microestructural por microscopía electrónica de barrido (SEM)	59
4.1.4	Evaluación por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	62
4.1.5	Análisis del comportamiento coloidal y tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica (DLS)	64
4.1.6	Análisis espectroscópico por infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y reflectancia total atenuada (ATR).....	66
4.1.7	Caracterización mediante espectroscopía Raman.....	69
4.2	Propiedades y estructura de andamios de PLA:YAG/Nanocristales.....	71
4.2.1	Comparación morfológica de composites nanoestructurados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía óptica.....	71

4.2.2	Propiedades fluorescentes de los andamios dopados con nanocristales.....	74
4.2.3	Evaluación espectroscópica mediante infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), reflectancia total atenuada (ATR) y espectroscopía Raman.	76
4.2.4	Análisis calorimétrico: TGA y DSC.....	78
4.2.5	Ensayo de humectabilidad	80
4.2.6	Pruebas mecánicas	82
4.2.7	Análisis <i>in vitro</i>	85
4.2.8	Viabilidad celular.....	85
4.2.9	Adhesión celular	86
4.2.10	Ensayos de mineralización.....	90
4.3	Evaluación de tejido <i>in vivo</i>	92
4.3.1	Análisis <i>in situ</i>	92
4.3.2	Análisis H&E	93
	A los 7 días:	96
	A los 21 días:	96
4.3.3	Análisis tinción tricrómica de Masson , CD34 y P-S100	99
4.3.4	Diagnóstico histopatológico de implante y correlación de la severidad de GVHD (Enfermedad de injerto contra huésped).....	105
5	Capítulo 4. Discusión.....	110
6	Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas	119
7	Literatura citada.....	122
	Anexos.....	IX

Índice de imágenes

Páginas

1 Actividad osteoblástica en el proceso de remodelación ósea	11
2 Esquema osteonas-osteocitos y su organización en el hueso cortical	13
3 Esquema resorción ósea.....	15
4 Proceso de defectos óseos	21
5 Aspectos considerables en la ingeniería de tejidos	22
6 Tipos de injertos naturales vs sintéticos	24
7 Diagrama esquemático de la técnica airjet spraying	27
8 Fotoexcitación y luminiscencia.....	31
9 Imagen representativa del desarrollo de nps de elementos de tierras raras	33
10 Resumen gráfico	35
11 Diagrama de flujo del método de síntesis sol-gel	37
12 Diagrama de flujo del método de síntesis de los andamios fibrilares de pla por el método air-jet spraying (ajs).....	39
13 Metodología in vivo	48
14 Cristalización formada.....	52
15 Patrones de difracción de rayos-x.....	54
16 Espectros de excitación y emisión de fotoluminiscencia	58
17 Espectros de fotoluminiscencia.....	59
18 Micrografías sem de los diferentes ncs.....	62
19 Dimensiones de los nanocristales (ncs).....	64
20 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de fourier.....	66
21 Espectros de reflectancia total atenuada (atr)	68
22 Resultados de espectroscopía raman	69
23 Imágenes de microscopía óptica	70
24 Análisis morfológico sem.....	73
25 Fotoluminiscencia en tiempo real de andamios.....	74
26 Análisis espectroscópico de andamios	76

27 Evaluación de la estabilidad térmica.....	78
28 Ensayo de humectabilidad.....	80
29 Análisis de resistencia	81
30 Viabilidad celular línea hfob.....	84
31 Adhesión celular a las 24 y 48 horas.....	86
32 Fotografías por microscópicas óptica de andamio irradiado a 450 nm.....	88
33 Tinción de rojo de alizarina para depósitos calcificados.....	89
34 Incremento de nódulos calcificados	91
35 Evaluación fotoluminiscente in situ	92
36 Integración de andamios y respuesta inflamatoria.....	93
37 Integración, inflamación y degradación de los andamios compuestos.....	98
38 Integración, inflamación y degradación de los andamios compuestos.....	99
39 Evaluación histológica de andamios post-implantación.....	103
40 Respuestas inflamatorias	104
41. Evaluación de degeneración y desmoplasia	105
42. Esquema evolutivo	107
43. Intercambio iónico.....	121

Índice de tablas y esquemas

Páginas

1. Síntesis y aplicaciones del PLA en	30
2 Valores promedios de las LNCs.....	53
3. Análisis por elemento finito de las propiedades mecánicas del diente	83
4 Clasificación y manifestaciones histopatológicas de la GvHD aguda.....	107
5 Diagnóstico histopatológico del implante y correlación con la severidad de la GVHD.....	109

Resumen

A nivel global, ha habido un incremento exponencial en lesiones óseas y fracturas durante la última década. La aplicación de elementos de tierras raras (ETR) ha sido objeto de extensa investigación como biomarcadores de cáncer para detección temprana, sondas de imágenes y entrega de medicamentos. Además, los ETR se han estudiado como recursos estratégicos para desarrollar materiales implantables para la regeneración ósea, optimizando propiedades mecánicas, rastreando células, induciendo respuestas celulares y regulando el microambiente local en la reparación de tejidos duros humanos, debido a su bioactividad y similitud con los minerales encontrados en dientes y huesos. Sin embargo, ha habido una investigación limitada sobre el seguimiento de la degradación continua de biomateriales con el tiempo y si la holgura o desprendimiento de implantes está relacionado con la degradación gradual.

Este estudio proporciona información sobre la formación de fibras composite por el rociado de chorro de aire de PLA codopado con lantánidos Ce^{3+} , Eu^{3+} y Tm^{3+} , para potenciar la regeneración del tejido óseo. Un enfoque novedoso para el monitoreo de fluorescencia a largo plazo de andamios de PLA implantados durante la regeneración ósea fue facilitado por la alta distribución de material y los mínimos efectos de extinción de nanopartículas de conversión ascendente. Los resultados demostraron que almacenar nanopartículas luminiscentes y lograr una liberación efectiva de nanopartículas puede convertirlo en un biomaterial potencial para la reparación ósea y una herramienta prometedora para el seguimiento multimodal de por vida mejorando el rendimiento osteogénico.

Palabras clave: Andamio compuesto, elementos de tierras raras, ácido poliláctico (PLA), nanopartículas luminiscentes.

Abstract

Globally, there has been an exponential surge in bone injuries and fractures over the last decade. The utilization of rare earth elements (REEs) has undergone extensive research, serving as cancer biolabels for early detection, imaging probes, and drug delivery systems. The REEs have also been analyzed as strategic assets for creating implantable materials conducive to bone regeneration, optimizing mechanical properties, tracking cells, eliciting cellular responses, and managing the local microenvironment in the repair of human hard tissues, owing to their bioactivity and resemblance to minerals located in teeth and bones. Nevertheless, there has been restricted research on monitoring the ongoing degradation of biomaterials over time and whether the looseness or detachment of implants is associated with gradual degradation.

This study offers insights into the air jet spraying of PLA composite codoped with Ce^{3+} , Eu^{3+} , and Tm^{3+} lanthanides to augment bone tissue regeneration. A groundbreaking approach for the long-term fluorescence monitoring of implanted PLA scaffolds during bone regeneration was enabled by the extensive material distribution and minimal quenching effects of up-conversion nanoparticles. The outcomes indicated that storing luminescent nanoparticles and achieving effective nanoparticle release can render it a potential biomaterial for bone repair and a viable tool for lifelong multimodal tracking, thereby enhancing osteogenic performance.

Keywords: Composite scaffold, rare earth elements, polylactic acid (PLA), luminescent nanoparticles.

Capítulo 1. Introducción

1.1 El hueso

El hueso es el segundo tejido mayormente trasplantado en todo el mundo. Anualmente, se calcula que más de cuatro millones de operaciones utilizan injertos óseos o materiales de sustitución ósea para tratar dichos defectos óseos (J. Liu et al., 2019; X. Liu et al., 2019). El esqueleto humano adulto consta de 213 huesos, sin considerar los sesamoideos (huesos en cápsula fibrosa que envuelve algunas articulaciones). El hueso, comprende al tejido conectivo activo, no solo brinda soporte y facilita el movimiento, sino que también protege estructuras vitales, almacena minerales y factores de crecimiento, así como citocinas, que son glicoproteínas que median interacciones autocrinas o paracrinas en diversos tejidos (Macdonald & Gowen, 1992).

Además, ofrece un entorno propicio para la hematopoyesis (producción de células sanguíneas) en la médula ósea. Resulta relevante destacar que el hueso se encuentra en constante remodelación, adaptándose a cambios biomecánicos y reemplazando tejido dañado, lo que garantiza su resistencia. En términos de clasificación, los huesos se pueden categorizar en largos, como el fémur; cortos, representados por huesos como los carpianos; planos, ejemplificados por el cráneo; e irregulares, como las vértebras. Es interesante señalar que los huesos planos se originan a través de la osificación membranosa, mientras que los huesos largos resultan de una combinación de formaciones endocondral y membranosa (Buck & Dumanian, 2012; Clarke, 2008).

El hueso maduro se clasifica en tres tipos histológicos principales: i) cortical o compacto, ii) trabecular o calloso, y iii) periostio. El hueso cortical, que representa el 80% del esqueleto humano adulto, es denso y rodea la médula ósea. Se caracteriza por tener una matriz externa compacta con vasos sanguíneos y osteocitos localizados en las osteonas, también conocidos como sistemas

haversianos. Estas osteonas son cilíndricas y presentan un diseño lamelar en el que las fibrillas de colágeno se organizan alternadamente, ofreciendo resistencia similar a la madera multilaminada (Valtanen et al., 2021).

El hueso trabecular, que comprende el 20% restante del esqueleto, tiene una estructura tipo panal formada por trabéculas y cavidades con médula ósea roja. A diferencia del hueso cortical, el trabecular no posee un sistema haversiano, pero sus paquetes, de forma semilunar, también muestran un patrón lamelar (Valtanen et al., 2021).

El periostio, la capa más externa del hueso, es una membrana vascular delgada que contiene osteoblastos y células progenitoras, y tiene la capacidad de formar hueso nuevo. Esta membrana, además de vasos sanguíneos y células óseas, se adhiere firmemente al hueso a través de las fibras de Sharpey. Por otro lado, el endostio recubre internamente el hueso, manteniendo una relación con la médula ósea y albergando también células y vasos sanguíneos. Es esencial destacar la función de la matriz extracelular en la formación ósea y la disposición desordenada de fibrillas de colágeno en el tejido óseo, haciéndolo más frágil (Hofmann et al., 2007a; Safadi et al., 2009; Sommer et al., 2017).

1.2 Composición ósea

1.2.1 Células óseas

Las células esenciales para la biología ósea son los osteoblastos (mineralización-formadores óseos), osteocitos y osteoclastos (reabsorbentes óseos). Mientras que los osteoblastos y osteocitos provienen de células madre mesenquimales, los osteoclastos se originan de células madre hematopoyéticas y están relacionados con los monocitos/macrófagos (Melke et al., 2016).

1.2.2 Osteoblastos

Los osteoblastos se originan de células troncales mesenquimales pluripotentes, células que surgen de 3 capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo (Kolios & Moodley, 2012; Takahashi & Yamanaka, 2006). Estas son capaces de transformarse en múltiples células de tejido conectivo (osteoblastos, condroblastos y células estromales), pudiendo diferenciarse en hueso, cartílago, y tejido adiposo. En condiciones adecuadas, estas células se convierten en células osteoprogenitoras, precursores directos de osteoblastos. Estos precursores están presentes en áreas como el periostio y la médula ósea. Diferentes subpoblaciones dentro de los osteoblastos reaccionan de manera única ante diversas vías de señalización celular, lo que explica la heterogeneidad en diferentes áreas esqueléticas. La vía Wnt/ β -catenina es esencial para la diferenciación de estas células madre hacia osteoblastos. Este sistema juega un papel fundamental en el desarrollo esquelético.

Los osteoblastos, generalmente de forma cúbica o columnar, juegan un papel vital en la formación de hueso, siendo responsables de producir componentes esenciales del hueso, como el colágeno tipo I y proteoglicanos. Participan activamente en la mineralización ósea, liberando vesículas que depositan calcio y fosfato. A nivel celular, los osteoblastos poseen estructuras similares al retículo endoplásmico rugoso y al aparato de Golgi, reflejando su papel en la producción de proteínas. Además de colágeno, producen proteínas como osteocalcina (OC) y osteopontina (OP), esenciales para su función; como se muestra en la Fig. 1.

Estas células no solo son fabricantes de hueso; también secretan citocinas, factores de crecimiento y proteínas que influyen en la biología ósea y en la formación de otras células, como los osteoclastos. De hecho, secretan la proteína RANK ligando, vital para la diferenciación de osteoclastos. Los osteoblastos son sensibles a estímulos mecánicos y hormonales, como la parathormona (PTH) y la vitamina D, cruciales para la regulación ósea. La constante tensión mecánica es esencial para el hueso, y los osteoblastos responden a ella para modificar el tamaño y forma del

mismo (Jin et al., 2021; C. Li et al., 2021; Safadi et al., 2009). Finalmente, en áreas sin formación ósea activa, encontramos células que revisten el hueso. Estas células son osteoblastos inactivos que pueden reactivarse en situaciones como la reparación de fracturas.

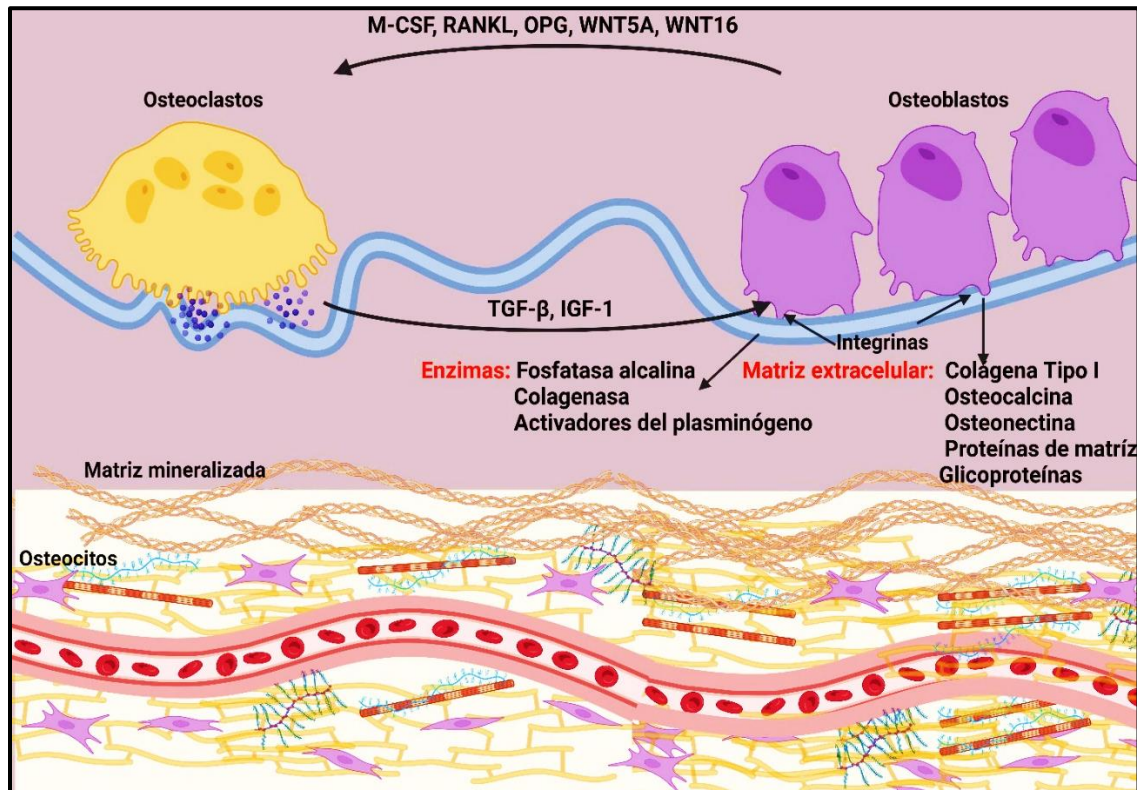


Figura 1. Actividad osteoblástica en el proceso de remodelación ósea. La remodelación comienza con la apoptosis de los osteocitos y el reclutamiento de pre-osteoclastos mediado por RANKL (Fase de Activación), seguido de la osteoclastogénesis. Los osteoclastos resorben el hueso (Fase de Resorción), permitiendo así la liberación de factores generalmente almacenados en la matriz ósea, que reclutan a los osteoblastos en la zona reabsorbida (Fase de Reversión). Una vez reclutados, los osteoblastos producen la nueva matriz ósea y promueven su mineralización (Fase de Formación). *Elaboración propia con la aplicación BioRender. apoyado por Kim et al. (2020).*

1.2.3 Osteonas y osteocitos

Las osteonas, también conocidas como sistemas de Havers, son estructuras

microscópicas fundamentales en el tejido óseo. Estas unidades anatómicas se encuentran en el interior del hueso compacto y desempeñan un papel crucial en la función y la resistencia del esqueleto. Las osteonas están compuestas por una serie de componentes interrelacionados, como fibras de colágeno, cristales de apatita, osteocitos y un sistema de canales, que trabajan en conjunto para mantener la integridad y la remodelación del tejido óseo. A través de este intrincado sistema, las osteonas contribuyen al soporte estructural del cuerpo y a la adaptación del hueso a las demandas físicas cambiantes (Chang & Liu, 2022). Los osteocitos se encuentran alojados dentro del hueso, y constituyen entre el 90% y 95% de todas las células óseas. Estas células evolucionan a partir de osteoblastos que quedan atrapados en la matriz ósea que ellos mismos producen. Residen en espacios conocidos como “*lacunas*” o lagunas óseas y tienen funciones críticas en la señalización celular y en la preservación de la matriz ósea.

Estas células tienen la capacidad de interconectarse y comunicarse entre sí y con los osteoblastos a través de una red denominada “*canalículos*” o canalículos. Como se muestra en la Fig. 2, esta red permite que los osteocitos en el interior del hueso se comuniquen entre ellos y con células externas a la matriz ósea. Son especialmente importantes en la transformación de cargas mecánicas en eventos celulares, lo que afecta la formación y remodelación ósea. Un aspecto notable es que los osteocitos pueden estimular a los osteoblastos mediante la expresión de un factor específico de osteoblastos, el OSF-1. Además, una proteína, DMP1, es expresada en grandes cantidades por los osteocitos. Esta proteína juega un papel en la mineralización esquelética y la regulación del fosfato (Buck & Dumanian, 2012).

Los osteocitos secretan esclerostina, un inhibidor de la formación ósea. Se ha descubierto que la ausencia de este inhibidor puede conducir a enfermedades como la esclerosteosis. Estas células también poseen receptores para la parathormona (PTH), esencial para la regulación del metabolismo mineral. Además, los osteocitos muestran características comunes con las células nerviosas, como la presencia de receptores NMDA, asociados con la neurotransmisión.

Por último, estos osteocitos actúan como sensores de las fuerzas mecánicas que actúan sobre el hueso. Están rodeados por una fina capa de matriz no mineralizada, lo que les permite detectar el flujo de fluido que pasa por encima de ellos en respuesta a cargas mecánicas. Esta habilidad mecanosensorial es fundamental para el proceso de remodelación ósea (Safadi et al., 2009).

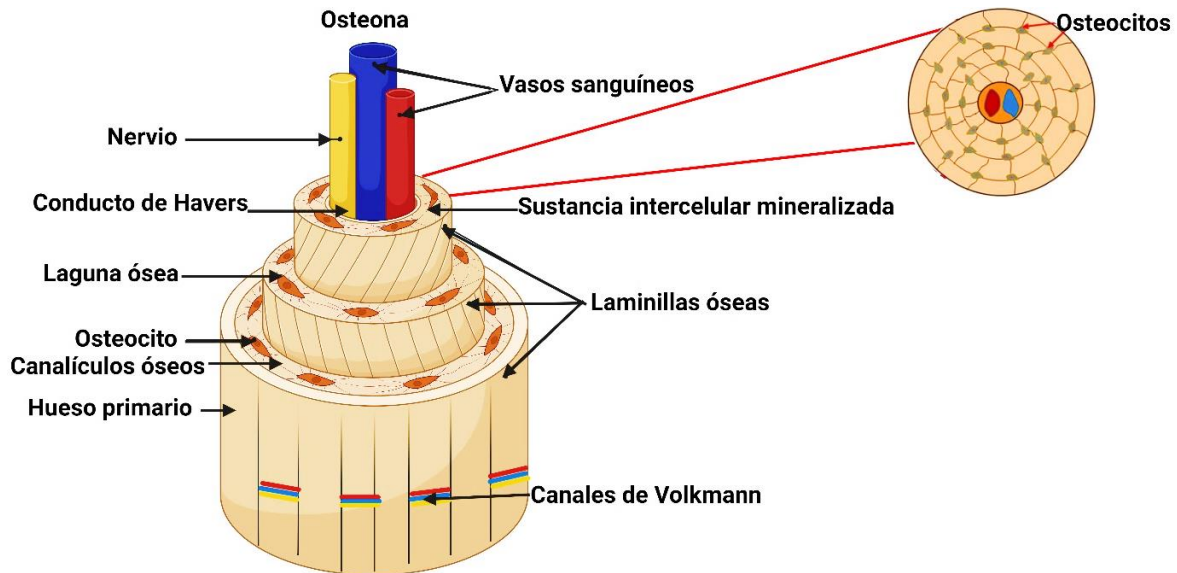


Figura 2. Esquema osteonas-osteocitos y su organización en el hueso cortical. Ilustración de osteonas, que muestra los cuatro componentes de una osteona secundaria madura, incluyendo osteocitos, red lagunas-canales, láminas, conducto de Havers (izquierda), y la organización espacial de hueso primario, hueso intersticial y osteonas dentro del hueso cortical (derecha). *Elaboración propia con la aplicación BioRender. apoyado por Chang & Liu, (2022).*

1.2.4 Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas, con un rango general de 3 a 25 núcleos por célula. Estas células desempeñan el papel primordial en la resorción ósea, esencial para el recambio y remodelación del tejido óseo. Estos se originan del linaje de monocitos/macrófagos y, aunque tienen orígenes distintos a los osteoblastos, su formación depende en parte de la presencia de osteoblastos y de

un conjunto de citoquinas críticas como RANKL, interleucinas y factores estimulantes de colonias (CSF). RANKL, es un miembro de la super familia del factor de necrosis tumoral (TNF), es esencial para la diferenciación de los osteoclastos. Mientras que M-CSF juega un papel en la proliferación y supervivencia de los precursores de osteoclastos. Específicamente, las citoquinas como la PTH y 1,25 dihidroxivitamina D3 fomentan la osteoclastogénesis, mientras que la calcitonina actúa como un inhibidor (Buck & Dumanian, 2012; Clarke, 2008).

Los osteoclastos operan en áreas específicas de resorción, ubicándose en cavidades conocidas como lagunas de Howship cuando están activamente resorbiendo el hueso. En el proceso de resorción, los osteoclastos secretan iones de hidrógeno y la enzima cathepsina K. Mientras los iones de hidrógeno disuelven la componente mineral del hueso, cathepsina K degrada la matriz proteica, principalmente el colágeno tipo I. Además, tienen la capacidad de perforar el hueso cortical, formando canales que permiten el paso de vasos y nervios. Un rasgo distintivo de los osteoclastos activos es su "*ruffled border*" o borde rugoso, que está en contacto directo con la matriz ósea durante la resorción (Fig.3). Alrededor de esta zona rugosa, se encuentra la "zona clara", un área de adhesión al hueso que se caracteriza por su rica concentración de microfilamentos e integrinas, formando un anillo de actina visible microscópicamente (Buck & Dumanian, 2012).

Dentro de su estructura citoplasmática, los osteoclastos albergan una serie de enzimas y orgánulos. La fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) es una enzima clave en su función resorptiva, y la presencia de mitocondrias, lisosomas y vesículas enfatiza la naturaleza metabólicamente activa de estos osteoclastos. La combinación de estos elementos subraya la complejidad y vitalidad de los osteoclastos en el mantenimiento de la salud ósea. Finalmente, los osteoclastos se unen a la matriz ósea mediante receptores integrina. Al hacerlo, se polarizan y desarrollan un borde rugoso para la resorción. Durante este proceso, la estructura actínica del osteoclasto forma un anillo de actina, crucial para la resorción.

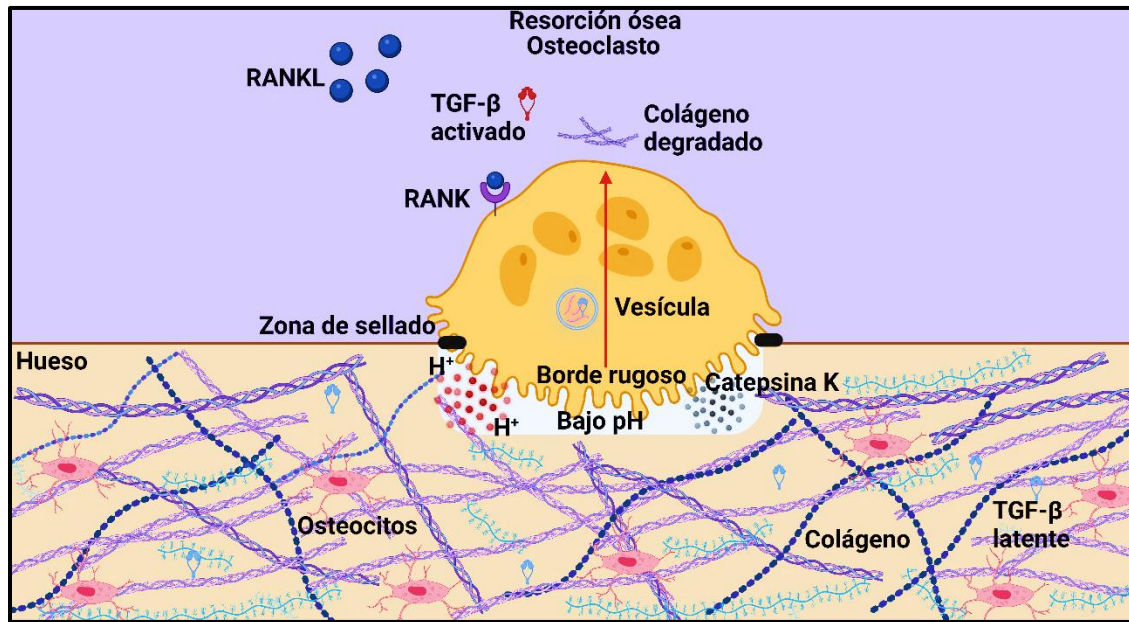


Figura 3. Esquema resorción ósea. El osteoclasto puede envaginar fragmentos de colágeno degradado, y posiblemente también el TGF- β , induciendo así directamente la formación de osteoclastos y la resorción ósea. Este proceso también conlleva la expresión de citocinas osteoclastogénicas en los osteocitos y la apoptosis de estos últimos como resultado de la liberación de citocinas osteoclastogénicas. *Elaboración propia con la aplicación BioRender. apoyado por Mostov & Werb, (1997).*

1.2.5 Matriz ósea

La matriz ósea es esencial para la estructura del hueso, representando alrededor del 90% de su volumen. Está compuesta por una matriz mineral, que es principalmente hidroxapatita (HAP) ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]\text{Ca}(\text{OH})_2$) (~70%), y constituye el 65%. Esta matriz mineral confiere resistencia y rigidez al hueso, albergando el 99% del calcio del cuerpo, 85% del fósforo y entre 40-60% de las reservas de magnesio y sodio. Sin ella, el hueso se torna blando y deformable, como en enfermedades como la osteomalacia o el raquitismo. La matriz orgánica, que representa el 20%, es secretada por los osteoblastos. Predominantemente está formada por colágeno tipo I (90%), pero también contiene proteoglicanos, glicoproteínas y factores de crecimiento esenciales para la formación, mineralización y remodelación ósea. Las

proteínas morfogenéticas óseas, descubiertas en 1965, son particularmente destacables, ya que son fundamentales para varios procesos de desarrollo embrionario y la salud ósea. Anomalías en esta matriz orgánica pueden conducir a enfermedades como la osteogénesis imperfecta, o enfermedad de los huesos quebradizos. Además, el hueso también contiene lípidos y agua, que representan el 15% restante, siendo ambos esenciales para su integridad y función (Clarke, 2008).

1.3 Fisiología ósea

1.3.1 Mineralización

La rigidez del hueso se adquiere a través de la mineralización. En este proceso, elementos como el calcio y el fosfato solubles se convierten en fosfato de calcio sólido o cristalino integrado en la matriz orgánica del hueso. A pesar de que este fenómeno aún no se comprende en su totalidad, se piensa que es dirigido por osteoblastos. Este proceso de mineralización ocurre entre 10 a 15 días tras la secreción de la matriz orgánica. El hueso está formado en su mayoría por un 50-70% de minerales, un 20-40% de matriz orgánica, un 5-10% de agua y un 3% de lípidos aproximadamente. Como se mencionó anteriormente, su componente mineral principal es la hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que se encuentra en cristales mucho más pequeños que los geológicos, haciéndolos más solubles y esenciales para el metabolismo mineral.

A medida que la matriz madura, se asocia con la expresión de fosfatasa alcalina y proteínas no colágenas, como osteocalcina, osteopontina y sialoproteína ósea. Estas proteínas, que se unen al calcio y al fosfato, ayudan a regular la deposición ordenada de minerales en el hueso. El mineral del hueso le otorga rigidez y resistencia, mientras que la matriz orgánica aporta elasticidad y flexibilidad. La mineralización inicial en el hueso parece ser facilitada por vesículas en la matriz

extracelular, sintetizadas por condrocitos y osteoblastos, que actúan como microentornos para la formación de cristales.

Existen agentes que promueven la mineralización, como la proteína de matriz dentinaria 1 y la sialoproteína ósea. Las cinasas fosfoproteínas y la fosfatasa alcalina también regulan este proceso. La fosfatasa alcalina ósea podría aumentar las concentraciones locales de fósforo, remover inhibidores del crecimiento cristalino o modificar fosfoproteínas para controlar su capacidad de actuar como núcleos de cristalización.

La vitamina D tiene un papel indirecto en la mineralización. Tras su absorción o producción en la piel, el hígado produce 25-hidroxivitamina D y los riñones producen 1,25-dihidroxivitamina D [1,25-(OH)₂D]. Esta última mantiene el calcio y el fósforo séricos en concentraciones adecuadas para la mineralización pasiva del hueso, principalmente al estimular la absorción intestinal de ambos minerales. También promueve la diferenciación de los osteoblastos e influye en otras células del esqueleto (Buck & Dumanian, 2012).

1.3.2 Formación ósea

El hueso es un tejido dinámico que se somete a un proceso constante de remodelación, asegurando su integridad y adaptabilidad. A lo largo de la vida, el hueso experimenta una renovación cíclica, en la que se equilibra la resorción del hueso existente y la formación de nuevo hueso. Esta renovación es vital, pues el esqueleto enfrenta cargas cíclicas y tensiones torsionales continuamente. Sin este proceso, el hueso excedería rápidamente sus límites de tolerancia. En un ciclo que dura entre 3 y 4 meses, áreas específicas del hueso son remodeladas en unidades llamadas Unidades de Remodelación Ósea (BRUs). Es un mecanismo que permite que aproximadamente el 25% del hueso trabecular activo y el 3% del hueso cortical se renueven anualmente. Sin embargo, con el paso de los años, la cantidad de hueso añadido en cada ciclo tiende a disminuir, posiblemente debido a una

reducción en el número de osteoblastos.

Dentro del feto, la formación ósea ocurre de dos maneras principales: la osificación endocondral y la osificación intramembranosa. La osificación endocondral implica la formación de hueso a través de un intermediario cartilaginoso y es esencial para la formación de huesos largos y su crecimiento longitudinal. Este proceso comienza con la proliferación de condrocitos en un marco de cartílago hialino, que pasa por distintas zonas de transformación hasta que se forma el hueso. Por otro lado, la osificación intramembranosa se refiere a la formación de hueso sin un intermediario cartilaginoso y es predominante en la formación de huesos planos.

Aquí, las células madre mesenquimales se diferencian directamente en osteoblastos para formar el hueso. La relación entre la resorción y formación ósea es un proceso complejo y aún no es completamente entendido. Aunque hay diversas teorías y evidencia emergente, se sugiere que ciertas citocinas, como IL-6, IL-1 e IL-11, podrían estar involucradas en la activación tanto de osteoclastos como de osteoblastos. Además, la liberación de factores estimulantes de osteoblastos durante la resorción ósea y otras interacciones moleculares podrían explicar este acoplamiento. Un entendimiento más profundo de este proceso ha llevado a tratamientos innovadores para enfermedades como la osteoporosis (Clarke, 2008).

Sin embargo, diversas enfermedades pueden alterar este delicado balance de remodelación. Condiciones como hiperparatiroidismo primario, hipertiroidismo y la enfermedad de Paget se caracterizan por una activación anormal de osteoclastos, lo cual puede tener consecuencias graves en la salud ósea del individuo. Este panorama nos muestra la importancia de la formación y remodelación ósea en la salud humana y la necesidad de investigar más a fondo para entender mejor estos procesos y cómo pueden ser afectados por diversas condiciones patológicas.

1.3.3 Crecimiento y modelado óseo

Los huesos largos crecen longitudinalmente mediante el proceso de osificación

endocondral en la fisis. Sin embargo, el crecimiento radial del hueso se produce mediante un proceso llamado crecimiento óseo aposicional. Este crecimiento se da a nivel del periostio con la posterior resorción del hueso antiguo a nivel del endostio. Las células progenitoras óseas en la capa de “*cambium*” son las responsables de este proceso. El crecimiento de los huesos faciales varía según la ubicación y está relacionado en gran medida con el proceso de crecimiento óseo aposicional. Además, tanto la osificación intramembranosa como la osificación endocondral contribuyen al cambio de tamaño y forma del esqueleto craneofacial durante el desarrollo. Se cree que el modelado del cráneo es señalado mediante señales de mecano-transducción provenientes del crecimiento subyacente del cerebro. La Ley de Wolff, popularizada en 1892, establece que los huesos cambian de forma para adaptarse a las tensiones que se les imponen. En efecto, el hueso sufre resorción en las zonas donde no experimenta tensión y se refuerza donde se aplican fuerzas de tensión. Por lo tanto, aunque el concepto de modelado tiene una función importante para optimizar la resistencia estructural del hueso, también puede tener efectos perjudiciales (Buck & Dumanian, 2012).

1.3.4 Remodelación ósea

La remodelación ósea es el proceso regulado de resorción y reemplazo del hueso con un pequeño cambio global en forma tridimensional. Es esencialmente el proceso de mantenimiento diario que mantiene los huesos saludables, ayuda en la regulación de la homeostasis del calcio y asiste en la reparación del hueso microdañado. La remodelación comienza al nacer y continúa hasta la muerte. Si bien el proceso parece ser en gran parte aleatorio, también está dirigido a áreas que requieren reparación. El resultado final de cada ciclo de remodelación es la producción de una nueva osteona o paquete trabecular.

1.3.5 Defectos óseos

La Organización Mundial de la Salud ha notado un aumento preocupante en enfermedades musculoesqueléticas entre 2010 y 2020, con costos de tratamiento en alza. Los defectos óseos son especialmente problemáticos y pueden ser causados por múltiples factores, desde traumas hasta enfermedades patológicas. Estos defectos, que suelen dañar el tejido blando y el flujo sanguíneo circundantes, limitan la autocuración del hueso.

Es crucial entender la diferencia entre un defecto óseo de "tamaño crítico" y una "no-uniión". El primero no sanará por sí solo y requiere tratamientos adicionales como injertos óseos, especialmente si supera los 2 cm o si hay una pérdida de más del 50% de la circunferencia ósea. Por otro lado, la "no-uniión" implica fallos en la señalización celular o inestabilidad biomecánica que impiden una correcta fusión ósea. En estos casos, la biología y estabilidad pueden ser adecuadas, pero la recuperación se ve afectada por la pérdida significativa de tejido óseo y posibles complicaciones adicionales, como el estado del tejido blando circundante (Amini et al., 2012). Pequeños defectos óseos usualmente sanan sin intervención adicional (Fig. 4). Sin embargo, si el defecto es lo suficientemente grande, puede llevar a complicaciones como falta de fusión o fracturas patológicas. La ingeniería de tejidos es una opción emergente que combina células, materiales y factores bioquímicos para desarrollar estructuras que faciliten la curación de estos defectos óseos.

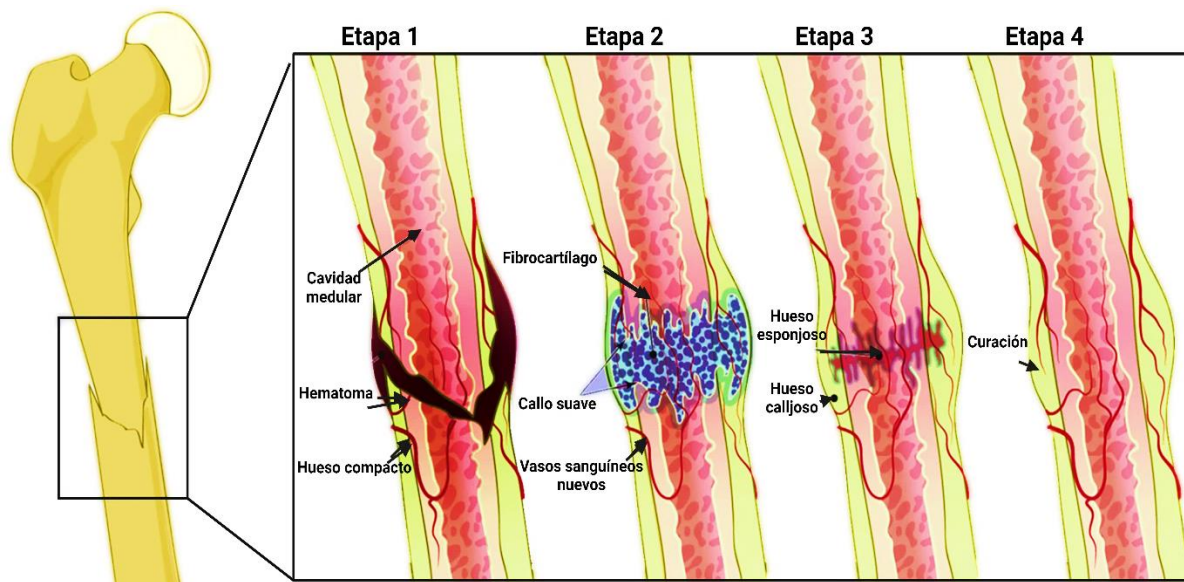


Figura 4. Proceso de defectos óseos. La curación de fracturas óseas es un proceso complejo que comienza con inflamación y la formación de un callo de cartílago. A medida que los osteoblastos se acumulan, este callo se transforma en hueso. Los osteoclastos luego absorben el callo, permitiendo que los osteoblastos restauren la estructura anatómica del hueso dañado y soporten la carga mecánica. Este proceso de curación ósea implica múltiples etapas y es fundamental para la recuperación de las lesiones óseas (Xiong & Xiong, 2022).

1.3.6 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario emergente que ha mostrado promesa particular en el tratamiento de enfermedades óseas, un problema creciente especialmente entre la población envejecida y personas con condiciones como la osteoporosis. Esta disciplina combina conocimientos de biología celular, ingeniería de materiales y bioquímica para crear andamios artificiales, estructuras que imitan al tejido óseo natural, para facilitar la regeneración y reparación de huesos dañados (Amini et al., 2012).

Utilizando biomateriales diseñados con características específicas, como la habilidad para conducir el crecimiento celular (osteoconductividad), inducir la formación de hueso (osteoinductividad), y albergar células que generan hueso (osteogénesis), la ingeniería de tejidos puede acelerar el proceso de curación.

Además, estos materiales se seleccionan por su alta biocompatibilidad, minimizando el riesgo de respuestas inflamatorias o toxicidad (S. Chen et al., 2022; C. Li et al., 2021).

A pesar de los avances significativos, el campo aún enfrenta desafíos. El metabolismo óseo es un sistema complejo y la investigación que requiere es larga y laboriosa, lo que limita el desarrollo a un ritmo más rápido. Aun así, la ingeniería de tejidos está progresando en solucionar problemas clínicos que hasta ahora eran intratables, ofreciendo una nueva esperanza para el tratamiento eficaz de defectos óseos y enfermedades relacionadas.

Esta tecnología también está adaptada para cumplir con las necesidades mecánicas del hueso humano, lo que es crucial para la transmisión adecuada de fuerzas y cargas en el cuerpo. Los productos de degradación de estos biomateriales están diseñados para ser no tóxicos, y su descomposición está sincronizada con el ritmo de crecimiento del nuevo tejido óseo. Su potencial para mejorar la calidad de vida de muchas personas es indiscutible, como se muestra en la Fig. 5 (Hofmann et al., 2007b; Melke et al., 2016; Sommer et al., 2017).

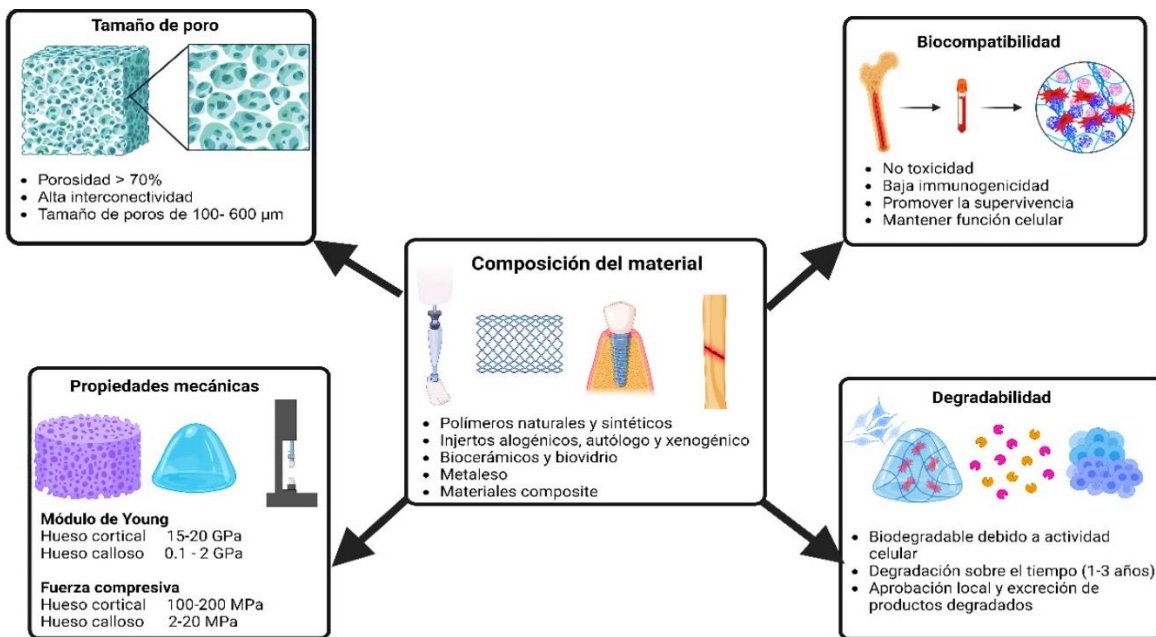


Figura 5. Aspectos considerables en la ingeniería de tejidos. Factores a considerar en el diseño de andamios y cómo interactúan entre sí. *Elaboración propia con la aplicación BioRender. apoyado por (Schulze et al., 2023).*

1.3.7 Tipos de injertos

Existen diferentes tipos de biomateriales utilizados debido a su capacidad regenerativa osteogénica. Algunos ejemplos son: el injerto óseo autógeno, el injerto óseo alogénico, o el uso de biomateriales sintéticos.

Los injertos óseos autógenos implican la extracción del hueso de un sitio (generalmente de la cresta ilíaca) del paciente y su trasplante a una zona dañada del mismo paciente. Abarcan el 58% de los sustitutos óseos y sigue siendo el más utilizado para la reconstrucción de pequeños defectos óseos. Estos poseen características osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas debido a la presencia de células osteogénicas y factores de crecimiento. Sin embargo, su uso se asocia con desventajas como morbilidad en el sitio del donante, suministro limitado de injertos, sangrado, dolor crónico, infecciones y malos resultados cosméticos (Hannink & Arts, 2011).

El aloinjerto, implica el trasplante de tejido óseo de un donante. Este tipo de injerto constituye el ~34% de los sustitutos óseos. Los injertos óseos alogénicos no están asociados con la morbilidad del sitio del donante y están disponibles en varias formas y tamaños. Sin embargo, hay varios inconvenientes asociados a los aloinjertos: riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, posibilidad de rechazo inmunológico, pérdida de propiedades biológicas y mecánicas debido a la esterilización del injerto. Además, la demanda de tejido aloinjerto supera con creces la oferta disponible (Zimmermann & Moghaddam, 2011).

Por otro lado, materiales bioinertes como la alúmina, el acero inoxidable y el poli (metacrilato de metilo) (PMMA) se han utilizado en una amplia gama de cirugías óseas. Las ventajas considerables de estos implantes frente a los injertos biológicos radican en su disponibilidad y reproducibilidad. Sin embargo, estos biomateriales no se integran bien con el hueso huésped y son encapsulados por el tejido fibroso después de su implantación en el cuerpo. La producción de residuos de desgaste y un alto desajuste de la rigidez entre los implantes de soporte de carga y el hueso adyacente son factores limitantes adicionales (O'Keefe & Mao, 2011).

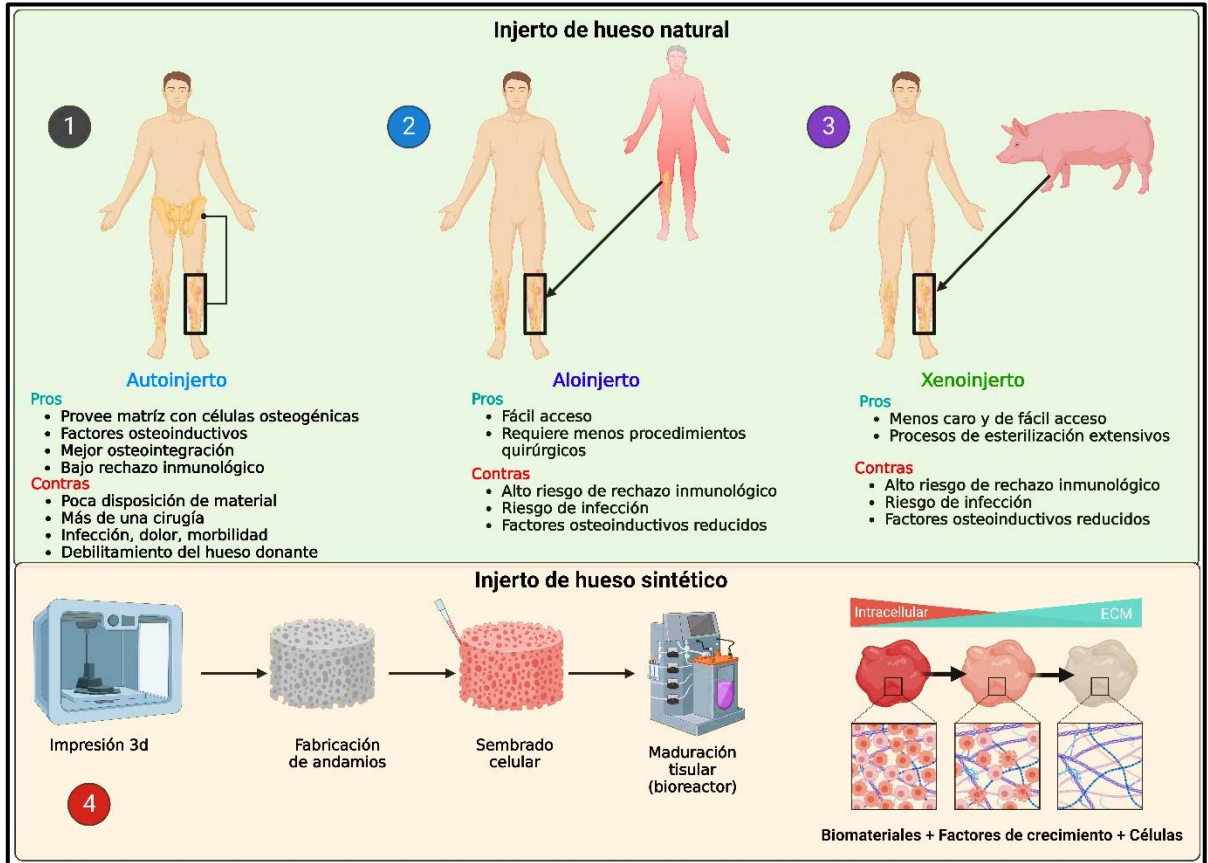


Figura 6. Tipos de injertos naturales vs sintéticos. Comparativa pros y contras de autoinjertos, aloinjertos, y xenoinjertos: Injertos óseos sintéticos y sus elementos esenciales. *Elaboración propia con la aplicación BioRender. apoyado por (Carvalho et al., 2021).*

1.4 Antecedentes

1.4.1 Andamios para regeneración ósea

La ingeniería de tejidos se erige como un campo pionero y transformador en la atención médica, con un enfoque particular en áreas críticas como la ortopedia y la regeneración ósea. Esta disciplina interdisciplinaria integra aspectos de la biología celular, la ciencia de biomateriales y técnicas avanzadas de fabricación como la síntesis de materiales mediante técnicas como: air jet spraying-spinning, electrohilado e impresión 3D. El objetivo es diseñar soluciones altamente personalizadas que aborden desafíos clínicos específicos, ofreciendo nuevas vías para una atención médica más eficaz y precisa. Los andamios porosos, diseñados con precisión a partir de datos anatómicos personales, pueden albergar células madre y factores de crecimiento que aceleran la curación y la regeneración del tejido óseo. Estos andamios se diseñan en un entorno virtual quirúrgico, lo que ofrece opciones específicas del paciente para corregir problemas como el desalineamiento óseo. Sin embargo, a pesar de los avances significativos y resultados preclínicos prometedores, la ingeniería de tejidos aún enfrenta obstáculos en la transición de la investigación al uso clínico rutinario, un vacío a menudo referido como el "valle de la muerte". Este desafío resalta la necesidad de más investigación aplicada y validación clínica para cerrar la brecha entre los avances tecnológicos y su implementación en la atención médica en el mundo real. Los esfuerzos de investigación recientes se han centrado en el desarrollo de andamios porosos que podrían proporcionar señales físicas y químicas para acelerar el proceso de regeneración ósea. También, se ha demostrado que los parámetros físicos como la arquitectura de los poros, el módulo elástico y la topografía son propiedades influyentes de los andamios que afectan no solo la unión celular sino también la adhesión celular y la regeneración tisular (Melke et al., 2016; Sommer et al., 2017).

1.4.2 Técnicas para la fabricación de andamios para regeneración ósea

En la ingeniería de tejidos, la síntesis de andamios es un proceso complejo que implica diversas técnicas, cada una con sus propias particularidades y aplicaciones. Entre los métodos convencionales se encuentran el colado con solvente, que es una técnica efectiva pero limitada para crear estructuras porosas de polímeros. Esta técnica utiliza un solvente orgánico para disolver un polímero seleccionado y un agente porogénico, como el cloruro de sodio, para inducir la porosidad. Aunque es eficaz en la generación de redes porosas, carece del grado de control necesario para interconectar los poros de manera efectiva, una característica esencial para la vascularización y el transporte de nutrientes.

Por otro lado, la liofilización es otro método versátil que elimina la necesidad de agentes porogénicos, utilizando en su lugar la cristalización del agua para formar los poros. Sin embargo, aunque la liofilización y el colado con solvente permiten cierto control sobre la porosidad, ambas técnicas son menos efectivas para crear características estructurales 3D similares a la matriz extracelular natural (Bhushan et al., 2022). Los hidrogeles ofrecen una biocompatibilidad excepcional debido a su similitud con el entorno de la matriz extracelular, pero a menudo carecen de la resistencia mecánica necesaria y pueden ser propensos a la degradación incontrolable y alta inmunogenicidad (Badrossamay et al., 2010).

En la vanguardia de las técnicas de fabricación se encuentra el electrohilado, que permite la producción de fibras en escalas que van desde lo micro hasta lo submicrométrico. Este método tiene la capacidad única de incorporar componentes inorgánicos a nanoescala, haciéndolo adecuado para aplicaciones avanzadas en ingeniería de tejidos. A pesar de su versatilidad, el electrohilado tiene desafíos como la baja tasa de producción y la necesidad de una fuente de alto voltaje. Por otro lado, el hilado por aspersión con aire (AJS, por sus siglas en inglés) emerge como una alternativa económica que permite recubrir grandes superficies de diversos sustratos de manera rápida y uniforme. Esta técnica facilita la fabricación de

andamios de membrana con nanocompuestos híbridos orgánicos e inorgánicos, generando estructuras porosas altamente interconectadas. Dada su rapidez y sencillez en el procesamiento, AJS se destaca por su accesibilidad, ya que no necesita equipos especializados y su costo operativo es bajo. El método se fundamenta en el uso de gas presurizado dispensado a alta velocidad, que estira la solución polimérica en fibras delgadas conforme sale de la boquilla. Simultáneamente, el solvente comienza a evaporarse, proceso que se completa una vez que las fibras se han asentado sobre un sustrato (Marsi et al., 2019).

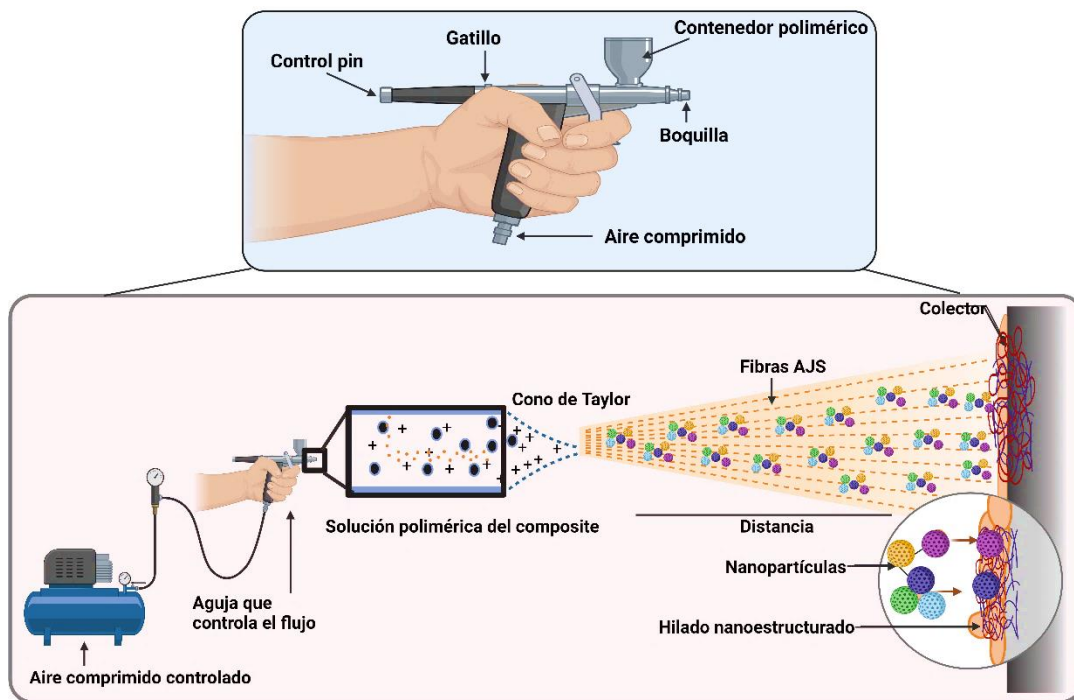


Figura 7. Diagrama esquemático de la técnica airjet spraying. Funcionamiento y componentes principales de la técnica de air-jet spraying conjugado con material dopante. *Elaboración propia con la aplicación BioRender. apoyado por (Abdal-Hay et al., 2013).*

1.4.3 Biopolímeros

Los polímeros naturales son una clase de polímeros que se encuentran en la naturaleza y están compuestos principalmente por proteínas (colágeno, fibroína de seda) y polisacáridos (quitosano, alginato, ácido hialurónico y celulosa). Estos

polímeros suelen contener moléculas biofuncionales que garantizan bioactividad, superficie biomimética y remodelación natural. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes como respuesta inmunogénica, contaminación microbiana (es decir, endotoxina), sintonizabilidad reducida, tasa de degradación incontrolable y débil resistencia mecánica. Debido a estas limitaciones, su aplicación en la regeneración de tejidos óseos es limitada. Uno de los polímeros naturales más estudiados para aplicaciones biomédicas es el colágeno. Este componente básico de varios tejidos animales ofrece una serie de sitios de unión favorables para las células óseas, adhesión y se sabe que promueve la deposición de matriz mineralizada. Sus principales características son la biodegradabilidad enzimática y la versatilidad para ser procesado en diferentes formas físicas, como andamios fibrosos e hidrogel.

Por otro lado, los polímeros sintéticos presentan estructuras y propiedades adaptadas mediante el diseño apropiado de los grupos funcionales de los polímeros. Estas ventajas garantizan una calidad predecible, reproducible y sintonizable. Las propiedades pueden variar según las aplicaciones específicas. Por ejemplo, su degradación y velocidad podrían alterarse actuando sobre la composición química, la cristalinidad y sobre la estructura molecular.

En comparación con los polímeros naturales, los polímeros sintéticos presentan una bioactividad reducida y presencia limitada de sitios de reconocimiento celular y osteoconductividad. En este contexto, se han probado varios recubrimientos como partículas biocerámicas para mejorar el rendimiento de su superficie para la regeneración del tejido óseo.

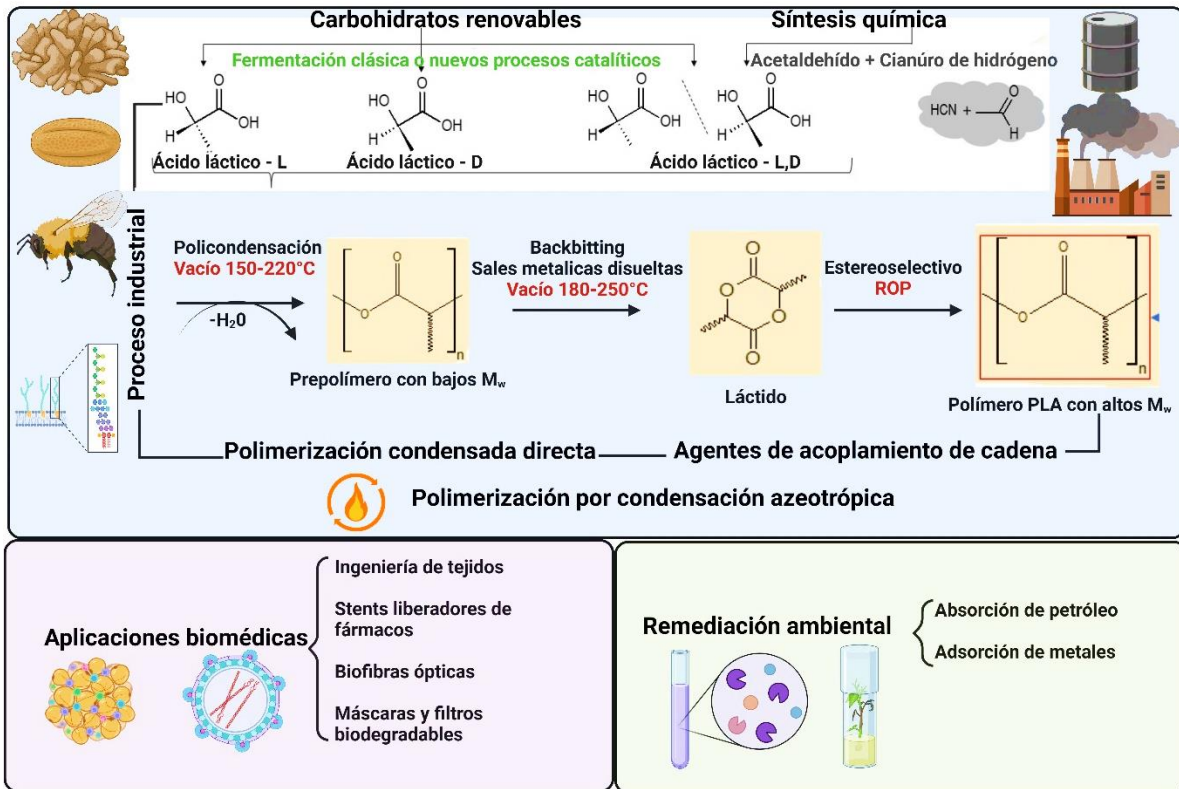
Entre los polímeros sintéticos más utilizados se encuentran los poliésteres alifáticos: Poli(ϵ -caprolactona) (PCL), polilactida (PDLA, PLLA), poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) y ácido poliláctico (PLA) (Pan et al., 2012).

1.4.4 Polímero ácido poliláctico

El ácido poliláctico (PLA) es un polímero sintético altamente valorado en el ámbito

de la regeneración ósea por sus atributos clave, como la citocompatibilidad, la estabilidad térmica y la producción de subproductos no tóxicos durante su degradación. Además, la estabilidad térmica y las propiedades de degradación del PLA se pueden personalizar ajustando la selección y disposición de los estereoisómeros en las cadenas poliméricas, conocidas como relaciones L/D, así como los pesos moleculares (Esquema 1). En estudios recientes, el PLA se ha combinado con hidroxiapatita para potenciar sus propiedades mecánicas. Un ejemplo notable es un andamio PLA/hidroxiapatita creado mediante técnicas de bioimpresión 3D, el cual exhibió canales que replican la estructura de los microvasos y mostró una excelente elasticidad. Por otro lado, experimentos *in vitro*, utilizando células mesenquimales humanas, han revelado un incremento en la adhesión celular, proliferación y osteodiferenciación en comparación con andamios similares sin hidroxiapatita o con canales de mayor tamaño (Pandele et al., 2020).

Adicionalmente, otros materiales derivados del PLA han obtenido resultados prometedores en regeneración ósea. Por ejemplo, un equipo de investigación desarrolló una malla nanofibrosa compuesta por PLA y gelatina. Al sembrar células madre mesenquimales en este andamio, se observó una efectiva diferenciación osteogénica. Debido al éxito en pruebas *in vitro*, este polímero también ha avanzado a la fase de ensayos *in vivo*. Además, algunos estudios han explorado la combinación de PLA con otros polímeros sintéticos, como el PCL, estabilizados por nanopartículas hidrófobamente modificadas. Estos andamios macroporosos y jerárquicos resultan ser biocompatibles y su estructura es análoga a la matriz extracelular natural.



Esquema 1. Síntesis y aplicaciones del PLA en biomedicina. El Poli(ácido láctico) (PLA) es un polímero crucial derivado de biomasa renovable. Se muestra la degradabilidad del PLA y la forma de síntesis o producción y aplicaciones de poly(L-Ácido láctico) (PLA), principalmente en biomedicina, utilizando métodos de polimerización innovadores y sostenibles. *Elaboración propia con la aplicación BioRender. apoyado por (de França et al., 2022).*

1.4.5 Nanocristales luminiscentes (LNCs)

Los elementos de tierras raras (ETR) conforman un grupo de elementos químicos con propiedades químicas similares. Estos elementos, poseen características únicas de fotoluminiscencia, otorgándoles propiedades espectroscópicas distintivas, como una emisión duradera y un ancho de banda estrecho. Debido a estas propiedades, los materiales basados en ETR son esenciales para aplicaciones en ingeniería de tejidos e imagenología biomédica.

Estas nanopartículas proporcionan el contraste fluorescente necesario para

visualizar componentes celulares y tejidos específicos. Diversos materiales luminiscentes, como puntos cuánticos, nanodiamantes y nanopartículas de oro, han sido propuestos para estas aplicaciones. Sin embargo, las nanopartículas dopadas con lantánidos, un subgrupo de los ETR, destacan por sus propiedades, como una larga vida útil de fluorescencia, alta eficiencia cuántica y resistencia a la fotodegradación. A diferencia de otras técnicas de etiquetado fluorescente, que pueden presentar problemas de estabilidad o toxicidad, las nanopartículas dopadas con lantánidos son especialmente prometedoras para aplicaciones médicas y terapéuticas dirigidas.

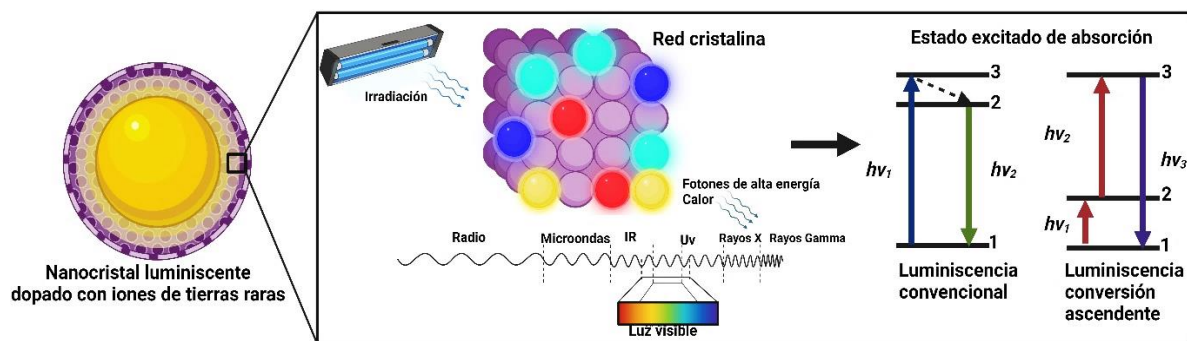


Figura 8. Fotoexcitación y luminiscencia. La red cristalina absorbe energía cuantizada, provocando la excitación de electrones y generando transferencia de energía, calor y emisión de fotones. También se representan diagramas de energía con transiciones relevantes. Existen varios efectos de emisión tales como i) Conversión ascendente Auger, ii) Conversión ascendente Anti-Stokes iii) de dos bandas. *Elaboración propia con la aplicación BioRender. apoyado por (Q. Liu et al., 2013).*

1.4.6 Granate de óxido de itrio-aluminio (YAG)

El granate de itrio y aluminio, conocido como YAG ($Y_3Al_5O_{12}$), es un material inorgánico no metálico de suma relevancia, reconocido por sus destacadas propiedades físicas, químicas, térmicas, mecánicas y ópticas. Su robustez y versatilidad lo convierten en un candidato idóneo para aplicaciones estructurales de alta temperatura, respaldado por su alto punto de fusión ($1970^{\circ}C$), su extrema dureza, notoria estabilidad química y de fase a elevadas temperaturas.

Dada su capacidad para ser dopado con iones de tierras raras, el YAG ha capturado el interés de la comunidad científica. Estos iones, al ser excitados en las nanopartículas dopadas, desprenden una luminiscencia característica, ampliando así sus aplicaciones potenciales, especialmente en el ámbito biomédico. Es notable el brillo que manifiestan estas nanopartículas al ser excitadas. Las denominadas nanopartículas de conversión descendente (DC) revelan una emisión desplazada tipo *Stokes*, influenciada directamente por un ion lantánido excitado en la matriz huésped, aspecto crucial para sus propiedades luminiscentes finales. La absorción de radiación lleva a un ion lantánido, o activador, a un estado excitado, experimentando una transición desde su estado fundamental al estado E2. A continuación, se produce una relajación no radiativa hacia el nivel E1, culminando en una emisión DC. Este proceso de relajación, que transita desde E2 hasta E1, es complejo y está modulado por la dinámica de fonones del nanofósforo (Hamroun et al., 2022).

En el ámbito de la iluminación, el YAG ha demostrado ser revolucionario al convertir la radiación absorbida en diferentes tonalidades de emisión mediante un amplio espectro fotoluminiscente. Esta versatilidad se extiende también al campo de detección de partículas de alta energía, con aplicaciones en imagen médica, física de alta energía y seguridad. Dada la demanda y diversidad de aplicaciones, el diseño y fabricación de escintiladores como el YAG:Ce³⁺ han evolucionado hacia diversas morfologías como nanocristales, nanofibras, y estructuras en formas tipo de varilla-arroz cuasiesféricas. Estos avances buscan no solo optimizar el rendimiento, sino también reducir costos, especialmente en aplicaciones que cubren grandes áreas (Osorio-Arciniega et al., 2022).

Con el propósito de adaptarse a los requerimientos específicos de la ingeniería y medicina, la fabricación de detectores ha adoptado formas geométricas variadas. Dada la complejidad de depender de cristales únicos, se han impulsado investigaciones para desarrollar compuestos centelleantes inorgánico-orgánicos que combinen bajo costo y alto rendimiento. En este contexto, los compuestos que incorporan una matriz polimérica se han posicionado como una alternativa

prometedora para los investigadores, dadas sus propiedades intrínsecas, su capacidad de resistencia a la radiación y su versatilidad en la fabricación de formas diversificadas (Ranakoti et al., 2023; L. D. Sun et al., 2014).

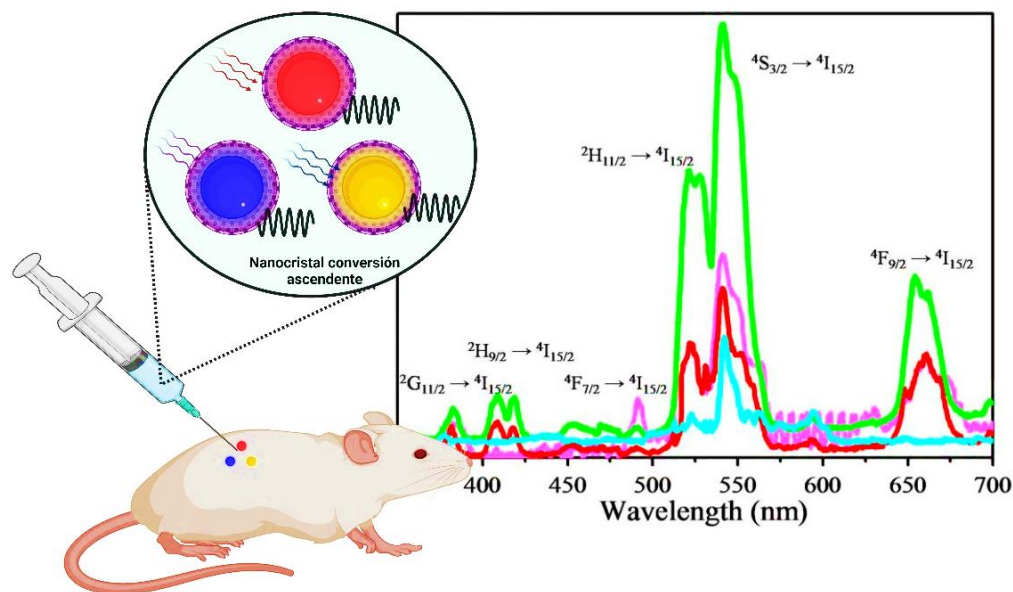


Figura 9. Imagen representativa del desarrollo de NPs de elementos de tierras raras (RE). Mediante la emisión de upconversion (UC), facilitan la conversión de luz ultravioleta a visible, crucial para aplicaciones en bioimágenes y detección. *Elaboración propia con la aplicación BioRender. apoyado por (L. D. Sun et al., 2014).*

1.5 Justificación

El desarrollo de composites de andamios fibrilares poliméricos integrados con nanocristales luminiscentes es esencial en la investigación actual. Estos nanocristales permiten una detección precisa de la localización, colonización e interacciones celulares en la superficie del andamio a través de la luminiscencia multimodal. Esta tecnología proporciona herramientas avanzadas para el monitoreo de células cultivadas, lo que es de gran relevancia en aplicaciones relacionadas con la regeneración de tejidos y la ingeniería de tejidos.

1.6 Hipótesis

Se hipotetiza que la técnica de air-jet spraying permitirá el desarrollo de andamios fibrilares composites con un seguimiento estructural y local preciso, presentando propiedades fisicoquímicas y biocompatibles adecuadas para su uso potencial en la regeneración de tejidos.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo General

El objetivo general de este estudio es sintetizar y caracterizar andamios fibrilares composites biocompatibles utilizando la técnica de air-jet spinning, con el propósito de guiar y facilitar la regeneración de tejidos en aplicaciones biomédicas.

1.7.2 Objetivo Específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanocristales luminiscentes con diversos iones dopantes de tierras raras.
2. Optimizar y sintetizar andamios fibrilares composites mediante la técnica de air jet spraying, y caracterizarlos a través de su análisis morfológico y fisicoquímico.
3. Evaluar la respuesta biológica de los osteoblastos fetales humanos (hFOB) cultivados sobre los andamios fibrilares composites, considerando morfología celular, interacción de adhesión y viabilidad celular.
4. Conducir ensayos *in vivo* para determinar el nivel de inflamación provocado por el composite dopado, seguido de su análisis histopatológico.

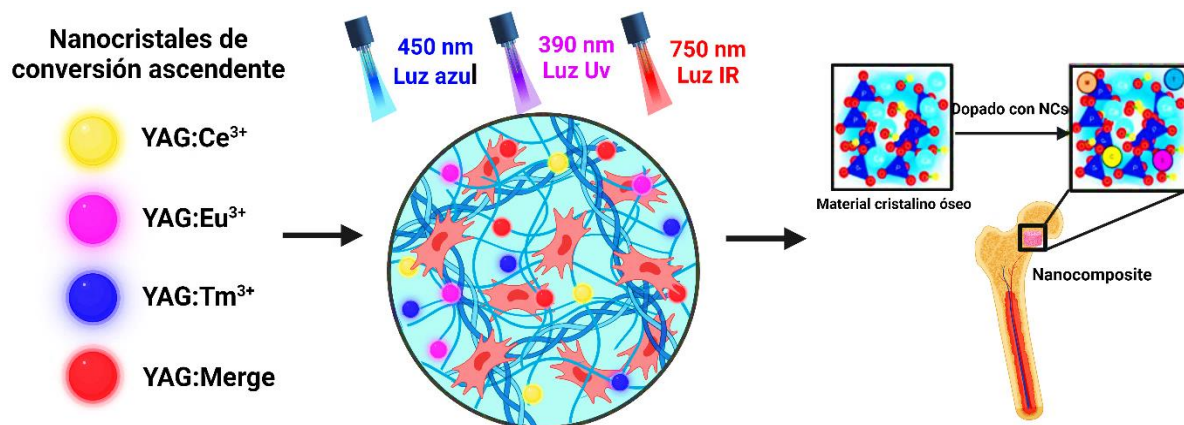


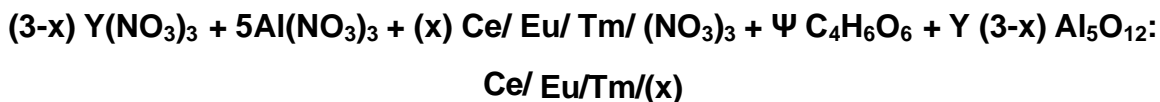
Figura 10. Resumen gráfico. Andamio fibrilar composite dopado con diferentes nanocristales (YAG:Ce³⁺, YAG:Eu³⁺, YAG:Tm³⁺ YAG:Merge) para su aplicación en la regeneración de tejido óseo.

Elaboración propia con la aplicación BioRender.

Capítulo 2. Metodología

Síntesis de nanopartículas luminiscentes YAG:Ce³⁺, YAG:Eu³⁺, YAG:Tm³⁺, YAG:Merge por el método de sol-gel.

Para la elaboración de nanocristales luminiscentes, se utilizó el método sol-gel. En este enfoque, una estructura cristalina, específicamente del tipo granate de aluminio-itrio, se sometió a dopado utilizando diversos iones de tierras raras, entre los cuales se incluyen Ce³⁺, Eu³⁺, y Tm³⁺. La composición química de esta reacción se basó en la siguiente relación estequiométrica.



Los reactivos empleados incluyeron Y(NO₃)₃·6H₂O, Al(NO₃)₃·6H₂O, Ce(NO₃)₃·6H₂O, Eu(NO₃)₃·6H₂O, Tm(NO₃)₃·6H₂O, y C₄H₆O₆, todos obtenidos de Sigma-Aldrich® con una pureza del 99.99%. Se utilizó ácido tartárico (C₄H₆O₆) como agente precursor-quelante en una proporción Ψ =2:2. La variable **x** representa el porcentaje de concentración de los distintos iones dopantes. Dicha variable se ajustó según la optimización de las propiedades luminiscentes de cada nanocristal producido.

Las proporciones de los iones dopantes se establecieron tras una optimización, siendo las concentraciones de Ce³⁺, Eu³⁺ y Tm³⁺ de 3%, 3% y 1.5%, respectivamente. Además, se realizó una combinación de estos iones (Merge) en una relación de 2:1:1%. Después de una extensa agitación magnética nocturna, los reactivos se disolvieron en agua desionizada que había sido filtrada previamente con una membrana de nailon de 0.2 μm. Inicialmente, se aumentó la temperatura a

60°C usando una parrilla eléctrica. Posteriormente, para tener un mayor control térmico, la solución se mantuvo en constante agitación en una rejilla de pirolisis por pulverización, manteniendo la misma temperatura, durante un periodo de dos horas. Subsecuentemente, los agregados se expusieron a un proceso de recocido en un horno Felisa FE-290, alcanzando temperaturas de hasta 1100°C y manteniéndose por intervalos de 2, 6 y 16 horas. Al concluir, se procedió a triturar dichos agregados utilizando un mortero de Ágata. Este protocolo se replicó para los distintos dopantes iónicos, entre ellos Ce^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} y una combinación designada como Merge, que incorpora todos los iones de tierras raras que se sintetizaron. Para concluir, los nanocristales obtenidos se almacenaron en frascos ámbar con el objetivo de prevenir su fotodegradación.

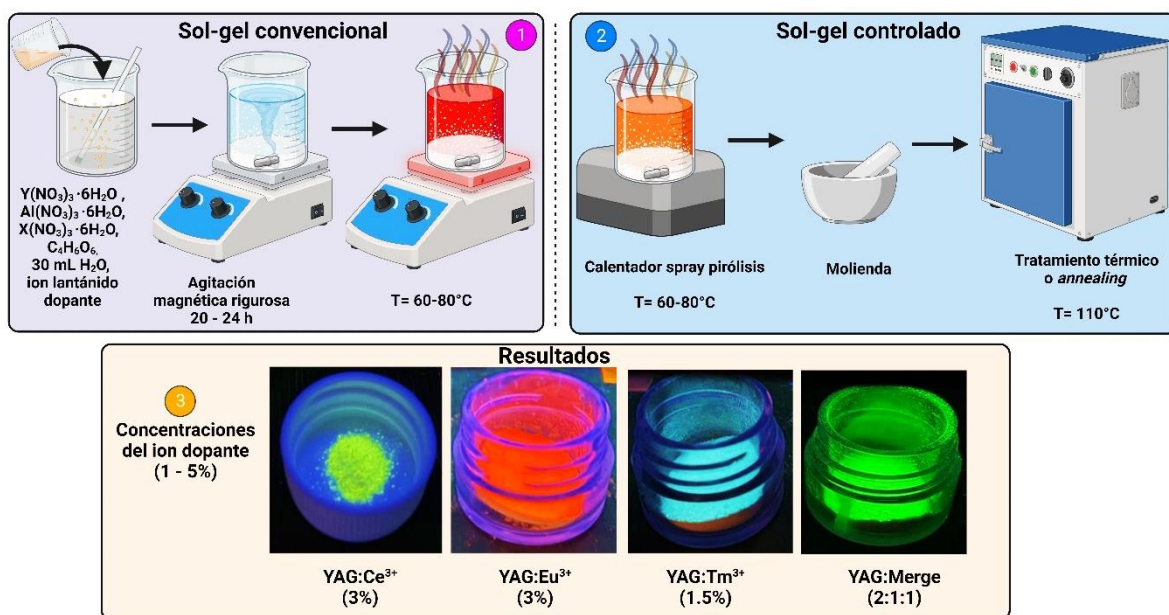


Figura 11. Diagrama de flujo del método de síntesis Sol-Gel. Se destacan las técnicas convencional y controlada, acompañado de imágenes representativas de agregados finales del material YAG, con diferentes concentraciones optimizadas del ion dopante. *Elaboración propia con la aplicación BioRender.*

3.2 Síntesis de nano/microfibras dopadas con nanocristales luminiscentes

Los andamios compuestos fibrilares se generaron utilizando la técnica air jet spraying (AJS), empleando soluciones de ácido poliláctico (PLA). En primer lugar, se formularon soluciones con el 10% en peso de PLA. Gránulos de PLA ($C_3H_6O_3$; PM 192,000 de Nature Works, Minnetonka, MN, EE. UU.) se disolvieron en cloroformo ($CHCl_3$ de J.T. Baker) que había sido filtrado previamente con una membrana de nailon de $0.2 \mu m$, después la mezcla fue agitada durante 20 horas. Posteriormente, se adicionó etanol al 70% y se agitó durante 30 minutos hasta lograr una solución homogénea. La proporción utilizada de cloroformo y etanol fue de 3:1.

A esta solución polimérica se le incorporaron nanocristales luminiscentes: YAG:Ce³⁺, YAG:Eu³⁺ y YAG:Tm³⁺. Además, se incluyó una mezcla de estos tres nanocristales (Merge). Con el objetivo de asegurar una distribución uniforme de las nanopartículas en la solución, se sometieron a un proceso de sonicación durante 2 horas. Esta solución fue después cargada en un aerógrafo de gravedad (ADIR modelo 699), el cual cuenta con una boquilla de 0,3 mm de diámetro. Se aprovechó la alimentación gravitacional de la solución para la elaboración de las membranas fibrilares, sin obtener desperdicio polimérico gradiente, alguno.

El sistema de aerógrafo estuvo conectado a un tanque de argón presurizado (número CAS 7740-37, concentración > 99%, PRAXAIR México, Nuevo León, México). Durante la deposición, se mantuvo una presión de 30 psi con una distancia de 15 cm entre la boquilla y el sustrato-colector. El aerógrafo se desplazó de manera constante en un movimiento horizontal a lo largo de un eje preestablecido. A lo largo de la deposición, se mantuvo constante el diámetro que el rocío cubría sobre el sustrato. Finalmente, para prevenir la fotodesestabilización, las muestras obtenidas se cubrieron y se secaron a 37°C durante 24 horas, previo a su análisis detallado.



Figura 12. Diagrama de flujo del método de síntesis de los andamios fibrilares de PLA por el método air-jet spraying (AJS). Se muestra el procedimiento paso por paso de la técnica AJS conjugada con NCs. *Elaboración propia con la aplicación BioRender.*

3.3 Técnicas de caracterización de los nanocrisales luminiscentes (LNCs)

Las propiedades fisicoquímicas de las LNCs sintetizadas se evaluaron utilizando diversos instrumentos de caracterización, entre los cuales se encuentran:

3.4 Difracción de rayos-X (XRD)

Se analizó la fase cristalina de los nanocrisales $Y_3Al_5O_{12}$ dopados con $Ce^{3+}/Eu^{3+}/Tm^{3+}$ utilizando el difractómetro de rayos X Phillips X'pert, equipado con una fuente de Cu y radiación $K\alpha_1$ ($\lambda = 0.15406$ nm). El escaneo XRD se llevó a cabo en un rango de 2θ de $15-80^\circ$, aunque el rango principal de interés fue de $20-80^\circ$. El tamaño promedio de los cristalitas se dedujo del ensanchamiento de los picos de XRD aplicando la ecuación de Scherrer. La fórmula es la siguiente:

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

Donde D representa el tamaño promedio del cristalito, 0.9 es una constante relacionada con la forma del cristalito (0.9×57.3), λ es la longitud de onda utilizada en XRD, θ denota el ángulo de difracción y β corresponde a la semi-amplitud corregida del pico de difracción más pronunciado.

3.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El tamaño y la morfología de los nanocristales luminiscentes ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}:\text{Ce}^{3+}/\text{Eu}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$) fueron analizados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando el equipo JEOL JEM-2010 con un voltaje acelerado de 200 kV. Para preparar las muestras, estas se dispersaron en etanol y se sonicaron durante una hora. Luego, se depositaron 50 μL de la muestra sobre una rejilla de cobre de malla 200 recubierta con una película de soporte de la marca Pelco. Usando el software ImageJ, se analizaron un total de 75 micrografías diferentes de los nanocristales.

3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se analizó la superficie de los nanocristales luminiscentes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando el equipo JEOL JSM-5300. Para preparar las muestras, estas se depositaron cuidadosamente sobre cinta conductora de carbono. Una vez fijadas, se expusieron a un haz de electrones acelerados, garantizando un barrido minucioso y detallado de la superficie, permitiendo así una visión clara y precisa de la morfología y composición de los nanocristales.

3.7 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La Dispersión Dinámica de Luz (DLS) es una técnica crucial que permite determinar el tamaño y la distribución de partículas en soluciones o suspensiones, especialmente en el rango nanométrico. Basándonos en el protocolo NIST, hemos empleado esta técnica utilizando el instrumento Microtrac Instruments-Zetatrac y su software asociado. Las mediciones se realizaron a una temperatura constante de 25°C. Los resultados, presentados en forma de distribuciones, reflejan tanto la intensidad como el número de partículas. Este método proporciona una visión detallada de la uniformidad y estabilidad de las muestras analizadas, siendo esencial en la investigación y desarrollo de nanomateriales.

3.8 Análisis espectroscópico mediante infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y técnica de reflectancia total atenuada (ATR)

La Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) es una herramienta esencial que nos permite estudiar las interacciones moleculares y la composición química de las muestras. En nuestro estudio, se obtuvieron espectros FTIR utilizando el espectrómetro Thermo Scientific Nicolet IS50R FT-IR. Para cada muestra, se crearon pastillas de KBr con una concentración del 0.25% en peso. Utilizamos la técnica de Reflexión Total Atenuada (ATR) con un cristal de alto índice de refracción para recibir un haz infrarrojo, lo que generó un espectro infrarrojo detallado. Estos espectros de transmisión se registraron en un rango de 4000 a 500 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , proporcionando información detallada sobre las características estructurales y composicionales de las muestras.

3.9 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica no destructiva que se basa en el fenómeno de dispersión inelástica de la luz al interactuar con la materia. Esta técnica proporciona información detallada sobre las vibraciones moleculares, permitiendo la identificación de compuestos y el estudio de estructuras moleculares. Para nuestro análisis, los espectros Raman fueron obtenidos mediante el equipo confocal Raman-WITec. Para calibrar el equipo, se utilizó silicio con una referencia de 521 cm^{-1} y un láser verde de 532 nm a una potencia de 3.4 mW. Las mediciones se realizaron utilizando un objetivo de 100x, lo que resultó en un tamaño de punto aproximado de $9\mu\text{m}$. Para el análisis de datos y determinar las características de las bandas de vibración, se empleó el software Origin, permitiendo también comparar los espectros obtenidos con datos de referencia.

3.10 Estudios de fotoluminiscencia (PL)

El análisis de fotoluminiscencia (PL) se realizó para estudiar los espectros de excitación y emisión de los nanocristales luminiscentes sintetizados, utilizando un espectrofotómetro Hitachi F-7000 con una lámpara de arco de xenón. Se seleccionaron longitudes de onda de excitación de 450 nm, 260 nm y 359 nm debido a su máxima intensidad de emisión PL. Mediante estos análisis, se obtuvo el índice de reproducción cromática (CRI, por sus siglas en inglés). El CRI es una medida cuantitativa de la capacidad de una fuente de luz para reproducir fielmente los colores de diversos objetos en comparación con una fuente de luz ideal o natural. Este índice es fundamental para entender cómo los nanocristales pueden influir en la percepción visual de los colores en diversas aplicaciones luminiscentes.

3.11 Técnicas de caracterización de las fibras poliméricas

Las características fisicoquímicas de las fibras de PLA combinadas con LNCs se analizaron mediante una serie de técnicas de caracterización avanzadas, incluyendo:

3.12 Microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM)

Utilizamos la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) mediante un equipo avanzado JEOL JSM-5300, complementado con imágenes de fluorescencia obtenidas a través de un microscopio Axio Imager A2 Zeiss.

3.13 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se llevaron a cabo análisis termogravimétricos (TGA) y de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para examinar las propiedades térmicas de las muestras. El análisis TGA, realizado con el equipo SDTQ600 de TA Instruments, mide la cantidad y velocidad con la que una muestra pierde su peso a medida que se calienta. Se utilizaron canastillas de platino que pesaron automáticamente muestras de 2-4 mg, calentándolas de 180°C a 400°C a una velocidad de 10 °C/min. Por su parte, el análisis DSC, utilizando el instrumento Q200 de TA Instruments, determina las transiciones térmicas como la temperatura de transición vítrea (T_g) y los puntos de fusión (T_m). Para este análisis, se tomaron muestras de 2.5-3 mg y se calentaron de 25°C a 180°C a un ritmo de 10 °C/min.

3.14 Análisis de humectabilidad

Para determinar la capacidad de las muestras para ser mojadas por un líquido, se midió el ángulo de contacto con agua en la superficie. Este parámetro es esencial ya que proporciona una idea de cómo interactúa un líquido con la superficie de un material. Para llevar a cabo la medición, se capturaron imágenes utilizando un sistema de medición del ángulo de contacto justo 5 segundos después de depositar una gota de 3 μ L en la muestra. Este ensayo se realizó en cada uno de los andamios estudiados, repitiéndose cinco veces, y se informaron los valores promedio obtenidos.

3.15 Pruebas mecánicas

El módulo de Young, también conocido como módulo de elasticidad, es una medida de la rigidez de un material y se utiliza para caracterizar su comportamiento elástico bajo tensión y deformación. Para comprender este comportamiento en las muestras sintetizadas, se realizaron pruebas de compresión utilizando una Máquina Universal de Ensayos con una celda de carga de 200 N, de acuerdo con la norma ASTM D695. Las muestras, con dimensiones de 8 × 8 × 5 mm, fueron sometidas a una tasa de carga de 1 mm/min, y se recopilaron los datos correspondientes de tensión-deformación. Este ensayo se efectuó en tres ocasiones para cada uno de los andamios en estudio. Finalmente, se presentaron los resultados obtenidos.

3.16 Caracterización biológica *in vitro*

La respuesta biológica de andamios fibrilares enriquecidos con nanocristales luminiscentes frente a células óseas fetales humanas (hFOB) fue meticulosamente analizada. Para este propósito, se recurrió a diversas técnicas especializadas de

caracterización *in vitro*, estas se detallan a continuación en el siguiente apartado.

3.17 Cultivo celular

Las células hFOB (línea celular ATTC número 1.19) fueron cultivadas en medio DMEM enriquecido con un 10% de suero bovino fetal (FBS). A este medio se le añadió penicilina (100 IU/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (0.3 µg/ml), esto con el fin de asegurar un ambiente óptimo de crecimiento celular. Los cultivos celulares se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C, en condiciones de 95% de aire, 5% de CO₂, y con una humedad del 100%.

3.18 Interacción celular con andamios composites

Tras esterilizar meticulosamente los andamios fibrilares compuestos con diferentes soluciones de OH/Ab y exponerlos a luz UV, seguido de un proceso de secado de 4 horas a diferentes concentraciones de OH (10-60%), se introdujeron células hFOB a una concentración de 1×10^4 células/ml. Posteriormente, las células se incubaron durante 24 horas para estudiar su interacción con los andamios. Después de este período, las células se fijaron con PFA al 4% y se empleó microscopía de fluorescencia (utilizando el Axio Imager A2 de Zeiss) para observar las muestras. Se realizaron lavados adicionales con PBS con el fin de eliminar cualquier célula que no se hubiera adherido al andamio. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el equipo de microscopía óptica AmScope.

3.19 Viabilidad celular

La biocompatibilidad de los andamios fibrilares compuestos se evaluó mediante el

ensayo de reducción de resazurina (DOJINDO®). La resazurina, una solución de color azul experimenta una reducción intracelular por células viables, generando un producto fluorescente de color rosa llamado resazurina. Las células hFOB se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/ml y se cultivaron durante 2, 4 y 6 días. Al finalizar cada período de cultivo, las células se incubaron con una solución de resazurina al 10% durante 4 horas a 37°C. Posteriormente, el sobrenadante se trasladó a una placa de 96 pozos, y se obtuvieron lecturas de absorbancia a 450 nm utilizando un lector ELISA (ChroMate, AWARENESS®). Los valores de absorbancia se correlacionaron directamente con la actividad metabólica de las células vivas, lo que indica la biocompatibilidad de los andamios.

3.20 Adhesión celular

Para analizar la adhesión celular en distintos andamios sintetizados con nanocristales controlados, incluidos YAG:Ce³⁺, YAG:Eu³⁺, YAG:Tm³⁺, Merge:NCs y PLA puro, se prepararon andamios cuádruples en placas de 48 pozos a 37°C. A continuación, se sembraron células hFOB sobre las superficies compuestas a una densidad de 5,000 células por pozo, y se incubaron a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂. Las interacciones entre las células y el compuesto se fijaron con PFA/PBS al 4% a las 24 y 48 horas después del tratamiento. Se observaron las muestras mediante microscopía de fluorescencia (Axio Imager A2 Zeiss) y las imágenes obtenidas se analizaron con el equipo de microscopía óptica AmScope.

3.21 Tinción de alizarina roja

Para valorar la mineralización de las células hFOB en los días 3 y 21, se utilizó la tinción de Rojo Alizarina. Inicialmente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Posterior a la fijación, las células

se tiñeron con una solución de rojo alizarina al 0.5% a 37 °C durante 20 minutos. Se capturaron imágenes de las células teñidas usando un microscopio Evos. Para cuantificar la tinción, las células se trataron con una solución de ácido acético al 10%, se calentaron a 85°C durante 10 minutos y se centrifugaron a 12,500 rpm durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante resultante y se midió su absorbancia a 405 nm con un lector de microplacas (Molecular Devices SpectraMax M2e). Para la cuantificación, se restó la tinción de fondo de los andamios sin células de los valores medidos. Estos procedimientos experimentales se realizaron por triplicado.

3.22 Diseño del estudio en modelo animal

En este estudio, empleamos un modelo animal para evaluar la respuesta biológica de andamios dopados con nanocristales luminiscentes en condiciones fisiológicas. Se seleccionó este modelo por su relevancia y se aseguró el bienestar animal en la investigación. A continuación, se detallan los procedimientos y resultados.

3.23 Declaración ética

El Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Odontología (CICUAL-FO) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) otorgó la aprobación para todos los procedimientos realizados en el modelo animal de inflamación inducida en ratas Wistar con la autorización del Comité de Cuidado, identificado con número de registro FO-M001-0004-2019.

3.24 Ensayo *in vivo*: implantación de andamios

Se seleccionaron y dividieron aleatoriamente nueve ratas Wistar macho, de 12 semanas de edad y con un peso de 200g, para la implantación de andamios. Estos animales se obtuvieron del bioterio del Posgrado en Odontología de la UNAM. Se implantaron subcutáneamente cinco tipos de andamios (PLA puro y dopados con YAG:Ce³⁺, YAG:Eu³⁺, YAG:Tm³⁺, Merge NCs) durante periodos de 7, 21 y 49 semanas bajo anestesia general (Ketamina 80mg/kg y Xilazina 10mg/kg). La preparación quirúrgica incluyó rasurado, desinfección y creación de composites rectangulares (2x1cm) en el lado superior izquierdo para los andamios de PLA al 10% w/v, PLA/YAG:Ce³⁺ y PLA/YAG:Eu³⁺, y en el lado derecho para los andamios PLA/YAG:Tm³⁺ y PLA/Merge. Cada andamio fue suturado firmemente con suturas de Nylon 5-0. Las ratas se alojaron en habitaciones con control de temperatura (18-22 °C, 50% de humedad relativa) con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, y acceso libre a agua y dieta estándar. La monitorización posquirúrgica evaluó el bienestar general, apariencia de la herida, sangrado, exudado e integridad del andamio.

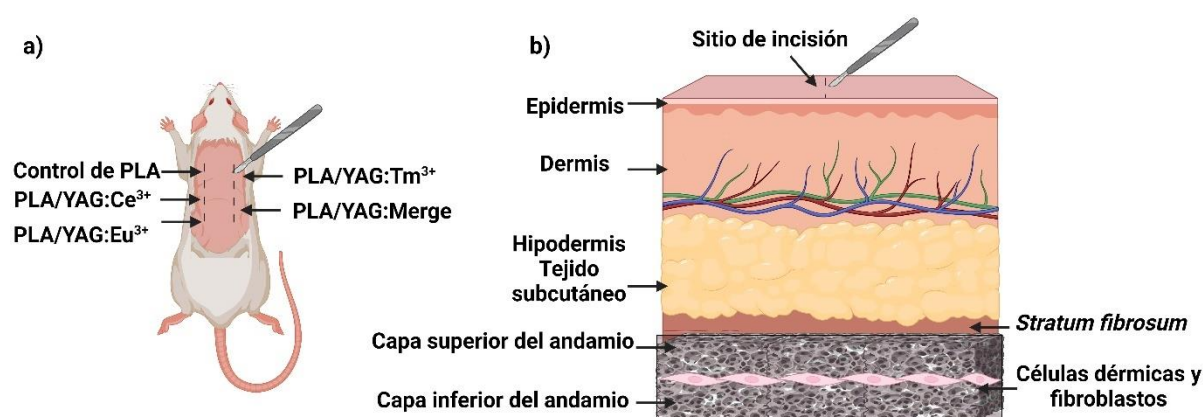


Figura 13. Metodología *in vivo*. a) Incisiones realizadas y representación espacial de la colocación de cada andamio. b) Detalle del sitio de incisión e interacción del andamio a nivel tisular. *Elaboración propia con la aplicación BioRender.*

3.25 Análisis fotoluminiscentes *in situ* de andamios implantados

Se irradiaron los andamios exclusivamente con una lámpara convencional de longitud de onda de luz azul. Esto permitió la observación directa de sus propiedades luminiscentes dentro del área implantada y la evaluación de la penetración de esta longitud de onda en el tejido de la rata.

3.26 Diagnóstico histopatológico de andamios preparados *ex vivo*

Se realizaron análisis histológicos para examinar las interacciones entre el tejido y el biomaterial en los sitios de implantación de los andamios y en el tejido circundante. Los animales fueron sacrificados a las 7, 21 y 49 semanas. Los andamios y el tejido adyacente se disecaron, fijaron y tiñeron con H&E y tricrómica de Masson, posteriormente se observaron bajo un microscopio Leica. Un patólogo experimentado analizó las secciones teñidas para identificar signos de daño tisular y cambios estructurales. La tinción tricromática usó colorantes rojos y azules para visualizar colágeno, núcleos, tejido muscular y citoplasma. La tinción H&E mostró la coloración de cromatina, mucina, núcleos, estructuras citoplasmáticas y la matriz extracelular. Entre los diagnósticos histológicos específicos se encontraron cambios estromales, encapsulamiento del implante en granuloma, inflamación perivascular, perineural, y angiogénesis. Para detectar CD34⁺, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (Cat. No. IR632, RTU, Dako) y el anticuerpo contra la proteína S100, Ab-1 (Neomarkers, Clone 4C4.9).

3.27 Clasificación de la enfermedad del injerto contra el huésped aguda por severidad (GHVD)

Grado 1 (leve, <25% de la piel afectada), Grado 2 (moderado, 25-50% de la piel

afectada con síntomas leves), Grado 3 (grave, >50% de la piel afectada con afectación hepática y gastrointestinal) y Grado 4 (muy grave, piel con ampollas, ictericia y diarrea severa) (Holler et al., 2018; Malard et al., 2023; Naserian et al., 2018).

3.28 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para analizar los datos cuantitativos, que se presentaron como media±desviación estándar. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software Inc., La Jolla, Estados Unidos) y Origin (California, Estados Unidos) para comparar los datos entre los grupos de estudio. La significancia estadística se determinó con valores de p menores de 0.05 (* $p \leq 0.05$), considerados significativos, valores de p menores de 0.01 (** $p \leq 0.01$), considerados altamente significativos, y valores de p menores de 0.001 (** $p \leq 0.001$), también considerados altamente significativos.

Capítulo 3. Discusión y resultados

4.1 Caracterización de nanocristales luminiscentes (LNCs) de YAG: Ce³⁺/ YAG: Eu³⁺/ YAG: Tm³⁺y YAG:Merge

4.1.1 Difracción de rayos-X (XRD)

La caracterización de la estructura cristalina de las muestras se llevó a cabo a través de la difracción de rayos X (XRD). Estas muestras fueron sintetizadas empleando dos métodos distintos: el sol-gel convencional, donde se incrementó la temperatura mediante una parrilla magnética, y el sol-gel controlado, en el cual se utilizó una plancha de spray pirólisis para regular el aumento de temperatura. En ambos casos, las muestras presentaron todos los picos de difracción característicos correspondientes a la fase tipo granate, también conocida como YAG. De igual forma, se mostraron los picos característicos de α -Al₂O₃ pudiendo ser indexados.

La síntesis de las muestras de YAG:Ce³⁺/Eu³⁺/Tm³⁺ se realizó a partir de un material inicial tipo gel que fue calcinado a 1100 °C en diferentes duraciones de recocido (2, 6 y 12 horas) (Armetta et al., 2019). Posteriormente, los polvos recolectados se sometieron a molienda para disminuir el tamaño de las partículas. El análisis del patrón XRD para el sistema tratado a 1100 °C mostró la aparición del pico primario del granate itrio aluminio-cerio (YAG) alrededor de $2\theta = 33.304^\circ$, correspondiente al plano cristalino con índices de Miller en [4 2 0], el cual es característico del sistema cúbico (Armetta et al., 2019; Kang et al., 2020).

En ninguna de las muestras sintetizadas se observaron fases secundarias o impurezas correspondientes a otro tipo de estructuras cristalinas como Y₄Al₁₂O₉ (YAM) o YAIO₃ (YAP). Se encontraron los tres picos característicos de difracción de la fase Y₃Al₅O₁₂, correspondientes a las direcciones cristalográficas [2 1 1], [4 0 0] y [4 2 0], los cuales fueron consistentes con la estructura cúbica estándar indexada

como fase tipo granate $Y_3Al_5O_{12}$ (archivo cristalográfico JCPDS 33-0040), perteneciente al grupo espacial Ia-3d [2 3 0] (Skrudiene et al., 2022; Y. Sun et al., 2023). Esta estructura se mantuvo invariable incluso a pesar de tratamientos térmicos extendidos. Además, la completa transformación de los precursores de YAG, junto con los diferentes iones dopantes del grupo de lantánidos/tierras raras, está respaldada por la falta de impurezas o cambios de picos observados en los patrones de XRD (Guo et al., 2016; Y. Ma et al., 2016a). Los iones Y^{3+} (0,90 Å), conocidos por su menor radio iónico, típicamente ocupan intersticios dodecaédricos *c* dentro de la red de YAG. Sin embargo, cuando los iones Ce^{3+} (1,143 Å), Eu^{3+} (1,066 Å) y Tm^{3+} (1,095 Å) se utilizaron como dopantes sustitucionales para los iones Y^{3+} en los sitios *c*, su mayor radio causó variaciones en la estructura local de la red y los parámetros de la celda, resultando en una expansión gradual de la celda unitaria (C. H. Chen et al., 2021; Wang et al., 2015). Existe una red compuesta por grupos octaédricos AlO_6 y hexaédricos AlO_4 , con átomos de itrio posicionados en los intersticios dodecaédricos formados por el arreglo de esquinas compartidas de los poliedros AlO_4 y AlO_6 (He et al., 2016). El tamaño promedio de grano, determinado aplicando la ecuación de Scherrer al pico [4 2 0], mostró una variación en función del tiempo de recocido (Wang et al., 2015; Xue et al., 2015).

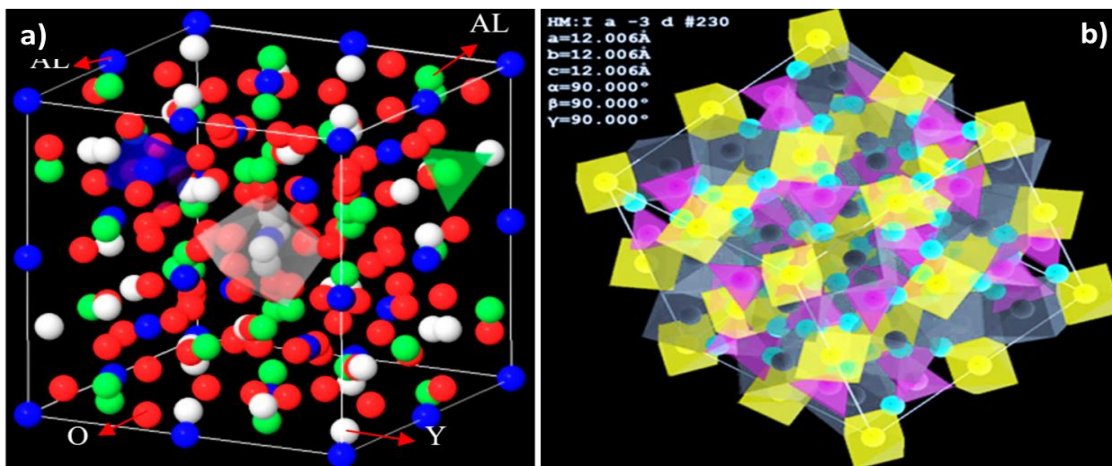


Figura 14. Cristalización formada. a) Estructura cristalina tipo granate y b) poliedros de coordinación ilustrados como elipsoides tridimensionales en un cristal YAG (Khouzani et al., 2020).

Los cristales YAG codopado tuvieron un tamaño promedio de aproximadamente 39 nm después de 2 y 6 horas de recocido, aumentando alrededor de 53 nm después de 12 horas. La estructura cristalina de YAG no se vio afectada por el aumento del tratamiento térmico o *annealing*, como lo indican los patrones de XRD del polvo YAG: Ce³⁺/Eu³⁺/Tm³⁺, obtenidos en diferentes tiempos de recocido (Y. Sun et al., 2023). En consecuencia, los nanocristales Y₃Al₅O₁₂ exhibieron mejores propiedades luminiscentes, optimizando la cristalinización de las partículas obtenidas.

Cabe mencionar que la concentración empleada en cada material luminiscente (Ce³⁺: 3% at., Eu³⁺: 3%, Tm³⁺: 2%) es muy pequeña. Esto ocasionó que los residuos de Al₂O₃, CeO₂, o fases oxidativas con otros iones dopantes como EuO₂, TmO₂ no sean detectables. Es importante subrayar que, a pesar de las variaciones introducidas en el proceso de sinterización y dopado, la estructura cristalina de YAG se mantuvo intacta, demostrando robustez y estabilidad de la matriz YAG como material base. La eventual manifestación de propiedades fotoluminiscentes favorables en los nanocristales Y₃Al₅O₁₂ añade otra dimensión de aplicabilidad a este material, posiblemente allanando el camino para su uso en aplicaciones ópticas avanzadas y tecnologías relacionadas.

Tabla 1. Valores promedios de las LNCs mediante ecuación de Scherrer.

TAMAÑO PROMEDIO NANOCRISTALES LUMINISCENTES	
Sol Gel Convencional y Sol Gel Controlada (2 horas)	41.27 nm (± 2 nm)
Sol Gel Convencional (6 horas)	38.78 nm (± 2 nm)
Sol Gel Controlada (16 horas)	53.12 nm (± 2 nm)

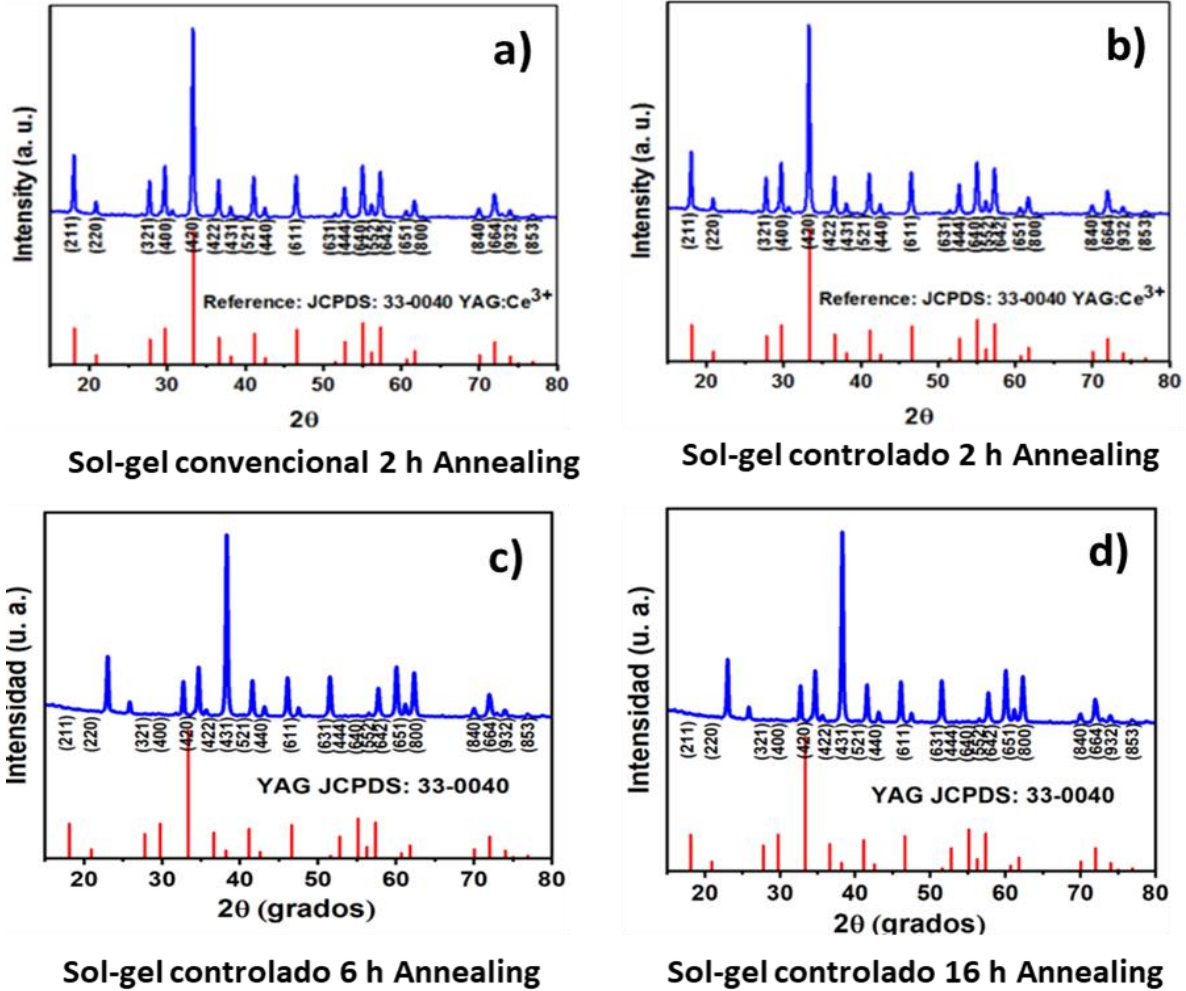


Figura 15. Patrones de Difracción de rayos-X. Se contrastan los NCs YAG: Ce³⁺ con la fase YAG pura (basada en el archivo cristalográfico JCPDS 33-0040). a) Muestra sintetizada por Sol-Gel convencional tras 2 h de tratamiento térmico, b) muestra obtenida por Sol-Gel con control de calentamiento vía spray de pirólisis a las 2 h de tratamiento térmico y c-d) muestras post 6 y 16 h de tratamiento térmico.

4.1.2 Evaluación de fotoluminiscencia y pruebas visuales

Las técnicas de fotoluminiscencia se emplearon para analizar las características de emisión y las contribuciones de diferentes niveles de energía excitados en los nanocristales de YAG:Ce³⁺/Eu³⁺/Tm³⁺ y Merge, evaluándolos en diferentes

duraciones de tratamiento térmico o *annealing* de 2, 6 y 16 horas. Los materiales de fósforo dopados, en general, sus espectros de excitación contienen tres regiones diferentes: (1) Transición de transferencia de carga (CT), (2) Absorción de banda a banda y (3) Transiciones $f-f$ (Chowdhury & Sharma, 2015).

El ion Ce^{3+} posee la configuración electrónica más simple entre todos los iones de tierras raras con un electrón $4f:4f^1$. La luminiscencia intrínseca del cerio resulta de las transiciones ópticas entre el estado base $4f^1$ y el estado excitado $5d^1$. La configuración del estado base $4f^1$ se divide en dos subniveles, $^2F_{5/2}$ y $^2F_{7/2}$, separados por casi 2000 cm^{-1} debido al acoplamiento espín-órbita, siendo esta la razón de la doble estructura que se observa en la banda de emisión del Ce^{3+} . Por otro lado, el estado excitado $5d^1$ se divide en componentes a causa del campo cristalográfico (Vistorskaja et al., 2023). Bajo una excitación de 342 nm, las nanopartículas de $YAG:Ce^{3+}$ mostraron una amplia emisión amarilla a 526 nm, atribuida a iones de Ce^{3+} al 3% y correspondiente a la transición del nivel más bajo $4f^1(^2F_{7/2}) \rightarrow 4f^0 5d^1$, y curvas con emisiones en el rango de 480-800 nm, asignadas a las transiciones típicas del ion Ce (III) (He et al., 2016; Rashmi & Dwivedi, 2019).

Al dopar la matriz YAG con iones de Eu^{3+} al 3% y excitando a 395 nm, se observaron dos amplias bandas de emisión naranja-rojo a aproximadamente 590 nm y 709 nm (Skrudiene et al., 2022). Estos picos a 589 nm, 593 nm, 608 nm, 614 nm, 618 nm, 697 nm, 703 nm y 709 nm fueron atribuidos a las transiciones $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ y $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ de Eu^{3+} , respectivamente. Sin embargo, la presencia de iones Eu^{3+} en el YAG nanoestructurado puede experimentar una simetría reducida dentro del entorno del campo cristalino debido al aumento de irregularidades en la superficie. Esto puede llevar a una intensidad prominente de transición $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ en el espectro de fotoluminiscencia (PL), resultado del acoplamiento espín-órbita y las transiciones se atribuyen a la mezcla de términos impares debido al campo cristalino. (Yan et al., 2011).

El ion Tm^{3+} en el material $YAG:Tm^{3+}$ (1%) mostraron emisión de conversión

ascendente azul al estimularse en el nivel 3H_5 de transiciones Tm^{3+} usando una longitud de onda de excitación de 800 nm, lo que desempeñó un papel vital en el almacenamiento temporal de iones Tm^{3+} excitados (Cates et al., n.d.; Haro-González et al., 2008). Vale la pena mencionar que para YAG: Tm^{3+} , la banda de emisión más fuerte, compuesta por múltiples picos, estaba centrada aproximadamente en 460 nm, correspondiendo a las transiciones desde $^1D_2 \rightarrow ^3F_4$ (Diamente et al., 2007). La forma y ubicación de los picos de excitación no se vieron afectados por la temperatura de calcinación, pero la intensidad del PLE aumentó, alcanzando su punto máximo a 1100 °C después de 16 horas (He et al., 2016).

Analizar la emisión combinada de los tres iones dopantes, referidos como "Merge", al ser excitados a una longitud de onda de 350 nm, indicó la presencia de distintas bandas, tal como se mencionó previamente. En el sistema YAG, para alcanzar una luminosidad y eficiencia óptimas con una concentración reducida de varios iones dopantes, es esencial garantizar una distribución homogénea de la concentración de activadores combinados "Merge" en el material anfitrión YAG.

Es notable cómo la modificación en las concentraciones de los materiales sintetizados derivó en la expansión de las bandas de emisión, volviéndolas no solo más amplias, sino también más definidas. Esta adaptación facilita la monitorización de la conversión ascendente multimodal (Deng et al., 2018).

El índice de reproducción cromática (CRI), se calculó mediante los parámetros de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE), como las coordenadas de color (x, y), con el fin de conocer las características fotométricas de las muestras preparadas (Chowdhury & Sharma, 2015). El CRI calculado mide cuantitativamente la capacidad de una fuente de luz para reproducir fielmente los colores de diversos objetos, este fue analizado específicamente para los nanocristales Merge, encontrando un color predominante amarillo (Fig. 13). A partir del diagrama cromático, se puede observar que las coordenadas de color atraviesan un breve rango desde la región verde hasta la región amarilla al variar la concentración de elementos de tierras raras. Esto se debe en gran parte a la proporción más alta del ion cerio presente (2:1:1%). Aunque los iones activadores, en particular los iones de lantánidos tienen características

intrínsecas que contribuyen a las propiedades ópticas de los fósforos, los niveles de energía electrónica de un ion activador en un cristal difieren enormemente de aquellos de un ion libre. La geometría local alrededor de los iones activadores, como en el caso de Ce^{3+} (1,143 Å), Eu^{3+} (1,066 Å) y Tm^{3+} (1,095 Å), tienen una importancia notable en la determinación del comportamiento espectroscópico de los iones de lantánido incorporados en una matriz anfitriona (Lin et al., 2016; Y. Ma et al., 2016b).

Esto se evidencia particularmente en la disminución de la brecha energética entre los niveles 5d y 4f, un fenómeno influenciado por el desplazamiento del centroide y la división del campo ligando. La relación intrínseca entre estos fenómenos y el color amarillo observado es crucial para entender a fondo las propiedades y aplicaciones de estos materiales en el campo de la iluminación y la imagen. Esta capacidad de seguimiento se ve realizada en múltiples técnicas de imagen.

Entre estas técnicas se incluyen la imagen óptica tradicional, la tomografía computarizada por rayos X (CT), la imagen por resonancia magnética (MRI) y, especialmente relevante para investigaciones en biomedicina, la imagen de fotoluminiscencia de conversión ascendente en tejidos profundos (UCL) (Deng et al., 2018).

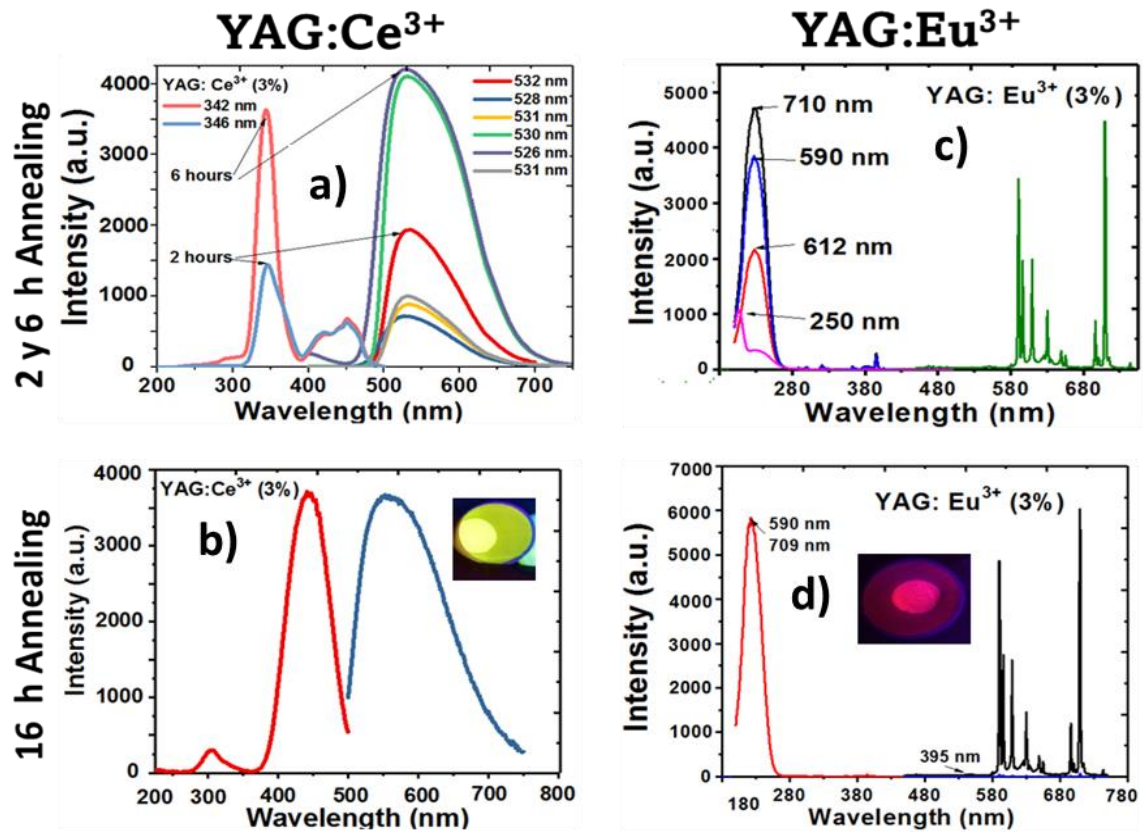


Figura 16. Espectros de excitación y emisión de fotoluminiscencia: a) YAG:Ce³⁺ excitado a 342 nm tras 2-6 h de recocido, b) la fotoluminiscencia se mejora mediante 16 h de recocido. c) Material YAG:Eu³⁺ excitado a 590 nm y d) la optimización de su espectro fotoluminiscente.

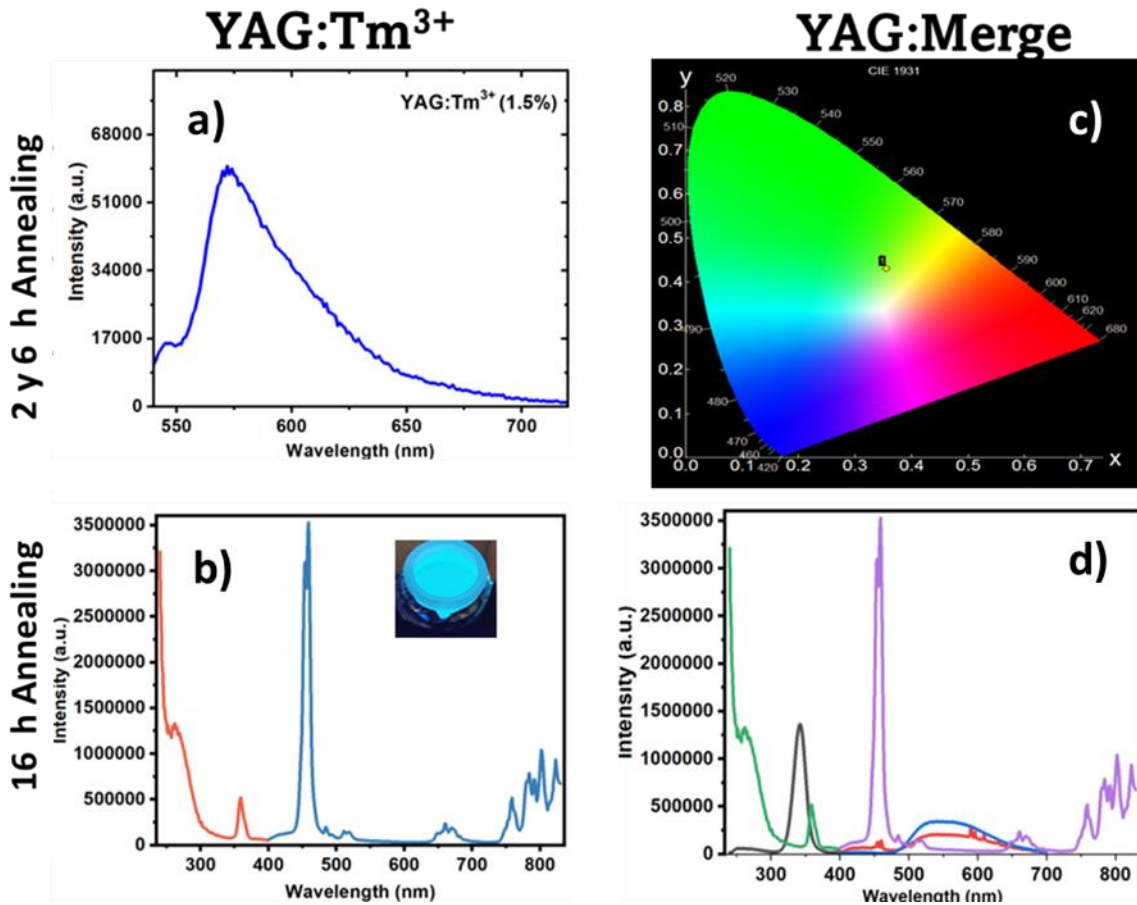


Figura 17. Espectros de fotoluminiscencia. a) YAG:Tm³⁺ excitado a 800nm tras 2-6 h de recocido, b) optimización de la fotoluminiscencia a 16 h de recocido, c) diagrama de cromaticidad (CIE) junto con las coordenadas de los nanocristales, d) YAG:Merge (2:1:1) excitado a 350 nm.

4.1.3 Caracterización morfológica y microestructural por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los siguientes paneles de la Figura 14, presentan el análisis SEM de las muestras YAG dopadas con Ce³⁺/Eu³⁺/Tm³⁺ y Merge, tras 16 horas de procesamiento. Se reveló la presencia de nanocristales de YAG:Ce³⁺ altamente dispersos con estructuras cuasiesférica compactas y bien definidas. Estas estructuras presentan "agujeros" en su superficie, lo que sugiere su formación a través de la liberación de gases durante la descomposición de componentes orgánicos y nitratos residuales,

o una fase líquida durante la síntesis que luego se evapora o se elimina, dejando tras de sí estos espacios vacíos. Estos poros podrían jugar un papel crucial en aplicaciones donde la transferencia de moléculas o iones es esencial, como la catálisis o la adsorción (Skrudiene et al., 2022). El tamaño de estos nanocristales fue de aproximadamente 45 nm a 60 nm.

Por otro lado, las micrografías de YAG:Eu³⁺ muestran una morfología de capas ligeramente angulares e irregulares, con tamaños de partículas más grandes alrededor de 100 nm (Rashmi & Dwivedi, 2019). Estos nanocristales se mostraron de tipo laminar con una estructura superpuesta y apilada, similar a las hojas de un libro. Su grosor es notablemente uniforme, lo que indica un proceso de crecimiento controlado durante la síntesis. La superficie de estos nanocristales laminados presenta áreas rugosas intercaladas con zonas más lisas, lo que podría ser indicativo de diferentes etapas de crecimiento o de la interacción con otros componentes durante su formación.

En algunas áreas de la imagen SEM, se pueden observar bordes levantados y ligeramente enrollados, sugiriendo una flexibilidad inherente de estas láminas nanocristalinas. Esta morfología es típica de materiales que han experimentado un proceso de exfoliación o que tienen una fuerte interacción entre las capas. Es probable que las fuerzas de van der Waals mantengan unidas estas capas en ausencia de enlaces químicos fuertes entre ellas. De manera similar, las partículas YAG:Tm³⁺ mostraron una morfología esférica con forma de placa agregada dentro del rango de tamaño de 50 a 100 nm, siendo muy similar en distribución y superficie a los nanocristales de YAG:Ce³⁺ (Haro-González et al., 2008). Cabe mencionar que todos los nanocristales (NC) exhibieron un alto grado de cristalinidad y nitidez (Zhou et al., 2021).

En un análisis más detallado, los nanocristales denominados Merge mostraron características morfológicas distintivas en comparación con otros tipos de nanocristales. Se identificaron defectos prominentes en sus extremos y en sus flancos. Curiosamente, su forma y estructura evocan a la morfología de los

nanocristales YAG:Eu³⁺, tal como se documentó en investigaciones previas (C. H. Chen et al., 2021; Y. Sun et al., 2023; X. Zhang et al., 2021a). Sin embargo, es crucial destacar que, a pesar de la presencia de estos defectos, también se observó una profusión de nanocristales con forma cuasiesférica. Estos son morfológicamente consistentes con lo que se ha observado en los nanocristales YAG:Ce³⁺ y YAG:Tm³⁺.

La explicación detrás de esta variedad morfológica se encuentra en la proporción específica utilizada durante la síntesis, que fue de 2:1:1. En esta proporción, los nanocristales de YAG:Ce³⁺ tuvieron una representación mayoritaria. La presencia dominante de estos nanocristales cuasiesférica refuerza esta elección en la proporción del proceso de síntesis.

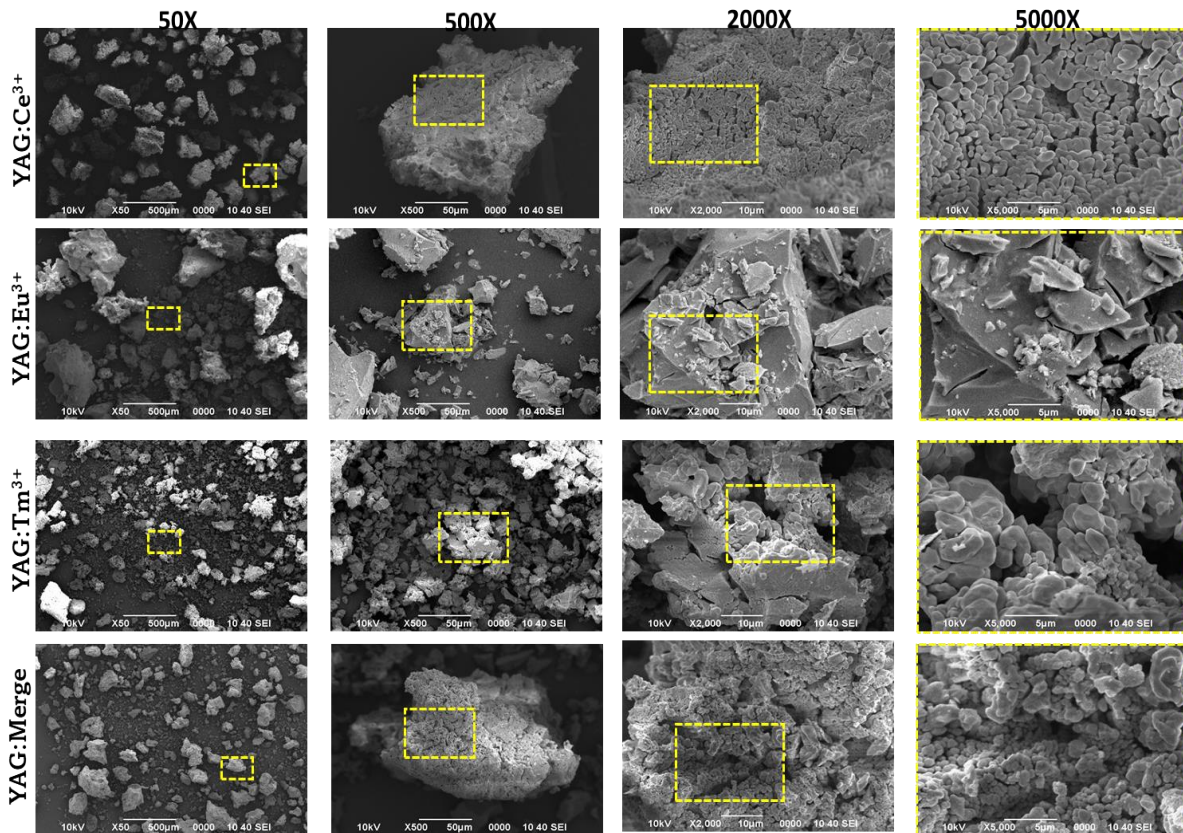


Figura 18. Micrografías SEM de los diferentes NCs. Micrografías a diferentes magnificaciones (50X, 500X, 2000X y 5000X) de nanocristales YAG:Ce³⁺, Eu³⁺, Tm³⁺ y Merge.

4.1.4 Evaluación por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las micrografías obtenidas mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) arrojaron detalles peculiares sobre la morfología de las partículas. Estos granos, pequeños y con un aspecto que recuerda a un tamiz, mostraban un diseño morfológico mayormente cuasiesférica. Además, estas micrografías mostraban una gama de tamaños que oscilaba entre 50 y 200 nm. A pesar de la tendencia hacia partículas luminiscentes nanoestructuradas (NPLs) cuasiesférica, se observaron otras estructuras, dando lugar a una composición heterogénea. Algunas partículas presentaban tamaños menores a 60 nm, mientras que otras eran más grandes, con tamaños menores a 150 nm. Esta variabilidad

podría ser el resultado de condiciones de síntesis no uniformemente controladas o de interacciones que ocurren después de la síntesis y que llevan a la formación de aglomerados.

La rugosidad y la asimetría de estos granos, junto con algunas formaciones irregulares, son indicativos de un proceso de formación complejo, donde factores como la velocidad de crecimiento, la temperatura y la concentración de precursores podrían haber desempeñado roles determinantes.

Todos los tamaños observados en las micrografías indican que el rango de tamaño original, que variaba entre 15 y 45 nm, parece ser más amplio, lo que sugiere una notable diversidad en las condiciones de síntesis. Sin embargo, se identificó agregación de partículas, con formaciones que a menudo parecían aglomeradas e irregulares. Esta agregación puede ser inducida por superficies hidrofílicas, que favorecen interacciones intermoleculares y, en particular, la formación de enlaces de hidrógeno entre las partículas, promoviendo su acercamiento y eventual agrupación.

Las micrografías TEM de alta resolución revelaron una característica sobresaliente: la presencia de franjas de retícula claramente definidas. Estas franjas son representativas de dominios cristalinos altamente ordenados, evidenciando la elevada calidad cristalina de los nanomateriales estudiados. De igual forma, no se observó incremento de dislocaciones en el material dopado nanoestructurado (Wubneh et al., 2018).

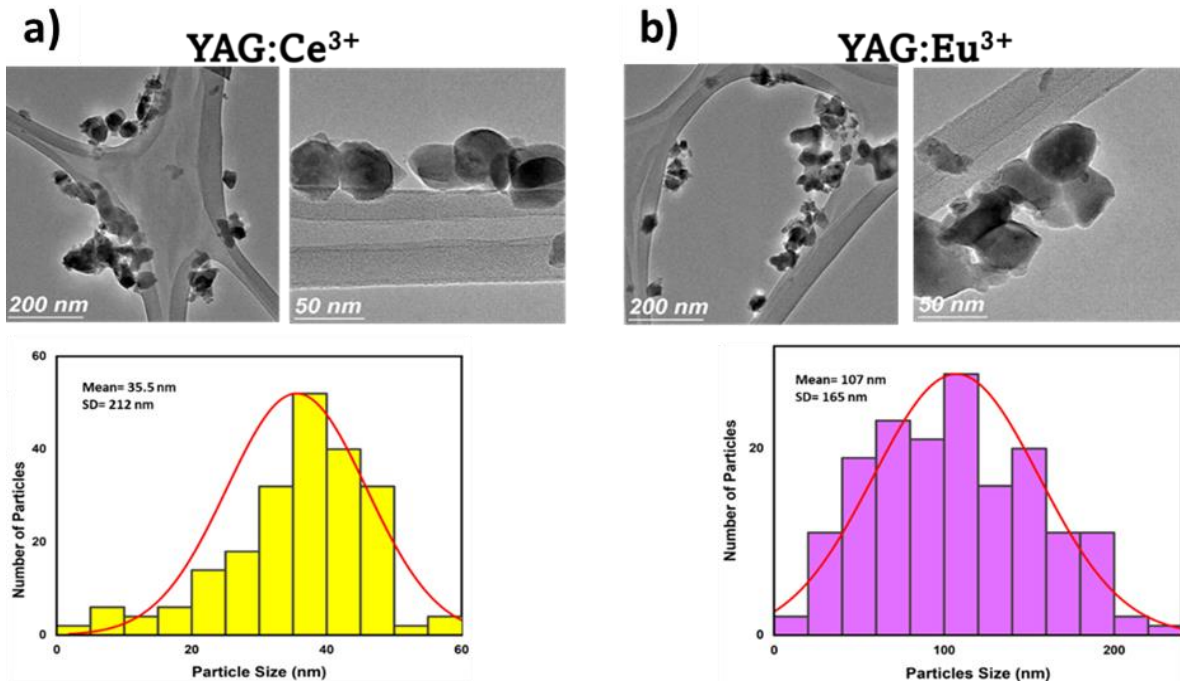


Figura 19. Imágenes morfológicas TEM. Micrografías TEM (200 y 50 nm) que comparan el tamaño medio y la morfología de los nanocristales a) YAG:Ce³⁺ y b) YAG:Eu³⁺.

4.1.5 Análisis del comportamiento coloidal y tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica (DLS)

El análisis mediante dispersión de luz dinámica (DLS) resulta esencial para comprender el comportamiento coloidal y la estabilidad de nanomateriales en solución. Esta técnica brinda una perspectiva detallada acerca de cómo las nanopartículas interactúan entre sí y cómo estas interacciones pueden influir en su dispersión o aglomeración.

A partir de los datos recabados, se observa que diferentes variantes del YAG muestran tamaños hidrodinámicos distintos. La variabilidad de estos tamaños, que oscilan desde nm hasta μm , indica posiblemente una diversidad tanto en la

morfología como en la aglomeración de las partículas. Por ejemplo, el YAG:Ce³⁺ con un tamaño de 3 nm podría estar reflejando nanopartículas individuales altamente dispersas. Por otro lado, las variantes con tamaños en el rango micrométrico (YAG:Eu³⁺ = 3 μm, YAG:Tm³⁺ = 4 μm, YAG:Merge = 5 μm) sugieren formaciones de aglomerados más grandes o estructuras más intrincadas.

La propensión hacia la aglomeración, evidente por la polidispersibilidad y la formación de conglomerados cohesivos, es un aspecto determinante al evaluar aplicaciones prácticas de estos nanomateriales. Esta aglomeración puede alterar propiedades clave como la reactividad, luminiscencia y biocompatibilidad, en función de la aplicación que se busque.

Si bien el DLS se enfoca en el análisis del comportamiento de las partículas en solución y en sus interacciones, otras técnicas complementarias de caracterización ofrecen información concreta acerca de la morfología y estructura cristalina inherente de las nanopartículas. La diversidad en tamaños detectada por el DLS subraya su sensibilidad para identificar aglomeraciones en medios acuosos. Esta disparidad en los hallazgos resalta la importancia de utilizar múltiples técnicas de caracterización con el fin de obtener una perspectiva completa y pormenorizada de la morfología, tamaño y comportamiento de las nanopartículas en variadas condiciones y medios al ser analizadas (Ansari et al., 2021).

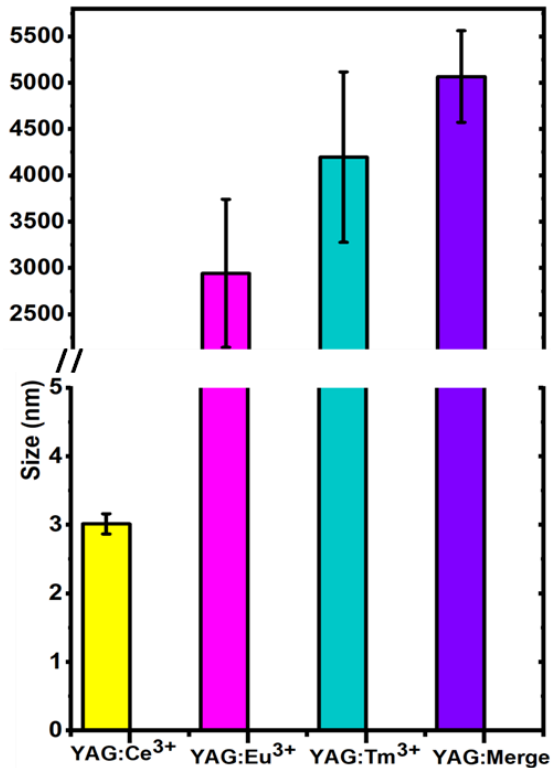


Figura 20. Dimensiones de los nanocristales (NCs). Análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) de todos los nanocristales mostrando variaciones en los tamaños de las nanopartículas.

4.1.6 Análisis espectroscópico por infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y reflectancia total atenuada (ATR)

El análisis espectroscópico mediante infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) se erige como una herramienta invaluable en la química y la ciencia de materiales, permitiendo identificar y cuantificar diversos grupos funcionales y estructuras químicas presentes en una amplia variedad de sustancias. La técnica, al aprovechar las vibraciones moleculares específicas que se manifiestan como bandas de absorción en un espectro, puede proporcionar una "huella digital" única para cada material.

En el estudio de los nanocristales luminiscentes en cuestión, el espectro FT-IR proporcionó múltiples perspectivas sobre su composición y estructura. El destacado

pico en 3597 cm^{-1} , señalando la presencia de moléculas de agua (H_2O), es indicativo de la posibilidad de hidratación superficial o de moléculas de agua atrapadas en la matriz del material cristalino YAG. Esta agua puede tener un impacto significativo en las propiedades físicas y químicas del nanomaterial (He et al., 2016).

Las bandas registradas en 1630 y 1500 cm^{-1} , que sugieren una coordinación de iones metálicos con grupos carboxilato ($-\text{COO}-$), son típicas de las vibraciones de tipo *stretching* o estiramiento de los grupos carboxilato, frecuentemente encontradas en nanopartículas estabilizadas o modificadas con moléculas orgánicas. El rango de 1080 y 1050 cm^{-1} , donde se observan las vibraciones de flexión del grupo O-H, destaca la presencia potencial de grupos hidroxilados en la superficie, que pueden influir en la estabilidad coloidal y las interacciones superficiales de las nanopartículas (Ansari et al., 2021).

Por otro lado, las vibraciones metal-oxígeno (M-O) detectadas entre $550-850\text{ cm}^{-1}$, y más específicamente, las centradas en aproximadamente $788, 691\text{ cm}^{-1}$ para Al-O y $723, 628\text{ cm}^{-1}$ para Y-O, no solo confirman la presencia de la fase YAG, sino que también arrojan luz sobre la coordinación y el entorno local de estos metales en la estructura. La nitidez de los picos observados sugiere una estructura cristalina bien definida, corroborada por la cristalización de las muestras $\text{YAG}:\text{Ce}^{3+}/\text{Eu}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ y nanocristales Merge a $1100\text{ }^\circ\text{C}$ (He et al., 2016).

El análisis de PLA desnudo por FT-IR presentó bandas características, que abarcan vibraciones moleculares específicas como 2947 cm^{-1} para C-O, y 1748 cm^{-1} para C=O, entre otras. Estas bandas son consistentes con la estructura y funcionalidad esperada de PLA. Cabe destacar que el FT-IR es particularmente útil en combinación con otras técnicas de caracterización, ya que aporta información sobre la química de superficie y los grupos funcionales, complementando datos morfológicos o cristalográficos.

A través del análisis por reflectancia total atenuada (ATR), se identificaron picos en

2960 y 2930 cm^{-1} , correspondientes a enlaces C-H en grupos metilo/metileno y el pico a 1740 cm^{-1} alude al enlace C=O en el grupo carbonilo del éster. Otros picos, como 1450 cm^{-1} y el doblete a 1325 y 1298 cm^{-1} , indican respectivamente la presencia de estiramiento C=O y flexión O-H en ácido tartárico, y estiramiento asimétrico del enlace O=S=O en el grupo sulfona. La región entre 750-817 cm^{-1} está estrechamente asociada con grupos aromáticos (Wang et al., 2015; Xue et al., 2015; Yin et al., 2012).

En el caso de los nanocristales dopados con tierras raras, las vibraciones resaltadas por el análisis ATR incluyen rangos como: 2928-3170 cm^{-1} para O-H debido a H_2O y $\sim 550\text{--}850 \text{ cm}^{-1}$ para vibraciones M-O, confirmando la consistencia con datos previamente obtenidos por FT-IR.

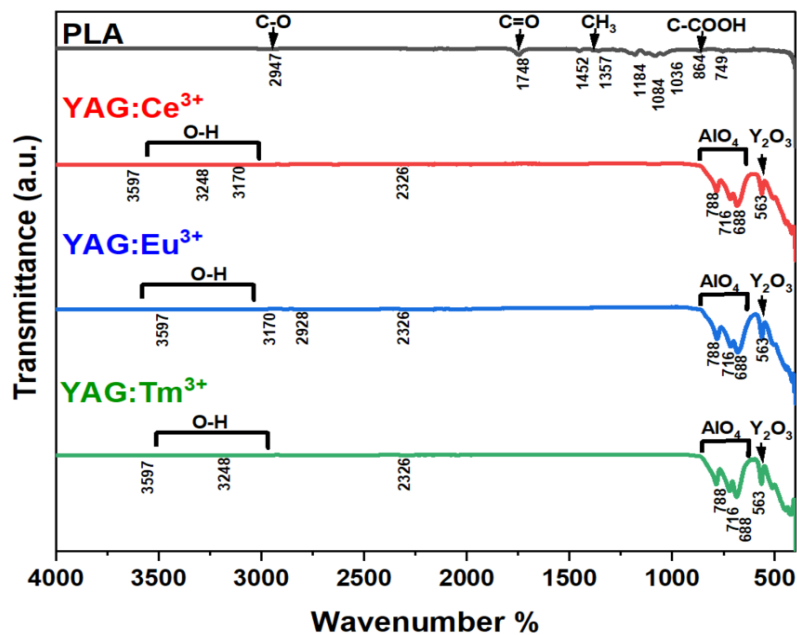


Figura 21. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier. Análisis FTIR de los distintos nanocristales con matriz YAG.

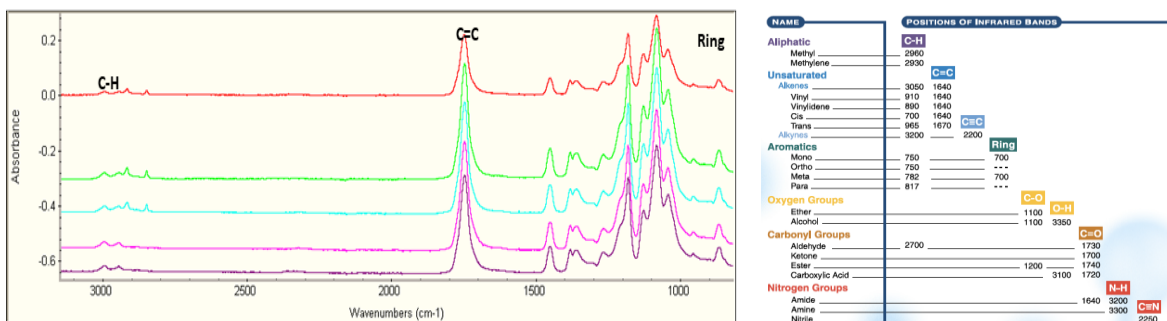


Figura 22. Espectros de reflectancia total atenuada (ATR). Análisis muestra concordancia con información recaba del análisis FTIR.

4.1.7 Caracterización mediante espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman ha emergido como una herramienta de caracterización esencial en la investigación y el estudio profundo de los nanocristales dopados con tierras raras. Esta técnica proporciona información clave sobre la estructura molecular y el comportamiento de dichos nanocristales. Uno de los hallazgos más destacados en investigaciones recientes es el incremento notable de la intensidad de la señal Raman cuando estos nanocristales dopados con tierras raras son sometidos a temperaturas más elevadas. Este efecto es especialmente pronunciado cuando el contenido de Al_2O_3 en la muestra es menor (Kang et al., 2020). Dicha investigación no solo consolidó la confiabilidad de la técnica Raman en este campo de estudio, sino que también destacó su pertinencia y aplicabilidad en el análisis de nanocristales de tierras raras.

La interpretación correcta de los espectros Raman es crucial para comprender las particularidades estructurales y de composición del material en estudio. Por ejemplo, los picos observados en rangos inferiores a 300 cm^{-1} se asocian con movimientos traslacionales-rotacionales del Y^{3+} . En un rango menor a 700 cm^{-1} , los picos corresponden al Al_2O_3 y AlO_4 , reflejando el estiramiento entre los átomos de Aluminio (Al) y Oxígeno (O) dentro de una unidad tetraédrica. Es fundamental también considerar las transiciones electrónicas $4f-4f$, ya que dan información sobre

las dinámicas internas de los electrones f en tierras raras, esenciales para entender el comportamiento óptico y electrónico de estos nanocristales.

Adicionalmente, al analizar el material puro de PLA mediante esta técnica, se observaron las transiciones correspondientes a C-COOH en 900 cm^{-1} , a C=O en 1480 cm^{-1} , y a C-H en 2996 cm^{-1} . Estos resultados refuerzan la versatilidad y la precisión de la espectroscopía Raman, demostrando su eficacia no solo en nanocristales dopados, sino también en otros materiales como el PLA.

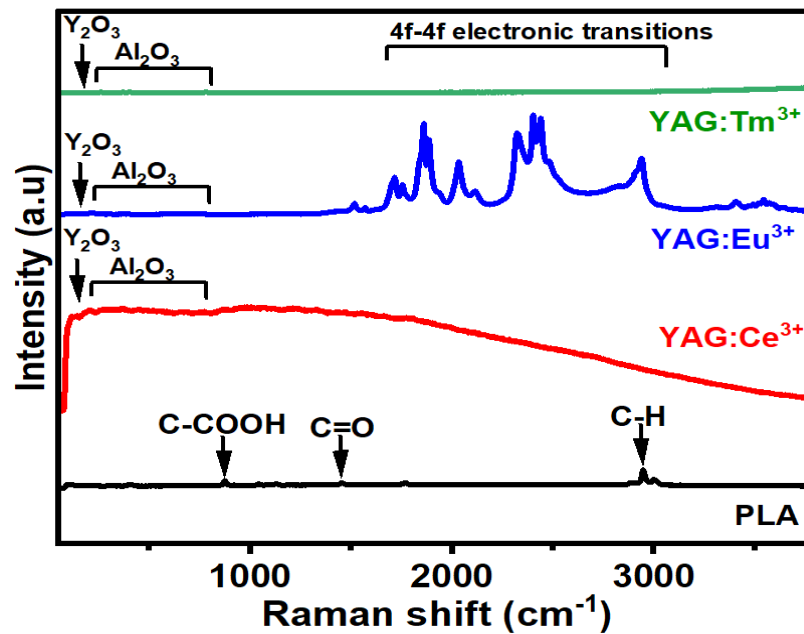


Figura 23. Resultados de espectroscopía Raman. Relevancia en los picos correspondientes al Al₂O₃ y AlO₄.

4.2 Propiedades y estructura de andamios de PLA:YAG/Nanocristales.

4.2.1 Comparación morfológica de composites nanoestructurados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía óptica

El método denominado "air jet spraying" (AJS) ha emergido como una técnica poderosa en la fabricación de andamios, permitiendo la conjugación de PLA con nanocristales especializados como YAG:Ce³⁺/Eu³⁺/Tm³⁺ y Merge. Una ventaja significativa de esta técnica es su capacidad para realzar la estabilidad estructural de los andamios. Esto se logra promoviendo una efectiva unión entre fibrillas y, al mismo tiempo, favoreciendo la generación de fibras interconectadas y estructuras intrincadamente porosas.

En el proceso de AJS, se utilizan altas tasas de producción y se explotan factores como la presión elevada, la alta velocidad y la evaporación controlada de la mezcla de polímeros, permitiendo que los materiales sean depositados de manera precisa sobre un colector y así conformar el composite deseado (Abdal-Hay et al., 2013b). Para garantizar la calidad y las propiedades deseables de estos composites, se hace indispensable analizar su morfología. Para ello, se recurrió al uso combinado de imágenes ópticas y técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes obtenidas a través del SEM confirmaron una morfología superficial homogénea tanto en los andamios de PLA puro como en aquellos conjugados con nanocristales (Bhaskar et al., 2018).

Los análisis mostraron variaciones en el diámetro de las fibras, siendo el más notable en los compuestos de PLA incorporando nanocristales. Estas variaciones, aunque sutiles, reflejan los cambios intrínsecos en las propiedades de la solución a medida que se integran los nanocristales. Además, estas diferencias en el diámetro pueden influir en las propiedades mecánicas y funcionales del andamio.

La estructura del andamio evidenció otras características destacables. Las fibras en las regiones más bajas del andamio exhibieron nanocristales adheridos, mientras que en las zonas superiores, estas incrustaciones eran menos evidentes. A pesar de la presencia de aglomerados de nanocristales, las fibras mantenían su integridad y flexibilidad, mostrando una elongación y estiramiento sin restricciones (Augustine et al., 2023; Lu et al., 2023).

Un hallazgo significativo fue el cambio en la rugosidad de los andamios con la incorporación de nanofósforos. En ciertas composiciones, como en el PLA/YAG:Ce³⁺ (3%) y PLA/Merge (2:1:1), estos nanofósforos parecían aglomerarse, lo que podría explicar el aumento en la rugosidad. Estas aglomeraciones, junto con una distribución no uniforme, son aspectos clave a considerar en la optimización del proceso y en la búsqueda de propiedades deseadas en los andamios, ya que, al tomar en cuenta estas características, se podrían potenciar respuestas biológicas. Se observó una marcada reducción en la formación de perlas o cuentas, producto de la sedimentación del biopolímero.

La interconectividad y el tamaño de poro son esenciales para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, transporte de nutrientes, oxigenación, bioreabsorción, entre otros. Se evidenció un aumento en las dimensiones de los poros, una interconectividad mejorada entre las fibras, una creciente tortuosidad y la consolidación de estructuras puntales, esenciales para fortalecer el andamio. Un posible enfoque hacia la fabricación de andamios estructurados de forma más homogénea es el uso de nanopartículas monodispersas y esféricas de poro que se pueden ensamblar en una red cristalina antes de la infiltración (Sommer et al., 2017). La distribución uniforme de las diferentes nanocristales luminiscentes (LNCs) en la matriz polimérica, puede deberse a la naturaleza neutral de los nanocristales brindados por la fuerza iónica del nanofósforo y de los grupos superficiales parcialmente cargados negativamente de la red de PLA (Q. Ma et al., 2014).

Finalmente, los nanocristales luminiscentes introducidos al andamio trajeron consigo una serie de modificaciones morfológicas y estructurales que, sin duda, juegan un papel esencial en las propiedades finales del andamio, abriendo un

abánico de posibilidades en términos de sus aplicaciones mecánicas, ópticas y biológicas.

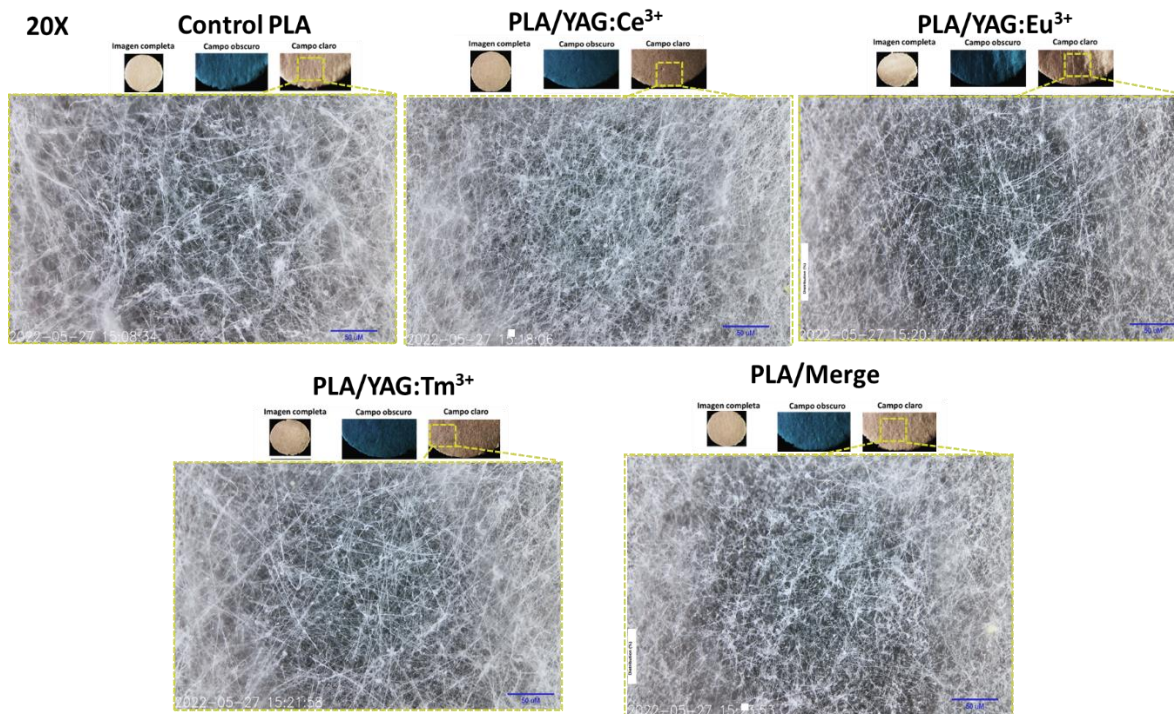


Figura 24. Imágenes de microscopía óptica. Se presentan varias fotografías de los andamios acoplados con NCs, comparando los pellets en campo claro y campo oscuro (magnificación 20X).

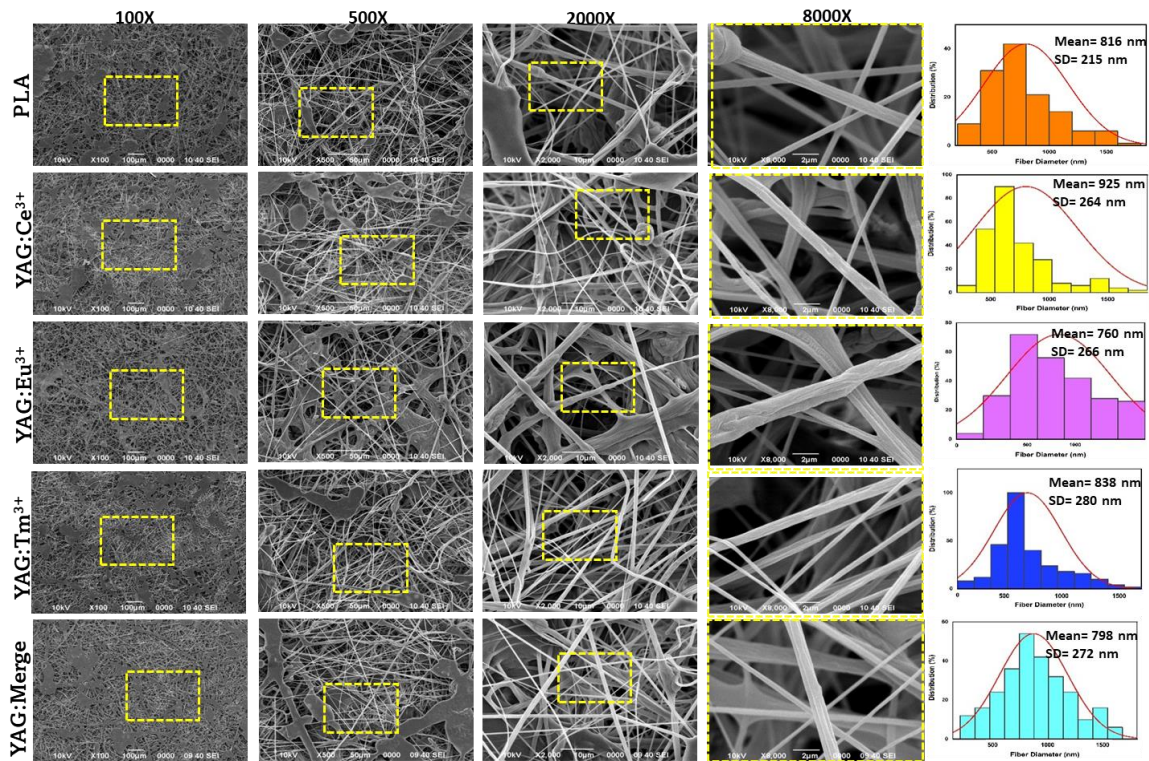


Figura 25. Análisis morfológico SEM. Evaluación de la microestructura de andamios de PLA con diversos NCs mediante microscopía electrónica de barrido (100X, 500X, 2000X y 8000X). Adicionalmente, se realiza un análisis cuantitativo del diámetro medio de cada andamio conjugado con iones lantánidos.

4.2.2 Propiedades fluorescentes de los andamios dopados con nanocristales

Las propiedades de fluorescencia de los andamios se investigaron exhaustivamente utilizando microscopía óptica avanzada, tanto bajo condiciones de luz blanca como azul. Al someter al andamio de PLA puro a esta inspección, se detectó una autofluorescencia mínima, lo que contrasta notablemente con los compuestos PLA/YAG:Ce³⁺ y PLA/Merge. Estos últimos manifestaron una fuerte fluorescencia, atribuida a una combinación de la longitud de onda de excitación adecuada y la presencia de nanocristales dispersos en la superficie de la fibra. Esta

fotoluminiscencia, rica en color y vibrante, no se observa en el PLA desnudo, sin modificar. Sin embargo, cabe destacar que los compuestos PLA/YAG:Eu³⁺ y PLA/YAG:Tm³⁺ manifestaron efectos luminosos más tenues, atribuibles a discrepancias en la longitud de onda de excitación (Nasrin et al., 2022).

La utilización de la microscopía óptica fluorescente en nuestra investigación reveló capacidades únicas en la obtención de imágenes de los andamios sintetizados, capacidades que no se replican en otros microscopios más tradicionales. Esta técnica nos brindó la oportunidad de analizar con precisión el hilado enriquecido con LNCs, permitiéndonos así discernir la homogeneidad y calidad del hilado. Además, se obtuvo una visión detallada sobre la orientación y estructura de las fibras poliméricas, así como la notable capacidad de emisión de los nanocristales. Estos últimos mostraron la posibilidad de generar diversos efectos luminiscentes, tales como el fenómeno de *quenching* (Gashti et al., 2012).

Los andamios sintetizados demostraron tener una estructura propicia para la biología celular. Los poros presentes en su estructura facilitan la migración celular, lo que se traduce en un potencial incremento en el intercambio de nutrientes y sustancias esenciales para el desarrollo celular. Además, el dopaje con LNCs aplicado potenció las propiedades hidrofílicas de los andamios, ofreciendo un entorno más compatible y beneficioso en comparación con los andamios no conjugados. Es relevante mencionar que, aunque algunos nanocristales no se excitaban óptimamente con la longitud de onda seleccionada ($\lambda = 450 \text{ nm}$), los andamios exhibieron una fotoluminiscencia notable. Específicamente, se pudo observar una mayor densidad de hilado en muestras como el control de PLA y, de manera destacada, en la matriz de PLA/ YAG: Eu³⁺.

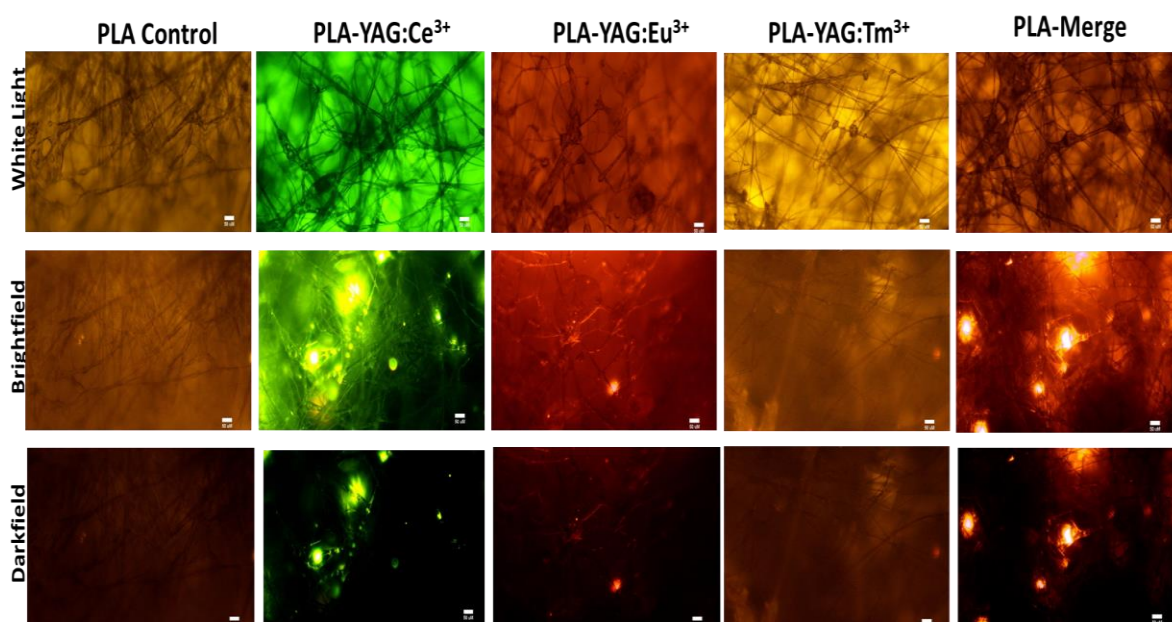


Figura 26. Fotoluminiscencia en tiempo real de andamios. La luminiscencia en andamios de PLA control y PLA/YAG:NCs se examinó usando microscopía óptica, revelando imágenes en campo claro (a), campo oscuro (b) y contraste de fase (c) (50µm). El brillo luminiscente emana de los andamios al excitarse con una longitud de onda de luz azul de 450 nm.

4.2.3 Evaluación espectroscópica mediante infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), reflectancia total atenuada (ATR) y espectroscopía Raman.

Al comparar el conjugado de andamio analizado mediante AJS con los análisis de muestras en polvo previas (Osorio Arciniega et al., 2021), el FTIR mostró un ligero desplazamiento en las bandas. Este desplazamiento se exhibió en los picos excitónicos moleculares del PLA, en particular en el pico de estiramiento alquilo C-H a 2996 cm^{-1} y el pico de estiramiento éster C=O a 1751 cm^{-1} (Suttiat et al., 2022). Se observaron frecuencias de flexión de los grupos -CH₃ asimétricos y simétricos en 1449 y 1360 cm^{-1} , respectivamente. Los picos de estiramiento C-O-C

aparecieron a 1186 y 1081 cm^{-1} . En PLA/nanocristales, los picos situados a 867 y 751 cm^{-1} correspondieron a las frecuencias de estiramiento de AlO_4 y Y_2O_3 .

Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos mediante espectroscopía ATR y Raman, revelando transiciones electrónicas del estado $4f$ al $5d$ (Chieng et al., 2014). La técnica ATR, o reflexión total atenuada, es especialmente útil para el estudio de superficies y proporciona datos cruciales sobre la presencia y orientación de ciertos grupos funcionales en la superficie del PLA y los nanocristales.

La espectroscopía Raman nos permitió, efectivamente, explorar los modos vibracionales tanto del esqueleto polimérico como de los nanocristales, facilitando la identificación de la presencia de posibles interacciones o enlaces entre ellos. Los modos vibracionales asociados con los nanocristales se manifestaron en picos excitónicos menores a 300 cm^{-1} , atribuibles al Y^{3+} . Adicionalmente, se registraron vibraciones moleculares menores a 700 cm^{-1} , correspondientes a Al_2O_3 y AlO_4 , lo que destaca las transiciones electrónicas de los nanocristales de $4f$ a $5d$. De igual forma, se observaron picos característicos del PLA en 2996, 1751, 1449 y 1081 cm^{-1} .

Este conjunto de datos espectroscópicos no solo resalta cambios significativos en el entorno químico y la simetría local, sino que también es crucial para el entendimiento profundo de las interacciones a nivel molecular y submolecular entre los nanocristales y el PLA. Comprender estos aspectos es vital, ya que las interacciones y enlaces presentes pueden influir notablemente en las propiedades mecánicas, térmicas y optoelectrónicas de los compuestos, afectando así su funcionalidad y aplicabilidad en distintas áreas, como la ingeniería de tejidos y la liberación controlada de fármacos.

Estos resultados enfatizan la importancia de un análisis detallado y exhaustivo en el nivel molecular para discernir las variaciones sutiles en las propiedades del compuesto y cómo estos cambios pueden ser aprovechados para el diseño de nuevos materiales con características mejoradas o específicas, adaptadas a las necesidades particulares de diferentes aplicaciones médicas y tecnológicas (Osorio-Arciniega et al., 2023).

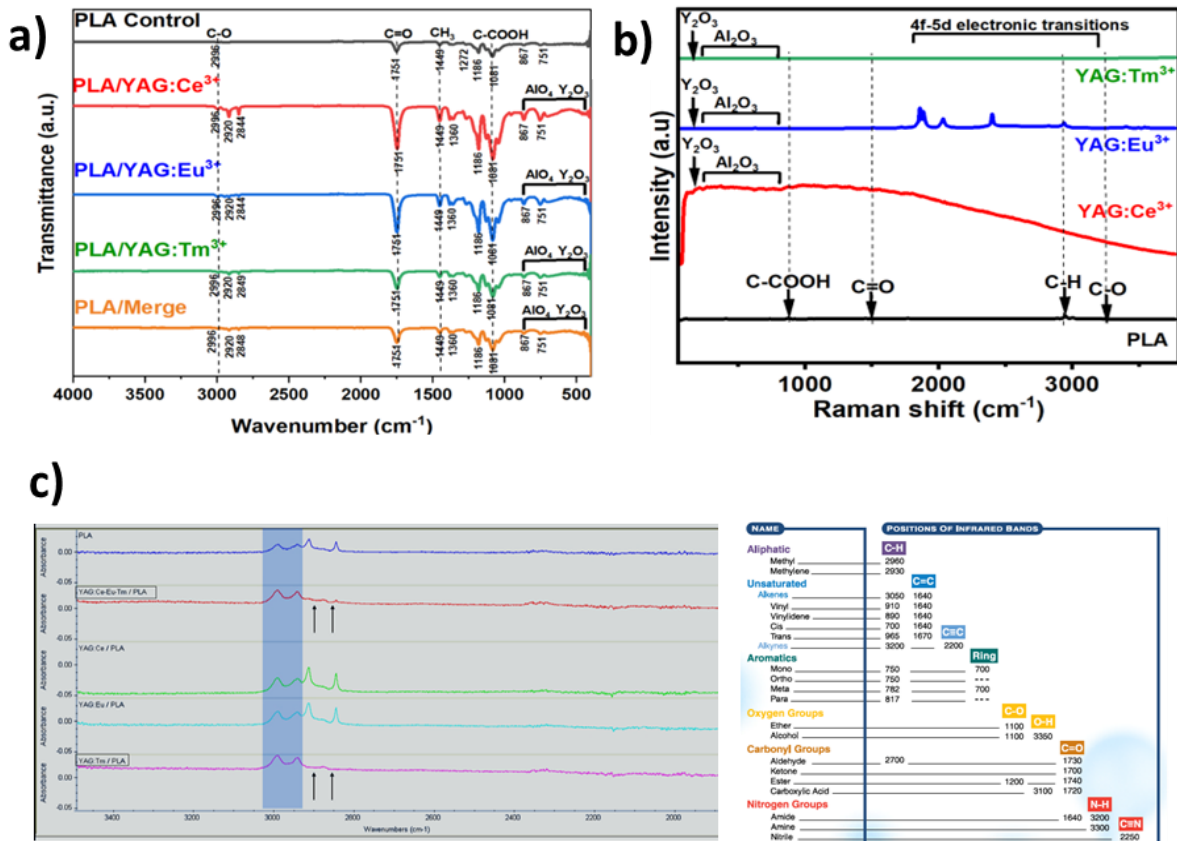


Figura 27. Análisis espectroscópico de andamios. (a) Espectros de Transmitancia FTIR, (b) Resultados de Espectroscopía Raman y (c) Análisis ATR.

4.2.4 Análisis calorimétrico: TGA y DSC

Las curvas de análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido (TGA-DSC) revelaron que el PLA experimenta degradación térmica principalmente a través de la vaporización en un solo evento. Esta variante específica de PLA exhibe estabilidad térmica hasta alrededor de 300 °C. Más allá de esta temperatura, ocurre la degradación mediante mecanismos de ruptura de cadena y de "unzipping" (desabrochado), resultando en una disminución del peso molecular. La pérdida de peso del andamio de PLA puro, sin aditivos, es del 85%, mientras que los compuestos de andamios dopados con NCs (PLA/YAG:Ce³⁺/Eu³⁺/Tm³⁺/Merge) experimentaron una pérdida de peso superior del 95% (González González et al.,

2022). Estos resultados indicaron que el material composite de PLA/YAG:Ce³⁺ fue el más termoestable.

También, se puede destacar que la pérdida de peso durante el proceso de degradación térmica es principalmente atribuida a la evaporación de agua cristalina en el andamio compuesto, que ocurre entre 30-200 °C. La mayoría de la pérdida de peso en andamios con nanocristales incrustados sucede en la etapa subsiguiente. En cuanto a los resultados de DSC, las curvas señalaron que la presencia de nanocristales en el andamio compuesto incrementa la temperatura de transición vítrea (T_g) del PLA. Esto sugiere un movimiento restringido de los segmentos de cadena de PLA debido a los nanocristales (He et al., 2016; S. Liu et al., 2020).

Este análisis reveló diferencias significativas en las proporciones de polímero y residuo entre el PLA puro y sus compuestos. El PLA puro registró un 90% de polímero y un 10% de residuo. En contraste, los compuestos dopados con nanocristales mostraron variaciones en estas proporciones. Específicamente, el andamio de PLA/YAG:Ce³⁺ presentó un 75.3% de polímero y un 24.7% de residuo. Asimismo, el PLA/YAG:Eu³⁺ mostró un 69.8% de polímero y un 30.2% de residuo, el PLA/YAG:Tm³⁺ un 75.3% de polímero y un 24.7% de residuo, y el PLA/YAG:Merge un 75.7% de polímero y un 24.3% de residuo.

Cabe destacar que, de estos, el PLA/YAG:Eu³⁺ evidenció el mayor porcentaje de residuo, con un 30.2%. Se atribuye esta transición a procesos exotérmicos, a la cristalización y a la presencia de materiales amorfos. Los distintos porcentajes y transiciones observados reflejan la complejidad y la diversidad de respuestas térmicas inducidas por la incorporación de diferentes nanocristales en los compuestos de PLA. Es crucial destacar que la integración de nanocristales altera significativamente las propiedades térmicas del PLA, lo cual podría tener implicaciones en la aplicación de estos compuestos en condiciones específicas. Los mecanismos de degradación, incluido el proceso de *unzipping*, sugieren una despolimerización que facilita la descomposición térmica del polímero. Además, las diferencias observadas en las tasas de pérdida de peso entre los andamios de PLA

puros y los compuestos indican la influencia substancial de los nanocrisales en el comportamiento térmico del PLA. Esto abre puertas para investigaciones futuras más detalladas en este campo, buscando optimizar las propiedades de estos compuestos y ampliar su aplicabilidad en el ámbito médico y otros campos relacionados (Osorio-Arciniega et al., 2023).

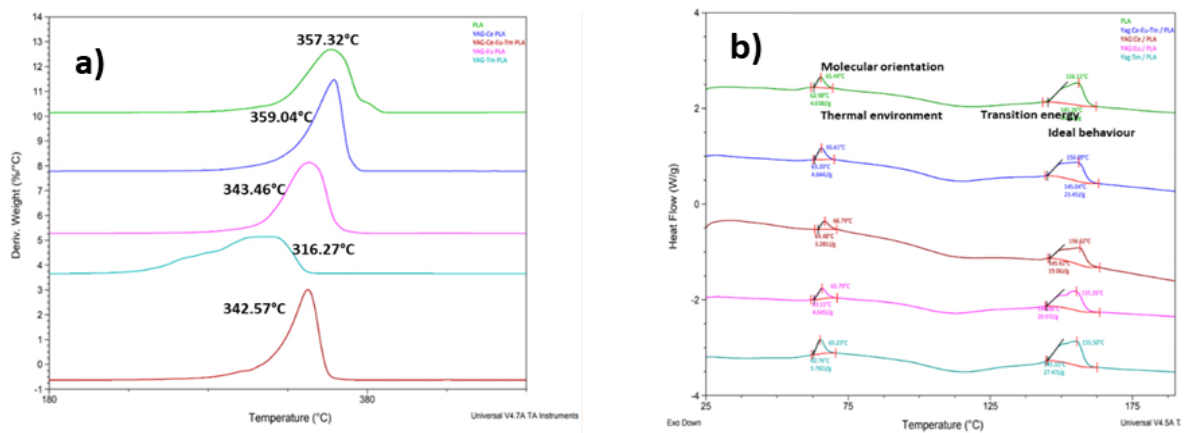


Figura 28. Evaluación de la estabilidad térmica. Influencia de los nanocrisales en la estabilidad térmica del PLA evaluada por análisis termogravimétrico (TGA) y curvas derivadas termogravimétricas (DTG) (a, b).

4.2.5 Ensayo de humectabilidad

La humectabilidad superficial es crucial en los andamios para la ingeniería de tejidos, ya que impacta la osteogénesis y el comportamiento celular. En este ensayo, se utilizaron mediciones del ángulo de contacto para evaluar la humectabilidad superficial del PLA y los compuestos de PLA/nanocrisales. Los ángulos de contacto fueron los siguientes: andamio de PLA puro = 93.12°, YAG:Ce³⁺ = 89.25°, YAG:Eu³⁺ = 89.15°, YAG:Tm³⁺ = 89.65°, YAG:Merge = 90.15°. Cabe mencionar, que ángulos de contacto superiores a 90° definen superficies hidrofóbicas, mientras que ángulos inferiores a 90° caracterizan superficies hidrofílicas (Bakhshi et al., 2023).

Los andamios de PLA puros se mostraron hidrofóbicos, mientras que los andamios

conjugados de PLA/nanocristales indicaron una ligera hidrofiliicidad con ángulos de contacto por debajo de 90°. Al mejorar la hidrofiliicidad, se promueve mejoras en comportamientos mecano-tensiles (J. Liu et al., 2019; S. Liu et al., 2020; X. Liu et al., 2019). La incorporación de lantánidos indujo cambios composicionales y microestructurales, mientras mantenía una rugosidad superficial consistente, lo que afecta la humectabilidad de la superficie (K.R et al., 2020).

Cabe mencionar que la transición desde superficies predominantemente hidrofóbicas a hidrofílicas es de suma importancia, ya que las superficies hidrofílicas son propicias para la adhesión celular, factor clave para la integración y la regeneración del tejido. Estos cambios en la humectabilidad y en las propiedades superficiales sugieren una modificación en la interfaz entre el andamio y el entorno celular, lo cual puede tener implicaciones significativas en la efectividad de los andamios para la ingeniería de tejidos, especialmente en aplicaciones óseas. Es fundamental, por lo tanto, entender cómo estas modificaciones en la humectabilidad y en la composición influyen en la interacción célula-material y en los procesos de regeneración y reparación tisular (Kelvii Kwok, 2020).

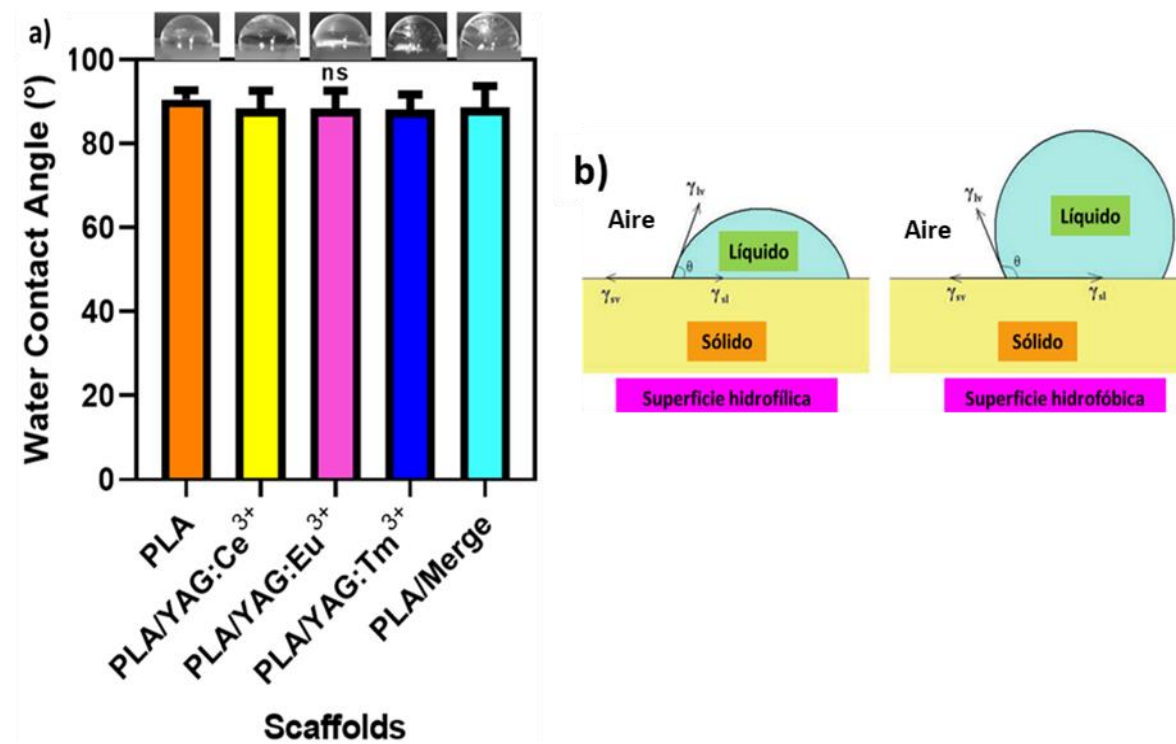


Figura 29. Ensayo de humectabilidad. a) Se ilustra la naturaleza ligeramente hidrofílica de los

andamios al ser dopados con nanocristales (NCs), b) ángulo de contacto en varias superficies.

4.2.6 Pruebas mecánicas

Al incorporar agentes nucleantes NCs, se incrementó la cristalinidad del PLA, mejorando así la resistencia del andamio. El andamio de PLA puro mostró alta elasticidad. La incrustación de nanocristales (2 wt%) mejoró el módulo de Young (E) y el módulo de dureza (H), indicando una fuerte adhesión interfacial. Es interesante notar que el PLA/YAG:Ce³⁺ mostró la resistencia más alta, mientras que el PLA/YAG:Eu³⁺ tuvo una estabilidad y propiedades mecánicas superiores (Yakdoui et al., 2022).

Este aumento en la resistencia y en las propiedades mecánicas es crucial para desarrollar andamios efectivos que puedan soportar las cargas mecánicas *in vivo*, especialmente en aplicaciones ortopédicas donde los andamios están sometidos a esfuerzos mecánicos significativos. La adhesión interfacial robusta sugiere una integración efectiva de los nanocristales en la matriz de PLA, lo que es esencial para garantizar la transferencia de esfuerzos entre la matriz y los refuerzos, y así, optimizar las propiedades mecánicas del compuesto.

La elaboración de andamios fibrilares para la regeneración del tejido óseo se rige por normativas de la Organización Internacional de Normalización (ISO) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos. El estándar ISO 22803:2004 establece requisitos específicos para los materiales de membrana utilizados en cirugía oral y maxilofacial, y para evaluar su cumplimiento, tanto la FDA como la ISO proponen pruebas estandarizadas.

Entre estas pruebas, se incluyen pruebas mecánicas, como las de compresión, cizallamiento y otras, que son fundamentales para evaluar propiedades mecánicas de los implantes de tejido óseo. Por ejemplo, se miden la resistencia a la tracción y alargamiento hasta la rotura, la resistencia al impacto, y la resistencia a la flexión y el módulo de elasticidad, siguiendo estándares como: ISO 527, ISO 180 e ISO 178.

Estas pruebas garantizan que los andamios óseos cumplan con los requisitos de resistencia y durabilidad necesarios para su aplicación clínica. Sin embargo, es importante destacar que, a pesar de estas normativas y parámetros, todavía existe controversia a nivel mundial en cuanto a los parámetros específicos utilizados en la elaboración de andamios óseos (Gao et al., 2022). Según Schultze y sus colegas (2023), se ha determinado que el módulo de Young para el hueso cortical se encuentra en el rango de 15-20 GPa, mientras que para el hueso calloso oscila entre 0.1-2 GPa. Esto se traduce en notables niveles de fuerza compresiva: 1000-200 MPa para el hueso cortical y 2-20 MPa para el hueso calloso.

Como se muestra en la Tabla 2, .Viecilli y colaboradores (2013), han determinado un análisis por elemento finito para analizar la resistencia de un diente, con una definición limitada a 2 proyecciones (2D) y una dirección de carga específica. Para minimizar errores en la determinación de los ejes de resistencia, se ajustó el módulo elástico del diente a 800 GPa en el modelo rígido (Viecilli et al., 2013).

Tabla 2. Análisis por elemento finito de las propiedades mecánicas del diente (MPa).

Estructura	Modelo dental y hueso no rígido		Modelo dental y hueso rígido	
	Módulo de Young	Coefficiente de Poisson	Módulo de Young	Coefficiente de Poisson
Esmalte	80000	0.3	800000	0.3
Dentina	20000	0.3	800000	0.3
Hueso	0.05-20000	0.325	Restringido	0.325
Ligamento periodontal	0.05	0.03	0.05	0.3

La elección de pruebas y estándares puede variar según la región y el tipo de aplicación clínica, lo que refleja la necesidad de un mayor consenso y desarrollo de estándares específicos para garantizar la calidad y eficacia de estos dispositivos en

la regeneración del tejido óseo. La superior estabilidad y propiedades mecánicas del PLA/YAG:Eu³⁺ sugieren potenciales aplicaciones en entornos más desafiantes donde se requiere una mayor resistencia y durabilidad. La capacidad de modificar y mejorar selectivamente las propiedades del PLA mediante la incorporación de nanocristales específicos abre nuevas posibilidades para el diseño y la fabricación de andamios para ingeniería de tejidos, permitiendo adaptar los andamios a las necesidades específicas de diferentes aplicaciones clínicas (Landy et al., 2013; Marchiori et al., 2019).

La superior estabilidad y propiedades mecánicas del PLA/YAG:Eu³⁺ sugieren potenciales aplicaciones en entornos más desafiantes donde se requiere una mayor resistencia y durabilidad. La capacidad de modificar y mejorar selectivamente las propiedades del PLA mediante la incorporación de nanocristales específicos abre nuevas posibilidades para el diseño y la fabricación de andamios para ingeniería de tejidos, permitiendo adaptar los andamios a las necesidades específicas de diferentes aplicaciones clínicas.

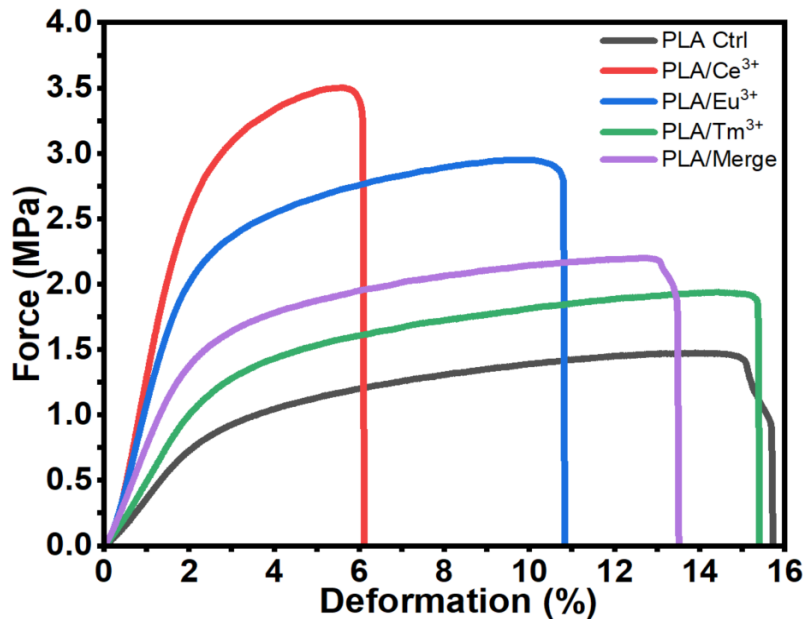


Figura 30. Análisis de resistencia. Se presentan las curvas de esfuerzo-deformación para el PLA puro y el PLA combinado con nanocristales, ilustrando las diferencias en las propiedades mecánicas entre los materiales. Los resultados evidencian las variaciones en la resistencia y la deformación debido a la incorporación de nanocristales en la matriz de PLA.

4.2.7 Análisis *in vitro*

4.2.8 Viabilidad celular

En el ámbito de la investigación biomédica, particularmente en la exploración del potencial terapéutico de los andamios celulares, se implementaron diversos ensayos con el objetivo de evaluar la viabilidad celular en células osteoblastos fetales humanos hFOB. Estos ensayos se llevaron a cabo empleando la técnica de Resazurina, durante periodos específicos de 2, 4 y 6 días (Ng et al., 2019).

En el curso de estos experimentos, se puso especial atención en evaluar los posibles efectos citotóxicos derivados de la incorporación de los diferentes nanocristales. Para obtener una comparativa sólida y representativa, los porcentajes de células viables de cada muestra se cotejaron con un grupo control PLA, de manera meticulosa y bajo estrictas condiciones experimentales.

De manera notable, se observó que las membranas no indujeron una disminución en el conteo celular, indicando su compatibilidad con las células osteoblastos hFOB. Sin embargo, se identificó que el andamio PLA/Merge exhibió un nivel de citotoxicidad discretamente superior. Esta observación llevó a la hipótesis de que tal fenómeno podría ser atribuido a que el contenido multinanocristalino puede estar desestabilizando las propiedades electrónicas y, en consecuencia, sometiéndose a ciclos de oxidación-reducción.

Este comportamiento sugiere una dinámica compleja, con múltiples factores influyentes, siendo crucial la concentración y naturaleza de los nanocristales incorporados en los andamios, así como sus interacciones electroquímicas. A pesar de estas variaciones y potenciales obstáculos, es esencial destacar que la totalidad de los andamios experimentales mantuvieron la viabilidad celular significativamente por encima del 50%, incluso durante periodos de observación extensos (Marsi et al., 2019; Suresh Babu et al., 2014; Vinothkumar et al., 2019).

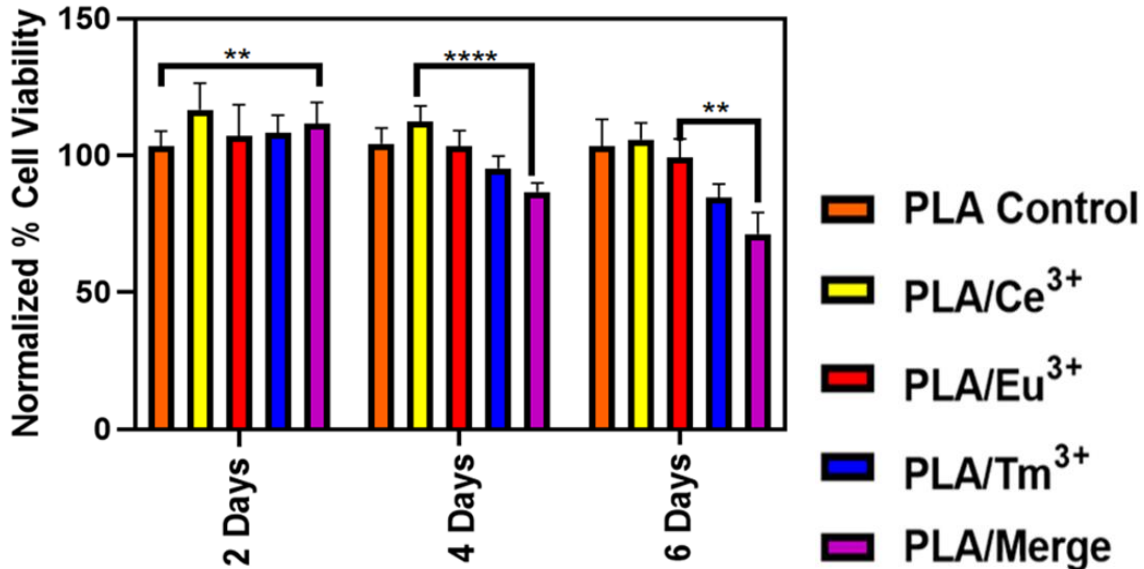


Figura 31. Viabilidad celular línea hFOB. Se ilustran los resultados de viabilidad celular a los 2, 4, y 6 días, demostrando no toxicidad. Se observa que los andamios de PLA/YAG:Ce³⁺ presentan los mejores resultados en términos de compatibilidad celular. La significancia se basó en valores de p: *p<0.05 (significativo), **p<0.01 (altamente significativo) y ***p<0.001 (muy significativo).

4.2.9 Adhesión celular

Para llevar a cabo una exploración exhaustiva y detallada del comportamiento y la interacción celular, se ejecutaron ensayos meticulosos de adhesión celular. Estos ensayos se realizaron mediante la línea celular hFOB, y se condujeron en intervalos de 24 y 48 horas, permitiendo así observar con precisión las dinámicas celulares en distintas fases del proceso de adhesión.

Los hallazgos revelaron patrones intrigantes y esclarecedores; se observó la formación de "*clusters*" celulares (aglomerado-conjunto) y se hizo evidente que un considerable número de células optaron por residir y proliferar dentro de cada andamio. Esta particular distribución y agrupación celular demuestran las características favorables de los andamios para albergar y soportar el crecimiento celular.

Con el transcurso del tiempo, se evidenció un crecimiento celular entrelazado y armonioso dentro de las fibrillas del andamio. Este entrelazado refleja la adaptabilidad y cohesión celular en el entorno proporcionado por los andamios. A pesar de la tendencia de las células a agruparse, se distribuyeron y expandieron a través de los diferentes andamios sintetizados. Este fenómeno sugiere la existencia de una comunicación intracelular efectiva y refinada en un entorno tridimensional, un aspecto crítico para el éxito de cualquier intervención o aplicación biomédica.

Además, se constató que las células hFOB mantuvieron su morfología redonda, no presentando extensiones membranosas ni la formación de filopodios (Agarwal & García, 2015). Esta consistencia morfológica es indicativa de la estabilidad y compatibilidad del microambiente proporcionado por los andamios sintéticos.

A lo largo de este exhaustivo estudio, se descubrió que los nanocristales compuestos que poseen superficies con mayor rugosidad y propiedades viscoelásticas óptimas ofrecen una abundancia de sitios propicios para la adhesión celular. Esta característica es crucial para establecer un microambiente celular robusto y favorecedor.

Cabe mencionar que investigaciones anteriores han subrayado repetidamente los beneficios inherentes de un módulo de Young adecuado en compuestos que han sido dopados con iones. Este parámetro, esencial para la integridad estructural del material, promueve significativamente la proliferación celular, su extensión y su diferenciación osteogénica (Yang et al., 2021; W. Zhang et al., 2021). El microambiente ocasionado por los andamios PLA/YAG:NCs, mostró ser equilibrado y nutritivo, potencializando el anclaje, proliferación y diferenciación celular.

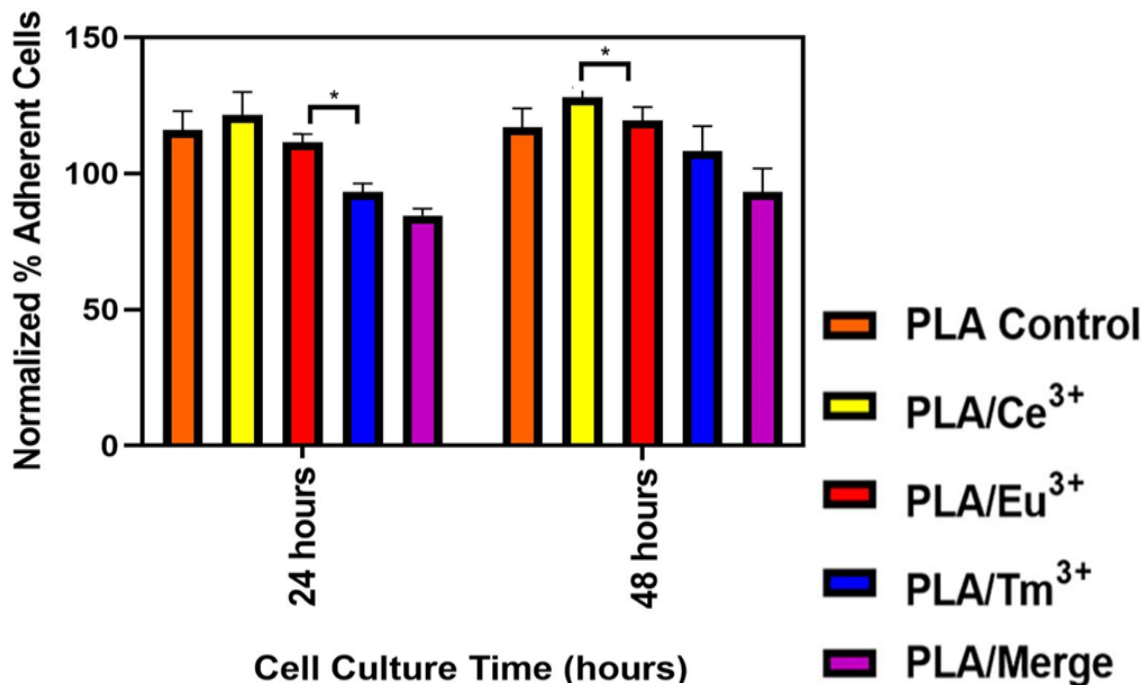


Figura 32. Adhesión celular a las 24 y 48 horas. La gráfica compara la adhesión celular en distintos momentos temporales con las placas control, evidenciando las diferencias en la interacción celular en el periodo especificado. La significancia se basó en valores de p: *<0.05, **<0.01, ***<0.001.

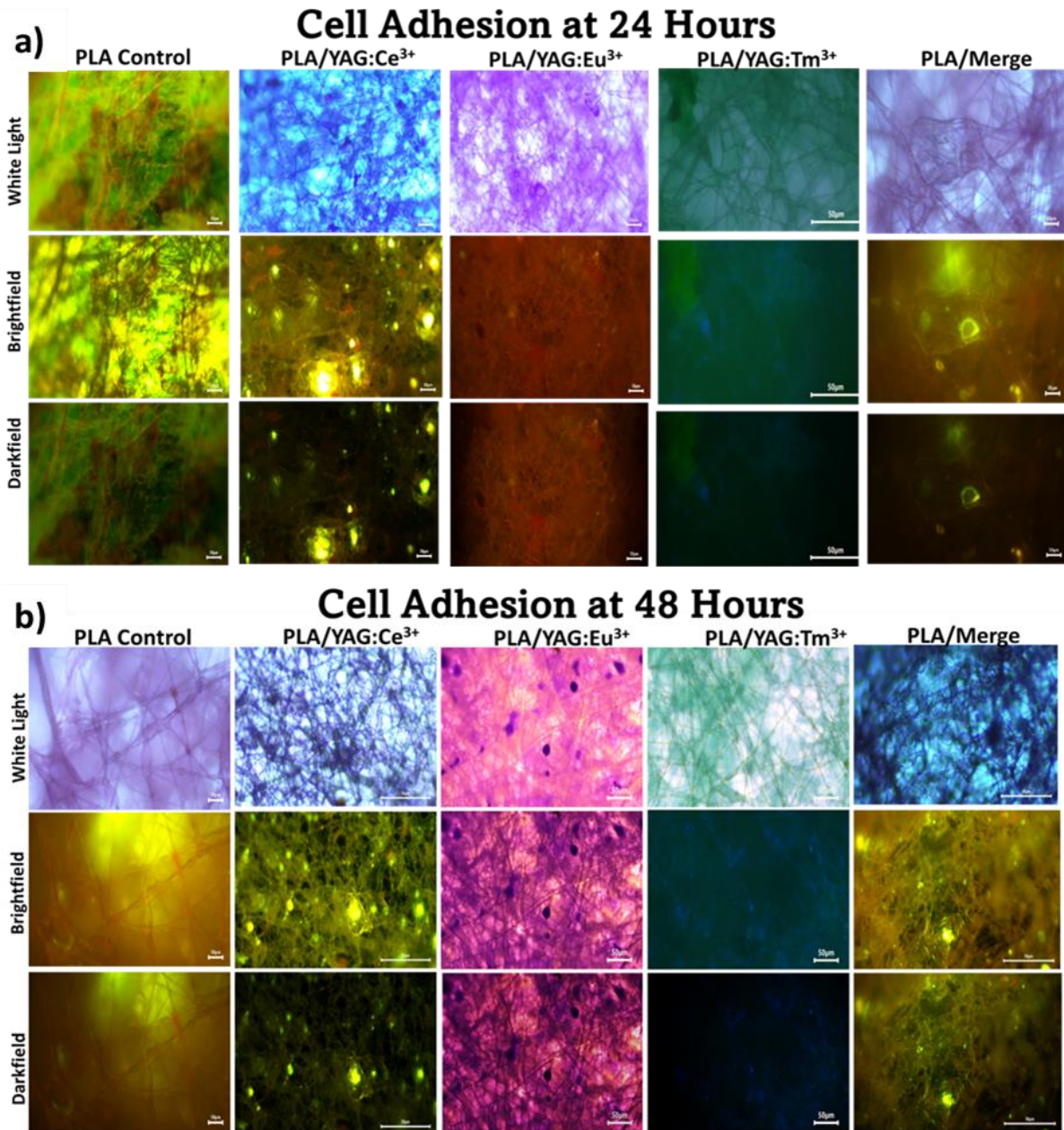


Figura 33. Fotografías por microscopía óptica de andamios irradiados a 450 nm. Las imágenes obtenidas mediante microscopio óptico revelan el andamio irradiado con luz azul de 450 nm, mostrando un aumento notable en la adhesión celular de 24 a 48 horas (a,b). Las imágenes proporcionan una visualización clara de la interacción celular con el andamio en el tiempo especificado.

4.2.10 Ensayos de mineralización

La metodología implementada para la cuantificación de la mineralización de calcio, a través de la utilización de tinción de alizarina roja (ARS), determinó la interacción celular y la adaptación de los andamios fibrilares dopados con NCs. Los resultados han evidenciado una presencia intensificada de tinción en andamios que han sido meticulosamente modificados con PLA/YAG:NCs en comparación con los andamios constituidos exclusivamente de PLA puros. Este detalle es crucial, ya que indica la viabilidad y eficacia de los andamios modificados en la promoción del proceso de mineralización.

A lo largo de un periodo de cultivo de 3 a 21 días, los osteoblastos hFOB en andamios de PLA/YAG:NCs, ocasionaron un aumento significativo en los nodos mineralizados. Este fenómeno es un indicador prometedor de la efectividad del material y de su potencial aplicabilidad en el campo de la regeneración tisular y la medicina regenerativa. Además, se identificaron nódulos de calcio de forma no estructurada en todos los grupos evaluados, incluido el grupo de control de PLA (Gregory et al., 2004).

De manera análoga, los niveles de mineralización observados en células hFOB cultivadas en andamios de PLA/nanocristales fueron superiores en comparación con aquellos obtenidos en andamios de PLA puros después del mismo periodo de cultivo de días (W. Zhang et al., 2021; X. Zhang et al., 2021b). Estos hallazgos coinciden y corroboran los beneficios intrínsecos de los andamios modificados con nanocristales.

Diversas investigaciones previas han consolidado la noción de que las superficies de mayor rugosidad tienen la capacidad de potenciar las concentraciones de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina, ambos marcadores cruciales del crecimiento osteoblástico. ALP, en particular, desempeña un rol determinante en la deposición mineral al transformar fosfato orgánico en inorgánico, catalizando de este modo el proceso de mineralización osteoblástica (Agarwal & García, 2015).

Este proceso de mineralización es esencial para el desarrollo y mantenimiento de la integridad ósea, y es crucial en la aplicación de técnicas de regeneración y reparación ósea. La mejora en los niveles de mineralización y en la producción de marcadores osteoblásticos es indicativa de una osteogénesis efectiva y de un ambiente propicio para el crecimiento y desarrollo celular.

Finalmente, se infiere de los estudios recientes que los andamios composites de PLA/NCs tienen la capacidad innata de fomentar procesos de osteogénesis en células hFOB. Lo notable de este descubrimiento es que estos procesos son facilitados aun en ausencia de factores osteogénicos tradicionales (Bernardo et al., 2022), lo que amplía el horizonte de posibilidades y aplicaciones de estos materiales en el campo médico y biológico, optimizando y diversificando las alternativas de tratamiento y intervención en la regeneración ósea.

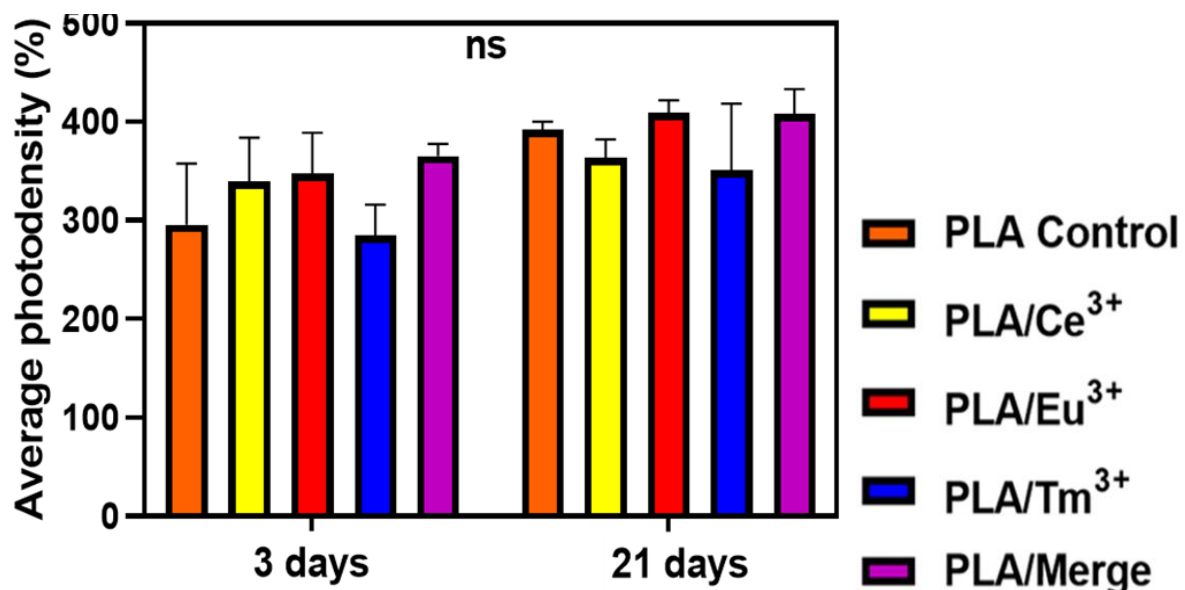


Figura 34. Tinción de rojo de alizarina para depósitos calcificados. Se observan depósitos calcificados en los andamios de PLA y PLA/nanocristales, evidenciando un incremento con el tiempo de cultivo (3 y 21 días). La tinción resalta la presencia de formaciones calcificadas, indicativas de la osteoconducción en los andamios. Criterios de significancia: * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, y *** para $p < 0.001$.

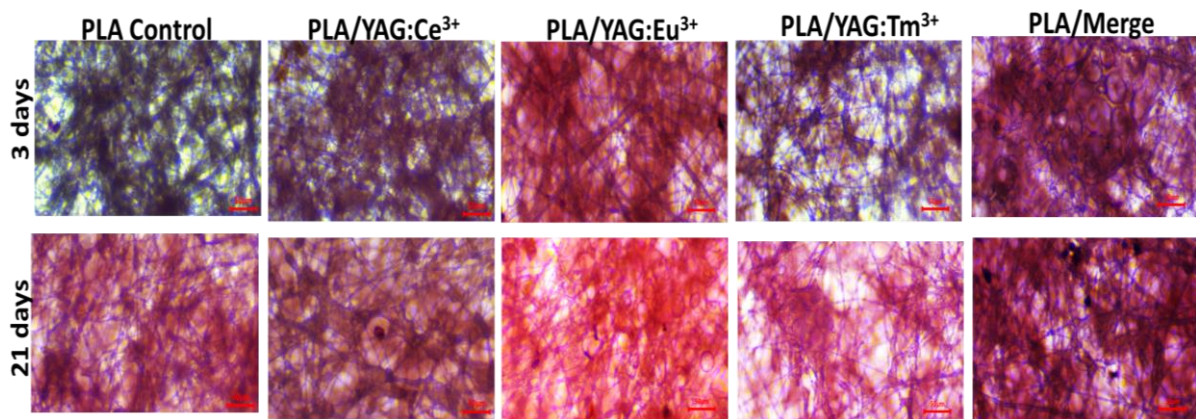


Figura 35. Incremento de nódulos calcificados. La visualización mediante microscopio óptico muestra el incremento significativo de nódulos calcificados entre los días 3 y 21 de exposición, resaltando la capacidad del Rojo de Alizarina para evidenciar de manera eficaz dichos depósitos calcificados a lo largo del periodo evaluado.

4.3 Evaluación de tejido *in vivo*

4.3.1 Análisis *in situ*

Los andamios fueron subcutáneamente depositados en la parte de la región interescapular y lumbar de la rata como se demuestra en la parte metodológica (PLA puro y dopados con YAG:Ce³⁺, YAG:Eu³⁺, YAG:Tm³⁺, Merge NCs). Para este estudio en específico, el andamio correspondiente a PLA;YAG:Ce³⁺, fue irradiado con una lámpara convencional correspondiente a una longitud de onda de 455 nm (luz azul), donde se pudo exhibir el resplandor en tonalidad amarilla radiante directamente en el modelo a tiempo real. Además, se pudo observar la limitación del andamio en el tejido circundante, donde se apreciaba la asimilación eficiente, demostrando bio integración exitosa en la capa de *Stratum Fibrosum subcutis* (Naserian et al., 2018; Wells et al., 2010). Al ser irradiados los demás andamios a esta longitud de onda *in situ*, no mostraron una fotoluminiscencia fidedigna, debido a que no correspondía a su longitud de onda propicia de excitación.

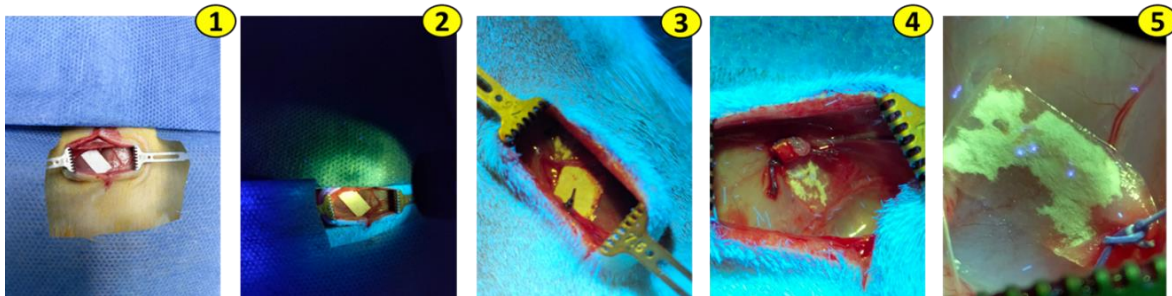


Figura 36. Evaluación fotoluminiscente *in situ*. Imágenes secuenciales del andamio YAG:Ce³⁺ irradiado con luz azul (450 nm), mostrando las propiedades fotoluminiscentes del material en condiciones *in situ*.

4.3.2 Análisis H&E

El estudio se desarrolló en tres etapas específicas: a los 7, 21 y 49 días. Desde una perspectiva clínica, es esencial promover una regeneración de la piel de manera acelerada y con la menor contracción de la herida posible. Esto se debe a que una contracción excesiva podría derivar en una cicatrización no deseada.

Las heridas tratadas con los diversos andamios fibrilares y nanocristales sintetizados demostraron un cierre de herida similar al grupo control de PLA. El empleo de andamios fibrilares y nanocristales sintetizados en el tratamiento de heridas reveló una disminución significativa.

Esta observación sugiere que la presencia de andamios nanodopados desempeña un papel fundamental al proporcionar un soporte mecánico. Este soporte no solo contribuye a mantener el tamaño y la forma de la herida, facilitando así su manejo y posicionamiento, sino que también estimula la regeneración del tejido, evitando la contracción no deseada.

Diversos estudios respaldan la idea de que la migración de células cutáneas hacia la zona de la lesión, facilitada por los andamios nanofibrilares, desempeña un papel crucial en la reducción de la contracción de la herida. Además, estudios han destacado la formación de nuevos vasos sanguíneos como un paso esencial en el

proceso general de cicatrización de heridas (Mohiti-Asli et al., 2017).

En un contexto más amplio, los andamios que incorporan iones de tierras raras o lantánidos tienen el potencial de transformar significativamente el campo de la regeneración y cicatrización de heridas. Las nanopartículas de lantano (iones de tierras raras), presentan propiedades excepcionales, como su capacidad para mantener una baja citotoxicidad y la particularidad de no generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas cualidades son de suma importancia, ya que una respuesta inflamatoria excesiva y la presencia de ROS pueden ser obstáculos para un proceso de cicatrización eficaz, lo que a menudo resulta en cicatrices más notorias y persistentes (Vijayan et al., 2022).

Lo que realmente distingue a estos iones de tierras raras es su capacidad destacada para estimular la angiogénesis, un proceso fundamental en la regeneración de tejidos. La angiogénesis implica la creación de nuevos vasos sanguíneos, asegurando un suministro eficaz de oxígeno y nutrientes a las células involucradas en el proceso de regeneración. Este incremento en el flujo sanguíneo y en el suministro de nutrientes en la zona de la herida es crucial para lograr una cicatrización más rápida y eficiente.

Además de su influencia en la angiogénesis, estas nanopartículas también desempeñan un papel esencial en la migración de células clave, como los fibroblastos y células cutáneas. Los fibroblastos son actores fundamentales en el proceso de regeneración de tejido, ya que son responsables de la producción de colágeno, una proteína esencial para la cicatrización. Al promover la migración de fibroblastos y estimular la producción de colágeno, los iones de tierras raras refuerzan aún más el proceso de regeneración y, en última instancia, aceleran la cicatrización de heridas (Vijayan et al., 2022).

Un estudio realizado por Drouven y su equipo (1986), destaca la relevancia de las regiones telopéptidas en lo que respecta a la calidad y cantidad de la formación de fibrillas de colágeno. Sorprendentemente, se ha descubierto que los iones de calcio, iones de lantánidos o fosfato aceleran la velocidad de polimerización del colágeno tipo "p". Es importante destacar que los iones de lantánidos son capaces de acelerar

tanto el colágeno "p" como el colágeno "i", mientras que los iones de calcio y fosfato solo afectan al primero. Esto sugiere que el colágeno "p" es más susceptible a la influencia de su entorno iónico que el "i". Además, se ha observado que las concentraciones de iones de lantánidos necesarias para estimular la gelificación del colágeno "i" son significativamente más bajas que las requeridas para el colágeno "p" (Drouvens & Evans⁵, 1986).

Este hallazgo abre la posibilidad de acelerar la formación de geles de colágeno mediante la utilización de iones de lantánidos en concentraciones relativamente bajas. La respuesta estimulante se ha registrado con tan solo 5 μM de iones de lantánidos, una concentración que se asemeja a la del propio colágeno. Este efecto podría atribuirse a un número limitado de sitios de unión de iones de lantánidos, presumiblemente ubicados en la estructura helicoidal de la molécula de colágeno. Estos resultados no solo explican cómo afectan al colágeno "p" y "i", sino que también se correlacionan con los datos de luminiscencia de los NCs.

Además, se ha observado que el proceso de entrecruzamiento covalente entre moléculas de colágeno comienza tempranamente, incluso antes de que finalice la fase de crecimiento. Aproximadamente el 60% de las fibrillas de colágeno "i" son resistentes al frío al concluir la fase de crecimiento, y este porcentaje aumenta al 85% en 15 minutos adicionales. Los análisis han revelado la acumulación de componentes de alto peso molecular durante y después de la fase de crecimiento, lo que sugiere que el entrecruzamiento covalente intermolecular de las moléculas de colágeno puede ocurrir tan pronto como estas se alinean adecuadamente en una fibrilla en crecimiento.

Para investigar los sitios de unión de los iones de lantánidos, se ha utilizado la luminiscencia de los NCs. Estos iones tienen la capacidad de aceptar energía de cromóforos cercanos y, al excitarse, emiten fotones con energías características al decaer. Los colágenos "p" y "i" han demostrado tener máximos de excitación a 290 nm y 225-335 nm, lo que no corresponde a los aminoácidos aromáticos presentes en el colágeno. Esto podría deberse a la presencia del compuesto de enlace cruzado piridinolina. Además, se ha observado que la aceleración de la formación

de geles de colágeno causada por los NCs es similar en efecto a la producida por otros iones de lantánidos en diferentes condiciones de pH. Las microfotografías electrónicas confirman que los iones de lantánidos promueven la formación de fibrillas de colágeno ordenadas y estratificadas (Drouvens & Evans, 1986).

A los 7 días:

El andamio de PLA reveló la formación de granulomas difusos, integrados por eosinófilos, sin evidenciar deterioro venoso. Contrastantemente, los andamios de PLA/YAG:Ce³⁺ y PLA/YAG:Eu³⁺ indicaron una consolidación granulomatosa menos difusa, con áreas reparativas específicas y presencia de desmoplasia inmadura. Fascículos musculares peri implantarios fueron detectados en el último caso. Es destacable la observación de degradación del biopolímero en el material PLA/YAG:Eu³⁺ en diferentes fases y áreas, mientras que en PLA/YAG:Tm³⁺ se apreció una concentración de granulomas con presencia elevada de microesferulitas, vesículas con material fibrilar e histiocitos. Para YAG: Merge, se observó granuloma, degeneración macro y micro vesicular, e inicio de daño en tejido nervioso, visualizando perineuritis en primeros estadios. En todos, se detectó degeneración macrovesicular y presencia de células gigantes, predominando en el control de PLA en menor proporción.

A los 21 días:

El granuloma en PLA exhibió una maduración uniforme con indicativos de avances en cicatrización y reparación alrededor del granuloma, manifestando una reacción granulomatosa con degradación microvesicular y predominancia de células gigantes e histiocitos maduros. La integración compacta y definida del andamio fibrilar dentro del granuloma fue notable. Para PLA/YAG:Ce³⁺ se detectó

maduración y consolidación del granuloma, hialinización vascular y perineural y degradación moderada del andamio fibrilar en comparación con el grupo control PLA. PLA/YAG:Eu³⁺ evidenció degradación lenta, presentándose dentro de un granuloma fusiforme, manteniendo la predominancia de histiocitos locales, y PLA/YAG:Tm³⁺ mostró consolidación del granuloma con infiltrado inflamatorio. Finalmente, PLA/Merge presentó granuloma consolidado, mostrando limitación del granuloma y mayor presencia de basófilos y linfocitos, dependiendo del plano de corte, los andamios con nanocristales se presentaban de manera ovalada (corte longitudinal) y fibrillar (corte transversal).

A los 49 días:

El material control de PLA evidenció una degradación significativa, con presencia de células gigantes multinucleadas fagocitando el material y contenido fibrilar y polimérico microvesicular dentro del granuloma. PLA/YAG:Ce³⁺ manifestó patrones extensivos de degradación con la presencia predominante de eosinófilos y una población elevada de linfocitos acompañados de histiocitos, sin alteraciones histológicas en los fascículos inflamatorios. A la vez, se visualizaron focos de inflamación activa. PLA/YAG:Eu³⁺ presentó granuloma difuso con contenido fibrilar en macro y micro vesículas, mientras que PLA/YAG:Tm³⁺ mostró elevada presencia de vesículas y escaso contenido del material implantado dentro del granuloma consolidado, con focos necróticos evidenciados. En cuanto a PLA/Merge, se observó un granuloma difuso con cuerpos de Rossel (agrupación de inmunoglobulinas), indicativos de respuesta humoral con rechazo crónico y áreas necróticas fibrinosas, destacando una asimilación y desintegración más laboriosa para el organismo, no obstante, la cicatrización se efectuó de manera efectiva.

Este profundo análisis subraya la compleja interacción entre los diferentes andamios y el organismo, reflejando la adaptabilidad, respuesta inflamatoria y

capacidad de regeneración y reparación tisular en diferentes estadios del proceso curativo.

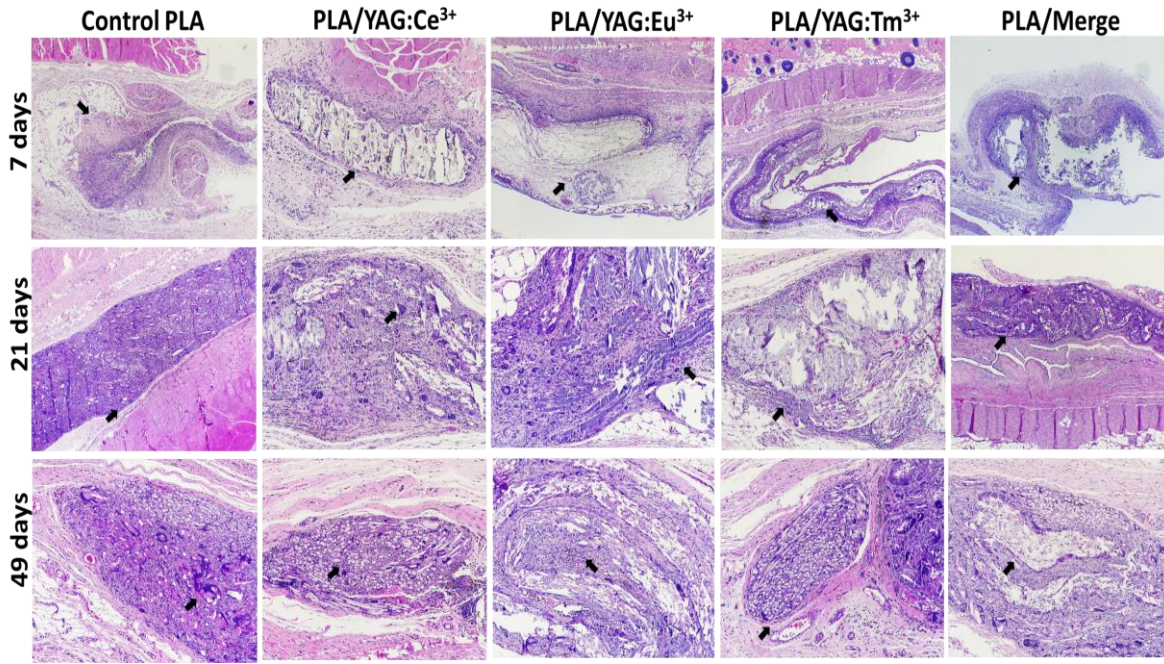


Figura 37. Integración de andamios y respuesta inflamatoria. Micrografías ópticas revelan una integración suave de los andamios de PLA y YAG:NCs (10% p/v) con la fibra de colágeno circundante, con una inflamación gradual y leve observada después de 21 días. A los 7 días post-cirugía, se evidencia en las secciones histológicas la encapsulación del compuesto y las nanopartículas dentro del granuloma, rodeadas por microvesículas (100X y 40X).

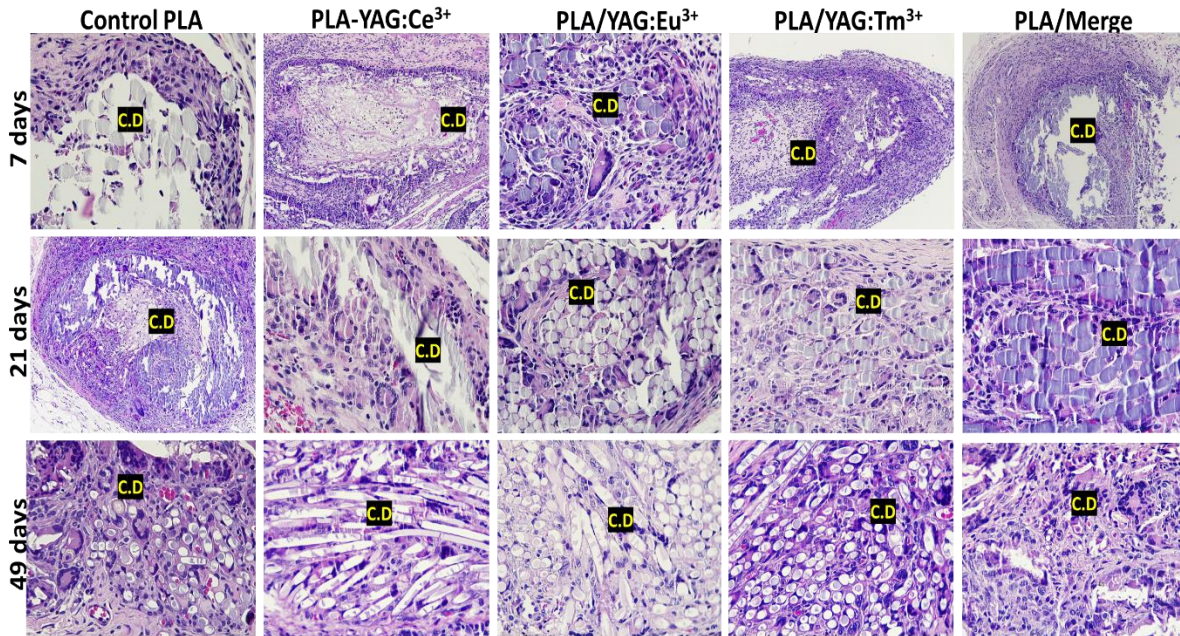


Figura 38. Integración, inflamación y degradación de los andamios compuestos. Las micrografías ópticas demuestran una integración sin problemas de los andamios de PLA y YAG:NCs (10% p/v) con la fibra de colágeno circundante, y se observa una inflamación gradual y leve después de 21 días. A los 7 días post-cirugía, se evidencia la encapsulación del compuesto y las nanopartículas dentro del granuloma, rodeado por microvesículas, en las secciones histológicas (40X). Adicionalmente, se observó la presencia del composite degradado en estructuras fibrilares (C.D).

4.3.3 Análisis tinción tricrómica de Masson , CD34 y P-S100

Se utilizó la tinción tricrómica de Masson principalmente para conocer el estado del colágeno. Los andamios constituidos por PLA/ YAG:Ce³⁺, Eu³⁺, y Tm³⁺ exhibieron degeneración de colágeno y fibrosis.

A los siete días post-implantación, se visualizó en el grupo control de PLA un tejido conectivo denso, acompañado de vasos sanguíneos en estado de congestión (saturación vascular), y un comportamiento semejante se identificó en las muestras de PLA/YAG:Ce³⁺ y Eu³⁺. Esto contrastó notablemente con lo observado en las muestras de PLA/YAG:Tm³⁺ y PLA/Merge.

Al llegar a los 21 días, el andamio control de PLA implantado mostró una formación de fibras de colágeno densas y bien organizadas, conjuntamente con una reducción apreciable en el número de vasos sanguíneos presentes. Por otro lado, todas las muestras de PLA con nanocristales exhibieron depósitos de colágeno de configuración irregular, intercalados con canales vasculares, evidenciando un patrón distinto de integración y respuesta tisular .

En el umbral de los 49 días, se observaron en las muestras de PLA/YAG:Ce³⁺, Eu³⁺, y Tm³⁺ consistentes depósitos de fibras de colágeno (Granados-Hernández et al., 2018). En contraste, el colágeno en las muestras de PLA/Merge se manifestó de manera más difusa y dispersa, sugiriendo una posible variación en la interacción material-tejido. Finalmente, se logró evidenciar la presencia de cicatrización y fibrosis, en donde se visualizaron fibroblastos circunscritos por un collarete de linfocitos activados. (Bodkin & Criswell, 2021).

Adicionalmente, se condujo un ensayo de inmunohistoquímica CD34⁺, marcador crucial para células progenitoras endoteliales, que resulta ser positivo para células troncales y células precursoras hematopoyéticas. CD34⁺ es una sialomucina transmembrana de 115 kDa. Si bien la expresión de CD34⁺ se pierde durante la diferenciación en la línea hematopoyética, se mantiene en la angioblástica. Además, existen pruebas que respaldan la idea de que un subconjunto de células estromales CD34⁺ derivadas de la médula ósea y el músculo representan un tipo de célula madre mesenquimal. Se han propuesto diversas funciones para CD34⁺, que incluyen la inhibición de la diferenciación y la promoción de la proliferación en las células madre hematopoyéticas. Su papel como molécula de adhesión con capacidad de señalización, y su función como ligando de L-selectina, que está involucrado en la unión de linfocitos a vénulas endoteliales altas en los ganglios linfáticos, entre otros, es fundamental. En la piel normal, CD34⁺ se encuentra en células endoteliales sanguíneas, células en forma de huso y dendríticas intersticiales y perivasculares de la dermis reticular, células alargadas alrededor de la parte media de los folículos pilosos y células en forma de huso alrededor de las glándulas sudoríparas ecrinas secretoras (Tardío, 2009). Este marcador está

vinculado con la formación de vasos sanguíneos y fenotipo. Por otro lado también está asociado a diversas enfermedades vasculares.

A través de esta técnica, se lograron identificar células endoteliales, lo que permitió contar los vasos sanguíneos hallados en tejidos crónicamente inflamados en áreas lesionales de la capa del "*Stratum Fibrosum subcutis*", contrastándolos con la dermis no afectada. En la mayoría de los andamios, se verificó un aumento en la neovascularización, donde se detectaron lesiones tanto crónicas como agudas, manifestando una reducción de colágeno y elastina.

Asimismo, se examinó la proteína S100, que desempeña roles diversos en la regulación celular, homeostasis de Ca^{2+} , organización de membrana, dinámica del citoesqueleto, motilidad, y crecimiento celular, entre otros aspectos. Mediante este análisis, se observó la formación de tejido neural, macrófagos y células adiposas. Esta tinción inmunohistoquímica no reveló la presencia de tejido nervioso *novo* o neurofilamentoso. El tejido situado en subcutis y en áreas de alta vascularización predominante fue estudiado. En ningún escenario se visualizaron nervios pequeños que pudieran ser omitidos debido a los componentes de la intensidad de la inflamación vascular (Zhu et al., 2013). Investigaciones anteriores han propuesto que los nervios de la dermis y subcutis pueden ser identificados fácilmente por el anticuerpo anti-S100, apuntando a una posible hiperplasia nerviosa asociada con la inmunoreactividad del receptor del factor de crecimiento nervioso (Cribier et al., 2006). La proteína S100 tiene un papel importante en la respuesta inmune y la regulación de células dendríticas en la piel. Estos resultados sugieren que la exposición crónica de los diferentes andamios sintetizados, tienen un impacto significativo en la cantidad de células dendríticas en la epidermis y su función en el sistema inmunológico cutáneo (Bosset, 952).

Por otro lado, el protocolo actualizado del Grupo de Melanoma de la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC) para la evaluación patológica de los ganglios linfáticos centinela (SLN) se basa en la evaluación de múltiples niveles del ganglio linfático utilizando no solo láminas teñidas con hematoxilina-eosina, sino también inmunohistoquímica (IHC), para aumentar la

eficacia en la detección de pequeños focos metastásicos. Entre los anticuerpos recomendados tradicionalmente para este propósito, se encuentra la proteína S100 (pS100). Esta fue el primer marcador con la mayor sensibilidad entre todos los marcadores asociados a melanocitos y un valor práctico en el diagnóstico del melanoma, y el más utilizado para la evaluación de los ganglios linfáticos centinela (SLN). Similar a SOX10, es miembro de una familia de factores de transcripción involucrados en el desarrollo embrionario del testículo, la cresta neural y el sistema nervioso periférico.

La proteína S100 puede ser expresada por neoplasias epiteliales de células mioepiteliales/basales, tumores neurogénicos y malignidades mamarias. Por lo tanto, la interpretación de la S100 en SLN requiere una evaluación cuidadosa por parte de patólogos experimentados debido a posibles diagnósticos erróneos y a la frecuente sobreestimación de la presencia de enfermedad metastásica. Las células dendríticas positivas para S100, en particular, tienden a estar presentes de manera aislada o en pequeños grupos en los ganglios linfáticos (Szumera-Ciećkiewicz et al., 2020). En este análisis específico, no se visualizaron casos de neoplasias epiteliales o basales.

Los distintos andamios dopados con nanocristales manifestaron características histológicas que sugieren la presencia de tejido de granulación, inflamación focal aguda y, además, inflamación crónica difusa de moderada a marcada. La inflamación crónica perivascular se ubica, generalmente, entre áreas no afectadas y zonas con inflamación crónica difusa. Se determinó que la respuesta inflamatoria crónica visualizada en las lesiones ocupadas por el granuloma consolidado, estaba claramente delimitada entre áreas inflamatorias y no inflamatorias (Jin et al., 2021; Kuberappa et al., 2016; C. Li et al., 2021; Ratajczak-Wielgomas et al., 2018; Wright et al., 2009; X. Zhang et al., 2021a).

Los macrófagos son elementos cruciales en la respuesta inflamatoria durante el proceso de cicatrización de heridas. En la fase inicial, los macrófagos tienden a adoptar un fenotipo proinflamatorio (M1), secretando citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1). Esta respuesta inflamatoria es esencial para la eliminación de residuos celulares y patógenos.

Posteriormente, en la fase de proliferación y remodelación, los macrófagos transicionan hacia un fenotipo antiinflamatorio (M2), contribuyendo a la reparación del tejido mediante la secreción de factores de crecimiento y citocinas antiinflamatorias. La secuencia de eventos en la respuesta normal del cuerpo a la lesión puede variar según el tipo de tejido, la edad, el estado de salud y la naturaleza aguda o crónica del defecto. En algunos casos, la inflamación excesiva puede dar lugar a heridas crónicas o formación de cicatrices. Los biomateriales con propiedades inmunomoduladoras tienen el potencial de modular la respuesta de los macrófagos y mejorar el proceso de cicatrización (Hortensius, 2016).

Finalmente, este análisis microscópico detallado descubre diferencias sutiles pero significativas en la respuesta tisular y el proceso de integración de los variados tipos de implantes, otorgando percepciones valiosas acerca de sus posibles aplicaciones y ajustes necesarios para perfeccionar su funcionalidad en futuros desarrollos clínicos. La diversidad en la respuesta tisular a cada versión del implante enfatiza la relevancia de comprender a fondo la interacción entre el material implantado y el entorno biológico circundante.

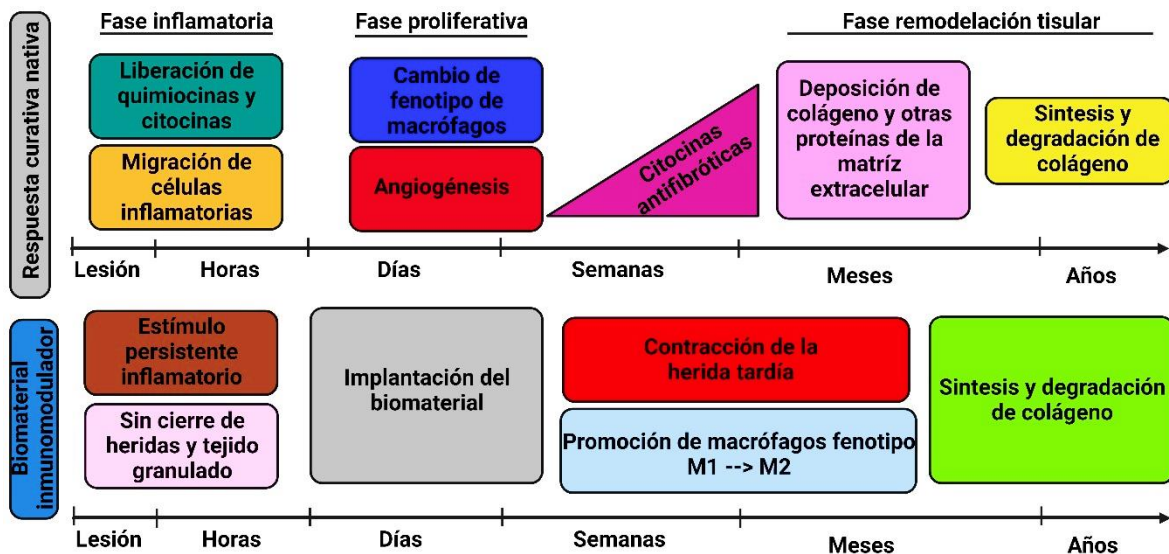


Figura 39. Respuestas inflamatorias. (a) Secuencia en la respuesta normal del cuerpo a la lesión (adaptado de Bentzen). (b) La respuesta a la lesión varía según el tejido, la edad y la salud. Biomateriales inmunomoduladores pueden mejorar la cicatrización, reduciendo la inflamación y previniendo cicatrices. *Elaboración propia por BioRender, apoyado de (Hortensius, 2016).*

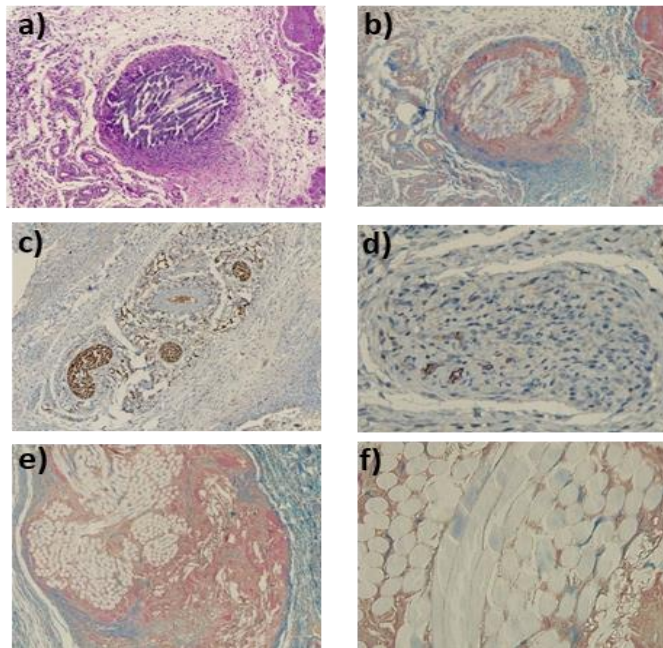


Figura 40. Evaluación histológica de andamios de YAG:Ce³⁺ a los 7 y 49 días post-implantación. a) Imágenes de secciones histológicas teñidas con H&E de granuloma consolidado de YAG:Ce³⁺ a los 7 días, mostrando una delgada pared de tejido conectivo con leve presencia de bandas de fibrina. b) La tinción de tricrómica de Masson también a los 7 días, confirmando los hallazgos. c) PLA/Merge muestra inflamación perivascular y perineural con proteína S100, y d) CD34 resalta el centro de proliferación endotelial en el punto caliente a los 7 días. y f) A los 49 días, YAG:Ce³⁺ exhibe degradación del andamio dentro del granuloma, mostrado por la tinción de tricrómica de Masson (100X y 40X).

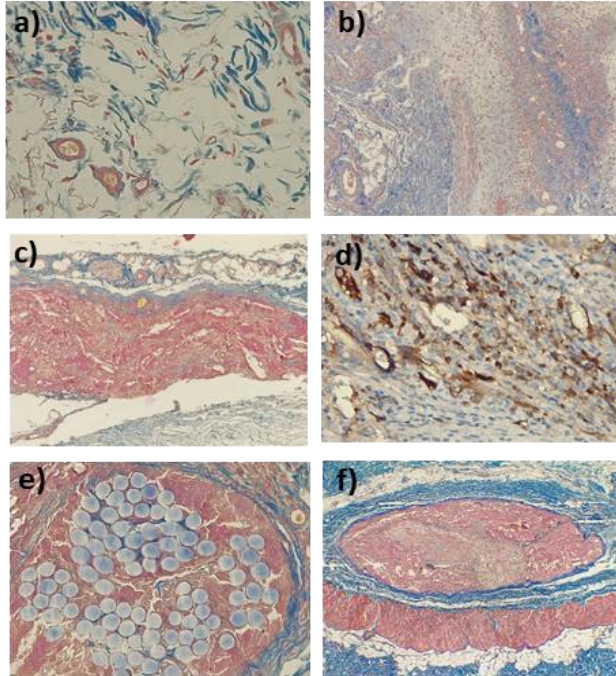


Figura 41. Evaluación de degeneración y desmoplasia. Inmunotinciones de estados y reacciones de los andamios de PLA y PLA/Merge en diferentes tiempos post-implantación. a) A los 7 días, el PLA muestra degeneración de fibras de colágeno. b) A los 7 días, el PLA/Merge exhibe desmoplasia. c) A los 21 días, se observa desorganización del granuloma en PLA/Merge. d) En el mismo periodo, CD34⁺ en PLA indica un punto caliente vascular. e) Se muestra un granuloma consolidado rodeado de fibras de colágeno en el sitio de implante. f) A los 49 días, el control de PLA revela un granuloma bien conformado y capas de tejido subcutáneo intactas.

4.3.4 Diagnóstico histopatológico de implante y correlación de la severidad de GVHD (Enfermedad de injerto contra huésped).

La enfermedad aguda del injerto contra el huésped (GVHD) inicialmente fue caracterizada como una condición secundaria en modelos murinos de trasplante de médula ósea, surgiendo después de superar la toxicidad vinculada al acondicionamiento. En estos modelos, se observaron síntomas como inactividad, síndrome de desgaste y cambios significativos en la piel y pelaje, culminando, en muchos casos, en la muerte por una 'enfermedad secundaria'.

Originalmente, la GVHD se clasificaba en aguda o crónica basándose en el momento de aparición de los síntomas; la forma aguda se presentaba antes de los 100 días después del trasplante y la crónica después de estos 100 días. Sin embargo, esta clasificación experimentó una refinación gracias a una conferencia de consenso de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) en 2005. Ahora, la distinción entre GVHD aguda y crónica se fundamenta en las características propias de la enfermedad más que en el tiempo de aparición. La forma crónica puede impactar cualquier órgano del cuerpo, a diferencia de la aguda que afecta primordialmente la piel, el hígado y el tracto gastrointestinal.

La clasificación actual de la enfermedad que cumple con la definición de GVHD crónica de los NIH incluye la GVHD crónica clásica o GVHD crónica superpuesta si también está presente la GVHD aguda, y esto es independiente del tiempo transcurrido desde la aparición de la GVHD. Los síntomas agudos de la GVHD se pueden categorizar, según su momento y persistencia, en GVHD aguda clásica, de aparición tardía, recurrente o persistente. Además, la GVHD aguda se califica por su severidad de I a IV, teniendo en cuenta diversos síntomas y parámetros clínicos. La categoría I, por su mínimo impacto en el resultado del paciente, no suele ser considerada de importancia clínica. En consecuencia, la mayoría de los estudios ponen el foco en los grados II a IV, y especialmente en los casos severos de grado III y IV.

El sistema de gradación MAGIC es un ejemplo de cómo se pueden graduar estos casos, y aunque no es comúnmente utilizado en la práctica clínica rutinaria, ha demostrado ser de gran utilidad para estandarizar la recolección de datos clínicos sobre GVHD aguda (Ballester-Sánchez et al., 2016). Esto se evidencia por el desarrollo y validación de la aplicación electrónica eGVHD, que asiste a los profesionales de la salud en la evaluación de la GVHD aguda en la práctica clínica, proporcionando una herramienta esencial para una evaluación precisa y uniforme de esta compleja condición (Holler et al., 2018; Malard et al., 2023).

Tabla 3. Clasificación y manifestaciones histopatológicas de la GvHD aguda.

Clasificación general	Histopatologías
Grado I	Leve, <25% de la piel afectada, vacuolización de células basales epidérmicas.
Grado II	Moderado, 25-50% de la piel afectada con síntomas leves, presencia de queratinocitos necróticos individualmente.
Grado III	Grave, >50% de la piel afectada con afectación hepática y gastrointestinal, áreas confluentes de necrosis de queratinocitos formando ampollas.
Grado IV	Muy grave, piel con ampollas, ictericia y diarrea severa, desprendimiento de la epidermis.

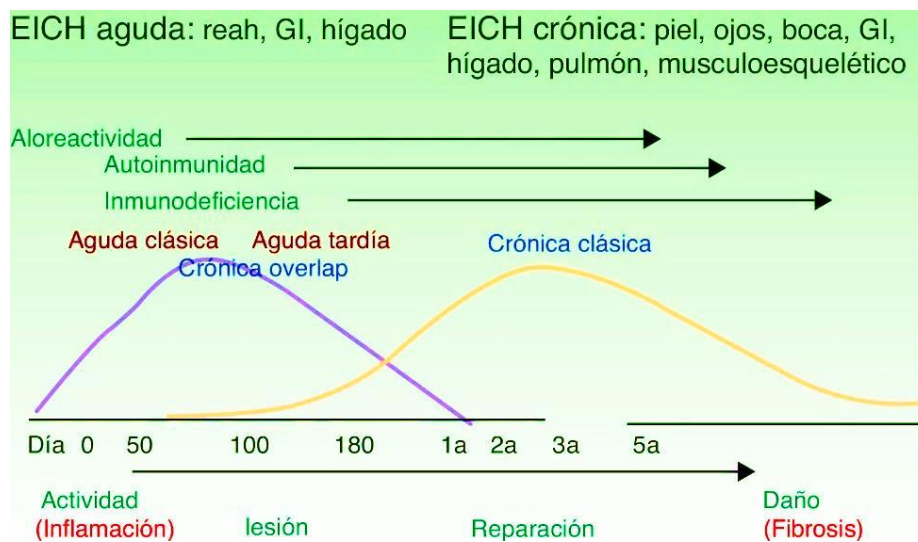


Figura 42. Gráfica enfermedad aguda del injerto contra el huésped (GVHD) crónica vs aguda. Gráfica evolutiva complementario de la GvHD aguda y crónica (Holler et al., 2018).

La clasificación del estadio de la Enfermedad del Injerto contra el Huésped (GvHD) aguda fue posible mediante la implantación de cada andamio fibrilar, y estos fueron evaluados a los 7, 21 y 49 días. Durante los primeros 7 días de análisis, se observó que los andamios de control PLA, PLA/Ce³⁺ y PLA/Tm³⁺, se mantuvieron en Grado I. En cambio, el PLA/Merge alcanzó el Grado II, mientras que el PLA/Eu³⁺ demostró un rechazo exacerbado, clasificándose así en un nivel de Grado III.

Al proceder con el análisis de las muestras en el día 21, se constató que todas mantenían el mismo grado de daño contra huésped, sin exhibir alteraciones significativas en las laminillas examinadas. Esta condición persistió hasta los 49 días, sin manifestar variación alguna. Es relevante subrayar que el contenido de PLA/Merge exhibía tendencia hacia Grado III.

En cuanto a las respuestas inflamatorias, el PLA puro y el PLA/Tm³⁺ manifestaron un granuloma radial difuso, mientras que otros exhibieron un granuloma esférico compacto. El PLA/Eu³⁺ indujo inflamación perivascular y perineural. Todos los andamios generaron una respuesta inflamatoria que involucra granulocitos, especialmente polimorfonucleares (PMN) y eosinófilos, lo que indica la formación de una matriz provisional alrededor del andamio. Esto es una consecuencia esperada debido a la introducción de material exógeno y a la intervención quirúrgica realizada.

Curiosamente, en este contexto, la mayoría de los implantes evidenciaron procesos de angiogénesis, con la excepción del PLA:YAG:Ce³⁺. El composite PLA/YAG:Eu³⁺ presentó un GVHD de Grado III, acompañado de una extensa necrosis de queratinocitos (Alsaad & Ghazarian, 2005). Además, se observó la formación de células gigantes de cuerpo extranjero (FBGCs), lo que añade un nivel adicional de complejidad a la respuesta inflamatoria y reparativa observada en los tejidos circundantes al andamio (Eslami-Kaliji et al., 2023).

Tabla 4. Diagnóstico histopatológico del implante y correlación con la severidad de la GVHD. Se muestra el diferente grado de severidad de los diferentes composites nanoestructurados a los 7, 21 y 49 días post implantación.

	Group	Stromal changes	Encapsulation of the implant in granuloma	Perivascular inflammation	Perineural inflammation	Angiogenesis CD34	S100 protein nerve plexus	Acute Graft-Versus-Host Disease GVHD
7 days	PLA	Immature desmoplasia	Radial diffuse type	Present without damage	Absent	Present	Present	Grade I
	PLA/Ce ³⁺	Degeneration of collagen fibers	Spherical compact consolidated type	Absent	Absent	Absent	Absent	Grade I
	PLA/Eu ³⁺	Fibrosis/ immature desmoplasia	Spherical compact consolidated type	Present with damage	Present with damage	Present	Absent	Grade III
	PLA/Tm ³⁺	Degeneration of collagen fibers/ desmoplasia	Radial diffuse type	Present without damage	Present without damage	Present	Absent	Grade I
	PLA/Merge	Immature desmoplasia	Spherical compact consolidated type	Perivascular sclerosis without damage	Neural atrophy/ perineural sclerosis	Present	Absent	Grade II
21 days	PLA	Fibrosis	Spherical compact consolidated type	Absent	Present without damage	Present	Absent	Grade I
	PLA/Ce ³⁺	Fibrosis/ immature desmoplasia	Spherical compact consolidated type	Present without damage	Present without damage	Absent	Absent	Grade I
	PLA/Eu ³⁺	Fibrosis	Spherical compact consolidated type	Present without damage	Absent	Present	Present	Grade III
	PLA/Tm ³⁺	Mature desmoplasia	Spherical compact consolidated type	Present without damage	Present without damage/ sclerosis	Present	Absent	Grade I
	PLA/Merge	Mature desmoplasia	Spherical compact consolidated type	Present without damage	Absent	Absent	Absent	Grade II
49 days	PLA	Fibrosis	Nodular consolidated type	Absent	Absent	Absent	Absent	Grade I
	PLA/Ce ³⁺	Fibrosis	Nodular consolidated type	Absent	Absent	Present	Absent	Grade I
	PLA/Eu ³⁺	Panniculitis/ atrophic changes in muscle fibers/ peri-implant fibrosis	Nodular consolidated type	Hyalinization/ vascular atrophy	Absent	Absent	Absent	Grade III
	PLA/Tm ³⁺	Fibrosis	Nodular consolidated type	Hyalinization/ present without damage	Hyalinization/ present without damage	Absent	Absent	Grade I
	PLA/Merge	Panniculitis/ atrophic changes in muscle fibers/ peri-implant fibrosis	Nodular consolidated type	Vascular atrophy	Neural atrophy/ intrafascicular fibrosis	Absent	Absent	Grade II

Capítulo 4. Discusión

La investigación detallada sobre nanocristales YAG dopados ha revelado información significativa, crucial para su aplicación en distintos campos, especialmente en bio-imagen. Los hallazgos obtenidos de variadas técnicas de análisis, como XRD, SEM, TEM y DLS, han expuesto la diversidad y complejidad morfológica y estructural de estos nanocristales, aportando un entendimiento profundo sobre su formación, estabilidad, y propiedades ópticas y luminiscentes.

La morfología de los nanocristales, influenciada por las variaciones en la síntesis y los protocolos experimentales y en la misma forma de análisis, dicta en gran medida su eficiencia y comportamiento en diferentes medios. Micrografías TEM de alta magnificación evidenciaron franjas de retícula bien definidas, destacando la naturaleza altamente cristalina de los nanocristales. Cabe destacar que los NCs mostraron buena geometría interatómica al no presentar indicios de dislocaciones, confirmando que el tamaño del cristalito es independiente de la concentración de cada ion dopante. También, se observaron granos pequeños con formas cuasiesférica, rugosas y asimétricas, y el tamaño cristalino predominante oscilaba entre 15 y 45 nm, aunque también se evidenció la presencia de estructuras más prominentes, con tamaños entre 100 y 200 nm, sugiriendo un proceso de crecimiento, ensamblaje dinámico y amalgamado.

Estudios recientes proponen que, al realizar análisis de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) en la red cristalina del material YAG dopados con iones de tierras raras, se pueden observar elementos como oxígeno (O), aluminio (Al) e itrio (Y), cuya presencia variaba dependiendo del tipo de síntesis. En este caso, los iones dopantes podrían no verse identificados esto debido a su reducido porcentaje atómico (Vlasova et al., 2015). Los porcentajes atómicos de los nanocristales indicaron que el aluminio superaba ligeramente al de itrio.

Este hallazgo se puede entender por medio de tres hipótesis principales. En primer lugar, algunos elementos podrían haberse evaporado durante el proceso de síntesis

a causa de las elevadas temperaturas; en segundo lugar, la formación de fases metaestables en proporciones menores; y finalmente, una alteración estequiométrica, transformando los iones dopantes en comportamiento redox (ex. el ion de Ce (III) a Ce (IV)) (Tsuruoka et al., 2016). Por otro lado, se especula que, en el transcurso de la síntesis en ambiente oxigenado, ciertas especies de los iones dopantes pudieran también haber experimentado oxidación, transformándose en especies de los iones dopantes (IV) en la superficie de los nanocristales.

Es vital destacar que la elección de la proporción en el proceso de síntesis, específicamente 2:1:1, fue deliberada, buscando optimizar propiedades específicas de los nanocristales de YAG:Ce³⁺, los cuales predominaban en la mezcla. Su morfología cuasiesférica se presupone beneficiosa para aplicaciones específicas, favoreciendo una mayor superficie de contacto y una distribución homogénea en un sustrato, a la vez que influye en sus propiedades ópticas, mecánicas y térmicas.

El análisis conjunto de datos derivados de diferentes técnicas de caracterización, incluido FTIR, es fundamental para interpretar integralmente las propiedades y comportamientos de los nanocristales. La sinergia entre estas herramientas es vital para obtener una visión holística, permitiendo un discernimiento detallado de los nanomateriales, lo que es esencial para optimizar sus aplicaciones en diversos campos. Además, las técnicas espectroscópicas como Raman y ATR complementan esta visión, proporcionando *insights* sobre la química de superficie y los grupos funcionales, además de mitigar las limitaciones inherentes a cada técnica, como el fondo de fluorescencia alto en el espectro Raman, que puede ser contrarrestado efectivamente mediante la implementación de nanopartículas de metales nobles. Se observó que, través de la espectroscopía Raman, los picos detectados en rangos inferiores a 300 cm⁻¹ y aquellos menores a 700 cm⁻¹ reflejaron movimientos traslacionales-rotacionales de Y³⁺ y el estiramiento entre los átomos de Aluminio (Al) y Oxígeno (O), respectivamente, mientras que se observaron transiciones específicas a C-COOH en 900 cm⁻¹, C=O en 1480 cm⁻¹ y C-H en 2996 cm⁻¹ en el material puro de PLA. En complemento, el análisis FT-IR identificó bandas

en 1630 y 1500 cm^{-1} , asociadas a coordinaciones de iones metálicos con grupos carboxilato, y vibraciones de flexión del grupo O-H en el rango de 1080 y 1050 cm^{-1} , indicativas de la presencia de grupos hidroxilados. Además, se registraron vibraciones metal-oxígeno entre 550 - 850 cm^{-1} y picos característicos a 2947 cm^{-1} para C-O y 1748 cm^{-1} para C=O en el PLA. Las peculiaridades reveladas por ambos métodos espectroscópicos no solo confirmaron la consistencia en los datos obtenidos, sino que también destacaron la estructura cristalina y las complejidades químicas presentes en los nanocristales y el PLA, subrayando así la importancia de estas metodologías en la dilucidación de las propiedades y comportamientos de tales materiales.

Los ensayos fotoluminiscentes (PL) de los diferentes nanocristales sintetizados destacan el potencial de los nanocompuestos en aplicaciones de monitoreo espaciotemporal real. Donde, es crucial reconocer los distintos perfiles de emisión de los iones en los nanocristales de YAG. A partir de los datos, el ion Ce^{3+} presentó una prominente emisión amarilla a 526 nm bajo una excitación de 342 nm , y su perfil en el espectro de fotoluminiscencia denotó una compleja estructura subyacente, evidenciada por las transiciones detectadas en el rango de 480 - 800 nm . Esta complejidad intrínseca contrasta con las emisiones naranja-rojo de Eu^{3+} observadas a 590 nm y 709 nm , subrayando el impacto del dopaje de iones en la matriz YAG y sugiriendo la presencia de irregularidades en la superficie que afectan la simetría del entorno cristalino.

Por otro lado, los iones Tm^{3+} mostraron una emisión de conversión ascendente azul significativa, centrada en 460 nm , la cual no fue alterada en forma ni ubicación por la temperatura de calcinación, aunque la intensidad del PL se elevó, evidenciando una influencia considerable del proceso de calcinación en la luminiscencia. Al examinar la emisión combinada de "Merge" (2:1:1) se encontró una diversidad de bandas, reflejo de la integración de los diferentes iones dopantes, sugiriendo la importancia de una distribución homogénea de los activadores en el material anfitrión para alcanzar luminosidad y eficiencia óptimas. El fenómeno de *quenching*

(atenuación luminiscente) o extinción de la concentración, no fue observado, pero cabe destacar que para confirmar tal afirmación se deben considerar tres aspectos fundamentales: 1) transferencia de energía de defecto, 2) transferencia de energía asistida por múltiples fonones mediante el acoplamiento electrón-fonón y 3) transferencia de energía de cada ion dopante (Chowdhury & Sharma, 2015).

El Índice de Reproducción Cromática (CRI) reveló una predominancia del color amarillo en los nanocristales "Merge", una manifestación correlacionada con la elevada presencia de iones de cerio. Este hallazgo subraya la importancia crucial de la geometría local circundante a los iones activadores en determinar el comportamiento espectroscópico. La prevalencia de la tonalidad amarilla, junto con las inherentes propiedades ópticas, es fundamental para el uso de estos materiales en campos como la iluminación y la biomedicina, resaltando así la versatilidad y adaptabilidad de estas nanopartículas en diversas técnicas de imagenología. Además, podemos inducir cierta fluorescencia y manipular la tonalidad a voluntad, permitiéndonos acceder a un espectro amplio de posibilidades y habilitando su utilización como biomarcadores. Este ajuste en la tonalidad proporciona un contraste fluorescente notable, lo que facilita la observación de estructuras y tejidos a simple vista.

Por otra parte, la presencia de diversos nanocristales confinados en los fibriles de PLA aseguró la retención de sus propiedades luminiscentes, excluyendo cualquier efecto de atenuación como el *quenching*. Cuando se excitaban los distintos andamios en cada longitud de onda, correspondiente a los diferentes nanocristales sintetizados, revelaron su naturaleza emisora intrínseca sin afectaciones, lo que facilitó identificar las áreas de confluencia, proporcionando un rastreo local y datos estructurales del andamio.

Los análisis de TGA-DSC mostraron que tanto el PLA puro como los compuestos de PLA con nanocristales sufren degradación térmica, siendo la variante de PLA/YAG:Ce³⁺ la más termoestable. Los diversos grados de pérdida de peso y las transiciones térmicas evidencian la influencia notable de los nanocristales en las respuestas térmicas del PLA. Esto sugiere un abanico de aplicaciones, , variando

según la combinación de nanocristales empleada.

La integración de nanocristales modifica significativamente las propiedades superficiales del PLA, alterando las superficies de hidrofóbicas a hidrofílicas, un elemento esencial para la adhesión celular y regeneración tisular en aplicaciones médicas como la ingeniería de tejidos óseos. Este cambio en la humectabilidad destaca la necesidad de entender las interacciones célula-material y su influencia en los procesos de regeneración y reparación tisular.

Los análisis de FTIR y espectroscopía Raman concordaron en mostrar cambios considerables en el entorno químico y la simetría local del PLA al incorporar nanocristales, evidenciando interacciones a nivel molecular y submolecular que son fundamentales para las propiedades mecánicas, térmicas y optoelectrónicas de los compuestos. Es notable que los nanocristales, al estar confinados dentro del PLA, exhibieron un ligero desplazamiento de sus bandas moleculares características en comparación con los nanocristales puros. Mediante la identificación de modos de vibración, obtuvimos percepciones significativas sobre la estructura cristalina, y particularmente sobre las vibraciones metal-oxígeno-metal específicas a la formación de fase YAG. Los picos de menor energía están relacionados con la traslación y libración de cationes en coordinaciones como tetraédrica, octaédrica y dodecaédricas, correspondientes a los modos más bajos (Kostić et al., 2015).

En relación con las propiedades mecánicas, los andamios dopados satisfacen los requisitos establecidos para implantes óseos. Resulta notable que el ión utilizado influyó en la deformación elástica, optimizando la resiliencia del andamio, lo cual podría abrir puertas a una variedad de aplicaciones debido a su comportamiento. Es importante subrayar que aquellos andamios en los cuales se apreció una mayor concentración de nanocristales aglomerados fueron los que manifestaron una resistencia superior, como es evidente en los casos de YAG:Tm³⁺ y YAG/Merge. Cabe resaltar que, la elección de sistemas fibra/disolvente es vital ya que afecta tanto el procesamiento, morfología de la fibra y sus propiedades intrínsecas, como la cristalinidad (de França et al., 2022; Oliveira et al., 2014). Por otro lado, podemos confirmar que los parámetros mecánicos obtenidos, coinciden con los estándares

establecidos por la ISO 22803:2004. Donde, se establecen requisitos específicos para los materiales de membrana utilizados en cirugía oral y maxilofacial.

Los estudios de viabilidad celular *in vitro* siguieron las normas ISO para evaluación biológica de biomateriales con aplicaciones médicas. Los composites se cortaron en piezas que representan una décima parte de la superficie del pozo de nuestras placas, siguiendo las pautas de la norma ISO 10993-5:2009 (Evaluación biológica de dispositivos médicos – Parte 5: Pruebas de citotoxicidad *in vitro*) (Piszko et al., 2023). Estos composites en monocapa indicaron que, a seis días, no hubo una disminución superior al 50% en ningún andamio sintetizado. Además, los andamios compuestos por PLA/Merge y PLA/Tm³⁺ fueron los que exhibieron una mayor disminución en la viabilidad celular. Sería beneficioso realizar estudios a tiempos más prolongados para determinar si existe un decremento, estancamiento o mejora en la viabilidad celular de cada andamio. Estos andamios demostraron ser prometedores para futuras aplicaciones en regeneración tisular y terapia celular. Es crucial que las investigaciones subsecuentes empleen los hallazgos actuales para optimizar la síntesis y funcionalización de andamios y mejorar su eficacia y compatibilidad en aplicaciones biomédicas y de regeneración de tejidos, mitigando posibles efectos citotóxicos asociados con la integración de nanocristales.

El análisis de adhesión mostró que los andamios con una porosidad estructurada, con puntales y una tortuosidad superficial, facilitan una adhesión celular óptima incluso durante períodos prolongados. La naturaleza ácida de los subproductos de degradación y la regulación del pH de cada andamio dopado con iones de tierras raras son aspectos aún desconocidos, resaltando la necesidad de futuros estudios para entender dicho comportamiento. Finalmente, el estudio de tinción de Alizarina roja concluyó que los andamios compuestos de PLA/NCs tienen la capacidad intrínseca de fomentar procesos de osteogénesis en células hFOB. Lo relevante de este descubrimiento es que tales procesos son facilitados incluso en ausencia de factores osteogénicos tradicionales.

Por otro lado, cuando las nanopartículas entran en contacto con la interfaz nano-célula, las células las perciben como señales externas provenientes de su entorno

inmediato. La señalización por nanopartículas es incierta debido a múltiples factores celulares y características de las nanopartículas, como carga, forma, tamaño y estabilidad coloidal, siendo fundamentales en la modulación de interacciones celulares. El proceso comienza con un enlace no específico, seguido por envoltura de membrana e internalización de la nanopartícula, involucrando interacciones electrostáticas, de Van der Waals y termodinámica celular. La internalización es dependiente de los mecanismos de endocitosis y se ve influenciada significativamente por el tamaño y la carga de las nanopartículas. Partículas menores a 200 nm son mayormente internalizadas por endocitosis mediada por clatrina y fagocitosis, mientras que las mayores a 200 nm por internalización mediada por caveolas. El tamaño afecta la internalización celular (*uptake*), con nanopartículas de 40-50 nm mostrando el mayor uptake. Las cargas superficiales también juegan un papel crucial; nanopartículas positivas son más internalizadas por células no fagocíticas y las negativas por células fagocíticas. La internalización de nanopartículas aniónicas también ha sido reportada, probablemente por la presencia de cargas positivas en la membrana celular (Mutalik et al., 2020).

Los estudio *in vivo*, evidenciaron zonas reparativas que reflejan una respuesta favorable del tejido circundante a los andamios impregnados con nanocristales de lantánido. Estos mostraron una degradación diversa y dependiente del tipo de lantánido utilizado, preservando, sin embargo, la integridad de los fascículos nerviosos. Investigaciones subsiguientes han resaltado las propiedades antioxidantes y moduladoras de las nanopartículas de óxido de cerio e itrio, protegiendo células del estrés oxidativo y promoviendo la osteogénesis, sin afectar la supervivencia celular a corto plazo ni sensibilizar la piel.

Los andamios de PLA, especialmente los conjugados con PLA/Ce³⁺ y PLA/Tm³⁺, han demostrado causar impactos leves en los tejidos, con menos del 25% de daño en la piel afectada y exhibiendo tendencias homogéneas y decrecientes en los procesos de cicatrización e inflamación. Por el contrario, los andamios fibrilares, como PLA/YAG:Eu³⁺ y PLA/Merge, han revelado daños tisulares más prolongados

y exacerbados, con más del 50% de la piel afectada y presencia de áreas de necrosis de queratinocitos. Es crucial destacar el impacto directo de la cristalinidad del polímero en su degradabilidad *in vivo*, afectando significativamente el rendimiento y viabilidad del andamio.

En la actualidad, la proteína S100 es una herramienta importante ya que es un marcador de fibras nerviosas, las cuales se unen específicamente a anticuerpos contra neurofilamentos y células dendríticas, pudiendo ser sensibles a diagnósticos como melanoma y corpúsculos de Meissner. En este estudio no se evidenció ninguna complicación significativa ante estas u otras enfermedades (Guinard et al., 2000). Por otro lado, el marcador CD34⁺ se utiliza también para caracterizar células en diferentes tipos de tumores cutáneos y lesiones. En este caso, no se detectaron tumores específicos como el sarcoma fibroblástico mixoinflamatorio, ni se encontraron signos de lipofibromatosis. Sin embargo, se identificaron algunas células dendríticas en la lesión mediante la expresión de CD34⁺. Esto sugiere que algunas características celulares pueden ser compartidas en varias lesiones de la piel, como el fibroma esclerótico, y no necesariamente indican una entidad única (Tardío, 2009).

Evidenciamos que la aGvHD se caracteriza por manifestaciones eritematosas cutáneas, enfermedad hepática colestásica, y disfunción gastrointestinal. Inferimos que el diagnóstico preciso mediante biopsias es vital debido a la similitud de estas manifestaciones con otras complicaciones. Pudimos demostrar que las células epiteliales son el principal objetivo de la respuesta inmunitaria en aGvHD, presentando células inmunitarias infiltradas cercanas a células apoptóticas, conocidas como "necrosis de célula satélite". Confirmamos que la aGvHD ocurre clásicamente hasta el día 100 y, posteriormente, como aGvHD aguda retardada. Destacamos la importancia de seleccionar meticulosamente las medidas preventivas de la GvHD, dada la limitación de tratamientos más allá del uso de antiinflamatorios o corticosteroides (Holler et al., 2018; Malard et al., 2023). El análisis meticuloso subraya la relevancia de considerar diversos factores inflamatorios y reparativos durante el diseño y selección de materiales de andamio,

resaltando la correlación entre la inflamación y el estrés oxidativo en la deterioración funcional y estructural. Además, se resalta la optimización de técnicas implantológicas, estableciendo un referente sólido para investigaciones futuras.

Las discrepancias entre las respuestas *in vitro* e *in vivo* de los diferentes nanocristales sintetizados en este estudio, concuerda con los datos observados en diversos estudios previos. De esta manera, ambos estudios comparativos utilizando un amplio conjunto de nanopartículas de tierras raras puede proporcionar información crucial sobre los riesgos de las nanopartículas de tierras raras. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los datos de clasificación de riesgos evaluados en este estudio se basaron en la métrica de dosis de área superficial, y las conclusiones podrían variar al utilizar otras métricas de dosis, como la masa o el número de partículas. Además, el potencial inflamatorio agudo podría no ser consistente con la inflamación crónica, lo que requiere investigaciones adicionales (Han et al., 2018).

En este estudio, no pudimos evaluar las diferencias de género en cuanto al potencial inflamatorio, ya que nos centramos en la clasificación de riesgos de los nanocristales con un amplio panel de variedades. Aunque en estudios previos se han observado diferencias de género en la evaluación de nanopartículas oxido-metálicas, el mecanismo subyacente aún no se comprende completamente y es motivo de debate. Esta cuestión debe ser abordada en futuros estudios (Han et al., 2018).

Este análisis brinda una perspectiva detallada sobre la imperiosa necesidad de innovar en materiales y técnicas con el fin de potenciar los resultados regenerativos y reducir al mínimo las complicaciones en el proceso de cicatrización. Se observó que los distintos materiales sintetizados exhibieron comportamientos similares a otros compuestos sintéticos. Se evidenció una reacción paulatina y autolimitante que se consolida progresivamente, sin avanzar, poniendo énfasis en la respuesta a la reacción a cuerpo extraño. Finalmente, los andamios fibrilares sintetizados representan una estrategia alentadora para optimizar la regeneración tisular bajo condiciones implantológicas.

Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas

Esta investigación subraya importantes avances en nanocristales YAG dopados, esenciales para la bioimagen y la biomedicina.

Mediante técnicas analíticas como XRD y SEM, se ha explorado la diversidad y complejidad morfológica de los nanocristales, proporcionando un conocimiento integral de su estructura y propiedades.

Con su morfología cuasiesférica, estos nanocristales demuestran estabilidad y eficiencia en varios entornos. Los análisis demuestran modificaciones en elementos como oxígeno, aluminio e itrio, influyendo en las propiedades ópticas, mecánicas y térmicas de los cristales y permitiendo una distribución uniforme en diferentes sustratos (PLA).

La interacción entre nanocristales y PLA mediante la combinación de métodos de caracterización es fundamental para entender a fondo las propiedades y comportamientos de los nanocristales y su potencial en monitoreo espaciotemporal.

Es crucial destacar la importancia de los andamios de PLA, enriquecidos con nanocristales YAG:Ce³⁺ y YAG:Tm³⁺, los cuales cumplen con los estándares requeridos para su uso en implantes óseos. Esto habilita el avance en el desarrollo de nuevas aplicaciones en regeneración de tejidos y terapias celulares. En este contexto, subrayamos la necesidad de mantener la viabilidad celular y de perfeccionar los procesos de síntesis y funcionalización de andamios en el ámbito de la medicina regenerativa.

Los nano complejos fibrilares producidos son aptos para imágenes intravitales y potencialmente para cirugías guiadas por fotoluminiscencia debido a las propiedades únicas de los NCs. Estos se excitan en diferentes longitudes de onda y emiten en rangos visibles y cercanos al infrarrojo, permitiendo visualización profunda en tejidos biológicos, facilitando la imagen de contraste. Adicionalmente, mediante la eficiencia fototérmica, la terapia multimodal (liberación de fármacos)

podría minimizar efectos secundarios y permitir el monitoreo del mecanismo del tratamiento (Bing-Shuai et al., 2022; Guryev et al., 2019).

Por otro lado, la hidroxiapatita (HA) es esencial en los tejidos duros humanos y crucial para reparar huesos y dientes, al ser un material bioactivo que establece un enlace biológico y facilita la osteointegración con el nuevo tejido óseo. Hoy en día, presenta una necesidad imperante de equipar al biomaterial HA con capacidades de seguimiento multimodal prolongado mientras retiene su bioactividad de vinculación ósea y osteogénica, dado que los biomateriales implantados no funcionan simultáneamente como materiales reparadores de tejidos.

La estructura base de la HA puede enriquecerse mediante la sustitución de iones como Ce^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} , y Mn^{2+} , gracias a sus diámetros iónicos similares al del ion Ca^{2+} , brindando propiedades de luminiscencia de conversión ascendente y paramagnetismo. Este estudio sugiere el uso de estas modificaciones para supervisar eficientemente el estado de degradación *in vivo* de la HA durante y después de la reconstrucción ósea. Esta innovación no solo permite una evaluación detallada del efecto reparador, sino que también resalta la necesidad de seguimiento multimodal continuo en reparaciones ortopédicas y odontológicas, combinando así las facultades de reparación y seguimiento en un único material de matriz HA (Bing-Shuai et al., 2022; F. Li et al., 2018; X. Li, Zou, Chen, et al., 2018; X. Li, Zou, Li, et al., 2018).

El análisis detallado de la respuesta tisular, junto con la implementación de técnicas vanguardistas, despliega nuevas y valiosas perspectivas en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Este estudio subraya hallazgos cruciales en la búsqueda de tratamientos seguros y efectivos para heridas, sirviendo como referencia sobre el empleo del biopolímero PLA y nanocristales con matriz YAG. Estos, dopados con diversos iones de tierras raras, actúan como rastreadores multimodales en tiempo real en el campo biomédico. Este trabajo no solo aporta información valiosa *in vitro* e *in vivo*, sino que también ofrece "*insights*" en diagnóstico histopatológico, correlacionándolo con grados de severidad GVHD, allanando el camino para futuras investigaciones y refinamiento de proyectos en este ámbito.

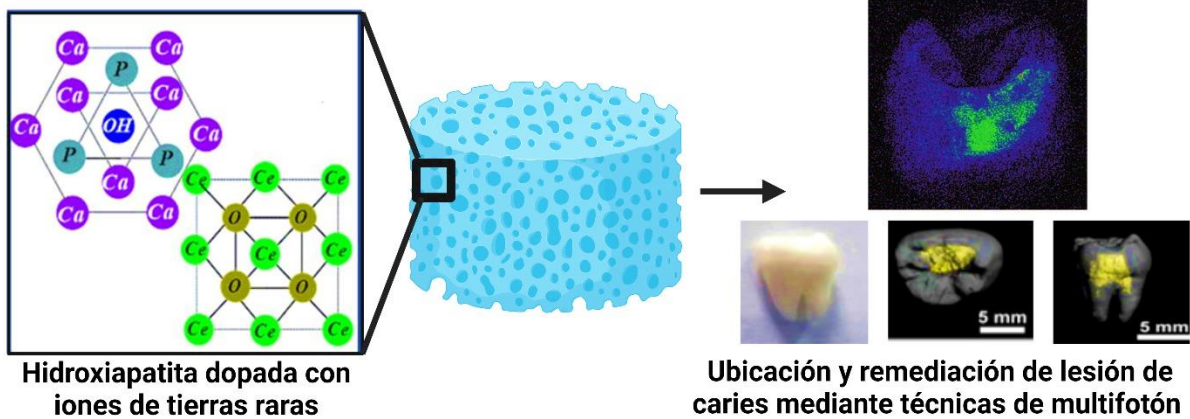


Figura 43. Perspectivas de intercambio iónico y visualización estructural. Este esquema ilustra las perspectivas y posibilidades del intercambio iónico entre iones de tierras raras e iones de calcio, específicamente en estructuras como la hidroxiapatita. La representación se ha logrado a través de la metodología de andamios multimodales, permitiendo un seguimiento de largo plazo en tiempo real de las estructuras visualizadas, permitiendo diagnósticos dentales mediante técnicas multifotónicas. *Elaboración propia con la aplicación BioRender apoyado por (Hall, 2002).*

Literatura citada

1. *A Review of Potential New Diagnostic Modalities for caries lesions* HALL. (n.d.).
2. Abdal-Hay, A., Sheikh, F. A., & Lim, J. K. (2013a). Air jet spinning of hydroxyapatite/poly(lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.09.017>
3. Abdal-Hay, A., Sheikh, F. A., & Lim, J. K. (2013b). Air jet spinning of hydroxyapatite/poly(lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.09.017>
4. Agarwal, R., & García, A. J. (2015). Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 94, pp. 53–62). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.013>
5. Alsaad, K. O., & Ghazarian, D. (2005). My approach to superficial inflammatory dermatoses. In *Journal of Clinical Pathology* (Vol. 58, Issue 12, pp. 1233–1241). <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.027151>
6. Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). *Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges*.
7. Ansari, A. A., Parchur, A. K., Labis, J. P., & Shar, M. A. (2021). Physicochemical characterization of highly biocompatible, and colloidal LaF₃:Yb/Er upconversion nanoparticles. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 20(9), 1195–1208. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00092-0>
8. Armetta, F., Saladino, M. L., Giordano, C., Defilippi, C., Marciniak, Ł., Hreniak, D., & Caponetti, E. (2019). Non-conventional Ce:YAG nanostructures via urea complexes. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39069-6>
9. Augustine, R., Kalva, S. N., Dalvi, Y. B., Varghese, R., Chandran, M., & Hasan, A. (2023). Air-jet spun tissue engineering scaffolds incorporated with diamond nanosheets with improved mechanical strength and biocompatibility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 221. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112958>

10. Badrossamay, M. R., McIlwee, H. A., Goss, J. A., & Parker, K. K. (2010). Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. *Nano Letters*, *10*(6), 2257–2261. <https://doi.org/10.1021/nl101355x>
11. Bakhshi, R., Mohammadi-Zerankeshi, M., Mehrabi-Dehdezi, M., Alizadeh, R., Labbaf, S., & Abachi, P. (2023). Additive manufacturing of PLA-Mg composite scaffolds for hard tissue engineering applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *138*, 105655. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2023.105655>
12. Ballester-Sánchez, R., Navarro-Mira, M., Sanz-Caballer, J., & Botella-Estrada, R. (2016). Aproximación a la enfermedad injerto contra huésped cutánea. In *Actas Dermosifiliogr* (Vol. 107, Issue 3). <http://ccr.cancer.gov/resources/>
13. Bernardo, M. P., da Silva, B. C. R., Hamouda, A. E. I., de Toledo, M. A. S., Schalla, C., Rütten, S., Goetzke, R., Mattoso, L. H. C., Zenke, M., & Sechi, A. (2022). PLA/Hydroxyapatite scaffolds exhibit in vitro immunological inertness and promote robust osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells without osteogenic stimuli. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05207-w>
14. Bhaskar, B., Owen, R., Bahmaee, H., Wally, Z., Sreenivasa Rao, P., & Reilly, G. C. (2018). Composite porous scaffold of PEG/PLA support improved bone matrix deposition in vitro compared to PLA-only scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *106*(5), 1334–1340. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36336>
15. Bing-Shuai, Z. H. O. U., Shi-Han, X. U., Song-Tao, H. U., Li-Heng, S. U. N., Jie-Kai, L. Y. U., Rui, S. U. N., Wei, L. I. U., Xue, B. A. I., Lin, X. U., Lin, W. A. N. G., Bing, H. A. N., & Biao, D. O. N. G. (2022). Recent progress of upconversion nanoparticles in the treatment and detection of various diseases. In *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (Vol. 50, Issue 2, pp. 19–32). Chinese Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2021.08.003>
16. Bodkin, A. J., & Criswell, S. L. (2021). Hidradenitis suppurativa lesions are associated with decreased collagen, decreased elastin, and increased neovascularization. *Journal of Histotechnology*, *44*(2), 80–89. <https://doi.org/10.1080/01478885.2020.1861924>
17. Bosset, S. (1952). *Skin ageing: Clinical and histopathologic study of permanent and*

reducible wrinkles Photobiology Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities.
<https://www.researchgate.net/publication/11390002>

18. Buck, D. W., & Dumanian, G. A. (2012). Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals. In *Plastic and Reconstructive Surgery* (Vol. 129, Issue 6, pp. 1314–1320). Lippincott Williams and Wilkins.
<https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824eca94>
19. Carvalho, M. S., Cabral, J. M. S., da Silva, C. L., & Vashishth, D. (2021). Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: Creating new bone by mimicking the extracellular matrix. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 7). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/polym13071095>
20. Cates, M. R., Allison, S. W., Jaiswal, S. L., & Beshears, D. L. (n.d.). *YAG:Dy and YAG:Tm Fluorescence Above 1400 C.*
21. Chang, B., & Liu, X. (2022). Osteon: Structure, Turnover, and Regeneration. In *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 28, Issue 2, pp. 261–278). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2020.0322>
22. Chen, C. H., Tang, N., Xue, K., Zhang, H. Z., Chen, Y. H., Xu, P., Sun, K., Tao, K., & Liu, K. (2021). Long-term tri-modal in vivo tracking of engrafted cartilage-derived stem/progenitor cells based on upconversion nanoparticles. *Biomolecules*, 11(7).
<https://doi.org/10.3390/biom11070958>
23. Chen, S., Chen, X., Geng, Z., & Su, J. (2022). The horizon of bone organoid: A perspective on construction and application. In *Bioactive Materials* (Vol. 18, pp. 15–25). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.048>
24. Chieng, B. W., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W., & Hussein, M. Z. (2014). Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites: Effects of graphene nanoplatelets. *Polymers*, 6(1), 93–104.
<https://doi.org/10.3390/polym6010093>
25. Chowdhury, M., & Sharma, S. K. (2015). Spectroscopic behavior of Eu³⁺ in SnO₂ for tunable red emission in solid state lighting devices. *RSC Advances*, 5(63), 51102–51109. <https://doi.org/10.1039/c5ra05360a>
26. Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. In *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN: Vol. 3 Suppl 3.*

<https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>

27. Cribier, B., Scrivener, Y., & Peltre, B. (2006). Neural hyperplasia in chondrodermatitis nodularis chronica helicis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 55(5), 844–848. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.01.006>
28. de França, J. O. C., da Silva Valadares, D., Paiva, M. F., Dias, S. C. L., & Dias, J. A. (2022). Polymers Based on PLA from Synthesis Using D,L-Lactic Acid (or Racemic Lactide) and Some Biomedical Applications: A Short Review. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14122317>
29. Deng, H., Huang, S., & Xu, C. (2018). Intensely red-emitting luminescent upconversion nanoparticles for deep-tissue multimodal bioimaging. *Talanta*, 184, 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.018>
30. Diamente, P. R., Raudsepp, M., & Van Veggel, F. C. J. M. (2007). Dispersible Tm³⁺-doped nanoparticles that exhibit strong 1.47 μm photoluminescence. *Advanced Functional Materials*, 17(3), 363–368. <https://doi.org/10.1002/adfm.200600142>
31. Drouvens, B. J., & Evans, C. H. (1986). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Collagen Fibrillogenesis in the Presence of Lanthanides** (Vol. 261, Issue 25).
32. Eslami-Kaliji, F., Hedayat Nia, N., Lakey, J. R. T., Smink, A. M., & Mohammadi, M. (2023). Mechanisms of Foreign Body Giant Cell Formation in Response to Implantable Biomaterials. In *Polymers* (Vol. 15, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym15051313>
33. Gao, Y., Wang, S., Shi, B., Wang, Y., Chen, Y., Wang, X., Lee, E. S., & Jiang, H. B. (2022). Advances in Modification Methods Based on Biodegradable Membranes in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14050871>
34. Gashti, M. P., Bowlin, G. L., Alimohammadi, F., Hulliger, J., Burgener, M., & Oulevey-Aboulfad, H. (2012). *Microscopic methods to study the structure of scaffolds in bone tissue engineering: A brief review*. <https://www.researchgate.net/publication/259459113>
35. González González, A., Rivas Santana, M., Zambrano Robledo, P. del C., & Quiza, R. (2022). Thermal and morphological characterization of 3D-printed PLA scaffolds

- for biomedical applications. *MRS Advances*, 7(35), 1206–1211. <https://doi.org/10.1557/s43580-022-00454-5>
36. Granados-Hernández, M. V., Serrano-Bello, J., Montesinos, J. J., Alvarez-Gayosso, C., Medina-Velázquez, L. A., Alvarez-Fregoso, O., & Alvarez-Perez, M. A. (2018). In vitro and in vivo biological characterization of poly(lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 106(6), 2435–2446. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34053>
37. Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A., & Prockop, D. J. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*, 329(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.002>
38. Guinard, D., Usson, Y., Guillermet, C., & Saxod, R. (2000). PS-100 and NF 70-200 Double Immunolabeling for Human Digital Skin Meissner Corpuscle 3D Imaging. In *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (Issue 2). <http://www.jhc.org>
39. Guo, D., Ma, B., Zhao, L., Qiu, J., Liu, W., Sang, Y., Claverie, J., & Liu, H. (2016). Bright YAG:Ce Nanorod Phosphors Prepared via a Partial Wet Chemical Route and Biolabeling Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(19), 11990–11997. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b01460>
40. Guryev, E. L., Shilyagina, N. Y., Kostyuk, A. B., Sencha, L. M., Balalaeva, I. V., Vodeneev, V. A., Kutova, O. M., Lyubeshkin, A. V., Yakubovskaya, R. I., Pankratov, A. A., Ingel, F. I., Novik, T. S., Deyev, S. M., Ermilov, S. A., & Zvyagin, A. V. (2019). Preclinical Study of Biofunctional Polymer-Coated Upconversion Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 170(1), 123–132. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz086>
41. Hamroun, M. S. E., Bachari, K., Mechernene, L., Guerbous, L., Chebout, R., Guenanou, A., & Boukerika, A. (2022). Optical and structural properties of composites films based on Ce³⁺-doped yttrium aluminium garnet nanoparticles embedded in polystyrene. *Luminescence*, 37(7), 1208–1214. <https://doi.org/10.1002/bio.4289>
42. Han, Y., Lee, D. K., Kim, S. H., Lee, S., Jeon, S., & Cho, W. S. (2018). High inflammogenic potential of rare earth oxide nanoparticles: the New Hazardous Entity. *Nanotoxicology*, 12(7), 712–728.

<https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1472311>

43. Hannink, G., & Arts, J. J. C. (2011). Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury*, 42(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.008>
44. Haro-González, P., Martín, I. R., González-Pérez, S., Liu, M., Wang, S. W., Capuj, N., & Lahoz, F. (2008). Increase of the blue upconversion emission in YAG:Tm³⁺ nanopowders by codoping with Yb³⁺ ions. *Journal of Luminescence*, 128(5–6), 924–926. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2007.11.033>
45. He, X., Liu, X., Li, R., Yang, B., Yu, K., Zeng, M., & Yu, R. (2016). Effects of local structure of Ce³⁺ ions on luminescent properties of Y₃Al₅O₁₂:Ce nanoparticles. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep22238>
46. Hofmann, S., Hagenmüller, H., Koch, A. M., Müller, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. L., Merkle, H. P., & Meinel, L. (2007a). Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials*, 28(6), 1152–1162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.10.019>
47. Hofmann, S., Hagenmüller, H., Koch, A. M., Müller, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. L., Merkle, H. P., & Meinel, L. (2007b). Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials*, 28(6), 1152–1162. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.10.019>
48. Holler, E., Greinix, H., & Zeiser, R. (2018). Acute graft-versus-host disease. In *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* (pp. 323–330). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02278-5_43
49. Hortensius, R. Harley, B. (2016) Naturally derived biomaterials for addressing inflammation in tissue regeneration. *Experimental Biology and Medicine*. 241: 1015-1024. DOI: 10.1177/1535370216648022
50. Jin, S., Xia, X., Huang, J., Yuan, C., Zuo, Y., Li, Y., & Li, J. (2021). Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 127, pp. 56–79). Acta Materialia Inc. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.067>

51. Kang, T., Lee, S., Kim, J., Jeong, Y., & Park, J. (2020). Thermal durability of YAG:Ce ceramic with containing Al₂O₃ and its Raman analysis. *Journal of Luminescence*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117077>
52. Kelvii Kwok, Y. (2020). Wettability on Different Surfaces. In *21st Century Surface Science - a Handbook*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92885>
53. Khouzani, M. K., Bahrami, A., Mehr, M. Y., van Driel, W. D., & Zhang, G. (2020). Towards multi-functional SiO₂@YAG:Ce core–shell optical nanoparticles for solid state lighting applications. *Nanomaterials*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/nano10010153>
54. Kim, J. M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M. B., & Shim, J. H. (2020). Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. In *Cells* (Vol. 9, Issue 9). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9092073>
55. Kolios, G., & Moodley, Y. (2012). Introduction to stem cells and regenerative medicine. In *Respiration* (Vol. 85, Issue 1, pp. 3–10). <https://doi.org/10.1159/000345615>
56. Kostić, S., Lazarević, Z., Radojević, V., Milutinović, A., Romčević, M., Romčević, N., & Valčić, A. (2015). Study of structural and optical properties of YAG and Nd:YAG single crystals. *Materials Research Bulletin*, 63, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.11.033>
57. K.R, R., Bontha, S., M.R, R., Das, M., & Balla, V. K. (2020). Degradation, wettability and surface characteristics of laser surface modified Mg–Zn–Gd–Nd alloy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(5). <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06383-9>
58. Kuberappa, P. H., Bagalad, B. S., Ananthaneni, A., Kiresur, M. A., & Srinivas, G. V. (2016). Certainty of S100 from physiology to pathology. In *Journal of Clinical and Diagnostic Research* (Vol. 10, Issue 6, pp. ZE10–ZE15). Journal of Clinical and Diagnostic Research. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/17949.8022>
59. Landy, B. C., VanGordon, S. B., McFetridge, P. S., Sikavitsas, V. I., & Jarman-Smith, M. (2013). Mechanical and in vitro investigation of a porous PEEK foam for medical device implants. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*, 11(1), 35–44. <https://doi.org/10.5301/JABFM.2012.9771>
60. Li, C., Mills, Z., & Zheng, Z. (2021). Novel cell sources for bone regeneration. In

MedComm (Vol. 2, Issue 2, pp. 145–174). Blackwell Publishing Inc.
<https://doi.org/10.1002/mco2.51>

61. Li, F., Du, Y., Pi, G., & Lei, B. (2018). Long-term real-time tracking live stem cells/cancer cells in vitro/in vivo through highly biocompatible photoluminescent poly(citrate-siloxane) nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 93, 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.014>
62. Li, X., Zou, Q., Chen, L., & Li, W. (2018). A ternary doped single matrix material with dual functions of bone repair and multimodal tracking for applications in orthopedics and dentistry. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(38), 6047–6056. <https://doi.org/10.1039/C8TB02041H>
63. Li, X., Zou, Q., Li, C., & Li, W. (2018). *Supplementary Information A ternary doping single matrix material with dual function of bone repair and multimodal tracking for applications in orthopedics and dentistry.*
64. Lin, Y. C., Karlsson, M., & Bettinelli, M. (2016). Inorganic phosphor materials for lighting. In *Topics in Current Chemistry* (Vol. 374, Issue 2, pp. 374–421). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0023-5>
65. Liu, J., Ruan, J., Weir, M. D., Ren, K., Schneider, A., Wang, P., Oates, T. W., Chang, X., & Xu, H. H. K. (2019). Periodontal bone-ligament-cementum regeneration via scaffolds and stem cells. In *Cells* (Vol. 8, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8060537>
66. Liu, Q., Feng, W., Yang, T., Yi, T., & Li, F. (2013). Upconversion luminescence imaging of cells and small animals. *Nature Protocols*, 8(10), 2033–2044. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.114>
67. Liu, S., Zheng, Y., Liu, R., & Tian, C. (2020). Preparation and characterization of a novel polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffold with biomimetic micro-nanofibrous porous structure. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(8). <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06415-4>
68. Liu, X., Zhou, L., Heng, P., Xiao, J., Lv, J., Zhang, Q., Hickey, M. E., Tu, Q., & Wang, J. (2019). Lecithin doped electrospun poly(lactic acid)-thermoplastic polyurethane fibers for hepatocyte viability improvement. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.069>
69. Lu, T., Sun, Z., Jia, C., Ren, J., Li, J., Ma, Z., Zhang, J., Li, J., Zhang, T., Zang, Q.,

- Yang, B., Yang, P., Wang, D., Li, H., Qin, J., & He, X. (2023). Roles of irregularity of pore morphology in osteogenesis of Voronoi scaffolds: From the perspectives of MSC adhesion and mechano-regulated osteoblast differentiation. *Journal of Biomechanics*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2023.111542>
70. Ma, Q., Wang, J., Dong, X., Yu, W., & Liu, G. (2014). Fabrication of magnetic-fluorescent bifunctional flexible coaxial nanobelts by electrospinning using a modified coaxial spinneret. *ChemPlusChem*, 79(2), 290–297. <https://doi.org/10.1002/cplu.201300262>
71. Ma, Y., Ji, Y., You, M., Wang, S., Dong, Y., Jin, G., Lin, M., Wang, Q., Li, A., Zhang, X., & Xu, F. (2016a). Labeling and long-term tracking of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro using NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ upconversion nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 42, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.030>
72. Ma, Y., Ji, Y., You, M., Wang, S., Dong, Y., Jin, G., Lin, M., Wang, Q., Li, A., Zhang, X., & Xu, F. (2016b). Labeling and long-term tracking of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro using NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ upconversion nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 42, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.030>
73. Macdonald, B. R., & Gowen, M. (1992). SCIENTIFIC REVIEWS IN RHEUMATOLOGY SERIES EDITOR: M. WALPORT CYTOKINES AND BONE. In *British Journal of Rheumatology* (Vol. 31). <http://rheumatology.oxfordjournals.org/>
74. Malard, F., Holler, E., Sandmaier, B. M., Huang, H., & Mohty, M. (2023). Acute graft-versus-host disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00438-1>
75. Marchiori, G., Berni, M., Boi, M., Bianchi, M., & Filardo, G. (2019). Cartilage mechanical tests: Evolution of current standards for cartilage repair and tissue engineering. A literature review. In *Clinical Biomechanics* (Vol. 68, pp. 58–72). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2019.05.019>
76. Marsi, T. C. O., Ricci, R., Toniato, T. V., Vasconcellos, L. M. R., Elias, C. de M. V., Silva, A. D. R., Furtado, A. S. A., Magalhães, L. S. S. M., Silva-Filho, E. C., Marciano, F. R., Zille, A., Webster, T. J., & Lobo, A. O. (2019). Electrospun Nanofibrous Poly (Lactic Acid)/Titanium Dioxide Nanocomposite Membranes for Cutaneous Scar Minimization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00421>

77. Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., Ito, K., & Hofmann, S. (2016). Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 31, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2015.09.005>
78. Mohiti-Asli, M., Saha, S., Murphy, S. V., Gracz, H., Pourdeyhimi, B., Atala, A., & Lobo, E. G. (2017). Ibuprofen loaded PLA nanofibrous scaffolds increase proliferation of human skin cells in vitro and promote healing of full thickness incision wounds in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 105(2), 327–339. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33520>
79. Mostov, K., & Werb, Z. (1997). Journey Across the Osteoclast. *Science*, 276(5310), 219–220. <https://doi.org/10.1126/science.276.5310.219>
80. Mutalik, S. P., Pandey, A., & Mutalik, S. (2020). Nanoarchitectonics: A versatile tool for deciphering nanoparticle interaction with cellular proteins, nucleic acids and phospholipids at biological interfaces. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 151, pp. 136–158). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.150>
81. Naserian, S., Leclerc, M., Thiolat, A., Pilon, C., Le Bret, C., Belkacemi, Y., Maury, S., Charlotte, F., & Cohen, J. L. (2018). Simple, reproducible, and efficient clinical grading system for murine models of acute graft-versus-host disease. *Frontiers in Immunology*, 9(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00010>
82. Nasrin, A., Hassan, M., Mirabet, M. M., Windhab, N., & Gomes, V. G. (2022). 3D-printed bioresorbable poly(lactic-co-glycolic acid) and quantum-dot nanocomposites: Scaffolds for enhanced bone mineralization and inbuilt co-monitoring. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 110(4), 916–927. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37340>
83. Ng, K., Azari, P., Nam, H. Y., Xu, F., & Pingguan-Murphy, B. (2019). Electrospinning of paper: A natural extracellular matrix inspired design of scaffold. *Polymers*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/polym11040650>
84. O’Keefe, R. J., & Mao, J. (2011). Bone tissue engineering and regeneration: From discovery to the clinic-an overview. In *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 17, Issue 6, pp. 389–392). <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0475>
85. Oliveira, J., Brichi, G. S., Marconcini, J. M., Mattoso, L. H. C., Glenn, G. M., & Medeiros, E. S. (2014). Effect of solvent on the physical and morphological

- properties of poly(lactic acid) nanofibers obtained by solution blow spinning. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 9(4), 117–125. <https://doi.org/10.1177/155892501400900414>
86. Osorio-Arciniega, R., García-Hipólito, M., Alvarez-Fregoso, O., & Alvarez-Perez, M. A. (2021). Composite fiber spun mat synthesis and in vitro biocompatibility for guide tissue engineering. *Molecules*, 26(24). <https://doi.org/10.3390/molecules26247597>
87. Osorio-Arciniega, R., García-Hipólito, M., Alvarez-Fregoso, O., & Antonio Alvarez-Perez, M. (n.d.). *Long Term Tracking Nanoparticles Composites for Bone Tissue Regeneration: Insights*.
88. Pan, L., Pei, X., He, R., Wan, Q., & Wang, J. (2012). Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.011>
89. Pandeale, A. M., Constantinescu, A., Radu, I. C., Miculescu, F., Voicu, S. I., & Ciocan, L. T. (2020). Synthesis and characterization of PLA-micro-structured hydroxyapatite composite films. *Materials*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/ma13020274>
90. Piszko, P., Kryszak, B., Gazińska, M., Słota, D., Sobczak-Kupiec, A., Włodarczyk, M., Szwed-Georgiou, A., Rudnicka, K., & Szustakiewicz, K. (2023). The effect of filler content on mechanical properties and cell response of elastomeric PGS/apatite foam scaffolds. *Ceramics International*, 49(15), 25353–25363. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.05.071>
91. Ranakoti, L., Gangil, B., Bhandari, P., Singh, T., Sharma, S., Singh, J., & Singh, S. (2023). Promising Role of Polylactic Acid as an Ingenious Biomaterial in Scaffolds, Drug Delivery, Tissue Engineering, and Medical Implants: Research Developments, and Prospective Applications. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28020485>
92. Rashmi, & Dwivedi, Y. (2019). White light color tuning ability of hybrid Dibenzoylmethane/YAG:Ce nanophosphor. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 206, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.07.106>
93. Ratajczak-Wielgomas, K., Kassolik, K., Grzegorzolka, J., Halski, T., Piotrowska, A.,

- Mieszala, K., Wilk, I., Podhorska-Okolow, M., Dziegiel, P., & Andrzejewski, W. (2018). Effects of massage on the expression of proangiogenic markers in rat skin. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 56(2), 83–91. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2018.0008>
94. Safadi, F. F., Barbe, M. F., Abdelmagid, S. M., Rico, M. C., Aswad, R. A., Litvin, J., & Popoff, S. N. (2009). Bone structure, development and bone biology. In *Bone Pathology* (pp. 1–50). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-347-9_1
95. Schulze, F., Lang, A., Schoon, J., Wassilew, G. I., & Reichert, J. (2023). Scaffold Guided Bone Regeneration for the Treatment of Large Segmental Defects in Long Bones. In *Biomedicines* (Vol. 11, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020325>
96. Skruodiene, M., Juodvalkyte, R., Kemere, M., Ramanauskas, R., Sarakovskis, A., & Skaudzius, R. (2022). Enhanced optical properties of yttrium aluminum garnet with the yttrium vanadate impurity phase. *Heliyon*, 8(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11386>
97. Sommer, M. R., Vetsch, J. R., Leemann, J., Müller, R., Studart, A. R., & Hofmann, S. (2017). Silk fibroin scaffolds with inverse opal structure for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 105(7), 2074–2084. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33737>
98. Sun, L. D., Wang, Y. F., & Yan, C. H. (2014). Paradigms and challenges for bioapplication of rare earth upconversion luminescent nanoparticles: Small size and tunable emission/excitation spectra. *Accounts of Chemical Research*, 47(4), 1001–1009. <https://doi.org/10.1021/ar400218t>
99. Sun, Y., Zhao, H., Qin, Z., Zhang, M., Li, X., & Sun, X. (2023). Significant enhancement of luminescence properties of YAG:Ce ceramics by differential grain sizes control. *Ceramics International*. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.01.213>
100. Suresh Babu, K., Anandkumar, M., Tsai, T. Y., Kao, T. H., Stephen Inbaraj, B., & Chen, B. H. (2014). Cytotoxicity and antibacterial activity of gold-supported cerium oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 5515–5531. <https://doi.org/10.2147/IJN.S70087>

101. Suttiat, K., Wattanutchariya, W., & Manaspon, C. (2022). Preparation and Characterization of Porous Poly(Lactic Acid)/Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PLA/PBAT) Scaffold with Polydopamine-Assisted Biomineralization for Bone Regeneration. *Materials*, 15(21). <https://doi.org/10.3390/ma15217756>
102. Szumera-Ciećkiewicz, A., Bosisio, F., Teterycz, P., Antoranz, A., Delogu, F., Koljenović, S., van de Wiel, B. A., Blokk, W., van Kempen, L. C., Rutkowski, P., Christopher van Akkooi, A., Cook, M., & Massi, D. (2020). SOX10 is as specific as S100 protein in detecting metastases of melanoma in lymph nodes and is recommended for sentinel lymph node assessment. *European Journal of Cancer*, 137, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.06.037>
103. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
104. Tardío, J. C. (2009). CD34-reactive tumors of the skin. An updated review of an ever-growing list of lesions (*Journal of Cutaneous Pathology* (2008) 35 (1079-1092)). In *Journal of Cutaneous Pathology* (Vol. 36, Issue 1, pp. 89–102). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2008.01212.x>
105. Tsuruoka, N., Sasagawa, T., Yodo, T., Yoshimoto, M., Odawara, O., & Wada, H. (2016). Facile preparation of YAG:Ce nanoparticles by laser irradiation in water and their optical properties. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1958-2>
106. Valtanen, R. S., Yang, Y. P., Gurtner, G. C., Maloney, W. J., & Lowenberg, D. W. (2021). Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future? *Injury*, 52, S72–S77. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.07.040>
107. Vicilli, R. F., Budiman, A., & Burstone, C. J. (2013). Axes of resistance for tooth movement: Does the center of resistance exist in 3-dimensional space? *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 143(2), 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2012.09.010>
108. Vijayan, V., Lakra, R., Korrapati, P. S., & Kiran, M. S. (2022). Lanthanum oxide nanoparticle-collagen bio matrix induced endothelial cell activation for sustained angiogenic response for biomaterial integration. *Colloids and Surfaces*


B: *Biointerfaces*, 216. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112589>

109. Vinothkumar, G., Rengaraj, S., Arunkumar, P., Cha, S. W., & Suresh Babu, K. (2019). Ionic Radii and Concentration Dependency of RE³⁺ (Eu³⁺, Nd³⁺, Pr³⁺, and La³⁺)-Doped Cerium Oxide Nanoparticles for Enhanced Multienzyme-Mimetic and Hydroxyl Radical Scavenging Activity. *Journal of Physical Chemistry C*, 123(1), 541–553. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b10108>
110. Vistorskaja, D., Laurikenas, A., Montejo de Luna, A., Zarkov, A., Pazyzbek, S., & Kareiva, A. (2023). Sol-Gel Synthesis and Characterization of Novel Y_{3-x}M_xAl_{5-y}V_yO₁₂ (M—Na, K) Garnet-Type Compounds. *Inorganics*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/inorganics11020058>
111. Vlasova, M., Márquez-Aguilar, P. A., Kakazey, M., Escobar-Martinez, A., & Guardian-Tapia, R. (2015). SEM-EDS investigation of YAG ceramic surface after laser modification. *Journal of Advanced Microscopy Research*, 10(4), 303–313. <https://doi.org/10.1166/jamr.2015.1280>
112. Wang, Q., Qiu, J. B., Song, Z. G., Yang, Z. W., Yin, Z. Y., & Zhou, D. C. (2015). Optical properties of Ce³⁺-Nd³⁺ co-doped YAG nanoparticles for visual and near-infrared biological imaging. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 898–903. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.04.082>
113. Wells, M. Y., Voute, H., Bellingard, V., Fisch, C., Boulifard, V., George, C., & Picaut, P. (2010). Histomorphology and vascular lesions in dorsal rat skin used as injection sites for a subcutaneous toxicity study. *Toxicologic Pathology*, 38(2), 258–266. <https://doi.org/10.1177/0192623309357953>
114. Wright, N. T., Cannon, B. R., Zimmer, D. B., & Weber, D. J. (2009). S100A1: Structure, Function, and Therapeutic Potential. In *Current Chemical Biology* (Vol. 3).
115. Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., & Uludağ, H. (2018). Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 80, pp. 1–30). Acta Materialia Inc. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>
116. Xiong, Y., & Xiong, Y. (2022). Applications of bone regeneration hydrogels in the treatment of bone defects: a review. In *Journal of Materials Science* (Vol. 57,

Issue 2, pp. 887–913). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10853-021-06675-7>

117. Xue, H., Sun, X., Bi, J., Wang, T., Han, J., Ma, Q., Han, L., & Dong, X. (2015). Facile electrospinning construction and characteristics of coaxial nanobelts with simultaneously tunable magnetism and color-tuned photoluminescence bifunctionality. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 26(11), 8774–8783. <https://doi.org/10.1007/s10854-015-3557-3>
118. Yakdoumi, F. Z., Hadj-Hamou, A. S., Rahoui, N., Rahman, M. M., & Abetz, V. (2022). Polylactic acid nanocomposites containing functionalized multiwalled carbon nanotubes as antimicrobial packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 213, 55–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.142>
119. Yan, X., Li, W., Wang, X., & Sun, K. (2011). Facile Synthesis of Ce³⁺, Eu³⁺ Co-Doped YAG Nanophosphor for White Light-Emitting Diodes. *Journal of The Electrochemical Society*, 159(2), H195–H200. <https://doi.org/10.1149/2.101202jes>
120. Yang, Y., Zhang, M., Ju, Z., Tam, P. Y., Hua, T., Younas, M. W., Kamrul, H., & Hu, H. (2021). Poly(lactic acid) fibers, yarns and fabrics: Manufacturing, properties and applications. In *Textile Research Journal* (Vol. 91, Issues 13–14, pp. 1641–1669). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/0040517520984101>
121. Yin, J., Kim, E. S., Yang, J., & Deng, B. (2012). Fabrication of a novel thin-film nanocomposite (TFN) membrane containing MCM-41 silica nanoparticles (NPs) for water purification. *Journal of Membrane Science*, 423–424, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.08.020>
122. Zhang, W., Lu, Y., Zang, Y., Han, J., Xiong, Q., & Xiong, J. (2021). SiO₂ coated up-conversion nanomaterial doped with ag nanoparticles for micro-CT imaging. *Nanomaterials*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/nano11123395>
123. Zhang, X., Huang, P., Jiang, G., Zhang, M., Yu, F., Dong, X., Wang, L., Chen, Y., Zhang, W., Qi, Y., Li, W., & Zeng, H. (2021a). A novel magnesium ion-incorporating dual-crosslinked hydrogel to improve bone scaffold-mediated osteogenesis and angiogenesis. *Materials Science and Engineering C*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111868>
124. Zhang, X., Huang, P., Jiang, G., Zhang, M., Yu, F., Dong, X., Wang, L., Chen, Y., Zhang, W., Qi, Y., Li, W., & Zeng, H. (2021b). A novel magnesium ion-


- incorporating dual-crosslinked hydrogel to improve bone scaffold-mediated osteogenesis and angiogenesis. *Materials Science and Engineering C*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111868>
125. Zhou, C., Chu, Z., Hou, W., & Wang, X. (2021). Lanthanide-Doped Upconversion-Linked Immunosorbent Assay for the Sensitive Detection of Carbohydrate Antigen 19-9. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.592445>
126. Zhu, L., Okano, S., Takahara, M., Chiba, T., Tu, Y., Oda, Y., & Furue, M. (2013). Expression of S100 protein family members in normal skin and sweat gland tumors. *Journal of Dermatological Science*, 70(3), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.03.002>
127. Zimmermann, G., & Moghaddam, A. (2011). Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*, 42(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.199>.



National Autonomous University of Mexico
Dentistry and Orthopedics: Advancements in Long-Term Tracking of PLA Scaffolds for Guided Tissue Engineering with Up-conversion Nanocrystals
Tissue Engineering Lab - UNAM

Presented by:
M.Sc. Rodrigo A. Osorio Arciniega

Supervisor:
Dr. Marco A. Álvarez Pérez



MAESTRIA Y DOCTORADO en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud

Abstract

Aimed at a global rise in bone injuries, this study explores the use of rare earth elements (REEs) in bone regeneration implants. We introduced a method using air jet sprayed PLA composite with specific lanthanides, allowing extended fluorescence tracking during bone healing via up-conversion nanoparticles. The results highlight their promise in both bone repair and long-term osteogenic monitoring.

Introduction

Bone defects pose significant therapeutic challenges. While allografts are common, they have associated risks. In response, nanoparticle-based biomaterials, which mimic bone's nanoscale extracellular matrix, are gaining traction. This study focuses on PLA scaffolds infused with lanthanide nanoparticles (Eu³⁺, Er³⁺, Tm³⁺, and Merge). Our aim is to develop polymeric composite fibillar scaffolds integrated with luminescent nanocrystals, harnessing their up-conversion fluorescence for dual functionality in bone repair and multimodal imaging/tracking. In vivo evaluations were conducted using the hFOB cell line, and in vivo assessments gauged the severity of Acute Graft-Versus-Host Disease (GVHD).

Methodology

Sol-gel synthesis of YAG:Ce³⁺/Tm³⁺/Merge NCs and conjugation of luminescent fibillar spots composite by Air Jet Spraying technique

Results

Phase Formation and Crystal Structure

Energy Transfer and Photoluminescence Characteristics

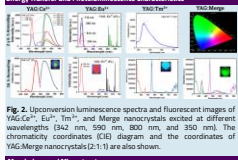


Fig. 2. Upconversion luminescence spectra and fluorescent images of YAG:Ce³⁺, Eu³⁺, Tm³⁺, and Merge nanocrystals excited at different wavelengths (362 nm, 590 nm, 800 nm, and 950 nm). The chromaticity coordinates (CIE) diagram and the coordinates of YAG:Merge nanocrystals(2:1:1) are also shown.

Structures of PLA/YAG/Nanocrystals Scaffolds

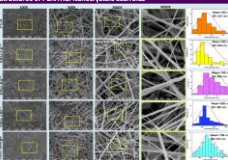


Fig. 5. Evaluation of PLA scaffold microstructure with various nanocrystals using SEM(100X, 500X, 2000X, and 8000X). Additionally, quantitative analysis of mean size diameter for each lanthanide scaffold.

Cell Interaction with Composite Scaffolds

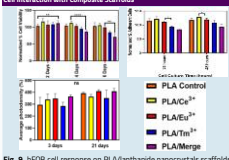


Fig. 9. hFOB cell response on PLA/lanthanide nanocrystals scaffolds (a) Cell viability tested at 2, 4, and 6 days showing non-toxicity with PLA/YAG:Ce³⁺ having the best results. (b) Cell adhesion at 24 and 48 hours, compared to control plates. (c) Alizarin red staining for calcium deposits on PLA and PLA/nanocrystals scaffolds, increasing with culture time (3 and 21 days). Results shown as mean ± SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (one-way ANOVA, Tukey's post-hoc).

Fluorescent Characteristics of the Scaffold Materials

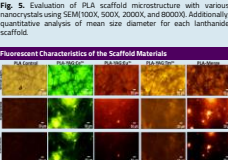


Fig. 6. Luminescence in PLA control and PLA/YAG/Lanthanide nanocrystals scaffolds was examined using optical microscopy, revealing images in bright-field (a), dark-field (b), and phase-contrast (c) with a scale bar of 50µm. The luminescent glow emanates from the scaffolds upon excitation with a 450 nm blue light wavelength.

Physicochemical Characteristics of the Conjugated Scaffold

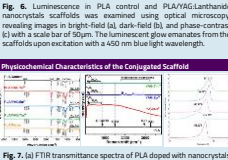


Fig. 7. (a) FTIR transmittance spectra of PLA doped with nanocrystals. (b) Raman Spectroscopy results. (c) Thermogravimetry analysis (TGA) assessing the influence of nanocrystals on PLA's thermal stability.

Fig. 8. (a) Derivative thermogravimetric (DTG) curves. (b) Viability assay of all synthesized scaffolds. (c) Stress-strain curves of PLA and PLA/nanocrystals.

Fig. 11. Alizarin red staining histograms of PLA control, PLA YAG:Ce³⁺, YAG:Eu³⁺, YAG:Tm³⁺, YAG:Merge scaffolds at 3 and 21 days in vitro. Increased mineral nodes were observed during the later stage of the experiment, showing variation roles of different ion dopants (50 µm).

Fig. 12. In situ photoluminescent assay: YAG:Ce³⁺ scaffold under blue light (450 nm).

Fig. 13. Optical micrographs of PLA and YAG:Nanocrystals (100x/w) scaffolds integrated smoothly with surrounding collagen fibers, with gradual and mild inflammation observed after 21 days. Encapsulation of the composite and nanoparticles within the granulation, surrounded by microvessels, was evident in the histological sections at 7 days post-surgery (40X). Additionally, the presence of composite degradation in fibrillar structures was observed (C.I.).

Fig. 14. (a) PLA:Merge displays perivascular and perineural inflammation with S100 protein, and (b) CD45 highlights the hot spot endothelial proliferation center at 7 days. (c-d) At 49 days, YAG:Ce³⁺ exhibits scaffold degradation within the granulation, shown by Masson trichrome staining (100X and 400X).

Histopathological Implant diagnosis and GVHD severity correlation

Group	Day	GVHD Severity	Implant Status
PLA Control	7	Low	Intact
	21	Low	Intact
	49	Low	Intact
YAG:Ce ³⁺	7	Low	Intact
	21	Low	Intact
	49	High	Degraded
YAG:Eu ³⁺	7	Low	Intact
	21	Low	Intact
	49	Low	Intact
YAG:Tm ³⁺	7	Low	Intact
	21	Low	Intact
	49	Low	Intact
YAG:Merge	7	Low	Intact
	21	Low	Intact
	49	Low	Intact

Conclusion

- LNCS demonstrated enhanced optical properties after extended annealing.
- PLA conjugated-multimodal LNCS scaffolds enabled cellular tracking and localization with low toxicity.
- In vivo assays showed an inflammatory response without tissue damage and polymer degradation.

Acknowledgements

Supported by CONACYT scholarships: 613415, DGU 745379 for Rodrigo Osorio Arciniega (UNAM doctoral studies). Gratitude to Manuel Garcia-Hipolito (BM-UNAM) and Jarveth Sarano-Bello (DSM) for their guidance.

Poster presentado en el congreso de: Materials Science Conference 2023 | Paris, France

Article

Composite Fiber Spun Mat Synthesis and In Vitro Biocompatibility for Guide Tissue Engineering

Rodrigo Osorio-Arciniega ¹, Manuel García-Hipólito ², Octavio Alvarez-Fregoso ² and Marco Antonio Alvarez-Perez ^{1,*}

¹ Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, DEPEI, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n. Cd. Universitaria, Coyoacán 04510, Mexico; rosorioarci@gmail.com

² Instituto de Investigaciones en Materiales, Circuito Exterior s/n. Cd. Universitaria, Coyoacán 04510, Mexico; maga@unam.mx (M.G.-H.); oaf@unam.mx (O.A.-F.)

* Correspondence: marcoalp@unam.mx



Citation: Osorio-Arciniega, R.; García-Hipólito, M.; Alvarez-Fregoso, O.; Alvarez-Perez, M.A. Composite Fiber Spun Mat Synthesis and In Vitro Biocompatibility for Guide Tissue Engineering. *Molecules* **2021**, *26*, 7597. <https://doi.org/10.3390/molecules26247597>

Academic Editor: Marek Bzeźwiński, Małgorzata Baśko and Roberta Cassano

Received: 22 October 2021
Accepted: 10 December 2021
Published: 15 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Composite scaffolds are commonly used strategies and materials employed to achieve similar analogs of bone tissue. This study aims to fabricate 10% wt polylactic acid (PLA) composite fiber scaffolds by the air-jet spinning technique (AJS) doped with 0.5 or 0.1 g of zirconium oxide nanoparticles (ZrO₂) for guide bone tissue engineering. ZrO₂ nanoparticles were obtained by the hydrothermal method and characterized by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). SEM and fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analyzed the synthesized PLA/ZrO₂ fiber scaffolds. The in vitro biocompatibility and bioactivity of the PLA/ZrO₂ were studied using human fetal osteoblast cells. Our results showed that the hydrothermal technique allowed ZrO₂ nanoparticles to be obtained. SEM analysis showed that PLA/ZrO₂ composite has a fiber diameter of 395 nm, and the FTIR spectra confirmed that the scaffolds' chemical characteristics are not affected by the synthesized technique. In vitro studies demonstrated that PLA/ZrO₂ scaffolds increased cell adhesion, cellular proliferation, and biomineralization of osteoblasts. In conclusion, the PLA/ZrO₂ scaffolds are bioactive, improve osteoblasts behavior, and can be used in tissue bone engineering applications.

Keywords: composite scaffold; guide tissue engineering; polylactic acid (PLA) nanofibers; zirconium ceramic; biocompatibility

1. Introduction

Periodontal disease is a chronic inflammatory condition caused by a highly pathogenic biofilm. If left untreated, it may result in irreversible destruction of the supporting periodontal tissues, which consists of the hard and soft tissues surrounding and supporting the teeth. In severe cases, reduced periodontal support can lead to tooth loss, requiring tissue bone augmentation and regeneration, followed by surgical procedures to restore the reconstitution of the complex structure of the tissue [1].

In clinical applications, various attempts have been made to repair the bone/periodontal apparatus over the last four decades. These include root surface conditioning, graft materials, non-resorbable membranes of polytetrafluoroethylene (e-PTFE), and bioceramic scaffolds [2]. However, the regeneration of defective or damaged bone/periodontal tissue has been challenging in reconstructive surgery. Furthermore, it is still considered a common cause of permanent functional loss and post-traumatic morbidity [3].

Hence, guiding the regeneration processes of the bone/periodontal apparatus's complex architecture still represents one of the most significant challenges in modern dentistry. From an anatomical and physiological perspective, the functional integration of composite scaffolds and/or polymeric matrices doped with nanoparticles that synchronously guide the tissue's regeneration is still demanding [4].

In recent years, scaffolds that combine a biodegradable polymers matrix, such as PCL, PLGA, or PLA doped with bioceramics (i.e., hydroxyapatite, TiO₂, magnesium-calcium

Long Term Tracking Nanoparticles Composites for Bone Tissue Regeneration: Insights

Rodrigo Osorio-Arciniega¹, Manuel García-Hipólito², Octavio Alvarez-Fregoso² and Marco Antonio Alvarez-Perez¹

¹Tissue Bioengineering Laboratory, Faculty of Dentistry, Mexico

²Institute for Materials Research, Mexico



***Corresponding author:** Rodrigo Osorio-Arciniega, Faculty of Dentistry, DEPEI, National Autonomous University, Circuito Exterior s/n. Cd. Universitaria, Coyoacán 04510, Mexico

Submission:  May 05, 2023

Published:  June 07, 2023

Volume 2 - Issue 1

How to cite this article: Rodrigo Osorio-Arciniega, Manuel García-Hipólito, Octavio Alvarez-Fregoso and Marco Antonio Alvarez-Perez. Long Term Tracking Nanoparticles Composites for Bone Tissue Regeneration: Insights. Innovations Tissue Eng Regen Med. 2(1).ITERM.000527.2023.

Copyright © Rodrigo Osorio-Arciniega. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract

Given the intricate physiological processes involved, creating bone grafts or prosthetic implants for clinical use can be challenging. Fortunately, recent advancements in nanotechnology have accelerated and facilitated the development of functional bone grafts and implants. Rare Earth (RE) materials are a class of emerging biomaterials that possess unique properties such as biocompatibility, fluorescence upconversion, and anti-inflammatory effects, making them highly valuable in tissue engineering. Recently, there has been an increasing need for materials that can enhance tissue regeneration and advance our knowledge of bone restoration over extended periods of time. This study offers a novel technique for creating tunable green and yellow upconversion composite emissions by embedding lanthanide nanoparticles $YAG:Ce^{3+}$ in Poly(Vinyl Alcohol) (PVA) scaffolds and stimulating them with 400nm blue wavelength light. By combining upconversion lanthanide nanoparticles with image superposition methodology, we are able to reliably track implanted materials or scaffolds over time during long-term fluorescence surveillance. This novel approach provides an effective way to distinguish between different materials and monitor their behavior *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Rare earth materials; Upconversion; Composite; Long-Term fluorescence; Poly(Vinyl Alcohol) (PVA)

Introduction

Rare-earth elements, also known as rare-earth metals, are a group of seventeen chemical elements located in the periodic table. This group includes fifteen lanthanides and two additional elements, scandium and yttrium. The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) defines this group of elements as rare-earth elements due to their limited abundance in the earth's crust. Additionally, these elements exhibit similar chemical properties, which makes it difficult to separate them from each other [1]. REE elements typically exist as trivalent cations and have a configuration of $[(Xe)4f^n 5s^2 5p^6 (n=0-14)]$. The 4f and 5p electrons are protected by the outer 5s, therefore environmental factors have little impact on their transitions.

Due to photoluminescence, this enables RE materials to have distinctive spectroscopic characteristics such long-lasting emission, narrow bandwidth, and bright fluorescent emissions [2]. Additionally, there is an observed phenomenon in lanthanide ions known as the "lanthanide contraction," which results in a gradual reduction in the ionic radius from La^{3+} (1.06Å) to Lu^{3+} (0.85Å) [1]. Usually, photoluminescence abides by Stokes' law, which states that the luminescence's wavelength must be longer than the stimulating radiation's wavelength. As a result, RE nanoparticles (1-100nm) are becoming crucial for new tissue engineering applications and biomedical imaging due to their ability to reduce