



Centro de Investigación Científica de Yucatán
Posgrado en Materiales Poliméricos

**ELABORACIÓN DE ANDAMIOS MEDIANTE
ELECTROHILADO E IMPRESIÓN EN TRES
DIMENSIONES CON POTENCIAL USO EN
REGENERACIÓN ÓSEA**

Tesis que presenta

ALEJANDRO EMMANUEL VIERA RUIZ

En opción al título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
(MATERIALES POLIMÉRICOS)**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

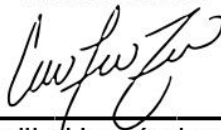
2020



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Alejandro Emmanuel Viera Ruiz** titulado “**Elaboración de andamios mediante electrohilado e impresión en tres dimensiones con potencial uso en regeneración ósea**”, fue realizado en la Unidad de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Fernando Hernández Sánchez, y pertenece al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente.



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 27 de agosto de 2020.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgar la beca de manutención No. 705198.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por las facilidades otorgadas para la realización de los experimentos en los laboratorios de la Unidad de Materiales (Química Macromolecular, Fisicoquímica y Biomateriales).

Dr. Fernando Hernández Sánchez, muchas gracias por brindarme un lugar en su grupo de trabajo para la realización de este proyecto bajo su dirección. Le agradezco por los conocimientos transmitidos, la confianza brindada, así como todo el tiempo y la paciencia.

Dr. Raúl Rosáles Ibáñez, mi gratitud por haber aceptado ser parte fundamental de este proyecto al fungir como mi tutor; así como también por haberme recibido en su laboratorio en la Universidad Nacional Autónoma de México, Anexo Fes Iztacala, el poder haber trabajado con usted fue muy enriquecedor.

Este proyecto fue en parte financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) UNAM. IA207420.

Al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez por los comentarios, aportaciones y sugerencias que hicieron posible la mejora de este trabajo, así como su participación activa como miembro del comité tutorial.

Al Dr. José Manuel Cervantes Uc por su apoyo en las pruebas de viscosimetría capilar para la determinación de las masas moleculares de la policaprolactona sintetizada.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes y al Dr. Luis Alberto May Hernández, por el tiempo dedicado para la revisión de esta tesis.

Este trabajo no habría sido el mismo sin el apoyo técnico de diferentes personas que facilitaron la caracterización de las muestras, es por ello que destaco la excelente labor realizada por el Dr. Hugo Joel Carrillo Escalante en la parte fisicoquímica; a la Q.I. Rossana Faride Vargas Coronado por las capacitaciones para el uso del equipo UV. VIS.

Al I.Q Silvia Beatriz Andrade Canto por las imágenes de microscopia electrónica de barrido que son parte importante de esta tesis.

A la I.B. Alejandra Isabel Sanguino Herrera, por su amistad y valioso apoyo en el laboratorio de química macromolecular para la síntesis de los polímeros.

A la M.C Arely Montserrat González González, C.D Amairany Rodríguez Navarrete y al C.D Jesús Giovanni Rodríguez Martínez por su valioso apoyo en los ensayos de citotoxicidad celular.

A la M.C Eva Marina Briz López, por su amistad, apoyo, observaciones y recomendaciones sobre este trabajo.

A mis compañeros y amigos del posgrado, por el apoyo académico, técnico y moral dentro y fuera de los laboratorios en especial a la M.C Irma Merary Pech Pool.

Al M.C Carlos Eduardo Belman Flores por sus observaciones, amor, comprensión y apoyo en todo momento.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
HIPÓTESIS	XIV
OBJETIVOS.....	XIV
Objetivo general	XIV
Objetivos específicos:	XIV
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Tejido óseo.....	1
1.1.1. <i>Histología del tejido óseo</i>	2
1.1.2. <i>Ingeniería de tejido óseo</i>	7
1.2. Elaboración de andamios: técnicas y materiales	8
1.2.1. <i>Impresión tridimensional (3D)</i>	10
1.2.2. <i>Electrohilado</i>	11
1.2.3. <i>Policaprolactona</i>	12
1.2.3.1. <i>Modificación superficial</i>	14
2. ANTECEDENTES	16
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	18
3.1. Materiales	18
3.2. Diseño e impresión 3D.....	18
3.2.1. <i>Escaneo de la tibia y el peroné</i>	19
3.2.2. <i>Diseño interno de los andamios</i>	20
3.2.3. <i>Impresión 3D</i>	22
3.3. Síntesis y caracterización de la PCL.....	25
3.3.1. <i>Con Sn (Oct)₂ como catalizador</i>	25
3.3.2. <i>Con NaH como catalizador</i>	26
3.3.3. <i>Caracterización de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)</i> 27	
3.3.4. <i>Determinación de la masa molecular mediante viscosimetría capilar</i>	27
3.3.5. <i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	28

3.3.6.	<i>Electrohilado y microscopía electrónica de barrido (MEB)</i>	29
3.4.	Modificación superficial de los andamios	40
3.5.	Cuantificación de aminas	40
3.6.	Ángulo de contacto	41
3.7.	Degradación acelerada	42
3.8.	Ensayos biológicos de los andamios	42
3.8.1.	<i>Ensayos de citotoxicidad de los andamios con hAMSCs.</i>	45
3.8.2.	<i>Ensayo de citotoxicidad con osteoblastos</i>	48
3.8.3.	<i>Diferenciación celular de hAMSCs a osteoblastos en los andamios.</i>	50
3.8.3.1.	<i>Evaluación de la mineralización ósea mediante tinción Von Kossa y Rojo de alizarina</i>	50
4.	RESULTADOS	53
4.1.	Síntesis y caracterización de la PCL	53
4.1.1.	<i>Síntesis de PCL con Sn(Oct)₂</i>	53
4.1.2.	<i>Síntesis de PCL con NaH</i>	55
4.1.3.	<i>Caracterización por FTIR</i>	57
4.1.3.1.	<i>FTIR de PCL con Sn(Oct)₂</i>	58
4.1.3.2.	<i>FTIR de PCL con NaH</i>	58
4.1.4.	<i>Determinación de la masa molecular mediante viscosimetría capilar</i>	59
4.1.5.	<i>Caracterización por DSC</i>	61
4.2.	Modificación superficial de los andamios	62
4.2.1.	<i>FTIR de los andamios de PCL modificados superficialmente</i>	65
4.3.	Cuantificación de aminas	66
4.4.	Ángulo de contacto	67
4.5.	Degradación acelerada de los tres diferentes tipos de andamios	69
4.6.	Ensayos biológicos de los andamios	70
4.6.1.	<i>Ensayos de citotoxicidad de los andamios con hAMSCs</i>	70
4.6.2.	<i>Ensayos de citotoxicidad de los andamios con osteoblastos</i>	72
4.6.3.	<i>Diferenciación celular de hAMSCs a osteoblastos en los andamios</i>	75
4.6.3.1.	<i>Evaluación de la mineralización ósea mediante tinción Von Kossa y Rojo de Alizarina</i>	75
	CONCLUSIONES	79

RECOMENDACIONES	81
ANEXOS	82
<i>Anexo A</i>	82
<i>Extrapolación para obtención de masas moleculares</i>	82
<i>Anexo B</i>	83
<i>Impresión 3D con PLA</i>	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.-Corte transversal de un hueso largo (fémur) adaptado de [2].	1
Figura 1.2.-Células del tejido óseo tomado de [1].	3
Figura 1.3.-Representación histológica del hueso compacto tomada de [1].	5
Figura 1.4.-Vista del interior de una trabécula tomada de [1].	6
Figura 1.5.-Diagrama del sistema para el modelado por deposición fundido.	10
Figura 1.6.-Representación esquemática sobre el desarrollo en la tecnología del electrospinning. (a) electrospinning convencional; (b) nuevo colector de electrospinning para fabricar andamios 3D; (c) colector para fabricar tubos nanofibrosos y (d) doble expulsión.	11
Figura 1.7.-Esquema general de la síntesis de PCL por diferentes métodos utilizando é-cl, tomado de [22].	12
Figura 1.8.-Etapas de la degradación de la PCL, adaptado de [26].	13
Figura 1.9.-Diagrama del ángulo de contacto formado entre un líquido y una superficie sólida, tomado de [29].	15
Figura 1.10.-Esquema general de un goniómetro utilizado para la medición de ángulos de contacto. tomado de [29].	15
Figura 3.1.-Metodología para la obtención de las reconstrucciones porosas de la tibia y el peroné.	18
Figura 3.2.-Siluetas de: A) tibia y B) peroné obtenidas mediante el proceso de digitalización.	19
Figura 3.3.-Lugares en donde fueron seccionados los modelos A) Tibia, B) Peroné.	19
Figura 3.4.-Disposición en la orientación de las 4 capas utilizadas para el diseño del interior poroso de ambos huesos. A)vista de los poros generados, B) ángulos de las fibras utilizadas para la generación de las capas.	20
Figura 3.5.-Vista del entramado generado para la creación de las estructuras porosas en el interior de los huesos.	21
Figura 3.6.-A) Ensamble final de las 5 partes, B) Tibia ensamblada.	22
Figura 3.7.-Andamios impresos utilizando PCL como material de impresión.	23
Figura 3.8.-Formación del entramado de 0 y 90° en las impresiones utilizando PCL.	24
Figura 3.9.-Fibras generadas a 45° y 135°.	24
Figura 3.10.-Electrohilado con una concentración de 15% p/v con 20cm de distancia al colector. El voltaje aplicado, así como la rapidez de flujo son presentados en los recuadros superiores izquierdos.	30
Figura 3.11.-Electrohilado concentración 20% p/v (primeras 2 imágenes distancia del colector de 15 cm, las 3 inferiores una distancia de 20 cm). El voltaje aplicado, así como la rapidez de flujo son presentados en los recuadros superiores izquierdos.	31
Figura 3.12.-Electrohilado 25% p/v, distancia del colector 20cm. El voltaje aplicado, así como la rapidez de flujo son presentados en los recuadros superiores izquierdos.	32
Figura 3.13.-Centro del andamio de PCL a 15 p/v,0.6 mL/h a 5h A) x500, B) x5000.	33
Figura 3.14.-Centro del andamio de PCL al 20 w/v,0.6ml/h a 3h A) x500, B) x5000.	34

Figura 3.15.-Centro del andamio de PCL al 25 w/v, 14Kv, 0.6ml/h a 7h A) x500, B) x5000.	35
Figura 3.16.-Distribución del tamaño de las fibras en los andamios de PCL al 15%.	36
Figura 3.17.- Distribución del tamaño de las fibras en los andamios de PCL al 20%.	37
Figura 3.18.- Distribución del tamaño de las fibras en los andamios de PCL al 25%.	38
Figura 3.19.-Andamios de PCL colocados en el cilindro rotacional antes del electrohilado.	39
Figura 3.20.-Electrohilado de PCL sintetizada con NaH sobre los andamios impresos.	39
Figura 3.21.-Andamios en proceso de esterilización por inmersión.	43
Figura 3.22.-Andamios en esterilización por luz U.V.	44
Figura 3.23.-Pruebas de esterilidad para los 3 tipos de andamios.	44
Figura 3.24.-Pasos para la cosecha de hAMSCs pase 5.	45
Figura 3.25.-Determinación de la viabilidad de las hAMSCs.	47
Figura 3.26.-placas de cultivo de 96 pozos con las células y andamios evaluados en el interior.	47
Figura 3.27.-Proceso para la obtención de osteoblastos de rata wistar.	49
Figura 3.28.-Placas de cultivo de 24 pozos con los explantes en el interior.	49
Figura 3.29.-Diferenciación y fijación celular	51
Figura 3.30.- Los pozos de las columnas 1 y 4 representan células sin medio osteoinductor, la columna 2 representa los pozos con la tinción Von Kossa mientras que la columna 3 es la tinción correspondiente a Rojo de Alizarina.	52
Figura 4.1.- A) PCL en el interior del matraz de 3 bocas, B) PCL disuelta en cloroformo.	53
Figura 4.2.-PCL obtenida utilizando Sn(Oct) ₂ .	53
Figura 4.3.- Síntesis de PCL utilizando Octoato de Estaño, tomado de [58].	54
Figura 4.4.- A) PCL en el interior del matraz de 3 bocas, B) película de PCL obtenida después de la evaporación del solvente.	55
Figura 4.5.-Síntesis de PCL con NaH, adaptado de [45].	56
Figura 4.6.-Espectro IR policaprolactona comercial.	57
Figura 4.7.-Espectros IR de las muestras de PCL catalizadas con Sn(Oct) ₂ .	58
Figura 4.8.-Espectros IR de las muestras de PCL catalizadas con NaH.	59
Figura 4.9.-Termograma DSC PCL r=49.78.	61
Figura 4.10.-Termograma DSC PCL r=94.163.	61
Figura 4.11.-Pasos seguidos para la inmovilización de gelatina en la superficie de los andamios bi-capa.	63
Figura 4.12.-Representación esquemática de la Inmovilización de moléculas de gelatina en los andamios de PCL electrohilados.	64
Figura 4.13.-Espectros FTIR sobre los tipos de PCL obtenidos para la elaboración de los andamios bi-capa.	65
Figura 4.14.-Cuantificación de aminos en andamios PCL aminolizados y con gelatina inmovilizada.	66
Figura 4.15.-Gota de agua sobre andamio de PCL.	67
Figura 4.16.-Gota de agua sobre andamio de PCL aminolizado.	67
Figura 4.17.-Gota de agua sobre un andamio de PCL+electrohilado+gelatina.	68

Figura 4.18.-Comparación del porcentaje degradativo en los diferentes tipos de andamios a lo largo de 5 semanas.	69
Figura 4.19.- hAMSCs vistas bajo el microscopio a un aumento de A) 4x, B) 10x y 40X, C) 20x.	70
Figura 4.20.- Ensayos de citotoxicidad de los andamios evaluados a tres tiempos con hAMSCs.	71
Figura 4.21.-Osteoblastos de huesos largos adheridos al tercer día de cultivo en la caja tipo T de 25 cm.	72
Figura 4.22.-Poblaciones de osteoblastos en la periferia de los andamios A) aumento a 4x, B) aumento a 10x.	73
Figura 4.23.- Osteoblastos de huesos largos vistos bajo el microscopio a diez días de cultivo. A) aumento 4x, B) aumento 10x y 40x, c) aumento 40x.	73
Figura 4.24.-Citotoxicidad de los andamios evaluados a tres tiempos con osteoblastos de huesos largos, donde se observa la viabilidad celular aceptable en el día 3; y disminución de la viabilidad y la proliferación celular en los días 7 y 10.	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.-Técnicas para la elaboración de andamios para regeneración ósea, adaptado de [14].	8
Tabla 2.1.-Trabajos reportados para la elaboración de andamios con PCL mediante la técnica de electrospinning.	17
Tabla 3.1.-Parámetros utilizados para el diseño del entramado poroso en el interior de las reconstrucciones de tibia y peroné.	21
Tabla 3.2.-Parámetros utilizados para la impresión 3D de los huesos.	22
Tabla 3.3.-Cantidad de andamios impresos de PCL para cultivo celular y degradación acelerada.	23
Tabla 3.4.-Cantidades propuestas para la polimerización por apertura de anillo de la e-cl.	25
Tabla 3.5.-Cantidades utilizadas para la síntesis de PCL con Sn(Oct) ₂ a diferentes tiempos de reacción.	26
Tabla 3.6.-Cantidades utilizadas para la síntesis de PCL utilizando NaH con tiempo de reacción de 1 hora.	26
Tabla 3.7.-Condiciones utilizadas para el electrohilado de la PCL sintetizada.	29
Tabla 3.8.-Tamaño promedio y desviación estándar en cada uno de los 3 andamios electrohilados.	36
Tabla 3.9.-Concentración de aminas para elaborar una curva de calibración.	41
Tabla 3.10.-Cantidad de andamios utilizados para las pruebas degradativas.	42
Tabla 3.11.-Esterilización de andamios para las pruebas biológicas.	43
Tabla 4.1.-Rendimientos de las reacciones utilizando Sn(Oct) ₂ .	54
Tabla 4.2.-Rendimiento de las reacciones con NaH.	55
Tabla 4.3.-Principales enlaces del espectro IR para PCL.	57
Tabla 4.4.-Tiempos de flujo promedios calculados en diferentes concentraciones.	59
Tabla 4.5.-Viscosidades calculadas para el cálculo de la masa molecular.	60
Tabla 4.6.-comparación de las temperaturas de fusión, cristalización, así como sus respectivas entalpías y grado de cristalinidad calculados a partir de los datos obtenidos del DSC.	62
Tabla 4.7.-Enlaces del espectro FTIR para la PCL modificada superficialmente.	65
Tabla 4.8.-Valores promedio de ángulos de contacto medidos.	68
Tabla 4.9.-Porcentaje de la masa perdida en los 3 tipos de andamios por semana.	69
Tabla 4.10.-Tinciones de rojo de alizarina para los 3 diferentes tipos de andamios a 7 días de cultivo.	75
Tabla 4.11.-Tinción Rojo de Alizarina para los tres diferentes tipos de andamios a 21 días de cultivo.	76
Tabla 4.12.-Tinción Von Kossa para los tres diferentes tipos de andamios a 7 días de cultivo.	77
Tabla 4.13.-Tinción Von Kossa para los tres diferentes tipos de andamios a 21 días de cultivo.	78

RESUMEN

En este trabajo se obtuvieron andamios bi-capa de Policaprolactona (PCL) con arquitectura similar al tejido óseo al combinar dos técnicas de elaboración: impresión en tres dimensiones y electrohilado de PCL sintetizada con baja masa molecular (47,000 Da). Adicionalmente se funcionalizaron con gelatina para modificar la biocompatibilidad de éstos. Mediante FTIR se confirmó la obtención de PCL sintetizada, así como la incorporación de la gelatina en los andamios bi-capa funcionalizados, al identificar sus grupos funcionales característicos (amina, amida I y amida II) presentes. A través de pruebas de ángulo de contacto y degradación acelerada se confirmó la modificación superficial en las estructuras de PCL al añadir grupos hidrofílicos. Finalmente, los resultados obtenidos a partir de las pruebas de caracterización biológica confirmaron que la adición de moléculas de gelatina modifica favorablemente la viabilidad celular con dos tipos de células: osteoblastos y células troncales de tejido adiposo de humano en andamios bi-capa funcionalizados.

ABSTRACT

Two-layer polycaprolactone (PCL) scaffolds with architecture similar to bone tissue was obtained by combining two techniques: 3D printing whereas low molecular mass (47000 Da) PCL was synthesized and deposited using electrospinning. Additionally, the scaffolds were functionalized with gelatin to modify their biocompatibility. Using FTIR the synthesis of PCL was confirmed as well as the incorporation of gelatin in the functionalized bi-layer scaffolds by identifying their characteristic functional groups (amine, amide I and amide II). Contact angle and accelerated degradation tests confirmed the surface modification of the structures by adding hydrophilic groups. Finally, the biological characterization confirmed that the addition of gelatin molecules favorably modifies cell viability in functionalized bi-layer scaffolds.

HIPÓTESIS

Combinando las técnicas de impresión en tres dimensiones (3D) y electrohilado es posible generar tejido óseo similar a la tibia y peroné, utilizando como modelo anatómico un conejo raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), con potencial en la regeneración de tejido óseo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Reconstruir una estructura porosa mediante impresión 3D y electrohilado de policaprolactona (PCL) para su uso potencial como andamios en la regeneración de defectos óseos.

Objetivos específicos:

1. Sintetizar y caracterizar (FTIR, viscosimetría capilar y DSC) PCL de baja masa molecular.
2. Obtener andamios con PCL de alto peso molecular utilizando impresión 3D.
3. Obtener andamios bi-capa, electrohilando la PCL sintetizada sobre la periferia de los andamios 3D impresos.
4. Modificar la superficie de los andamios bi-capa incorporando moléculas de gelatina.
5. Evaluar la influencia del electrohilado y la incorporación de las moléculas de gelatina sobre las propiedades fisicoquímicas (FTIR, cuantificación de aminas, ángulo de contacto, degradación acelerada) y biológicas (viabilidad y diferenciación celular) de los andamios bi-capa.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Tejido óseo

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conectivo constituido por células y componentes extracelulares calcificados; junto con la médula ósea forman los huesos, los cuales a su vez en conjunción con las articulaciones y tendones conforman el sistema óseo; el cual, constituye el 18% del peso corporal. Las 6 funciones básicas de éste son [1]:

1. Sostienen los tejidos blandos y provee puntos de inserción para los tendones de la mayoría de los músculos esqueléticos.
2. Protege de lesiones a los órganos internos más importantes, por ejemplo: los huesos del cráneo protegen al cerebro.
3. Proporcionan asistencia en el movimiento de los músculos esqueléticos.
4. Almacenan diversos minerales, especialmente calcio y fósforo, liberan hacia la sangre los minerales necesarios para mantener el equilibrio (homeostasis mineral).
5. Producen células sanguíneas (la médula ósea roja produce glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas)
6. Almacenamiento de triglicéridos en la medula ósea amarilla

La estructura del hueso a nivel macroscópico puede analizarse considerando las partes de un hueso largo. En la Figura 1.1 es posible observar las partes que conforman los huesos largos.

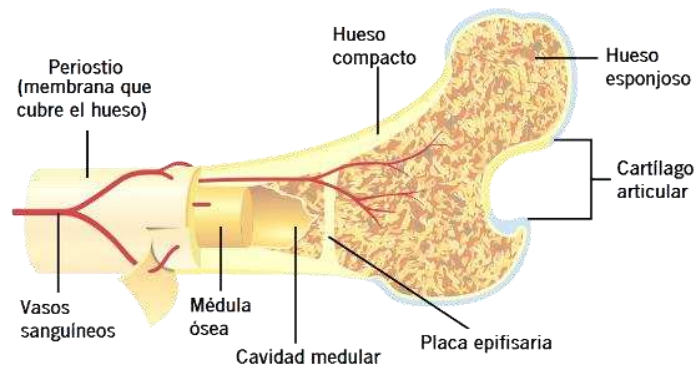


Figura 1.1.-Corte transversal de un hueso largo (fémur) adaptado de [2].

En la Figura 1.1 se observan diversos componentes visibles en un corte transversal de un hueso largo. El cartílago articular es una capa fina de cartílago hialino que cubre la zona de la epífisis donde un hueso se articula con articulaciones sinoviales. El periostio es una vaina dura de tejido conectivo denso e irregular que envuelve la superficie ósea en los lugares que no están recubiertos por cartílago. Las células formadoras de hueso del periostio permiten el crecimiento en espesor, pero no en longitud. El periostio también protege al hueso, lo asiste en la reparación de fracturas, ayuda a la nutrición del tejido óseo y sirve como punto de inserción a ligamentos y tendones. La cavidad medular es el espacio en el que se encuentra la médula ósea amarilla.

La placa epifisiaria son áreas de tejido cartilaginoso de crecimiento las cuales permiten el crecimiento de los huesos largos hasta que desaparecen en los adultos alrededor de los 25 años [3].

1.1.1. Histología del tejido óseo

El tejido óseo contiene una abundante matriz extracelular (matriz osteoide). La matriz osteoide está constituida por un 25% de agua, un 25% de fibras colágenas con proteínas no colágenas y un 50% de sales minerales cristalizadas. La sal mineral con mayor abundancia es el fosfato de calcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, la cual, en combinación con el hidróxido de calcio $[\text{Ca}_3(\text{OH})_2]$ forma los cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$. A medida que éstos se van formando, se combinan también con otras sales minerales, como el carbonato de calcio $[\text{CaCO}_3]$ y con iones como el Mg^{2+} , flúor, potasio y sulfato. Mientras estas se depositan en las estructuras formadas por las fibras colágenas de la matriz osteoide, se cristalizan y el tejido se endurece[4]. Este proceso recibe el nombre de calcificación y es iniciado por las células formadoras de hueso denominadas osteoblastos.

El tejido óseo presenta 4 tipos celulares: células osteogénicas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos [1].

- Células osteogénicas: son células madre no especializadas. Son las únicas células óseas que realizan división celular; las células resultantes se transforman en osteoblastos. Las células osteogénicas se encuentran a lo largo del endostio

(porción interna del periostio) y en los conductos intraóseos que contienen vasos sanguíneos.

- Osteoblastos: son células formadoras de hueso, inician la calcificación, sintetizan, secretan fibras colágenas y otros componentes orgánicos necesarios para construir la matriz osteoide. A medida que los osteoblastos se rodean a sí mismos con matriz osteoide, van quedando atrapados en sus secreciones y se convierten en osteocitos.
- Osteocitos: células óseas maduras que mantienen el metabolismo diario del tejido óseo a través del intercambio de nutrientes y productos metabólicos con la sangre. Al igual que los osteoblastos los osteocitos no realizan división celular.
- Osteoclastos: células de gran tamaño derivadas de la fusión de células hematológicas, se localizan en el endostio (en la cara proximal a la superficie ósea). La membrana plasmática del osteoclasto se pliega y forma un borde indentado. En este lugar, la célula libera enzimas lisosómicas y ácidos que digieren los componentes minerales y proteicos de la matriz osteoide (resorción).

En la Figura 1.2 se visualizan las células que conforman el tejido óseo.

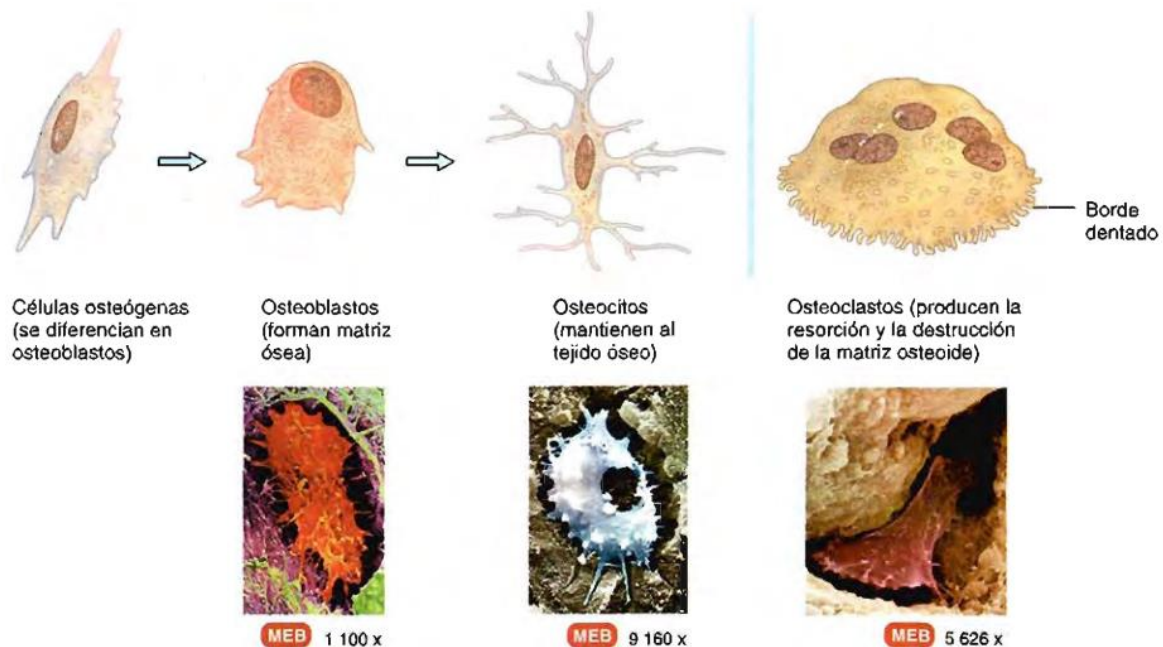


Figura 1.2.-Células del tejido óseo tomado de [1].

El hueso no es sólido, presenta porosidad (espacios vacíos) entre sus células y los componentes de la matriz osteoide. La porosidad permite que los vasos sanguíneos atraviesen y nutran a las células óseas. Otros espacios sirven como lugares de almacenamiento de la médula ósea roja, las regiones de un hueso pueden clasificarse como esponjosas o compactas. Aproximadamente el 80% del esqueleto está formado por hueso compacto y el 20% por hueso esponjoso.

El tejido óseo compacto o cortical presenta poca porosidad (5 al 10%) es el componente más sólido del tejido óseo. Se encuentra por debajo del periostio de todos los huesos y forma la mayor parte de los huesos largos. Proporciona protección, soporte y ofrece resistencia a la tensión causada por el peso y el movimiento [5].

Los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y los nervios atraviesan al hueso compacto desde el periostio por los conductos perforantes transversos o conductos de Volkmann. Estos vasos y nervios de los conductos perforantes se conectan con los de la cavidad medular, periostio y conductos centrales (o haversianos). Los conductos corren en sentido longitudinal en el hueso. Alrededor de estos conductos se encuentran laminillas concéntricas (anillos de matriz osteoide calcificada). Entre las láminas se observan pequeños espacios llamados lagunas, los cuales contienen osteocitos. Los canalículos surgen desde las lagunas y contienen líquido extracelular donde se localizan grupos de osteocitos. Los osteocitos se comunican entre si mediante sus uniones en hendidura. Los canalículos conectan entre si las lagunas y éstas a su vez con los conductos centrales; por lo cual se forma un intrincado sistema en miniatura de conductos interconectados a través del hueso. Este sistema suministra vías para alimentar a los osteocitos con nutrientes y oxígeno, así como para facilitar la eliminación de sus desechos.

Los componentes del hueso compacto se organizan en unidades denominadas osteonas o sistemas haversianos. Cada osteona consiste en un conducto central (o de Havers) con sus laminillas concéntricas, lagunas, osteocitos y canalículos. Las osteonas se alinean en el tejido óseo compacto en la misma dirección a lo largo de líneas de tensión; estas líneas de tensión pueden cambiar como consecuencia de discontinuidades óseas (fracturas) o deformidades físicas, la organización de las osteonas no es estática; sino variable a lo largo del tiempo en respuesta a las demandas físicas que ocurren en el esqueleto.

Las zonas situadas entre las osteonas reciben el nombre de laminillas intersticiales, dentro de las cuales se encuentran lagunas con osteocitos y canalículos. Las láminas intersticiales son fragmentos de osteonas que fueron parcialmente destruidas durante la reconstrucción ósea o en crecimiento. Las laminillas que rodean al hueso justo por debajo el periostio o que rodean la cavidad medular reciben el nombre de laminillas circunferenciales.

En la Figura 1.3 se aprecia como es histológicamente el hueso compacto.

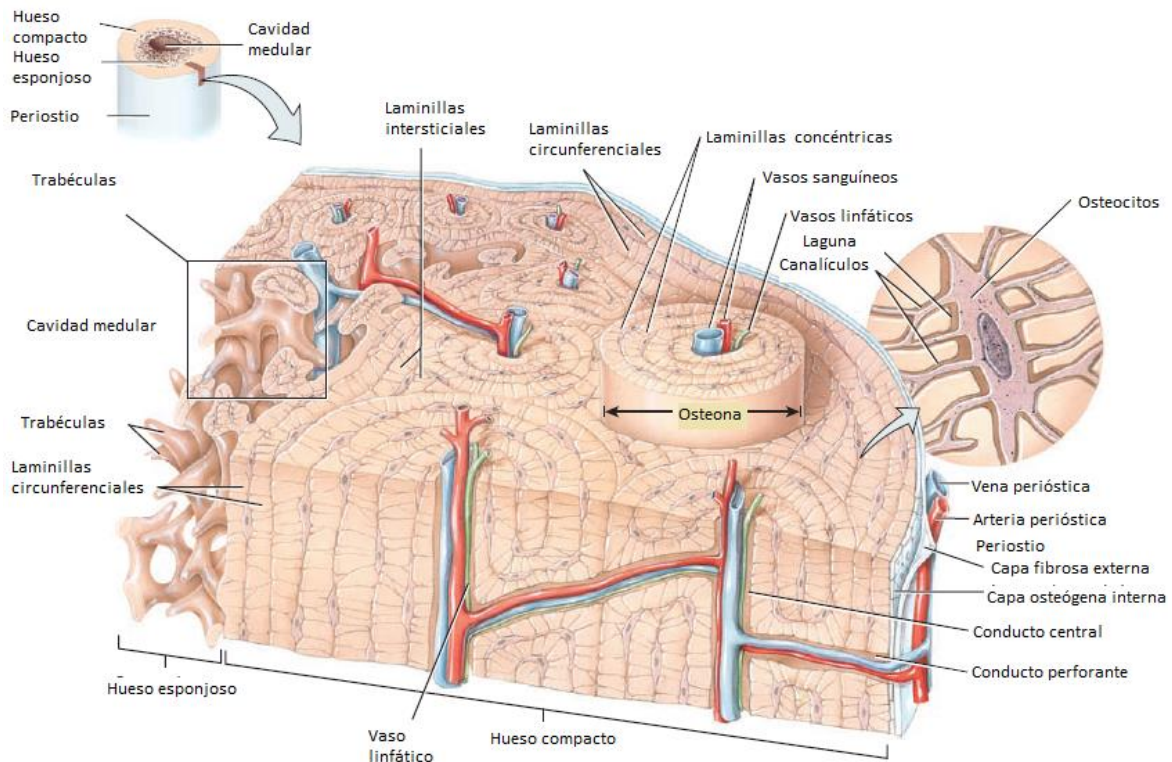


Figura 1.3.-Representación histológica del hueso compacto tomada de [1].

El tejido óseo esponjoso o trabecular no contiene osteonas; tiene láminas dispuestas en una red irregular de columnas delgadas que se denominan trabéculas. La porosidad en éste tipo de tejido es del 70 al 95% lo cual ocasiona que sea más liviano; los huesos largos entre las trabéculas contienen médula ósea roja encargada de la producción de células sanguíneas (hematopoyesis)[5]. Dentro de cada trabécula se encuentran lagunas que contienen osteocitos. Los canalículos se irradian hacia afuera desde las lagunas. Como los osteocitos del hueso esponjoso se localizan en las superficies trabeculares, reciben sus nutrientes directamente desde la sangre circulante que atravesó las cavidades medulares.

El tejido óseo esponjoso constituye la mayor parte del tejido de los huesos cortos planos y de irregulares. También integra muchos de los extremos en los huesos largos y el borde estrecho alrededor de la cavidad medular de éstos.

Las trabéculas del tejido esponjoso están orientadas a lo largo de las líneas de tensión (como las del hueso compacto), característica que ayuda a los huesos a resistir tensiones y transferir fuerza sin fracturarse. El tejido esponjoso tiende a localizarse donde los huesos no reciben fuertes tensiones o donde la tensión se desvía en varias direcciones.

En la Figura 1.4 es posible observar una representación histológica del hueso esponjoso.

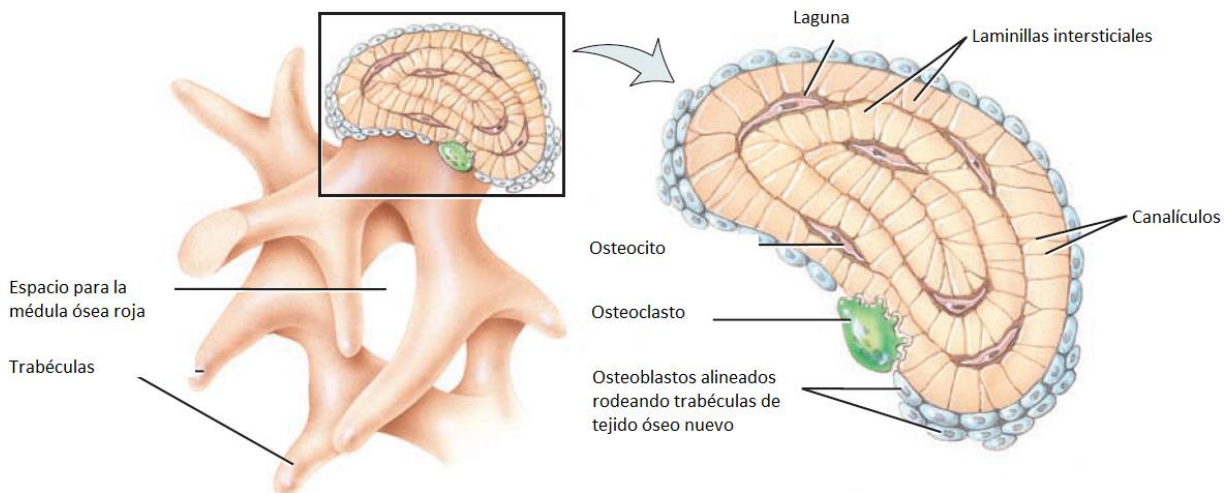


Figura 1.4.-Vista del interior de una trabécula tomada de [1].

El Hueso presenta una elevada capacidad de remodelación ósea gracias a la acción conjunta de los osteoblastos y osteoclastos[6]. Sin embargo, algunas fracturas o enfermedades como el cáncer provocan pérdidas de tejido generando zonas denominadas defectos óseos[7]. La gravedad de los defectos óseos es proporcional al tiempo requerido para la remodelación ósea; no obstante, el tiempo para la remodelación de ciertos defectos óseos críticos puede acelerarse con la ayuda de materiales diseñados específicamente para ello. La ingeniería de tejidos ósea se encarga de la elaboración de materiales que actúen como estructuras coadyuvantes en el proceso de reparación ósea [8].

1.1.2. Ingeniería de tejido óseo

La ingeniería de tejidos ósea es un área multidisciplinaria que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la salud para el desarrollo de estructuras biológicas, con el fin de generar tejidos que permitan restaurar, mantener o mejorar la función de éstos. Del mismo modo, combina materiales y componentes celulares con el objeto de utilizarlos en tratamientos específicos para garantizar un éxito terapéutico[9]. Esta disciplina nace como respuesta a los problemas que presentan el uso de las terapias como los autoinjertos y xenoinjertos (tejido de otra especie) utilizadas en la actualidad, desarrollando materiales inertes y bioactivos en organismos vivos (biomateriales) cuya estructura y composición puedan constituir una base (andamios) capaz de permitir la formación de tejido específico a partir de células cultivadas sobre ellos [10].

Se puede definir biomaterial como una sustancia o conjunto de sustancias que pueden ser usadas para sustituir un tejido, órgano o función en un ser vivo, sin ocasionar reacciones adversas. Otra definición aceptada explica que es una sustancia inerte sistémica y farmacológicamente diseñada para implantarse o incorporarse en sistemas vivos [11]. Utilizando biomateriales es posible construir andamios.

Un andamio es una estructura de tres dimensiones que funciona como una matriz extracelular artificial con el fin de proporcionar una estructura para la adhesión celular, migración, proliferación y regeneración del tejido [11]. Las características requeridas para el diseño de los andamios dependen del tejido para el que será diseñado. Para el tejido óseo se requiere lo siguiente [12]:

- Elaborados con materiales biocompatibles, no debe de ocasionar alguna reacción de rechazo en el ser vivo al cual se le desee implantar.
- Deben tener una estructura porosa; es decir, el material debe tener espacios huecos los cuales reciben el nombre de poros. El tamaño de los poros en andamios diseñados para la regeneración ósea se encuentra entre 200µm a 400µm; los poros deben de estar interconectados, la finalidad de los poros y la interconexión de los mismos es permitir el crecimiento celular, el intercambio de nutrientes y eliminación de desechos.

- Tener una superficie química que permita la diferenciación, migración y proliferación celular.

1.2. Elaboración de andamios: técnicas y materiales

Existen diversos métodos para la elaboración de andamios. Las de mayor auge son aquellas en donde se tiene un control preciso del tamaño de poro y de fácil replicación en diversas condiciones ambientales; en la Tabla 1.1 son presentadas varias técnicas utilizadas en la actualidad para elaborar andamios [13].

Tabla 1.1.-Técnicas para la elaboración de andamios para regeneración ósea, adaptado de [14].

Método	Polímeros	Características específicas	Porosidad y tamaño de poro
Andamios porosos biodegradables.			
Lixiviación por el método de sales	Polímeros absorbibles (PLLA, PLGA, colágeno, etc.)	Andamios porosos biodegradables controlados	20-50% 5-100 μm
Lixiviación de partículas de hielo	PLLA y PLGA	Control de la estructura del poro y producción de andamios delgados	95% 20-200 μm
Expansión de gas	PLLA, PLGA y PDLA	Controlar porosidad y estructura del poro	<90% 20-100 μm
Fabricación por microesferas			
Técnica de evaporación de disolventes	PLGA, PLGA	Área superficial extendida para realizar cultivo celular	<90% 20-300 μm
Andamios por agregado de partículas	Quitosano HAP	Alta estabilidad mecánica	Hueso, cartílago y tejidos osteocondrales
Liofilización	PLGA, PLLA, PGA, PLGA/PPF, colágeno y Quitosano	Esponja porosa 3D durable y flexible	<97% <200 μm
Fabricación de andamios de gel inyectables.			
Andamios a base de hidrogeles	Copolímeros en dibloque y tribloque, combinaciones de PLA, PGA, PLGA and PEG, colágeno, Quitosano, HA y fibrina	Muestran biocompatibilidad y causan una respuesta inflamatoria mínima	<85% 7-69 μm

Método	Polímeros	Características específicas	Porosidad y tamaño de poro
Fabricación de andamios cerámicos			
Replicación de esponjas	Esponja de poliuretano, PVA, BCP o sulfato de calcio	Poros del andamio cerámico interconectados	<50% 300-600 μm
Recubrimiento con fosfato de calcio	Recubrimiento a metales, vidrios, cerámicas inorgánicas y polímeros orgánicos (PLGA, PS, PP, silicón y PTFE), colágeno	Incrementa la biocompatibilidad y mejora la respuesta biológica con el organismo	<70% 9-150 μm
Control del tamaño de poro			
Proceso de impresión por tinta	Alginato de sodio	Construir tejidos complejos a base de múltiples tipos celulares (andamio de hidrogel)	
Deposición de material fundido FDM mediante técnicas de prototipado (impresión tridimensional).	Polímeros biodegradables o mezclas	Estructuras complejas de objetos tridimensionales, buenas propiedades mecánicas	<90% 30-2500 μm
Electrohilado	Polímeros en solución	Microfibras y nanofibras con diversas orientaciones	<90% 1-10 μm

Como puede visualizarse en la Tabla 1.1 existe una gran variedad de técnicas para la elaboración de andamios. Sin embargo, en los últimos años se han utilizado los métodos que permiten un control preciso en el tamaño de los poros; es por ello que el modelado de material por deposición fundido y el electrohilado son actualmente de las técnicas más utilizadas para la elaboración de andamios.

1.2.1. Impresión tridimensional (3D)

La tecnología de modelado por depósito fundido (FDM) es utilizada en las impresoras 3D y funciona utilizando un filamento de polímero como tinta (o metal) que se desenrolla de un carrete y suministra el material a una boquilla de extrusión, la cual se calienta (para fundir el material). El proceso de impresión consiste fundamentalmente en ir creando el objeto capa por capa, de abajo hacia arriba, es decir, el movimiento ocurre en las direcciones X, Y y Z. En la Figura 1.5 se muestra un diagrama del sistema de modelado por deposición fundido en donde un material es calentado a una temperatura cercana al punto de fusión y extruido a través de una boquilla para ser depositado en la plataforma de impresión [15].

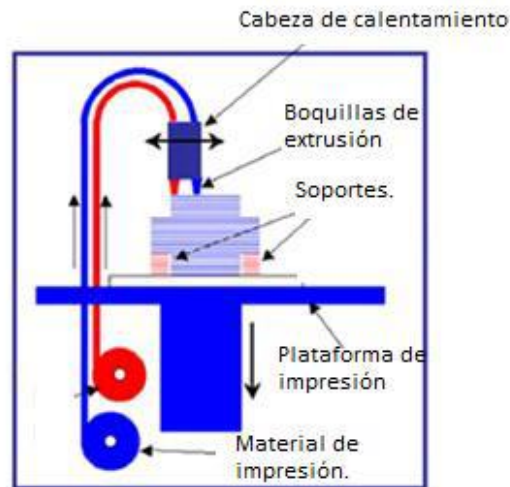


Figura 1.5.-Diagrama del sistema para el modelado por deposición fundido.

Existe gran variedad de polímeros que es posible utilizar para la impresión de andamios, como los poliésteres la cual es una familia de polímeros sintéticos; también se pueden utilizar polímeros naturales e hidrogeles. Sin embargo, para la elaboración de andamios es conveniente utilizar polímeros sintéticos debido a que el uso de éstos brinda como resultado andamios los cuales presentan características mecánicas similares al tejido óseo [16].

1.2.2. Electrohilado

Es una técnica simple y altamente versátil utilizada para generar fibras de diferentes tamaños (submicrométricas y nanométricas principalmente) utilizando fuerzas eléctricas en soluciones de diferentes materiales [17]. Se necesitan tres componentes principales para completar el proceso: una bomba de inyección (la cual posee una jeringa, con una aguja que funciona como capilar la cual contiene la solución polimérica); una fuente de alto voltaje y un colector conectado a tierra usualmente un plato metálico o un cilindro rotatorio tal como muestra la Figura 1.6.

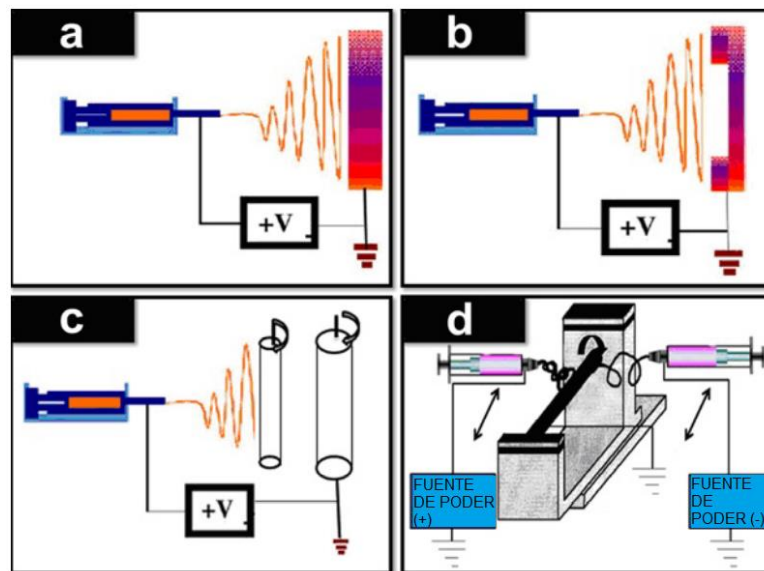


Figura 1.6.-Representación esquemática sobre el desarrollo en la tecnología del electrospinning. (a) electrospinning convencional; (b) nuevo colector de electrospinning para fabricar andamios 3D; (c) colector para fabricar tubos nanofibrosos y (d) doble expulsión.

Para el inicio del proceso, el material con el que se realizará el andamio debe estar disuelto en un disolvente adecuado (para evitar la obstrucción del capilar durante el proceso); subsecuentemente, la solución es colocada en una jeringa en la bomba de inyección donde será empujada hasta llegar a la punta de la aguja. La formación de las fibras sucede al aplicar voltaje en la aguja, ocasionando que las cargas eléctricas se acumulen promoviendo la formación de una gota en la punta del capilar. A medida que la intensidad del campo eléctrico se incrementa, la gota se alarga para crear una forma cónica

conocida como “cono de Taylor”. Posteriormente se produce un chorro eléctricamente cargado, y a medida que el chorro se mueve hacia la placa colectora, este se alarga por interacciones electrostáticas mientras que el disolvente se evapora en el trayecto hacia la placa.

Utilizando la técnica de electrohilado se han elaborado diversos andamios para la regeneración de diferentes tejidos [18]. Dentro de los materiales utilizados uno de los más importantes y ampliamente difundidos a nivel mundial es la policaprolactona (PCL), la cual forma parte de la familia de los poliésteres y se encuentra aprobada por la FDA para la elaboración de dispositivos médicos [19].

1.2.3. Policaprolactona

La PCL es un polímero hidrofóbico sintético compuesto por unidades repetitivas de caprolactona, en la literatura se encuentra documentado su uso para imitar la estructura y textura fibrosa del colágeno presente en el tejido óseo natural [20]. La PCL es un polímero lineal, semicristalino, biodegradable y biocompatible con una baja temperatura de fusión (60 °C) y miscibilidad con otros polímeros; existen diversos métodos para la síntesis de PCL, en la Figura 1.7 se representa un diagrama general utilizando diferentes métodos para obtener PCL [21].

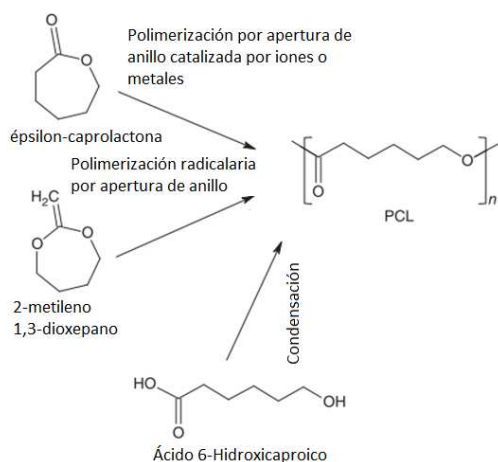


Figura 1.7.-Esquema general de la síntesis de PCL por diferentes métodos utilizando ϵ -cl, tomado de [22].

La PCL se ha utilizado para la elaboración de andamios en ingeniería de tejidos para regeneración ósea; sin embargo, el proceso degradativo bajo condiciones fisiológicas depende en gran medida del grado de cristalinidad y masa molecular de la PCL utilizada en la elaboración de estos. Se encuentra reportado en la literatura el uso de PCL de una masa molecular arriba de 68,000 Da en la elaboración de andamios, sin embargo, se ha encontrado que utilizando PCL con masas moleculares por debajo de los 50,000 Da ocasiona un cambio en las propiedades mecánicas en los andamios, razón por la cual la adhesión celular y diferenciación también varían, e incluso se encuentra reportado que utilizando PCL de 14,000 Da ocasiona un retardo en el proceso de diferenciación celular [23].

El resultado de un estudio degradativo llevado a cabo en roedores vivos demostró que cuando se utiliza PCL de 66,000Da el proceso de degradación comenzó hasta al final del mes 30 (fragmentación en la longitud de la cadena polimérica a segmentos de un tamaño promedio de 8,000Da) [24].

Otro estudio llevado a cabo con PCL de 3,000Da reportó que en 13 días el polímero fue degradado en combinación por hidrólisis y macrófagos en implantes intracelulares [25].

En la Figura 1.8 es presentado un esquema general de como ocurre la degradación de andamios de PCL implantados en organismos vivos.

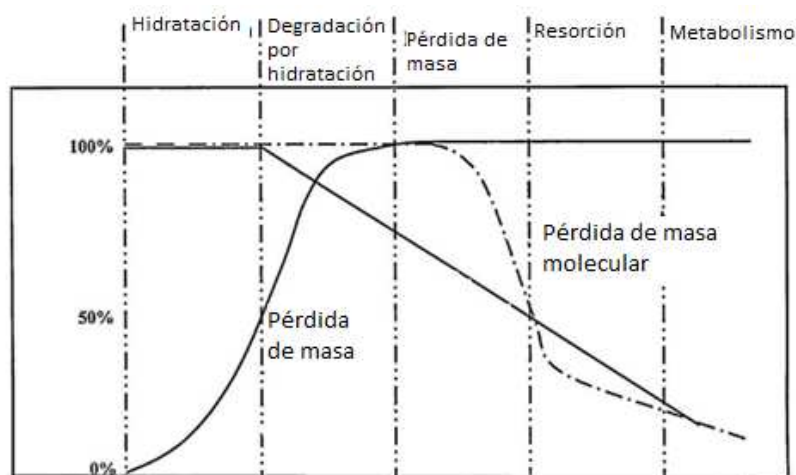


Figura 1.8.-Etapas de la degradación de la PCL, adaptado de [26].

Debido a la tardía biodegradación de la PCL por hidrólisis se han elaborado diversas técnicas y protocolos para modificar la superficie de los andamios con la finalidad de reducir la hidrofobicidad, acelerar la tasa degradativa y mejorar la adhesión celular [27].

1.2.3.1. Modificación superficial

Una de las técnicas utilizadas para generar cambios en las propiedades superficiales de la PCL consiste en añadir grupos amino en los grupos ésteres presentes en la cadena polimérica (aminólisis)[28]. Algunos autores realizan únicamente esta modificación, otros posterior a la aminólisis realizan un segundo proceso en donde añaden gelatina, quitosano, hidroxiapatita o algún factor de crecimiento para favorecer el crecimiento y adhesión celular [28].

Uno de los efectos ocasionados por la modificación superficial es la disminución de la hidrofobicidad de la PCL; es posible determinar este parámetro a través de la determinación del ángulo de contacto. Cuando una gota de agua es depositada sobre una superficie plana, esta se extiende sobre la superficie formando un ángulo en la zona de contacto con la superficie. Una superficie hidrofílica genera una gota extendida sobre su superficie[29].

Considerando una gota de agua en una superficie sólida, si ésta es atraída por la superficie, quedará completamente extendida; en este caso, se considerará que el ángulo de contacto será de 0° , entonces esta superficie es considerada como hidrófila. Al contrario, si el ángulo de contacto medido entre la gota y la superficie supera los 90° la superficie del material es considerada como hidrófoba. En la Figura 1.9 se muestra una representación gráfica de cómo es medido el ángulo generado cuando la gota es depositada sobre un material sólido.

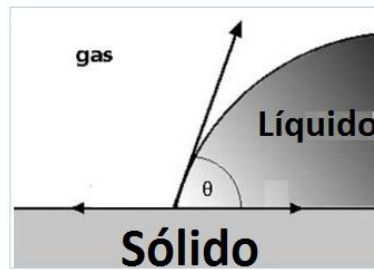


Figura 1.9.-Diagrama del ángulo de contacto formado entre un líquido y una superficie sólida, tomado de [29].

Para medir el ángulo de contacto se utiliza un goniómetro, un instrumento conformado por una lámpara para iluminar la gota colocada sobre una celda y así proyectar una sombra sobre un sistema de observación [30]; el cual tiene una escala para medir los ángulos formados, en la Figura 1.10 se muestra un esquema de un goniómetro.

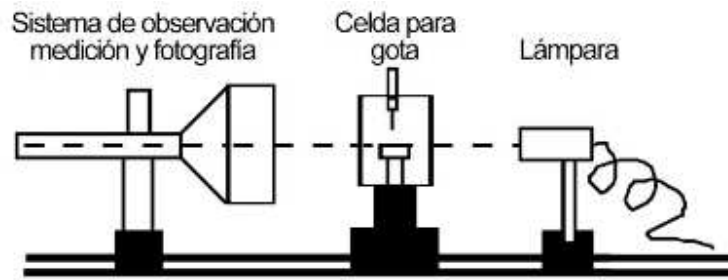


Figura 1.10.-Esquema general de un goniómetro utilizado para la medición de ángulos de contacto. tomado de [29].

2. ANTECEDENTES

A finales de 2009, Dong J. y colaboradores realizaron un estudio piloto donde utilizaron la técnica de prototipado rápido para fabricar andamios de poliácido glicólico (PGA) /poliácido láctico (PLA) en forma de cóndilo de mandíbula y se incubaron en ellas células madre de médula ósea. Los resultados *in vitro* exhibieron una buena compatibilidad de los materiales y sugirieron su aplicación para futuros tratamientos de lesiones craneo maxilofaciales [31].

En Portugal, a finales de 2010 el grupo de trabajo de Mano, se interesó en la producción de andamios (usando tecnología de prototipado rápido) con gradientes de tamaño de poro con la finalidad de mejorar la eficiencia en la siembra de células y controlar la distribución espacial de las mismas en el andamio. Para ello se emplearon mezclas de almidón y poli ϵ -caprolactona para el cultivo de células osteoblásticas. Los resultados mostraron una mejora en la viabilidad celular de un 35% a un 70% en el cultivo celular en los andamios con gradiente de tamaño de poro (si se compara con los de porosidad homogénea) bajo condiciones estáticas de cultivo [32].

Estudios comparativos de cultivo de células mesenquimales se realizaron sobre andamios de PCL y de un copolímero de hidroximetil glicólido y ϵ -caprolactona, manufacturados por técnica de prototipado rápido de impresión 3D. El estudio publicado en 2011 por Hennink y colaboradores, demostraron que las células sembradas en los andamios del copolímero tuvieron una mayor actividad metabólica, además de promover la diferenciación osteogénica, haciéndolos modelos promisorios para regeneración ósea [33].

Con la finalidad de estudiar la viabilidad celular de andamios para la regeneración de tejido blando (cardíaco), Yeong y colaboradores en Singapur, fabricaron andamios de PCL implementando la técnica de sinterizado selectivo por láser (SLS), obteniendo resultados positivos. Este grupo dirigió su trabajo fundamentalmente hacia la caracterización mecánica y biológica de las estructuras obtenidas [34].

El procesamiento de poliésteres puede ocasionar la degradación térmica del polímero lo cual a su vez genera pérdida en las propiedades mecánicas. Por esta razón, Perale et al. en 2007, se interesaron en la degradación durante el procesamiento –por micro extrusión- de la PCL y PLA, desde los pellets hasta la obtención de filamentos. Con base

en los resultados obtenidos los autores concluyeron que la micro extrusión no representa un riesgo degradativo durante el procesamiento de poliésteres biocompatibles de alta masa molecular [35].

Una investigación publicada también en 2011, por Yoon y su grupo de trabajo. propuso el uso de andamios para la liberación controlada de fármacos. Su propuesta exhibió la manufactura de un andamio de PCL, utilizando para ello impresión 3D incrustándole luego capas de nanofibras de PCL/ poli óxido de etileno con rodamina-B obtenidas utilizando electrospinning, de manera que la liberación de dicha molécula fue controlada con la variación del espesor de la capa de PCL [36].

En la Tabla 2.1 se enlistan algunos trabajos en donde es utilizada la técnica de electrospinning para la obtención de andamios elaborados con PCL para diferentes aplicaciones en ingeniería de tejidos.

Tabla 2.1.-Trabajos reportados para la elaboración de andamios con PCL mediante la técnica de electrospinning.

Material	Disolvente	Referencias
PCL 80 KDa	Cloroformo 10% m/v	Yoshimoto et Al [37].
PCL 65 KDa	Trifluoroetanol 50 mg-275 mL	Jha et Al [38].
PCL 45 KDa	Cloroformo: etanol (9:1)	Colmenares, Gabriel et Al [39].
PCL 80 KDa	Trifluoroetanol 20% m/v	Martín, Gaspar [40] Uluac, América [41]

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales

Los materiales utilizados fueron: Hidróxido de sodio (NaOH), hexametildiamina (HMDA), 2-propanol, etanol, cloroformo, épsilon caprolactona (e-cl), Hidruro de sodio (NaH), Octoato de estaño ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), PCL 80,000Da, Tetrahidrofurano (THF) grado HPLC, solución fosfato buffer salino (PBS), medio de cultivo suplementado (DMEM), suero fetal bovino (SBF)

3.2. Diseño e impresión 3D

Para elaborar los andamios porosos utilizando como base los huesos de la tibia y peroné de un conejo de la raza *Oryctolagus cuniculus*, se utilizó un scanner 3D de la marca Makerbot® modelo digitizer desktop 3D para generar el contorno de los huesos como archivos en formato STL. El proceso seguido para la obtención de la reconstrucción ósea porosa es mostrado en la Figura 3.1.

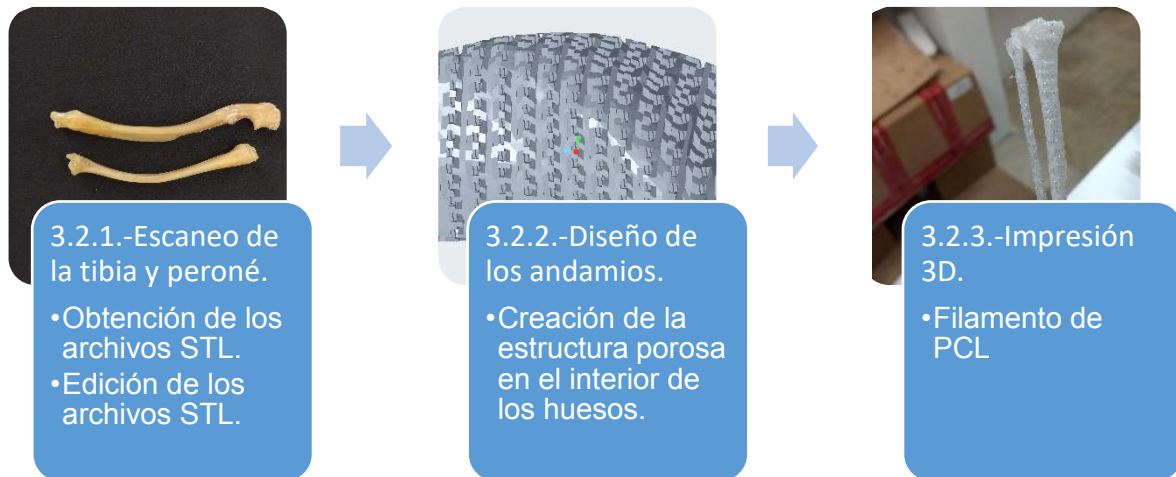


Figura 3.1.-Metodología para la obtención de las reconstrucciones porosas de la tibia y el peroné.

3.2.1. Escaneo de la tibia y el peroné

Ambos huesos fueron digitalizados utilizando un escáner de la empresa MakerBot® modelo digitizer desktop 3D, se realizaron 5 escaneos a cada hueso para obtener la reconstrucción sólida de ambas siluetas.

Posterior a la obtención de siluetas estas fueron modificadas utilizando el software de uso libre de la compañía Autodesk® llamado meshmixer, con este programa ambas siluetas fueron divididas. El hueso de la tibia fue dividido en 5 partes y el del peroné en 4, generando en total 9 partes; esto con el objetivo de facilitar la creación del interior poroso.

El resultado del escaneo realizado a la tibia y peroné puede observarse en la Figura 3.2.

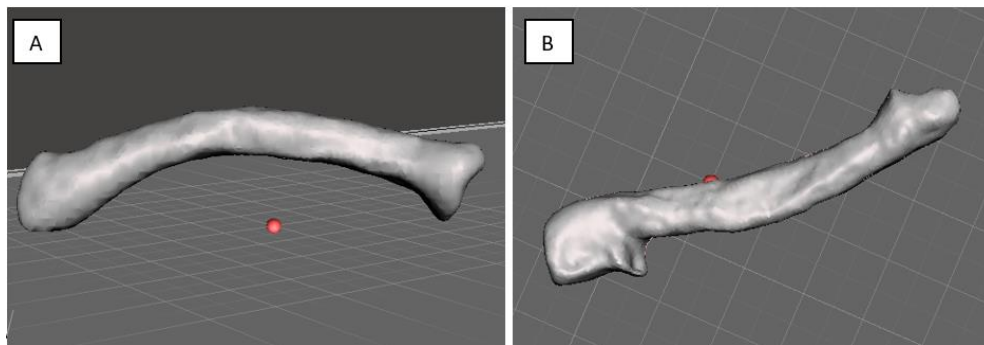


Figura 3.2.-Siluetas de: A) tibia y B) peroné obtenidas mediante el proceso de digitalización.

Posterior al proceso de digitalizado, ambos huesos fueron divididos para facilitar la creación del entramado poroso; la tibia fue dividida en 5 partes y el peroné en 4 como se observa en la Figura 3.3.

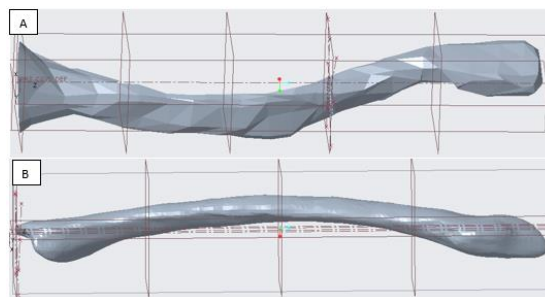


Figura 3.3.-Lugares en donde fueron seccionados los modelos A) Tibia, B) Peroné.

Después se diseñó el entramado poroso en cada una de las 9 partes resultantes.

3.2.2. Diseño interno de los andamios

Para generar el diseño poroso en el interior de los huesos se utilizó el software de diseño paramétrico CAD de la empresa PTC®, los diseños se realizaron utilizando 4 capas conformadas por fibras con diferentes orientaciones de acuerdo a la capa diseñada. La estructura porosa fue elaborada considerando los siguientes parámetros:

- Largo y ancho de las fibras.
- Número de fibras longitudinales y transversales.
- Silueta de los huesos.
- Dimensiones de los huesos.

En la Figura 3.4 es mostrada la disposición de las fibras utilizadas para la formación del interior poroso de ambos huesos.

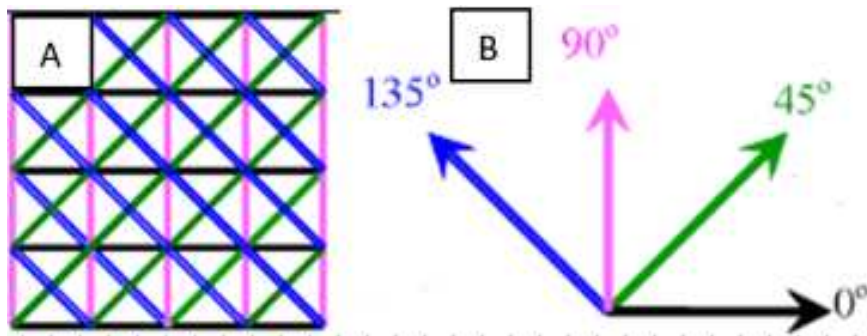


Figura 3.4.-Disposición en la orientación de las 4 capas utilizadas para el diseño del interior poroso de ambos huesos. A) vista de los poros generados, B) ángulos de las fibras utilizadas para la generación de las capas.

Como se observa en la Figura 3.4, la superposición de las fibras crea un entramado poroso, primero fue creada la capa correspondiente a los 90°, después la de 135°, la de 45° y por último la capa correspondiente a 0°. Con las dimensiones de cada una de 9 las partes (la altura permanece relativamente constante, sin embargo, el ancho es variable debido a la forma irregular de la superficie ósea) se calculó el número de fibras requerido por capa, así como el número de veces que era necesario replicar las capas para alcanzar la altura final de cada una de las 9 partes obtenidas en la división de los huesos.

En la Tabla 3.1 se muestran los parámetros utilizados para la elaboración del interior poroso en los huesos de la tibia y peroné.

Tabla 3.1.-Parámetros utilizados para el diseño del entramado poroso en el interior de las reconstrucciones de tibia y peroné.

	Dimensiones (mm)	Ancho de las fibras (mm)	Largo de las fibras (mm)	Separación entre cada fibra (mm)
Tibia (5 partes)	Ancho: 9.6 a 3 Largo: 82.30	0.3	Variable	0.15
Peroné (4 partes)	Ancho: 8.35 a 3 Largo: 67.81	0.3	Variable	0.15

Posterior a la obtención de las 9 partes, se procedió a realizar un ensamblaje de las piezas correspondientes para obtener la tibia y peroné utilizando el software PTC creo parametric.

Se observa en la Figura 3.5 el diseño del entramado interior de ambos huesos, se forma una estructura ordenada, porosa e interconectada.

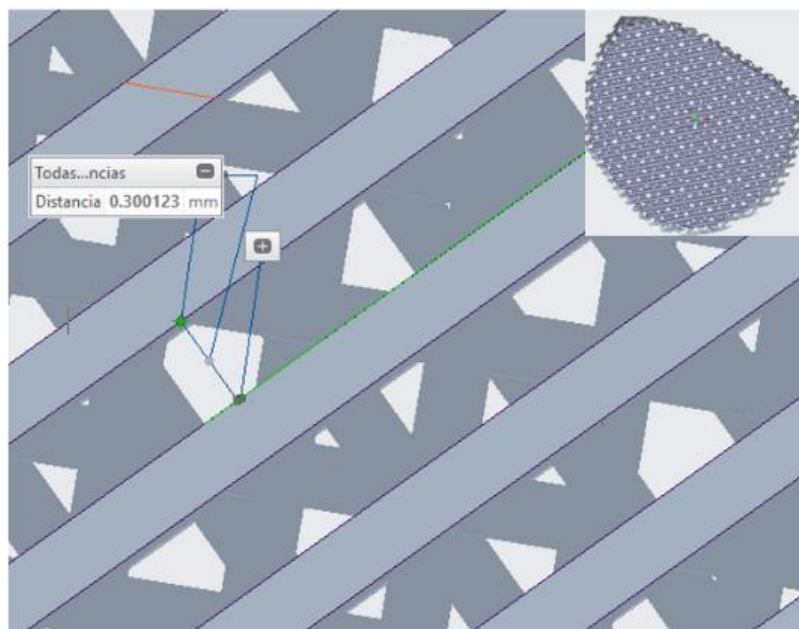


Figura 3.5.-Vista del entramado generado para la creación de las estructuras porosas en el interior de los huesos.

En la Figura 3.6 se observan las partes que conforman el diseño de la tibia, así como el ensamble final realizado utilizando los programas meshmixer® y PTC creo parametric®.

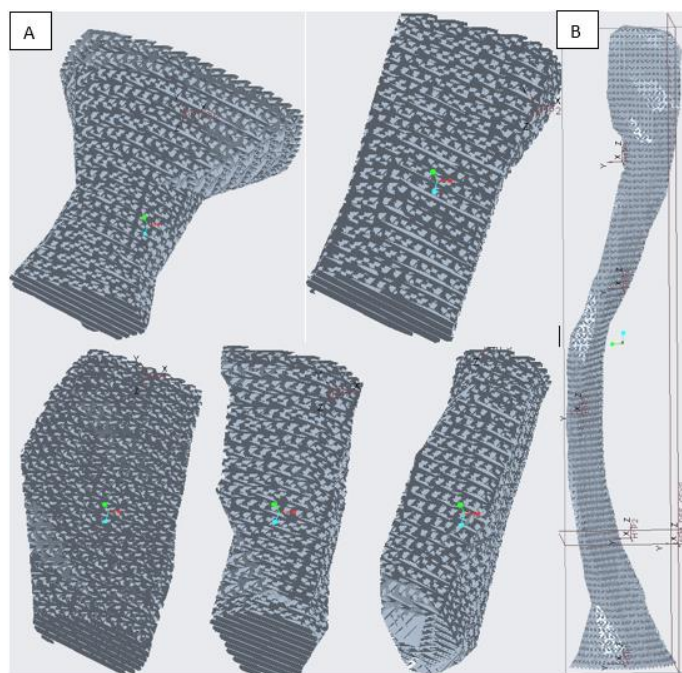


Figura 3.6.-A) Ensamble final de las 5 partes, B) Tibia ensamblada.

3.2.3. Impresión 3D

En la Tabla 3.2 son presentados los parámetros utilizados para la impresión de ambos huesos.

Tabla 3.2.-Parámetros utilizados para la impresión 3D de los huesos.

Material de impresión	*PLA	PCL
Temperatura de extrusión (°C)	190	155
Temperatura de la placa de impresión (°C)	25	25
Velocidad de impresión (mm/s)	10	10
Diámetro del filamento (mm)	1.77	1.77
Tamaño de la boquilla de impresión (mm)	0.2	0.2
Tiempo de impresión por capa (s)	20	5

*Nota: las impresiones utilizando PLA se encuentran en el anexo 1

Con los parámetros utilizados para la elaboración del interior poroso de la tibia y peroné, se imprimieron en total 100 andamios de PCL. En la Tabla 3.3 se presenta la cantidad de andamios requeridos para las pruebas degradativas y cultivo celular.

Tabla 3.3.-Cantidad de andamios impresos de PCL para cultivo celular y degradación acelerada.

	PCL	PCL+ E	PCL + E+G	Total
Degradación acelerada	15	15	15	45
Cultivo celular	16	16	16	48
Total	31	31	31	93

Los diseños porosos correspondientes a la tibia y peroné no se imprimieron en sus dimensiones originales, ya que al existir una diferencia entre las temperaturas de fusión del polímero (60°C) y la temperatura de impresión (155°C) se requería incrementar el tiempo de enfriamiento para conseguir la solidificación de la capa del polímero antes de depositar la siguiente. Esta limitación, originada por la herramienta (la impresora 3D), se abordó desde otro punto de vista: diseñando pequeños andamios circulares de 10 mm de diámetro y 8 capas de entramado, los cuales son mostrados en la Figura 3.7.



Figura 3.7.-Andamios impresos utilizando PCL como material de impresión.

En la Figura 3.8 se observa el interior del entramado a 0° y 90° de los andamios impresos con PCL es posible visualizar los poros generados, así como la homogeneidad en la formación de las fibras impresas. Las fotografías se tomaron utilizando un esteroscopio de la marca LEICA ® modelo M50

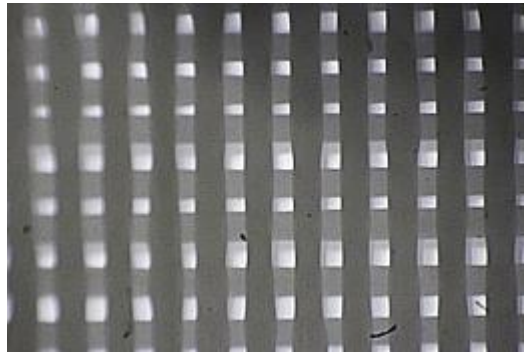


Figura 3.8.-Formación del entramado de 0 y 90° en las impresiones utilizando PCL.

La Figura 3.9 muestra la formación de las fibras a 45° y 135°, en donde se visualiza que la formación de estas fibras no es homogénea a diferencia de lo que ocurre en las de 90° y 0°, esto es debido a la precisión de la impresora 3D. Sin embargo, la generación de estas fibras genera variabilidad en los tamaños de poros, por lo cual los andamios generados tienen una similitud aún mayor con el hueso esponjoso o trabecular debido a que en este tipo de hueso el tamaño de los poros es completamente homogéneo [42].

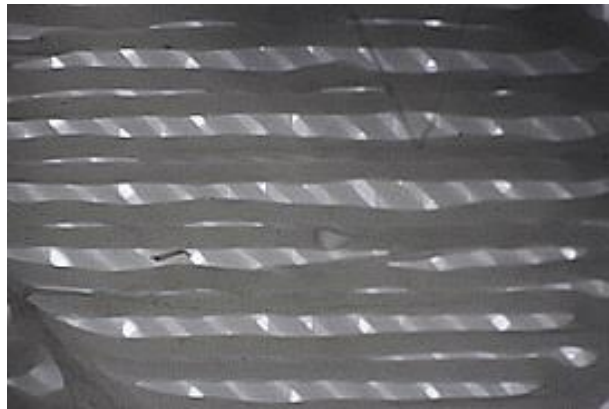


Figura 3.9.-Fibras generadas a 45° y 135°.

Con las fotografías obtenidas en el microscopio se realizaron 100 mediciones a los poros generados en los andamios utilizando el software para análisis de imágenes Image J, se obtuvo un tamaño promedio de 170 μm ; el cual se encuentra dentro del intervalo sugerido para la elaboración de andamios en regeneración ósea [43].

3.3. Síntesis y caracterización de la PCL

Todo el material de vidrio a utilizar fue lavado en una solución al 20% m/v de hidróxido de sodio con etanol esto con la finalidad de remover cualquier impureza que interfiriera con la polimerización. Las reacciones de síntesis fueron llevadas a cabo en una atmósfera inerte de nitrógeno.

Utilizando dos diferentes tipos de iniciadores se obtuvo PCL mediante polimerización por apertura de anillo de la ϵ -cl. En la literatura se encuentra ampliamente documentada la síntesis de PCL utilizando $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ [44], y algunos autores señalan el uso de NaH como un catalizador aniónico para obtener polímeros con masas moleculares elevadas a menores tiempos de conversión en comparación con el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. En la Tabla 3.4 se reportan las cantidades utilizadas en este trabajo para la síntesis de PCL, las cuales fueron calculadas utilizando como referencia trabajos previos realizados [45].

Tabla 3.4.-Cantidades propuestas para la polimerización por apertura de anillo de la ϵ -cl.

ϵ -cl (mmol)	Catalizador (mmol)	Relación (mmol/mmol)
19.99	1.99 ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$)	10.02
142.57	1.51 (NaH)	94.11

Posterior al peso del monómero y los catalizadores la polimerización de PCL se llevó a cabo utilizando dos metodologías diferentes de acuerdo al catalizador utilizado

3.3.1. Con $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalizador

1. Fueron colocados en el interior del matraz las cantidades de monómero y catalizador mencionadas en la Tabla 3.4 sobre un reóstato conectado a una canastilla de calentamiento con arena en el interior sobre una placa de agitación.
2. Fue desplazado el oxígeno del interior del matraz durante 40 min utilizando nitrógeno para crear una atmósfera inerte.

3. El baño de arena fue calentado hasta alcanzar una temperatura constante de 80 °C con agitación constante de 1000 rpm. Los intervalos de tiempo y las cantidades exactas utilizadas en cada reacción son mostradas en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5.-Cantidades utilizadas para la síntesis de PCL con Sn(Oct)₂ a diferentes tiempos de reacción.

	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4	Reacción 5
Mmol e-cl	19.97	19.97	19.97	19.97	19.99
Mmol Oct-Sn	1.94	1.98	2.00	2.00	2.00
Razón (ε-cl/Sn(Oct) ₂)	10.02	10.07	9.96	9.96	9.96
ε-cl (g)	2.28	2.35	2.28	2.28	2.28
Oct-Sn (g)	0.80	0.80	0.81	0.81	0.81
Tiempo(H)	5	16	24	48	72

4. Una vez transcurrido el tiempo de la reacción se dejó enfriar el polímero obtenido en el interior del matraz, posteriormente fueron vertidos 20 mL de cloroformo y agitados durante 1 h a una temperatura de 25°C para disolver los polímeros.
5. El contenido del matraz fue precipitado en 50 mL de metanol con agitación constante de 500 rpm para eliminar el monómero residual.
6. Fue vertido el contenido del matraz en una charola de teflón para evaporar el cloroformo y metanol, finalmente se colocaron las muestras en una estufa de vacío a 30°C durante 24 h.

3.3.2. Con NaH como catalizador

1. El catalizador y monómero fueron manipulados en una bolsa de atmósfera inerte de la marca Sigma-Aldrich para evitar contacto con el oxígeno atmosférico.
2. Se utilizaron las cantidades presentadas en la Tabla 3.6 para las pruebas de síntesis.

Tabla 3.6.-Cantidades utilizadas para la síntesis de PCL utilizando NaH con tiempo de reacción de 1 hora.

	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4	Reacción 5
mmol e-cl.	54.14	108.28	61.36	55.04	142.57
mmol NaH	1.08	1.15	1.23	1.12	1.51

Razón (ϵ - cl/NaH)	49.78	94.16	49.78	49.03	94.11
ϵ -cl (g)	6.18	12.36	7.04	6.28	16.27
NaH (g)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03

3. El baño de arena fue calentado a 80°C con agitación constante de 1000 rpm durante 1 h.
4. Se dejó enfriar el producto de la reacción hasta solidificar, posteriormente se añadieron 50ml de cloroformo con agitación constante de 500 rpm durante 1 h.
5. La solución del matraz fue precipitada en 150 mL de metanol con agitación constante de 500 rpm durante 60 min, posteriormente fue filtrada y vertida en una charola de teflón y se dejó evaporar el disolvente residual en una estufa de convección a 30°C durante 24 h.

3.3.3. Caracterización de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El espectro infrarrojo de las muestras de PCL sintetizadas y los andamios de PCL fueron obtenidos al realizar, a una muestra de cada polímero, 100 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} , en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} utilizando el equipo Nicolet 8700 de la marca Thermo Scientific, en modo ATR, con un cristal de selenuro de zinc.

3.3.4. Determinación de la masa molecular mediante viscosimetría capilar

La masa molecular fue determinada utilizando un viscosímetro Ubbelohde, las mediciones del tiempo en el cual la solución polimérica atraviesa el capilar se llevaron a cabo utilizando THF grado HPLC de la marca sigma Aldrich a 26 °C en un recirculador de agua utilizando 3 diferentes concentraciones del polímero: 4 mg/mL, 6 mg/mL y 10 mg/mL. La determinación de las masas moleculares se realizaron a los polímeros sintetizados con NaH a una razón de 49 ($r=49$)

Con el tiempo obtenido fue calculado la viscosidad inherente, posteriormente utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada se calculó la masa molecular del polímero en donde:

$$[\eta] = KM_V^\alpha$$

n = viscosidad inherente

M_V = masa molecular promedio(viscosa)

K, α = Constantes para un sistema soluto – solvente determinado

Las constantes $K(1.09 \times 10^{-3})$ y $\alpha(0.6021)$ utilizadas fueron tomadas de la literatura[46].

3.3.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para obtener los termogramas por DSC se colocaron 6 mg de muestra, los cuales fueron colocados en charolas de aluminio cubiertas con tapas del mismo material y posteriormente selladas a presión. El análisis se realizó en un equipo Diamond DSC de la marca Perkin Elmer, con una tasa de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno, en un intervalo de temperatura de 20 a 90 °C.

Con los datos obtenidos del DSC fue calculado el porcentaje de cristalinidad de cada muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$X_c \% = \frac{\Delta_{fus}H}{\Delta_f} \times 100$$

En donde:

X_c %: Porcentaje de cristalinidad.

$\Delta_{fus}H$: Entalpía de fusión del polímero.

Δ_f : Entalpía de fusión del polímero 100% cristalino.

El valor de la entalpía de fusión se obtiene de la literatura y se encuentra reportado con un valor de 139.3 J/g [47].

3.3.6. Electrohilado y microscopía electrónica de barrido (MEB)

La PCL obtenida en la síntesis fue utilizada para elaborar disoluciones variando la concentración de PCL entre 15 al 25% p/v, todas las disoluciones fueron disueltas en una mezcla de cloroformo: etanol (9:1) durante 2 h para posteriormente colocar el contenido de las soluciones en jeringas de 10 mL conectadas a un tubo de polietileno de 6 mm [38]. Para la técnica de electrohilado fue empleado un equipo modelo NaBond utilizando una placa colectora rectangular fija recubierta con papel aluminio, se realizaron pruebas para observar las fibras formadas con diferentes concentraciones de PCL en periodos de tiempo de 2 min sobre portaobjetos.

En la Tabla 3.7 se muestran las diferentes condiciones utilizadas durante las pruebas de electrohilado.

Tabla 3.7.-Condiciones utilizadas para el electrohilado de la PCL sintetizada.

Muestra	Concentración de PCL (%p/v)	Distancia del colector (cm)	Voltaje (Kv)	Rapidez de flujo (mL/h)
1	15	20	12	0.6
2		20	13	0.6
3		20	14	0.6
4		20	14	0.7
5		20	15	0.6
6	20	15	13	0.6
7		15	15	0.6
8		20	14	0.7
9		20	15	0.6
10		20	15	0.7
11	25	20	14	0.6
12		20	15	0.6

Posterior al proceso de selección para los parámetros de electrohilado se realizaron 3 andamios sobre placas colectoras fijas variando el tiempo de electrohilado. Después, fue seleccionado las condiciones en donde se observó la formación de fibras homogéneas sin la presencia de gotas. Este parámetro se utilizó como referencia para la elaboración del electrohilado rotatorio sobre los andamios impresos en 3D y así obtener un andamio bi-capa. Se estableció una velocidad de 3 rpm durante 20 min.

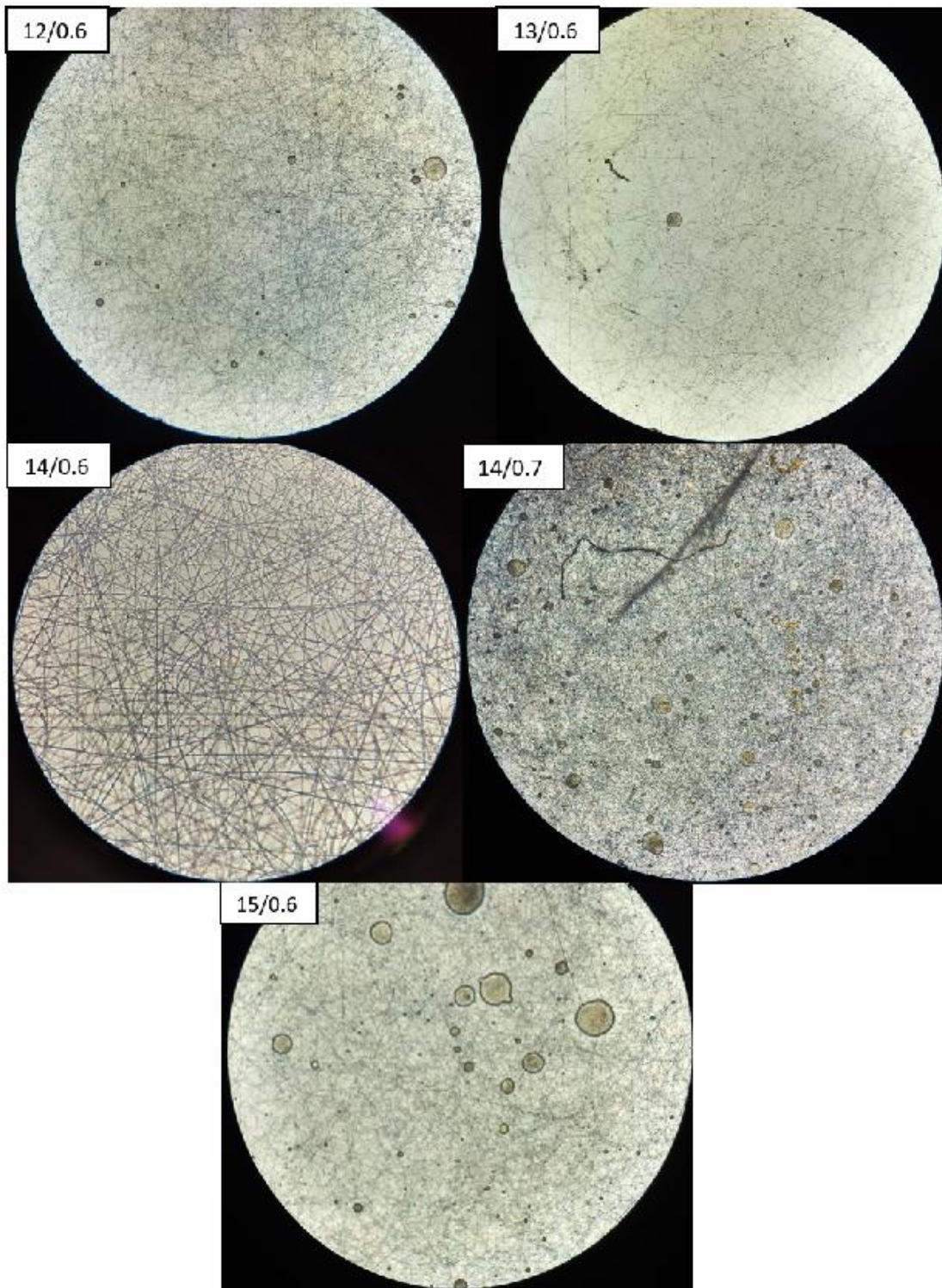


Figura 3.10.-Electrohilado con una concentración de 15% p/v con 20cm de distancia al colector. El voltaje aplicado, así como la rapidez de flujo son presentados en los recuadros superiores izquierdos.

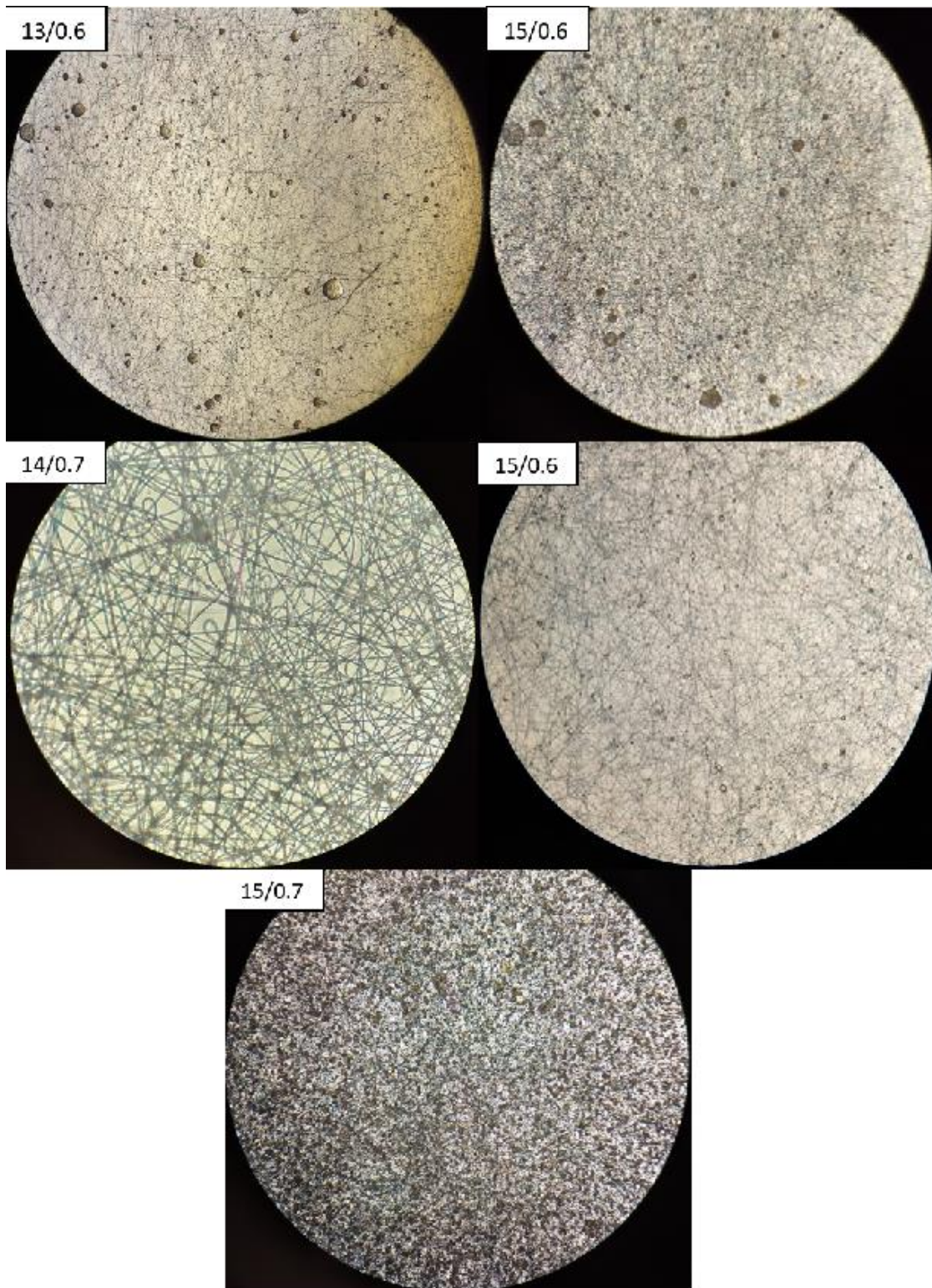


Figura 3.11.-Electrohilado concentración 20% p/v (primeras 2 imágenes distancia del colector de 15 cm, las 3 inferiores una distancia de 20 cm). El voltaje aplicado, así como la rapidez de flujo son presentados en los recuadros superiores izquierdos.

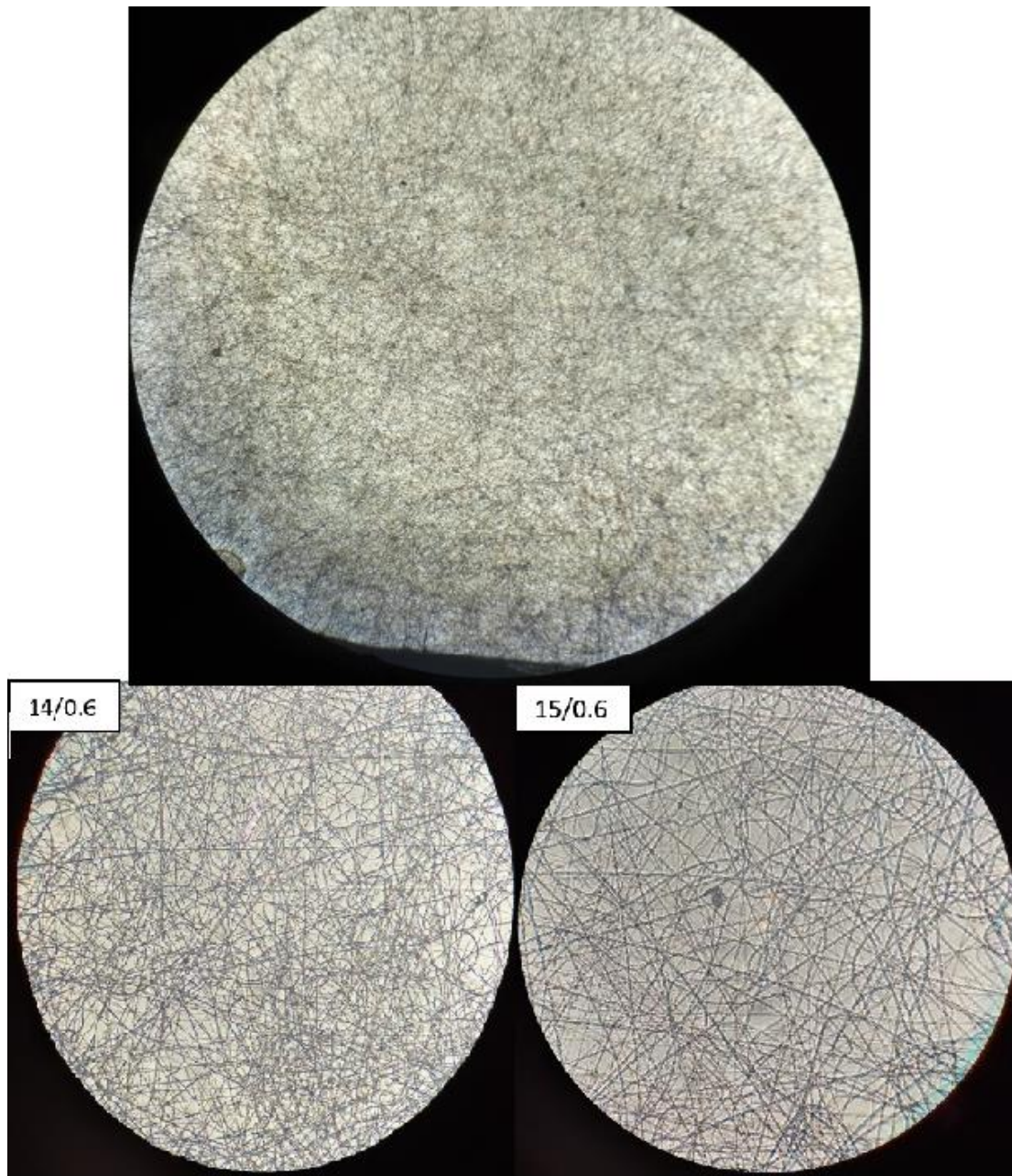


Figura 3.12.-Electrohilado 25% p/v, distancia del colector 20cm. El voltaje aplicado, así como la rapidez de flujo son presentados en los recuadros superiores izquierdos.

Después de observar y analizar las Figuras 3.10, 3.11 y 3.12 es posible concluir que los mejores parámetros para realizar el electrohilado es utilizando una concentración del 25% w/v de PCL, una distancia del colector de 20 cm, y 14 Kv de campo eléctrico con una velocidad de inyección de 0.6 mL/h. Con esos parámetros se apreció una baja formación

de gotas y enredos en las fibras de electrohilado. Sin embargo, los parámetros de las muestras 8 y 3 también mostraron resultados favorables

En la Figura 3.13 son presentadas las micrografías MEB realizadas al andamio electrohilado durante 3h utilizando los parámetros establecidos en la muestra 8. La coalescencia observada en las fibras es debido a que utilizando estos parámetros el solvente no se evapora adecuadamente

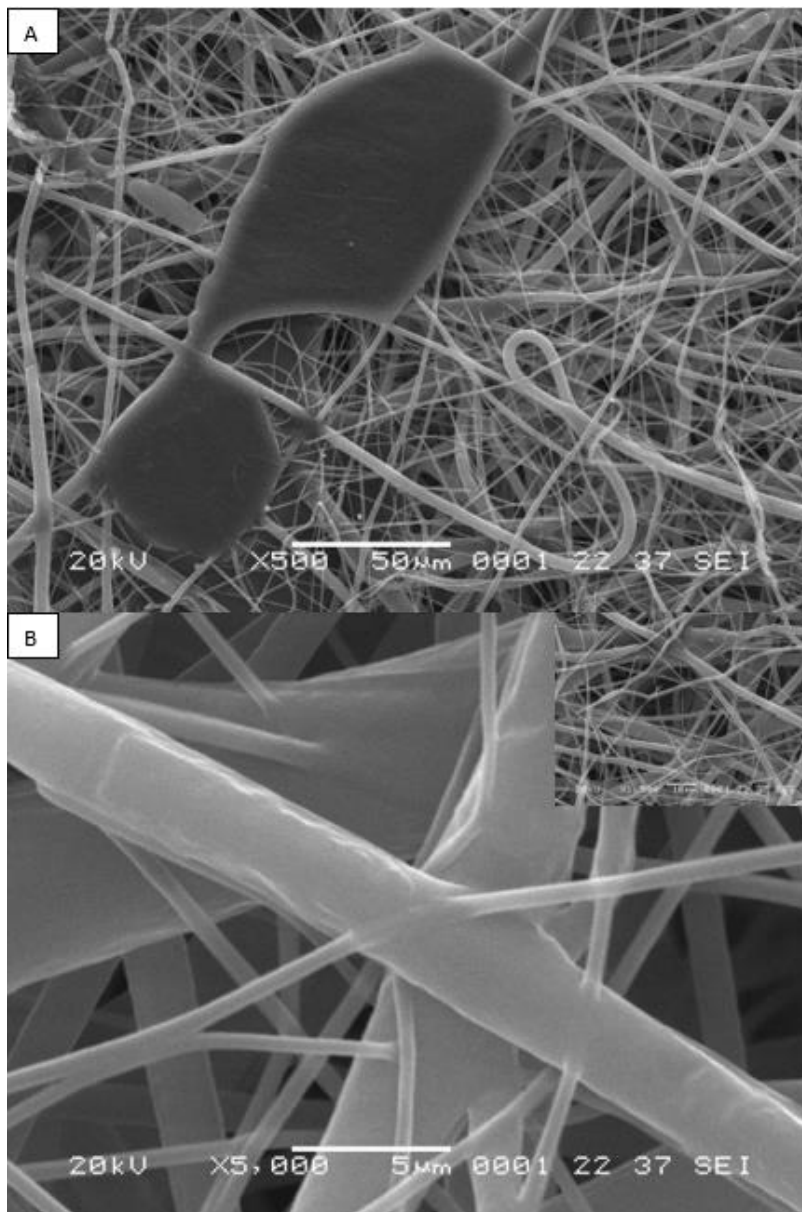


Figura 3.13.-Centro del andamio de PCL a 15 p/v, 0.6 mL/h a 5h A) x500, B) x5000.

En la Figura 3.14 son presentadas las micrografías MEB realizadas al andamio electrohilado durante 5 h utilizando los parámetros establecidos en la muestra 3.

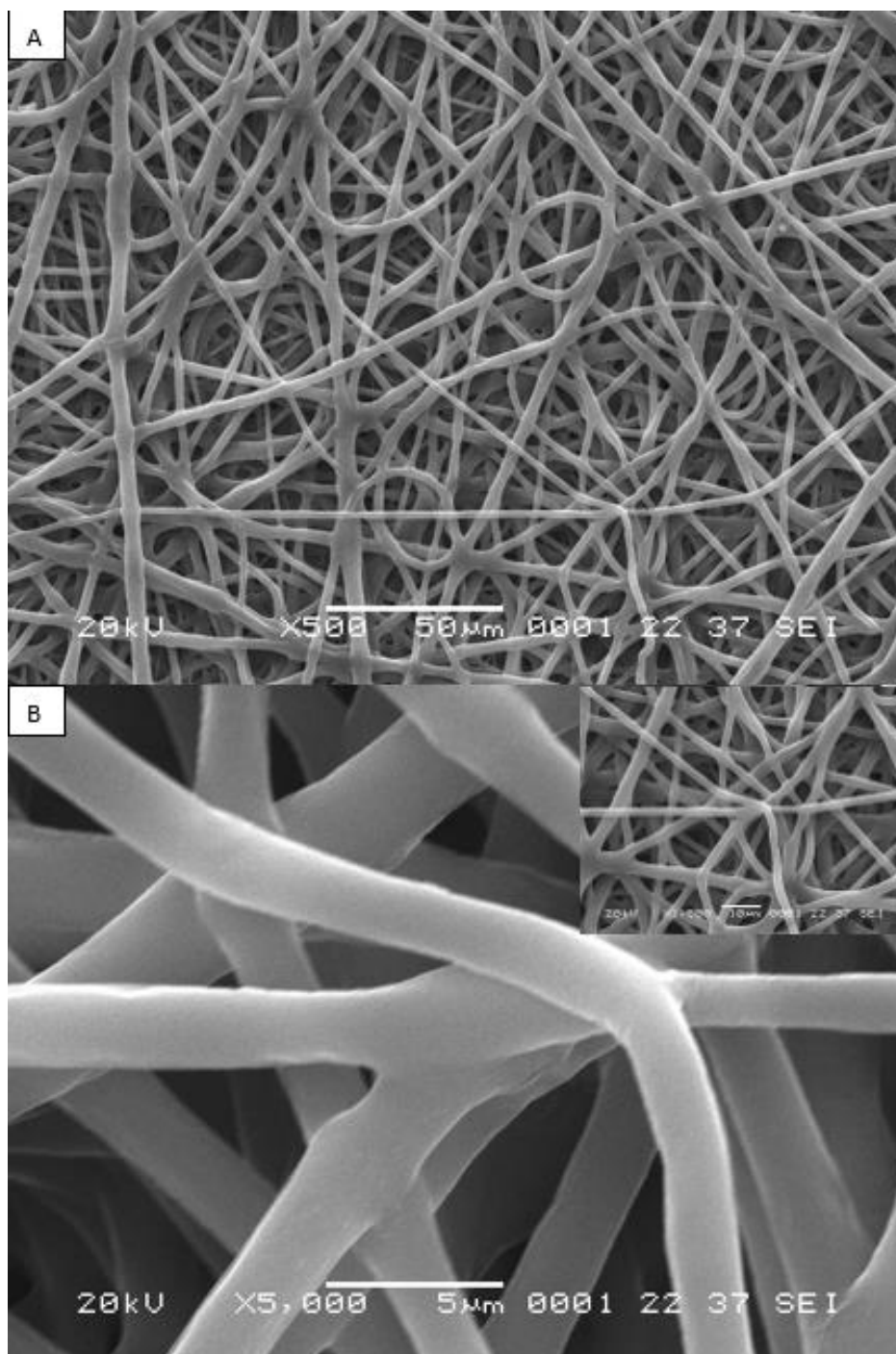


Figura 3.14.-Centro del andamio de PCL al 20 w/v, 0.6ml/h a 3h A) x500, B) x5000.

En la Figura 3.15 son mostradas las micrografías MEB realizadas al andamio electrohilado durante 7 h utilizando los parámetros establecidos en la muestra 11.

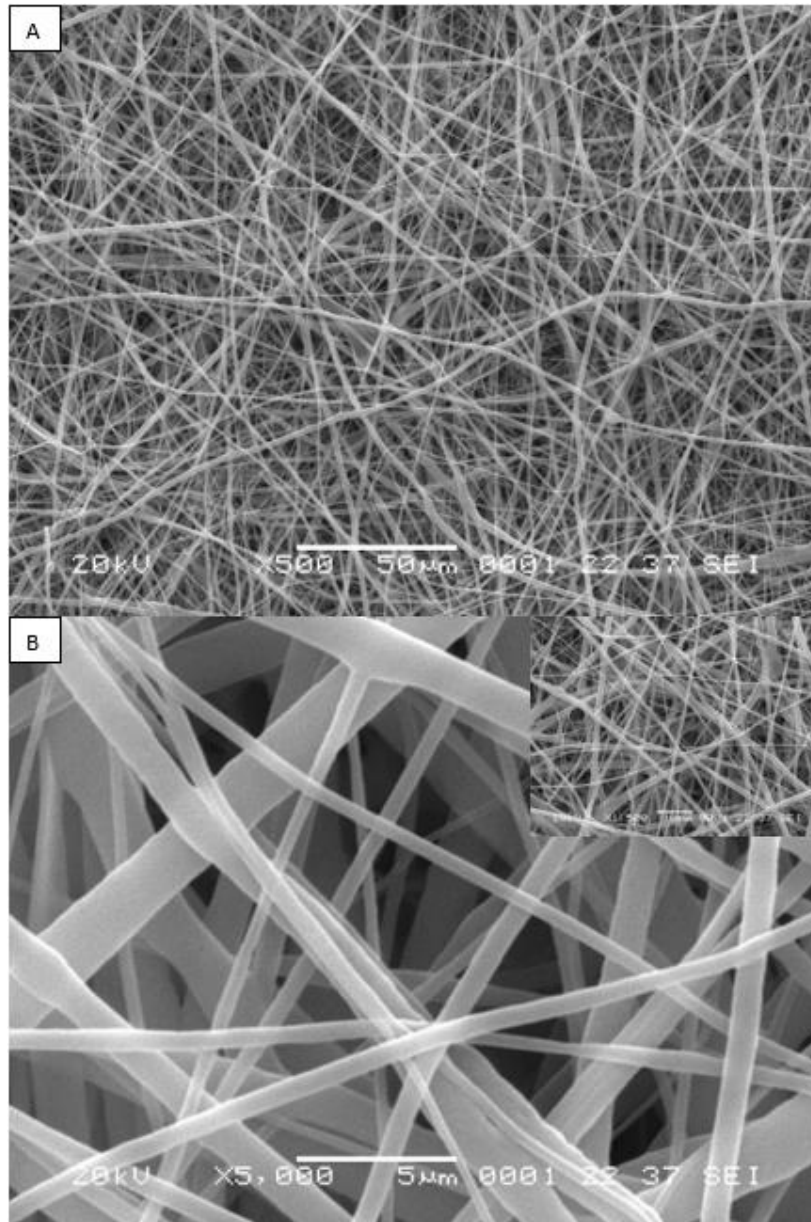


Figura 3.15.-Centro del andamio de PCL al 25 w/v, 14Kv, 0.6ml/h a 7h A) x500, B) x5000.

Analizando el tamaño de las fibras obtenidas en cada uno de los andamios electrohilados es posible aseverar que se obtienen mejores resultados utilizando una concentración de 25% p/v, 14 Kv de campo eléctrico y una velocidad de flujo de 0.6 mL/h.

Utilizando el software para el análisis de imágenes Image J se utilizó la herramienta Diameter J para obtener el tamaño promedio de la fibras generadas y la desviación estándar de dicho parámetro; en la Tabla 3.8 es presentado el promedio y la desviación estándar obtenidas para los 3 andamios electrohilados.

Tabla 3.8.-Tamaño promedio y desviación estándar en cada uno de los 3 andamios electrohilados.

	PCL 15%	PCL 20%	PCL 25%
Tamaño promedio (um)	2.85	1.93	1.57
Desviación estándar (σ)	1.03	1.43	0.45

Con el análisis realizado utilizando Diameter J también se obtuvo la frecuencia y distribución de diámetros en las fibras obtenidas En la Figura 3.16 se observa el rango en la distribución de diámetros en los andamios de PCL al 15%.

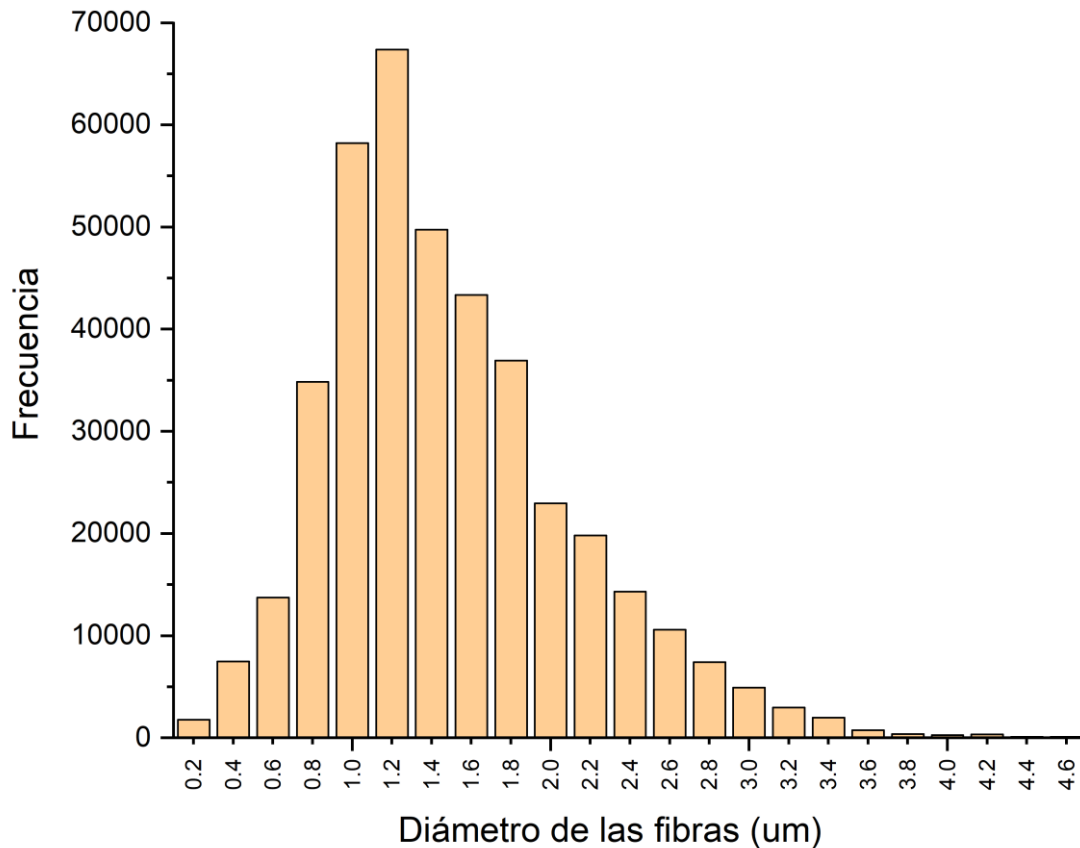


Figura 3.16.-Distribución del tamaño de las fibras en los andamios de PCL al 15%.

En la distribución de diámetros presentados en la Figura 4.53 es posible observar que en el andamio de PCL al 15% la distribución tiene un rango de 0.2 μm hasta 4.6 μm . con una moda de 1.2 μm ; es por este motivo que la desviación estándar presentada en la Tabla 4.15 es elevada.

En la Figura 3.17 se muestra el intervalo en la distribución de tamaños generado en las fibras de los andamios de PCL al 20%.

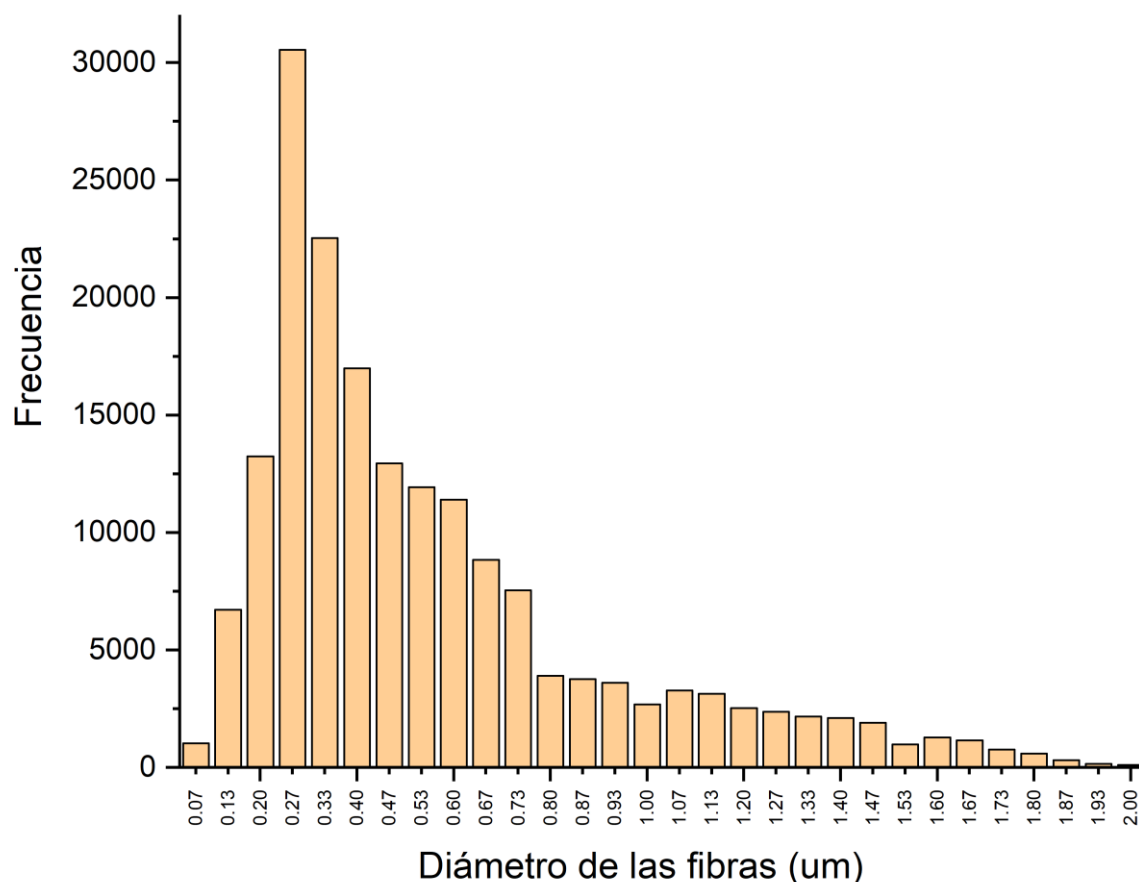


Figura 3.17.- Distribución del tamaño de las fibras en los andamios de PCL al 20%.

El rango de tamaños en las fibras de los andamios de PCL al 20% fue de 0.07 μm hasta 2.00 μm con una moda en los tamaños de 0.27 μm . El tamaño de las fibras obtenidas en este andamio fue menor a comparación del andamio de PCL al 15%. Sin embargo, se aprecia la formación de gotas en las imágenes SEM y se forma una mayor cantidad de fibras con diversos diámetros, por lo cual la desviación estándar es mayor que en los andamios electrohilados de PCL al 15%.

En la Figura 3.18 es presentado el rango de la distribución en los diámetros de los andamios de PCL al 25%.

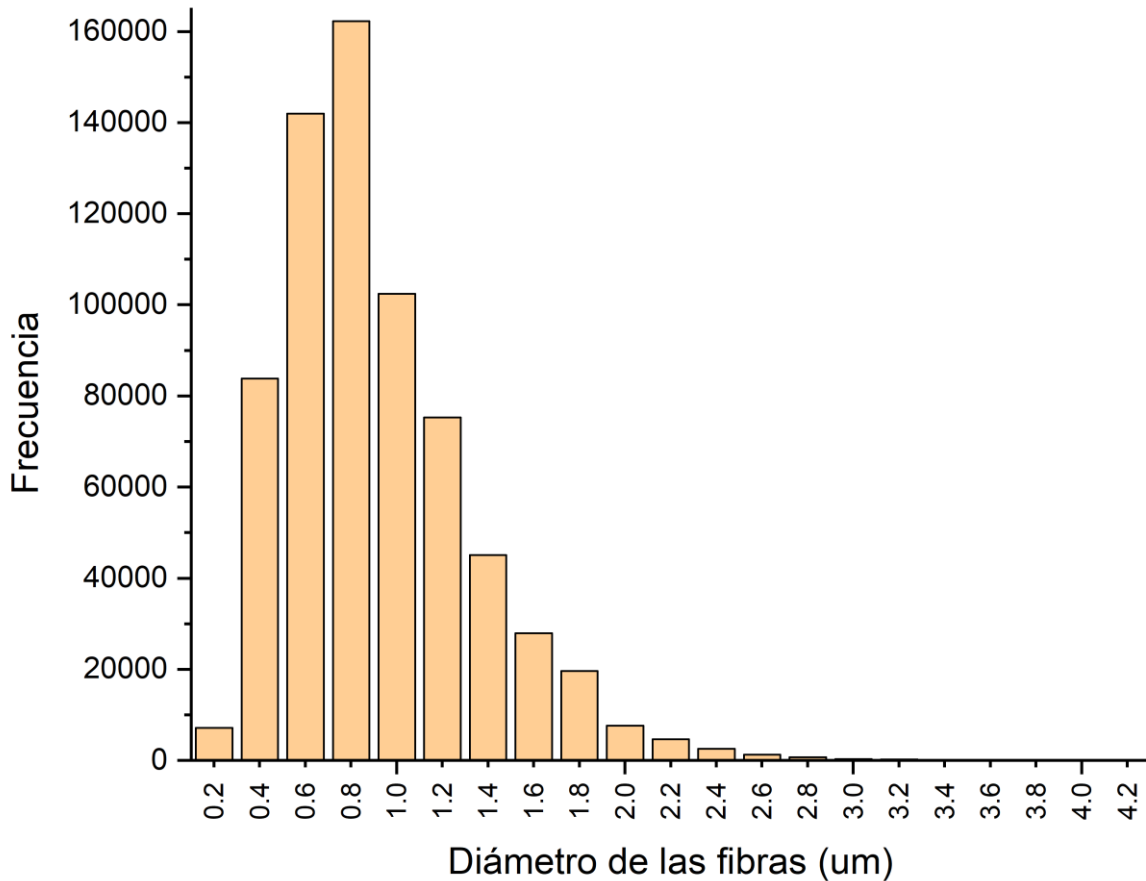


Figura 3.18.- Distribución del tamaño de las fibras en los andamios de PCL al 25%.

El rango en las fibras generadas va del 0.2 um hasta 4.2 um con una moda de 0.8 um. Sin embargo, la distribución de tamaños en los andamios de PCL al 25% es más homogénea y con una desviación estándar baja a comparación de los electrohilados con PCL al 15% y al 20%. Los diámetros de fibra obtenidos en todos los andamios corresponden a diámetros reportados para conglomerados de células para el recubrimiento óseo, es decir hueso cortical (1-2 um)[48].

En la Figura 3.19 es presentado el accesorio de acoplamiento para obtener andamios tubulares electrohilados, en el centro es posible observar los andamios colocados de manera paralela al eje de rotación.

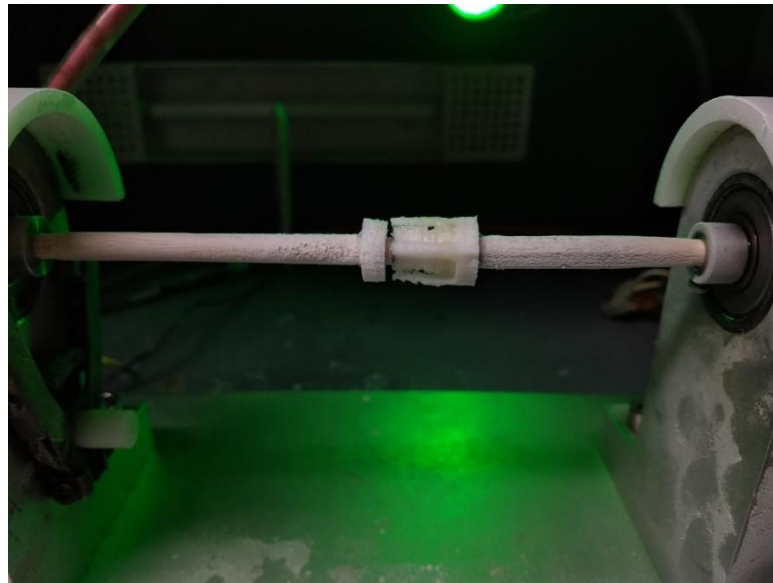


Figura 3.19.-Andamios de PCL colocados en el cilindro rotacional antes del electrohilado.

A partir de los 5 minutos de iniciado el proceso fue posible observar la formación de una capa de electrohilado alrededor de los andamios, al finalizar los 20 minutos los andamios se observaban recubiertos, por fibras de PCL electrohilada tal y como se muestra en la Figura 3.20



Figura 3.20.-Electrohilado de PCL sintetizada con NaH sobre los andamios impresos.

3.4. Modificación superficial de los andamios

La metodología a seguir para la modificación superficial de los andamios consistió en 3 etapas: aminólisis, fijación de glutaraldehído e inmovilización de gelatina (obtención de los andamios de PCL+E+G) [49].

Aminólisis

1. Los andamios se limpiaron con etanol al 70%
2. Fueron sumergidos en una solución al 10% m/v de hexametildiamina/2-propanol durante 3 h a 30°C.
3. Los andamios se enjuagaron durante 24 h con agua destilada para remover la hexametildiamina libre, después se dejaron secar durante 24 h a temperatura ambiente.

Fijación de glutaraldehído

4. Fue preparada una solución acuosa de glutaraldehído al 1% en donde los andamios fueron sumergidos durante 3 h, luego fueron enjuagados con agua destilada durante 48 h para remover restos de glutaraldehído libre.

Inmovilización de gelatina

5. Se preparó una solución de PBS (pH=7.4) con 3 mg/mL de gelatina, los andamios libres de glutaraldehído fueron colocados en dicha solución y puestos en refrigeración (2-4 °C) durante 24 h. Después, se enjuagaron con agua destilada para remover la gelatina libre durante 24 h; por último, fueron colocados en una estufa a vacío a 40 °C durante 24 h.

3.5. Cuantificación de aminas

Se realizó una curva de calibración para la cuantificación de aminas utilizando la siguiente metodología [50]:

1. Se prepararon dos soluciones: HMDA 1 M (5 mL) y ninhidrina 1.5% m/v (70 mL) ambas en etanol.
2. Con los datos presentados en la Tabla 3.9 se realizaron las 4 soluciones utilizadas para la elaboración de la curva de calibración.

Tabla 3.9.-Concentración de aminos para elaborar una curva de calibración.

Concentración de aminos (mmol)	Solución ninhidrina/etanol (mL)	Solución HMDA/etanol (μ L)	Solución total (mL)
5	4.975	25	5
10	4.950	50	5
25	4.825	125	5
50	4.750	250	5

3. Los 4 viales fueron calentados a 80 °C durante 25 min a baño María, posteriormente se dejaron enfriar durante 15 min.

Se colocaron 3 mL de etanol y 20 μ L de cada solución en una celda de cuarzo, posteriormente esta fue colocada en un espectrofotómetro UV-VIS A&E Lab Mod AE-UV-1608 para medir la absorbancia de las muestras con $\lambda=570$ nm. Las mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo el promedio para cada una.

Para la cuantificación de aminos presentes en los andamios bi-capa aminolizados y andamios bi-capa de gelatina. Se utilizaron 5 muestras (25 mg) para cada tipo de andamio y fueron colocadas en viales de vidrio. Las mediciones se realizaron por triplicado de acuerdo a la siguiente metodología:

1. Se les añadió 5 mL de solución de 1.5% ninhidrina/etanol
2. Se calentaron a 80 °C durante 25 min a baño María, posteriormente se dejaron enfriar durante 15 min.
3. Fueron añadidos a la celda de cuarzo 3 mL de etanol y 20 μ L de cada solución de los viales, se realizó la medición de absorbancia con $\lambda=570$ nm.

3.6. Ángulo de contacto

La medición fue realizada en la parte inferior lisa de los andamios fueron colocadas de manera individual en un goniómetro de la marca tantec® modelo CAM-PLUS. Las dimensiones de cada muestra fueron de 10 mm de diámetro, posteriormente fue utilizada una pipeta con capacidad de 30 µL para colocar una gota de agua desionizada sobre la superficie de cada muestra, las mediciones fueron realizadas por triplicado para cada uno de los tipos de andamios de PCL obtenidos.

3.7. Degradación acelerada

Se preparó una solución al 5 M de NaOH en agua destilada para evaluar la influencia de la modificación superficial en la velocidad degradativa de los diferentes tipos de andamios obtenidos. Posteriormente a cada tipo de andamio se le agregó 3 mL de esta solución a temperatura ambiente. Los porcentajes de pérdida de masa en los andamios fueron calculados por semana con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de pérdida de masa (\%)} = \frac{\text{masa inicial promedio}}{\text{masa perdida promedio}} \times 100$$

En la Tabla 3.10 son presentadas las cantidades de andamios requeridos para cada semana[51].

Tabla 3.10.-Cantidad de andamios utilizados para las pruebas degradativas.

Número de semana	PCL	PCL+E	PCL+E+G
1	3	3	3
2	3	3	3
3	3	3	3
4	3	3	3
5	3	3	3
Total	15	15	15

3.8. Ensayos biológicos de los andamios

Como primer paso antes de llevar a cabo las pruebas de cultivo celular los andamios fueron cortados con bisturí, para obtener 96 piezas y fueron esterilizadas utilizando la metodología descrita en la Tabla 3.11

Tabla 3.11.-Esterilización de andamios para las pruebas biológicas.

Tipo y número de andamios		Esterilización por inmersión y UV (1 h por lado)
PCL	32	72 horas en etanol
PCL+ electrohilado	32	72 horas en etanol
PCL + electrohilado + gelatina	32	72 horas en suero fisiológico con 10%antibiótico, antimicótico
Total de andamios		96

Después de la esterilización fueron colocados 3 andamios (uno de cada tipo) en medio de cultivo para incubación a 37°C y 5%CO₂ para validar la esterilidad, posteriormente fueron realizadas las pruebas de viabilidad celular

En la Figura 3.21 se muestra la esterilización por inmersión, el primer paso llevado a cabo antes de realizar las pruebas de viabilidad celular.

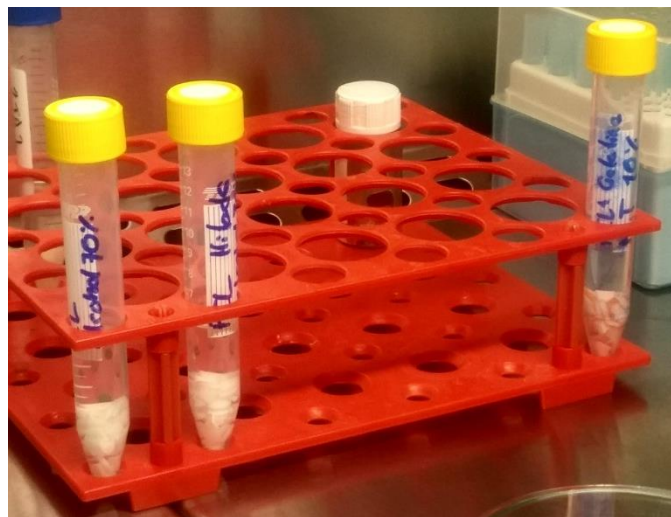


Figura 3.21.-Andamios en proceso de esterilización por inmersión.

Como es detallado en la metodología después de la esterilización por inmersión los andamios fueron colocados en placas petri de vidrio para esterilizar 1 h por cada lado. En la Figura 3.22 es posible observar los andamios bajo esterilización UV en la campana de flujo laminar.



Figura 3.22.-Andamios en esterilización por luz U.V.

El mantenimiento en la esterilidad de los andamios es crucial para el cultivo celular, en todo momento los andamios fueron manipulados con pinzas estériles en una cabina de bioseguridad tipo II para evitar el contacto de éstos con hongos o bacterias.

En la Figura 3.23 se observa el cultivo realizado para comprobar la esterilidad de los andamios antes de las pruebas de viabilidad celular. El cambio de coloración a un tono amarillo en el medio de cultivo es un indicativo de contaminación por bacterias.



Figura 3.23.-Pruebas de esterilidad para los 3 tipos de andamios.

Las pruebas de viabilidad celular se llevaron a cabo utilizando dos diferentes tipos celulares: células mesenquimales de tejido adiposo humano (hAMSCs) y células de tejido óseo de roedor (osteoblastos), mientras que las tinciones de Von Kossa y Rojo de alizarina se llevaron a cabo utilizando hAMSCs diferenciadas a osteoblastos.

En la Figura 3.24 se muestra un diagrama del procedimiento seguido para la cosecha y proliferación de hAMSCs.

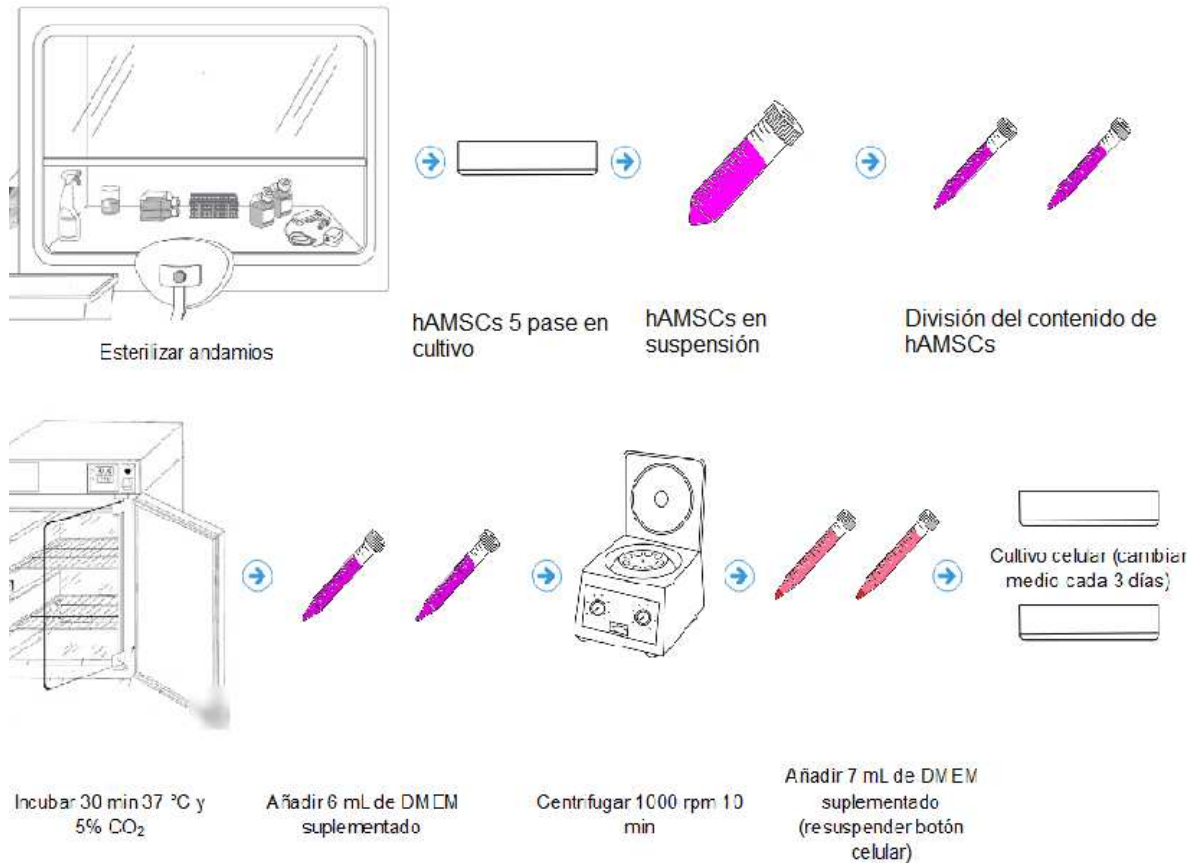


Figura 3.24.-Pasos para la cosecha de hAMSCs fase 5.

3.8.1. Ensayos de citotoxicidad de los andamios con hAMSCs.

Previamente fueron colocados los andamios de cada tipo en placas de cultivo de 96 pozos; se utilizó el kit de la marca Invitrogen® USA alamar blue cell viability, para todas las pruebas de viabilidad celular. El procedimiento utilizado fue [52]:

1. El medio de cultivo de las cajas con células confluentes fue desechado cuidadosamente con una micropipeta, se añadieron 5 mL de PBS a cada caja para lavar las células.
2. Se añadieron 2 mL de tripsina cubriendo la superficie de las cajas petri, se dejó incubar durante 5 min a 37°C y 5% CO₂

3. Las células se observaron utilizando un microscopio de luz invertida de la marca Leica modelo DM IL LED para visualizar el cambio en la morfología celular. El cambio en la morfología es un indicativo de la pérdida en la adherencia celular de la caja tipo T de 25 cm.
4. Se añadieron 6 mL de medio de cultivo a las cajas petri y después fue colocado el contenido de ambas en 2 tubos falcon y centrifugado durante 10 min a 1000 rpm.
5. Posteriormente se removió el sobrenadante y se añadieron 7 mL de medio de cultivo para resuspender el botón celular.
6. Fueron sembradas 1000 células por cada 10 μ L y se incubaron a tres diferentes tiempos (3,7 y 10 días), efectuando cambio de medio de cultivo cada 3 días para los pozos correspondientes a los días 7 y 10. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada uno de tres los tipos de andamios generados. Como control positivo se utilizó medio con células y como control negativo pozos sin células
7. En el día de la lectura para cuantificar la viabilidad celular de los andamios se les retiró el medio de cultivo y fueron lavados con 50 μ L de PBS, luego fue preparada una solución con medio de cultivo con 10% v/v del kit de ensayo Invitrogen. A cada uno de los pozos con andamios y a los grupos de control les fueron añadidos 100 μ L de dicha solución para incubar las placas de cultivo durante 4 h a 37°C y 5%CO₂. Después se leyó la absorbancia a λ 562 y λ 630nm en un equipo lector de placa marca BioTek instruments.

En la Figura 3.25 se pueden apreciar la secuencia de pasos para determinar la viabilidad de las hAMSCs

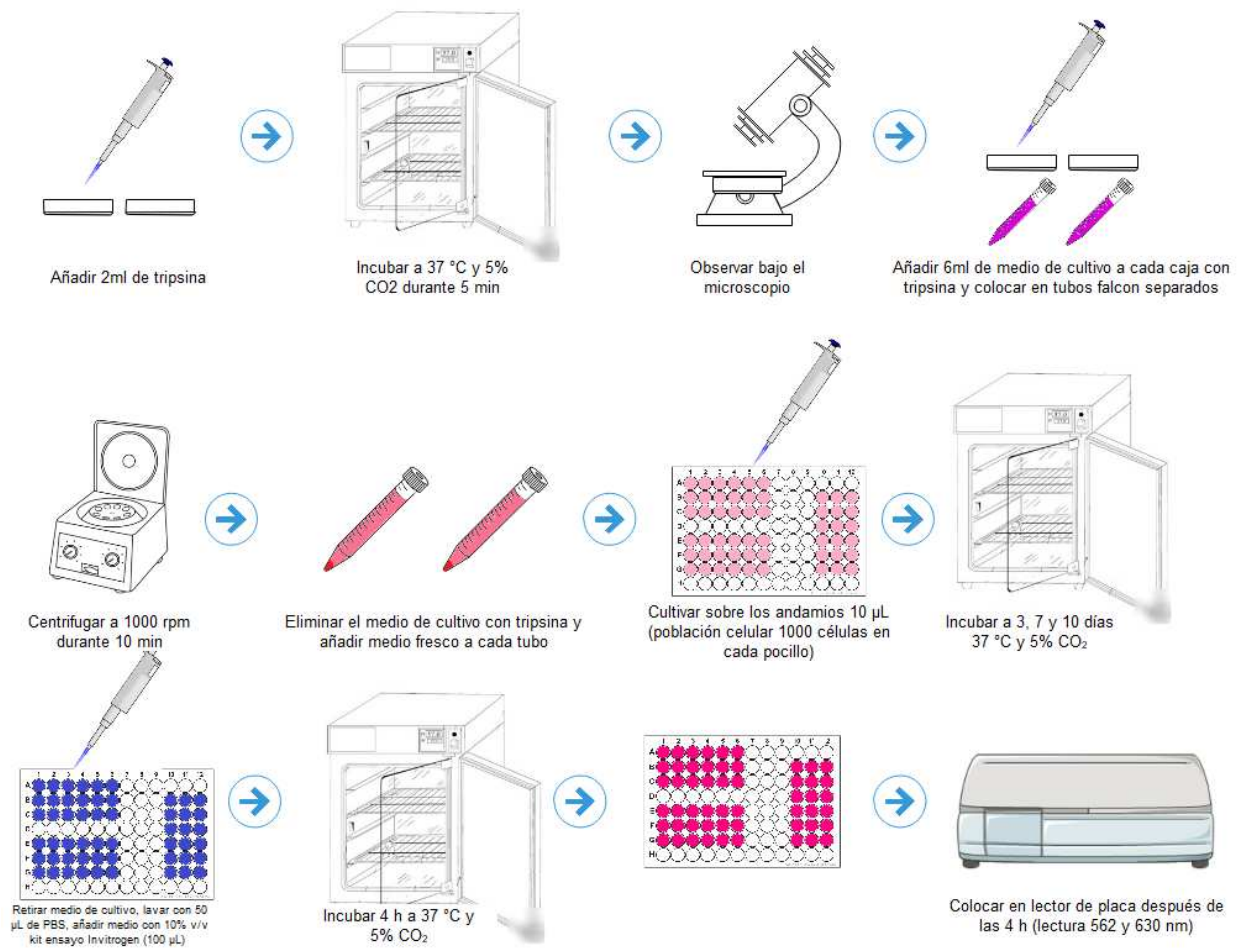


Figura 3.25.-Determinación de la viabilidad de las hAMSCs.

En la Figura 3.26 puede observarse las placas de cultivo con los andamios y las células al interior de los pozos.

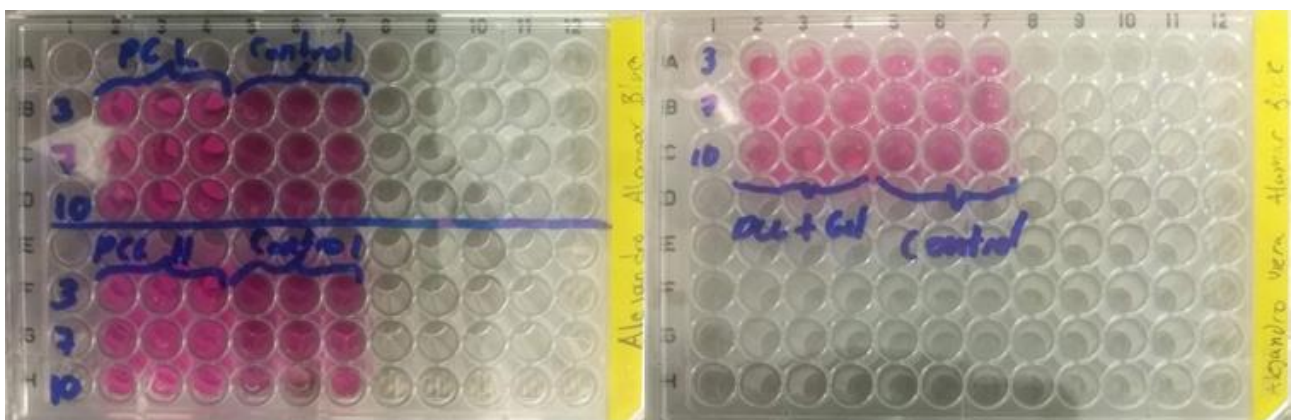


Figura 3.26.-placas de cultivo de 96 pozos con las células y andamios evaluados en el interior.

3.8.2. Ensayo de citotoxicidad con osteoblastos

Los osteoblastos fueron obtenidos de huesos largos de una rata wistar de cuatro días de nacido, fue sacrificada colocándola en una cámara con isoflurano y una inyección intraperitoneal de pentobarbital (3 mL), después fueron extirpados el radio, cúbito, tibia y peroné para ser almacenados a 4°C durante 24 h en una solución salina CS 0.9%NaCl Pisa. El procedimiento seguido fue el siguiente [53]:

1. El tejido extirpado fue disgregado manualmente con un bisturí para formar explantes de 1 mm, posteriormente éstos fueron colocados en 16 pozos de una placa de cultivo de 24 pozos con 2ml de DMEM suplementado en cada pozo.
2. Se realizó un monitoreo constante a cada uno de los 16 pozos con explantes para monitorear el crecimiento celular y evitar contaminación por hongos o bacterias, realizando cambios de cultivo cada 3 días. Al llegar determinados pozos de los explantes a confluencia celular éstos fueron tripsinizados utilizando 1 mL de tripsina como se describe en el procedimiento para las células hAMSCs.
3. Los pozos confluentes fueron sembrados en placas de cultivo de 6 pozos sin los explantes, al llegar a confluencia estos pozos fueron tripsinizados con 2 mL de tripsina para finalmente efectuar cultivos celulares con una densidad de 1000 células por cada 10 µL y se incubaron a tres diferentes tiempos (3,7 y 10 días), efectuando cambio de DMEM suplementado a los cultivos de los días 7 y 10. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada uno de los tres tipos de andamios generados (9 andamios para cada tipo).
4. Se llevó a cabo el mismo procedimiento del paso 7 realizado a las células hAMSCs.

En la Figura 3.27 se observan los pasos seguidos para la obtención de los osteoblastos de rata wistar; mientras en la Figura 3.28 pueden observarse al interior de los 16 pozos cada uno de los explantes colocados en la placa de cultivo con 24 pozos, posterior a la disgregación mecánica utilizando bisturí se le añadió el DMEM suplementado a cada uno de los pozos con el tejido a cultivar.

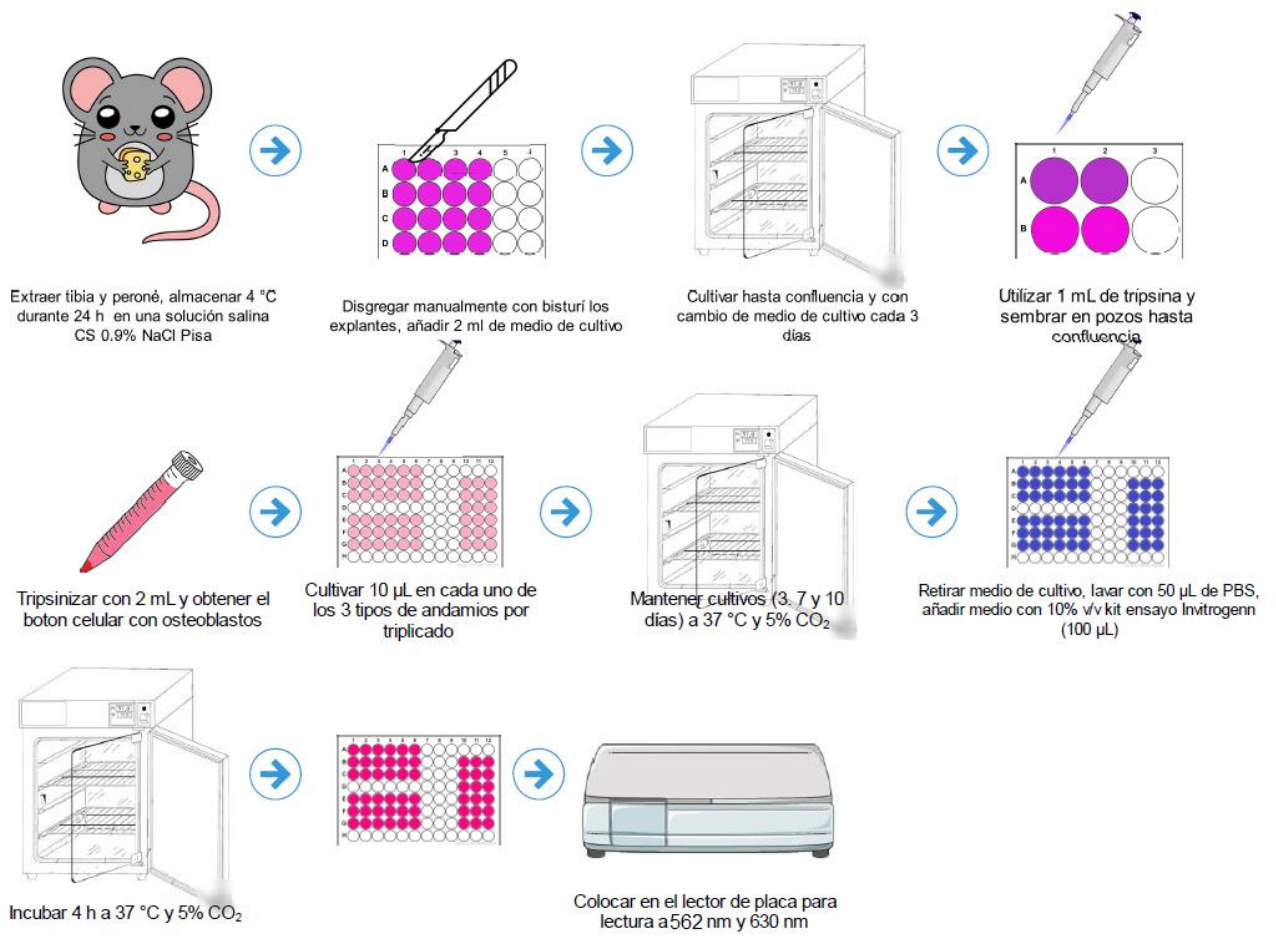


Figura 3.27.-Proceso para la obtención de osteoblastos de rata wistar.

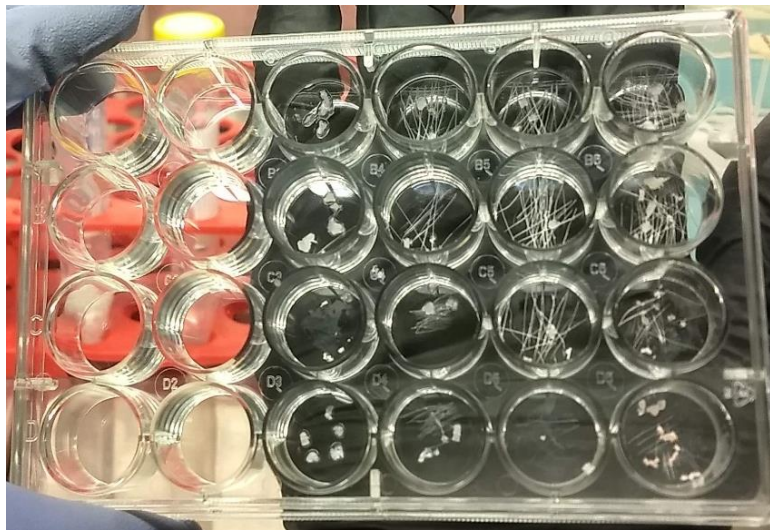


Figura 3.28.-Placas de cultivo de 24 pozos con los explantes en el interior.

3.8.3. Diferenciación celular de hAMSCs a osteoblastos en los andamios.

Para la diferenciación de hAMSCs a osteoblastos fue requerido elaborar medio de cultivo osteogénico. Como se describe a continuación: a 42.5 mL de medio de cultivo le fueron añadidos 7.5 mL de kit simulador osteogénico MesenCult® osteogenic differentiation kit (human), 5 µL de dexametasona, 250 µL de ácido ascórbico y 175 µL de β-glicerol siguiendo las especificaciones del fabricante. Finalmente se almacenó a 4°C realizando el cambio de medio semanalmente a los cultivos celulares de 21 días [54].

3.8.3.1. Evaluación de la mineralización ósea mediante tinción Von Kossa y Rojo de alizarina

La tinción Von Kossa es utilizada para identificar la formación de partículas de fosfato cálcico en la matriz extracelular de células óseas, esta técnica revela depósitos de calcio (fosfato, carbonato, sulfato y oxalato) mediante la sustitución del catión metálico AgNO_3 el cual es visualizado después de la reducción de la plata metálica, tiñendo de color negro los cultivos celulares con actividad mineralizante.[55] Por otra parte la tinción Rojo de alizarina es una segunda técnica que identifica depósitos de calcio los cuales se tiñen de rojo, la tinción ocurre durante el proceso de diferenciación osteogénica. Las tinciones de Von Kossa y Rojo de Alizarina fueron efectuadas a células hAMSCs diferenciadas a osteoblastos para dos tiempos de cultivo celular; 7 y 21 días para cada uno de los tipos de andamios con 2 grupos de control: sin medio osteoinductor (control negativo) y con medio osteoinductor (control positivo) en cajas de cultivo de 24 pozos [56].

En la Figura 3.29 es posible visualizar los pasos seguidos para la diferenciación y fijación celular.

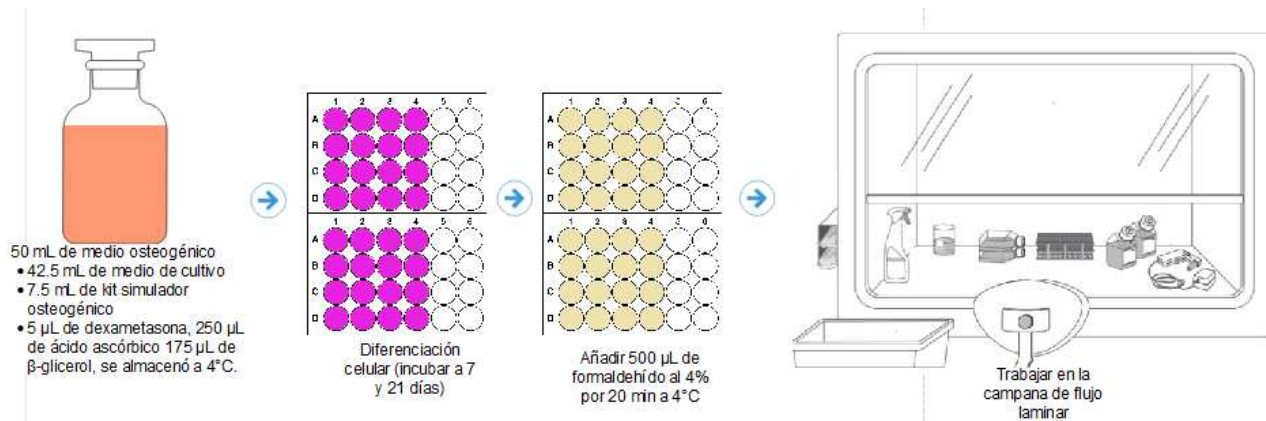


Figura 3.29.-Diferenciación y fijación celular

Para la tinción Von Kossa se realizó la siguiente metodología:

1. Las células fueron fijadas utilizando 500 µL de la solución al 4% de formaldehído durante 20 min a 4°C.
2. Se removió el formaldehído y se lavaron las células con 1 mL de agua destilada
3. Fue añadido 500 µL de AgNO_3 y se dejó reposar 20 min en la campana de flujo laminar en oscuridad.
4. Se desechó el AgNO_3 y fueron enjuagados cada uno de los pozos con agua destilada. Posteriormente se añadieron 1 mL de agua destilada y la placa de cultivo fue expuesta durante 1 h a luz ultravioleta.
5. Cada pozo se enjuagó con 1 mL de agua destilada para añadir la solución al 5% de tiosulfato durante 2 min para detener la reacción.
6. Se eliminó el tiosulfato y enjuagó con agua destilada previo a la observación bajo el microscopio.

Para la tinción de rojo de alizarina se realizó lo siguiente:

1. Las células fueron fijadas en los pozos utilizando 500 μ L de la solución al 4% de formaldehído durante 20 min a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar.
2. Los pozos se enjuagaron dos veces con 1 mL de agua destilada, seguidamente fue añadido 500 μ L a cada pozo de la solución de Rojo de Alizarina; se dejó reposar durante 5 minutos.
3. La reacción en cada pozo del plato de cultivo fue detenida enjuagando al menos 3 veces con agua destilada para posteriormente observar las células bajo el microscopio.

En la Figura 3.30 se representa como fue realizado el proceso de ambas tinciones en las placas de cultivo a 7 y 21 días.

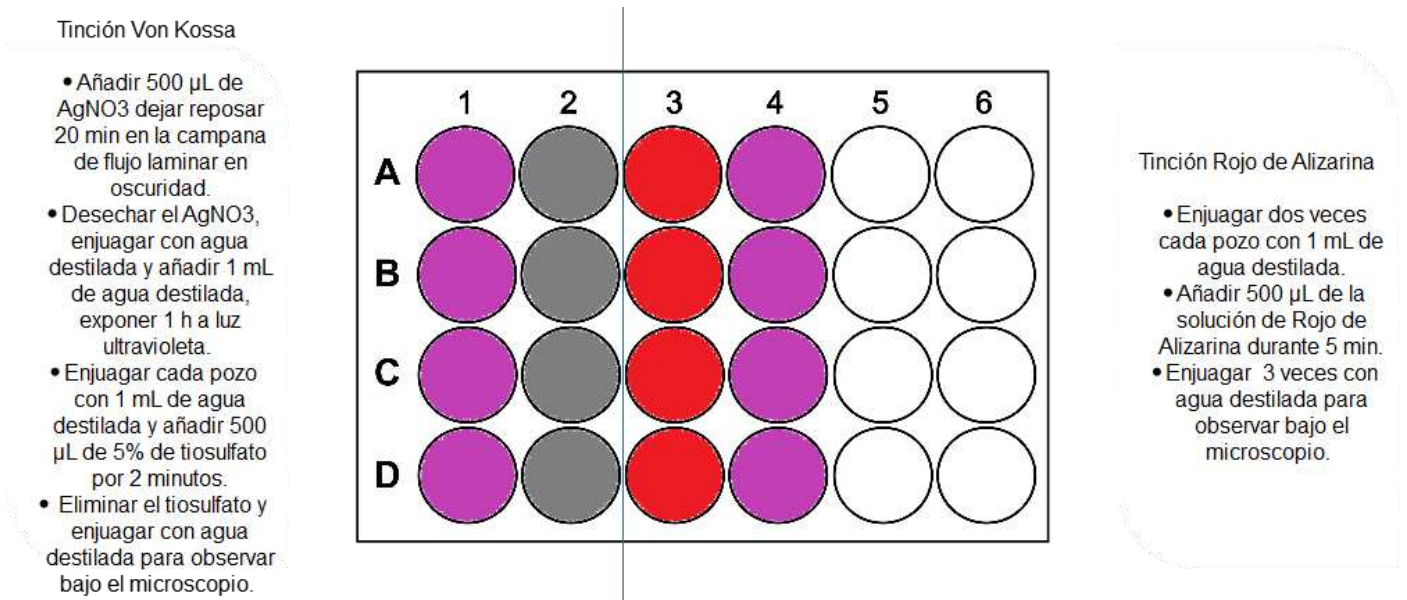


Figura 3.30.- Los pozos de las columnas 1 y 4 representan células sin medio osteoinductor, la columna 2 representa los pozos con la tinción Von Kossa mientras que la columna 3 es la tinción correspondiente a Rojo de Alizarina.

4. RESULTADOS

4.1. Síntesis y caracterización de la PCL

4.1.1. Síntesis de PCL con $\text{Sn}(\text{Oct})_2$

En la Figura 4.1 es posible observar el polímero obtenido utilizando como catalizador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ mediante el procedimiento descrito en la sección 3.3.1. En la Figura se identifica un material sólido adherido en el interior del matraz al finalizar la reacción, mientras que al agregar cloroformo este se disuelve.

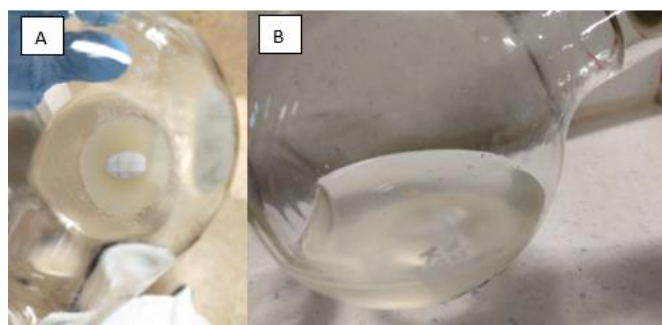


Figura 4.1.- A) PCL en el interior del matraz de 3 bocas, B) PCL disuelta en cloroformo.

El polímero disuelto fue vertido en una charola de teflón y posteriormente fue almacenado en contenedores de polietileno de alta densidad. En la Figura 4.2 es posible observar los polímeros obtenidos utilizando $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ a diferentes tiempos de reacción.



Figura 4.2.-PCL obtenida utilizando $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

En la Tabla 4.1 son presentados los datos calculados sobre el rendimiento de las reacciones utilizando $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

Tabla 4.1.-Rendimientos de las reacciones utilizando $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

Muestra (h)	E-cl(g)	PCL (g)	Rendimiento (%)
5	2.28	2.17	95.08
16	2.35	2.13	90.64
24	2.28	2.19	96.32
48	2.28	1.90	83.35
72	2.28	1.73	75.84

Físicamente es posible ver como en la Figura 4.2 ocurrieron cambios en la coloración conforme incrementaba el tiempo de reacción; este cambio como ha sido identificado previamente se debe a la degradación térmica en los polímeros obtenidos [57].

En la Figura 4.3 es posible ver esquemáticamente como ocurre la síntesis de PCL con $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. A 24 h.

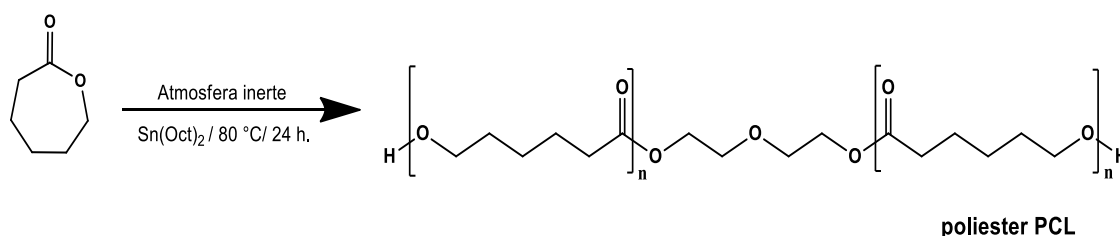


Figura 4.3.- Síntesis de PCL utilizando Octoato de Estaño, tomado de [58].

En la Figura 4.3 se muestra que el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ al escindir-se por acción del calor el estaño rompe el anillo en el enlace acyl de e-cl[59]. La reacción de propagación genera una especie reactiva, la cual se detiene cuando se unen a la especie de terminación.

Para la síntesis de PCL con $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ usualmente es utilizado algún alcohol para acelerar la velocidad de reacción [60]. Sin embargo, en esta síntesis la polimerización fue llevada a cabo sin alcohol para obtener polímeros de baja masa molecular [61].

4.1.2. Síntesis de PCL con NaH

En la Figura 4.4 puede observarse PCL en estado sólido al interior del matraz utilizando NaH como catalizador de la reacción, así como la película obtenida a partir del polímero obtenido como resultado del procedimiento seguido en el apartado 3.3.2.

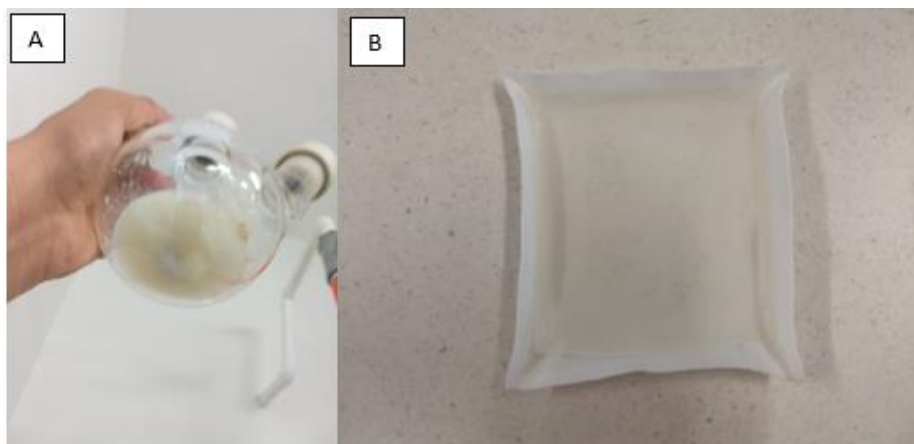


Figura 4.4.- A) PCL en el interior del matraz de 3 bocas, B) película de PCL obtenida después de la evaporación del solvente.

El rendimiento de las reacciones utilizando NaH es mostrado en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2.-Rendimiento de las reacciones con NaH

Muestra	E-cl	PCL (g)	Rendimiento (%)
Reacción 1	6.18	5.01	81.06
Reacción 2	12.36	8.15	65.93
Reacción 3	7.00	5.93	84.66
Reacción 4	6.28	5.23	83.24
Reacción 5	16.27	10	61.44

La polimerización aniónica utilizando NaH se llevó a cabo en su totalidad durante 1 h en la cual se obtuvieron rendimientos por encima del 60% como se visualiza en la Tabla 4.2. Comparando los rendimientos obtenidos en las polimerizaciones realizadas con $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ y NaH es notable que se obtienen mayores rendimientos utilizando $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. Sin embargo, el tiempo utilizado para obtener PCL con NaH es menor y la capacidad de formar películas de los polímeros obtenidos es un indicativo de la obtención de PCL con mayores masas moleculares[62].

En la figura 4.5 se muestra esquemáticamente la síntesis de PCL con NaH; este tipo de polimerización se denomina aniónica[61].

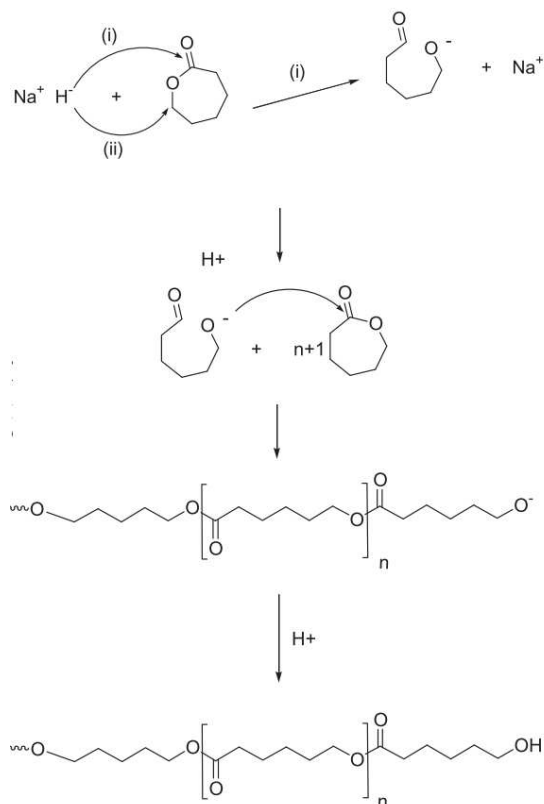


Figura 4.5.-Síntesis de PCL con NaH, adaptado de [45].

Como puede observarse en la Figura 4.5 el NaH se escinde en Na^+ e H^- . El H^- ocasiona la apertura del anillo de ϵ -cl formando dos especies de carboaniones [45]. El carbanión correspondiente a la ruptura del enlace acyl del anillo de ϵ -cl es el de menor impedimento estérico por lo cual es el encargado de llevar a cabo la reacción de propagación [63].

La propagación en las polimerizaciones aniónicas son muy susceptibles a la humedad, a la presencia de oxígeno y al CO_2 debido a que éstas detienen la propagación de los carboaniones [61]. La propagación se detiene cuando el hidrógeno del NaH se une en las cadenas poliméricas en crecimiento [64].

4.1.3. Caracterización por FTIR

En la Figura 4.6 es mostrado el espectro infrarrojo de una muestra comercial de PCL marca perstorp®.

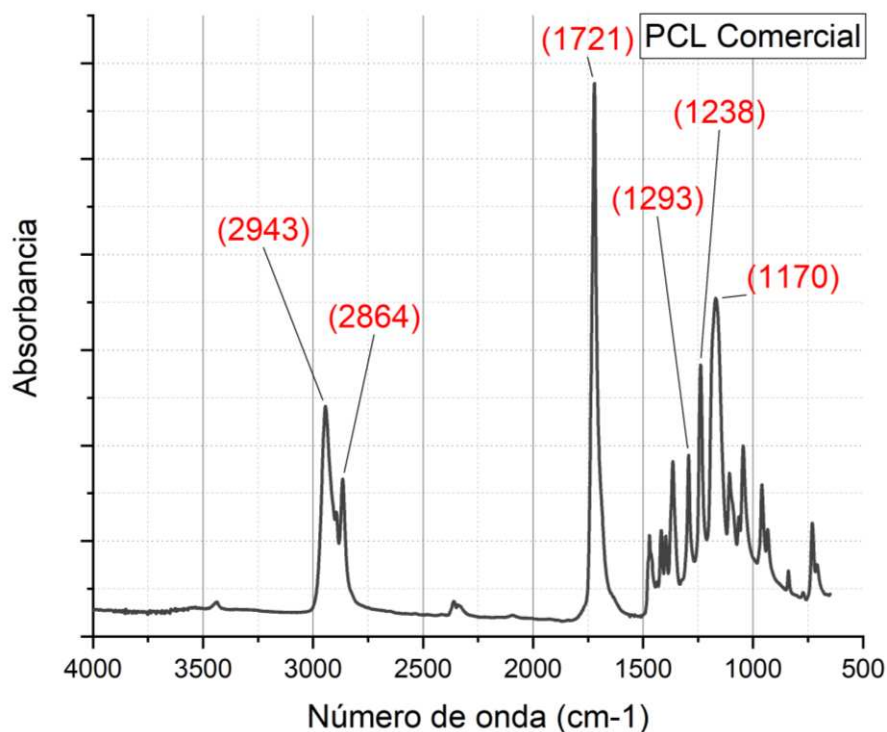


Figura 4.6.-Espectro IR policaprolactona comercial.

En la Tabla 4.3 son enlistados los principales picos presentes en el espectro IR de la PCL comercial, los cuales corresponden a los reportados en la literatura[65].

Tabla 4.3.-Principales enlaces del espectro IR para PCL.

Posición (cm ⁻¹)	Vibración
2943	Estiramiento asimétrica CH ₂
2864	Estiramiento simétrica CH ₂
1721	Estiramiento grupo carbonilo
1293	Estiramiento C-O y C-C en la fase cristalina
1238	Estiramiento asimétrica C-O-C
1170	Estiramiento C-O y C-C en fase amorfa

4.1.3.1. FTIR de PCL con $\text{Sn}(\text{Oct})_2$

En la Figura 4.7 se analizan los espectros obtenidos en cada una de las reacciones de síntesis de PCL utilizando como catalizador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

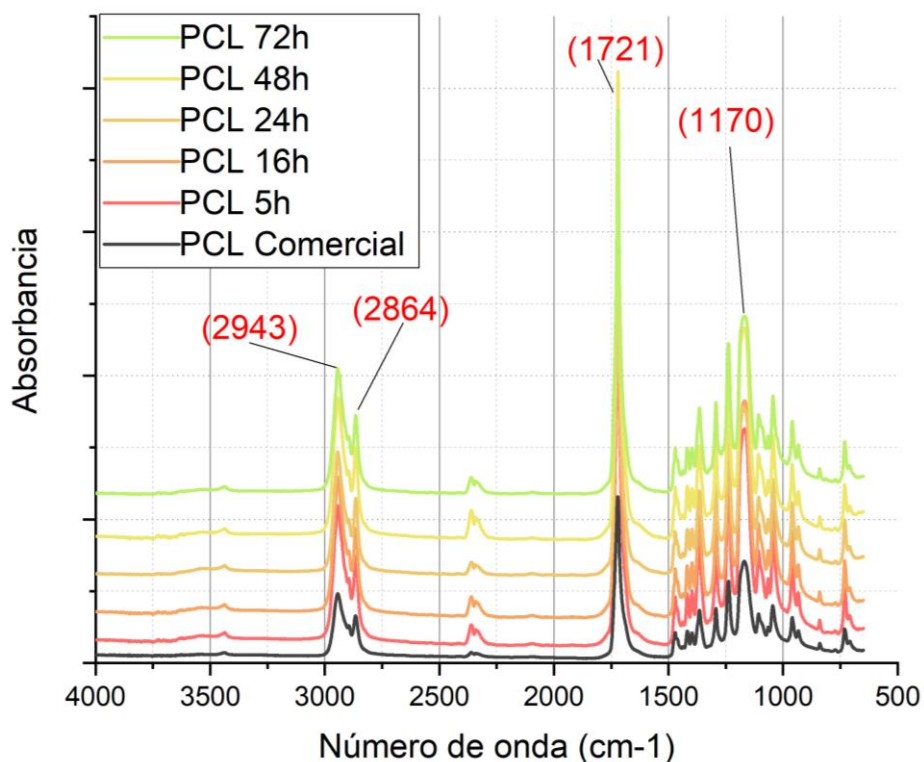


Figura 4.7.-Espectros IR de las muestras de PCL catalizadas con $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

Como puede observarse, los picos coinciden a las regiones correspondientes con la PCL comercial, por lo cual puede asegurarse que el producto de las reacciones de síntesis es PCL. No se observan algunas otras señales que indiquen restos de cloroformo, monómero residual o catalizador.

4.1.3.2. FTIR de PCL con NaH

En la Figura 4.8 es posible visualizar los espectros FTIR obtenidos en el análisis de las muestras sintetizadas con NaH .

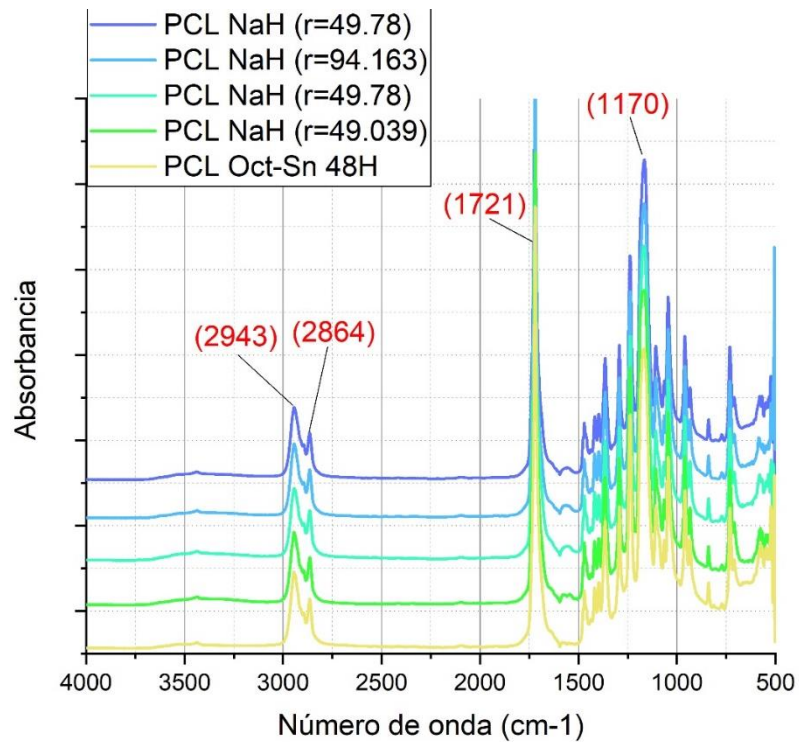


Figura 4.8.-Espectros IR de las muestras de PCL catalizadas con NaH.

El análisis de los espectros confirma que el polímero obtenido utilizando NaH como catalizador es PCL; como puede visualizarse en los espectros de FTIR, solo se observan los picos correspondientes a la PCL, por lo cual se puede aseverar que el procedimiento de polimerización y filtración llevados a cabo, elimina cualquier resto de monómero residual y catalizador.

4.1.4. Determinación de la masa molecular mediante viscosimetría capilar

El procedimiento para calcular los tiempos de flujo de la solución promedio para $r=49$ son descritos en el apartado 3.3.4. Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4.-Tiempos de flujo promedios calculados en diferentes concentraciones.

Concentración	0mg/ml	4mg/ml	6mg/ml	8mg/ml
Tiempo de retención promedio	250.8	303.6	312	363.6

Como puede observarse conforme aumenta la concentración de la PCL r=49 aumenta el tiempo de retención en el que el viscosímetro capilar, los tiempos permanecen constantes en cada uno de las mediciones realizadas lo cual es un indicativo de que las soluciones preparadas fueron homogéneas.

En la Tabla 4.5 son mostrados los valores calculados de las diferentes viscosidades a partir de los tiempos de retención obtenidos de la Tabla 4.5.

Tabla 4.5.-Viscosidades calculadas para el cálculo de la masa molecular.

Concentración	Tiempos de flujo promedio	η_{rel}	η_{esp}	η_{red}	η_{inh}
8mg/ml	363.6	1.44	0.31	38.77	46.42
6mg/ml	312.0	1.24	0.19	32.69	36.39
4mg/ml	303.6	1.21	0.17	43.47	47.76

Mediante la extrapolación de datos utilizando la viscosidad inherente con respecto a la concentración del polímero en la solución se calculó el valor de la ordenada al origen el cual fue de 45.535; este valor corresponde a la viscosidad inherente del polímero. Con el cálculo de este valor fue posible determinar la masa molecular promedio viscoso (Mv) de la PCL r=49. El cálculo obtenido fue de 47,279 Da.

4.1.5. Caracterización por DSC

En el termograma presentado en la Figura 4.9 son mostradas las temperaturas de fusión y cristalización de la PCL r=49.78 sintetizada con NaH.

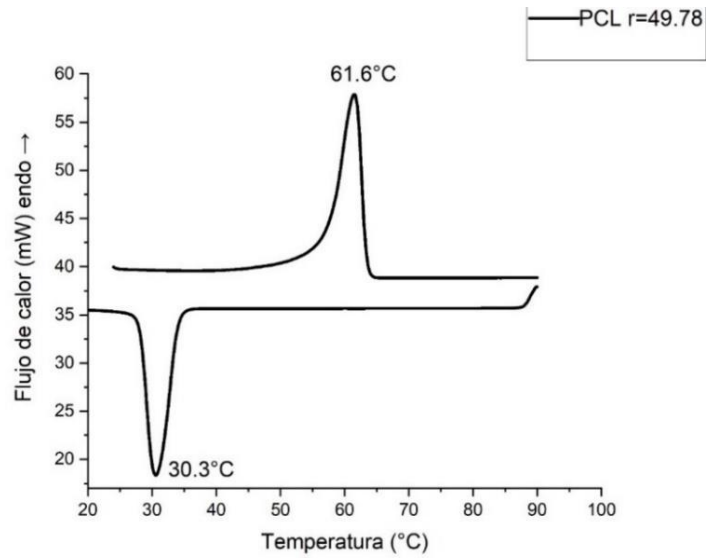


Figura 4.9.-Termograma DSC PCL r=49.78.

En la Figura 4.10 se presenta el termograma correspondiente a la PCL r=94.163, es posible observar diferentes temperaturas de fusión y cristalización.

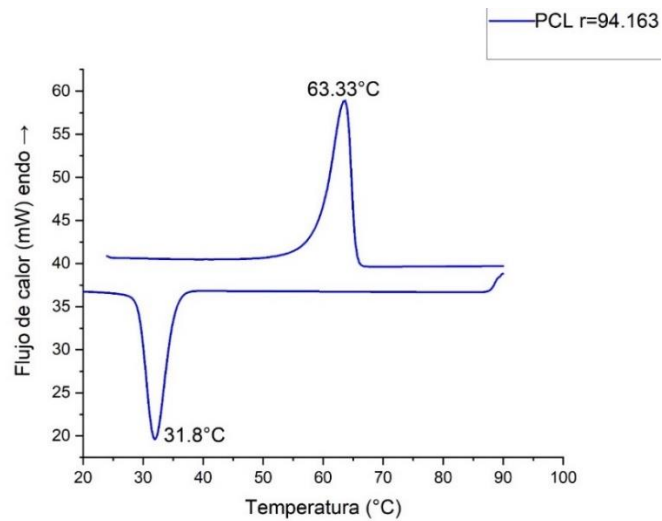


Figura 4.10.-Termograma DSC PCL r=94.163.

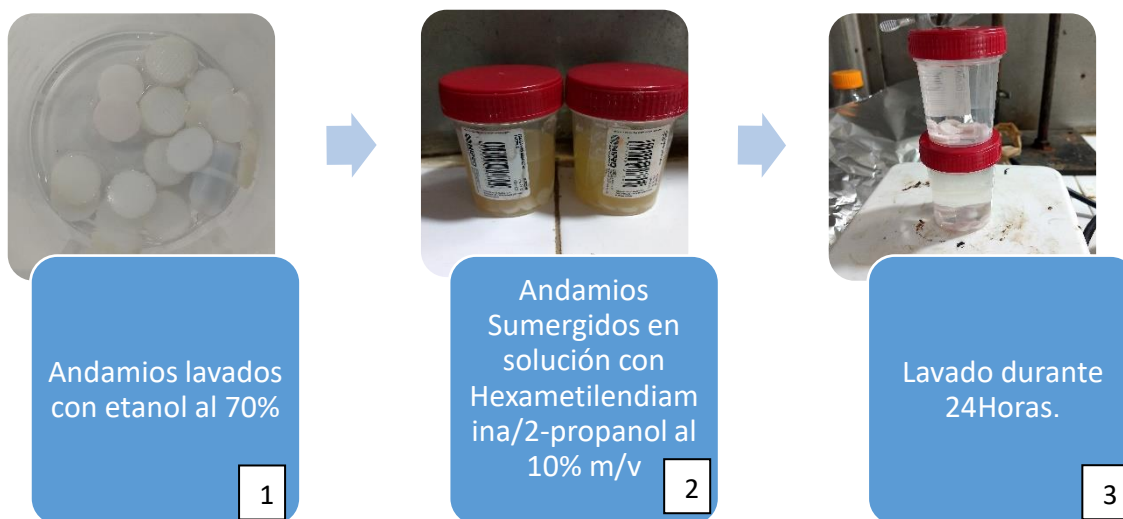
En la Tabla 4.6 son mostrados y comparados los valores obtenidos calculados a partir de los termogramas del DSC utilizando como referencia datos obtenidos previamente en el grupo de trabajo sobre PCL comercial de la marca Perstorp®[40].

Tabla 4.6.-comparación de las temperaturas de fusión, cristalización, así como sus respectivas entalpias y grado de cristalinidad calculados a partir de los datos obtenidos del DSC.

Muestra	T _m (°C)	T _c (°C)	$\Delta_{fus}H$ (J/g)	$\Delta_{cris}H$ (J/g)	X _c %
PCL Perstorp	61.00	29.00	67.84	-55.60	48.80
PCL r=49.78	61.60	30.30	84.59	-76.05	60.72
PCL r=94.16	63.30	31.80	98.45	-70.00	70.67

Analizando los datos de la Tabla 4.6 es posible decir que el uso de la PCL r=49.78 es el más adecuado para la técnica de electrohilado, ya que al tener una cristalinidad menor la degradación será más rápida a comparación de un polímero con mayor cristalinidad [26]. El incremento de la cristalinidad está relacionado con el aumento en la masa molecular y con el historial térmico del polímero. Por lo cual polímeros con menor masa molecular serán menos cristalinos. Este cambio en la cristalinidad se debe al incremento de la concentración del monómero en las reacciones de síntesis [66].

4.2. Modificación superficial de los andamios



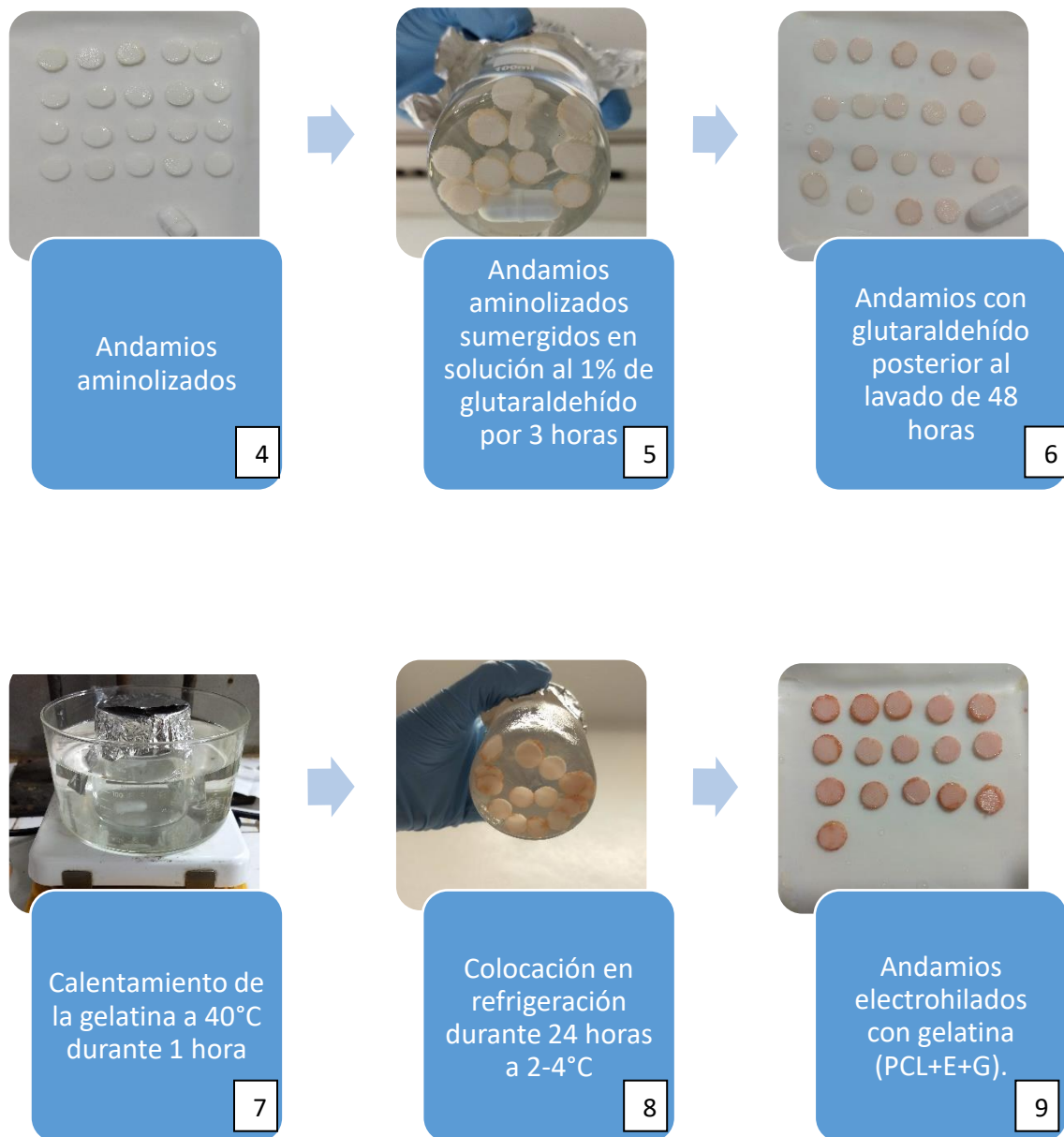


Figura 4.11.-Pasos seguidos para la inmovilización de gelatina en la superficie de los andamios bi-capa.

En la Figura 4.11 son presentados todos los pasos realizados para la inmovilización de las moléculas de gelatina en los andamios bi-capa. Como puede visualizarse del paso 1 al 4 no es perceptible un cambio de color en los andamios aminolizados, sin embargo, en

los pasos 5 y 6 se observa un cambio de color debido a la incorporación del glutaraldehído; esto se debe principalmente a la incorporación de grupos aldehído en los enlaces ésteres en la cadena polimérica de la PCL [67].

De los pasos 7 a 9 se observa un cambio en la coloración después de sumergir los andamios en la solución de gelatina, esto se debe a la formación de enlaces imina entre los enlaces aldehído y las aminas libres de la gelatina. En la Figura 4.12 se puede observar de manera esquemática como ocurre el proceso de inmovilización superficial de gelatina en la PCL.

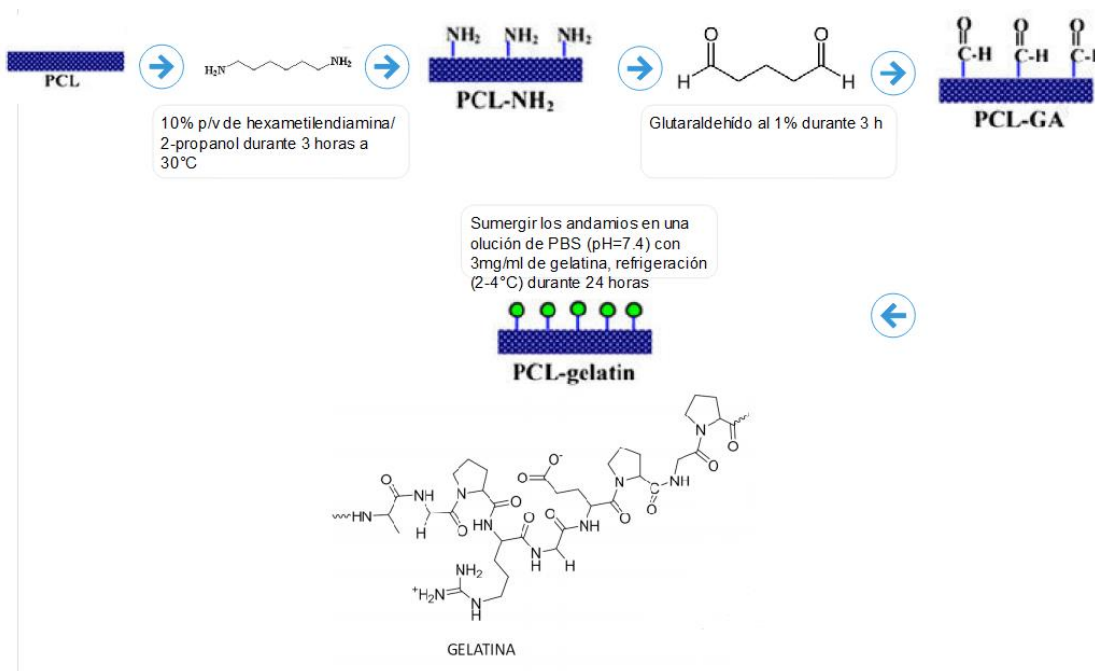


Figura 4.12.-Representación esquemática de la Inmovilización de moléculas de gelatina en los andamios de PCL electrohilados.

Para confirmar la introducción del grupo amina durante los pasos de aminolización e inmovilización de gelatina es posible utilizar el análisis mediante FTIR, cuantificación de aminas, ángulo de contacto y degradación acelerada; también se encuentra reportado que la incorporación de gelatina tiende a favorecer la proliferación y adhesión celular [68].

4.2.1. FTIR de los andamios de PCL modificados superficialmente

En la Figura 4.13 son presentados los diferentes tipos de PCL utilizados hasta la obtención de los andamios de PCL+E+G.

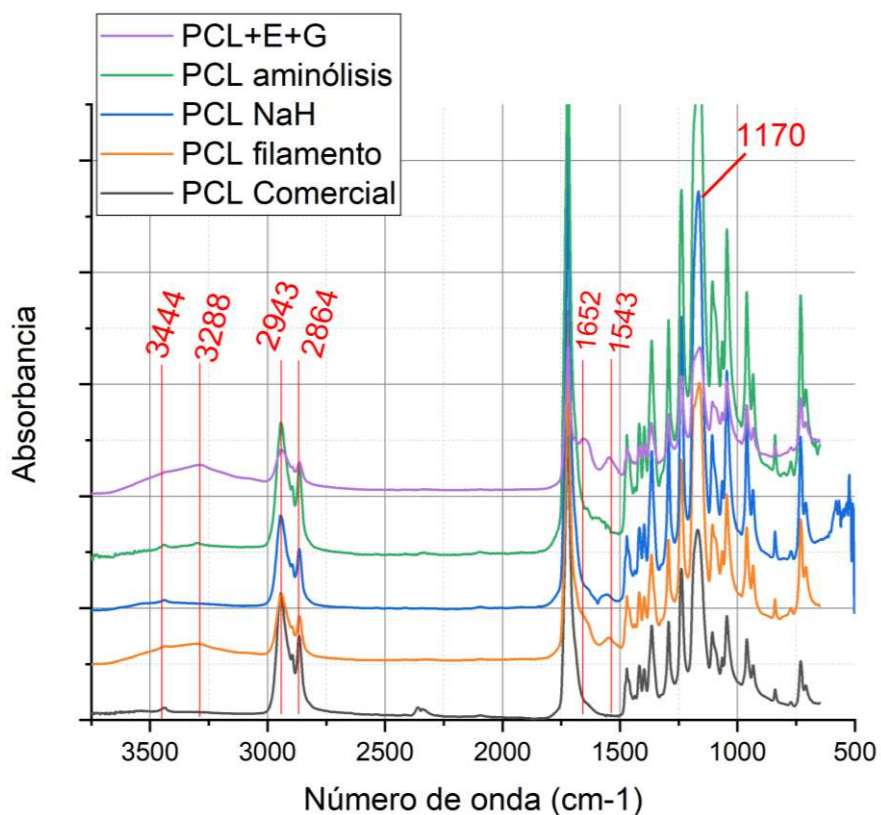


Figura 4.13.-Espectros FTIR sobre los tipos de PCL obtenidos para la elaboración de los andamios bi-capa.

En la Figura 4.13 es posible observar un cambio en los espectros FTIR correspondientes a los andamios de PCL modificados superficialmente, la aparición de picos y el análisis de estas regiones es presentado en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7.-Enlaces del espectro FTIR para la PCL modificada superficialmente.

Posición (cm-1)	Vibración
3444	Estiramiento NH
3288	Estiramiento OH
1652	Amida I
1543	Amida II

La vibración en las regiones del espectro FTIR mostradas en la Tabla 4.7 son las mismas reportadas en la literatura para superficies de PCL con gelatina [27]. Sin embargo, en el espectro correspondiente a la PCL aminolizada, es posible observar dos picos en la región comprendida entre 3500-3250 cm^{-1} . Estos dos picos corresponden a los estiramientos asimétricos y simétricos de las aminas primarias inmovilizadas en los andamios después de la aminólisis. Con el análisis FTIR es posible dilucidar que la técnica de inmovilización para las moléculas de gelatina fue efectiva.

4.3. Cuantificación de aminas

En la Figura 4.14 se observa la cuantificación de aminas en unidades de absorbancia a 570 nm entre andamios aminolizados y andamios con gelatina inmovilizada.

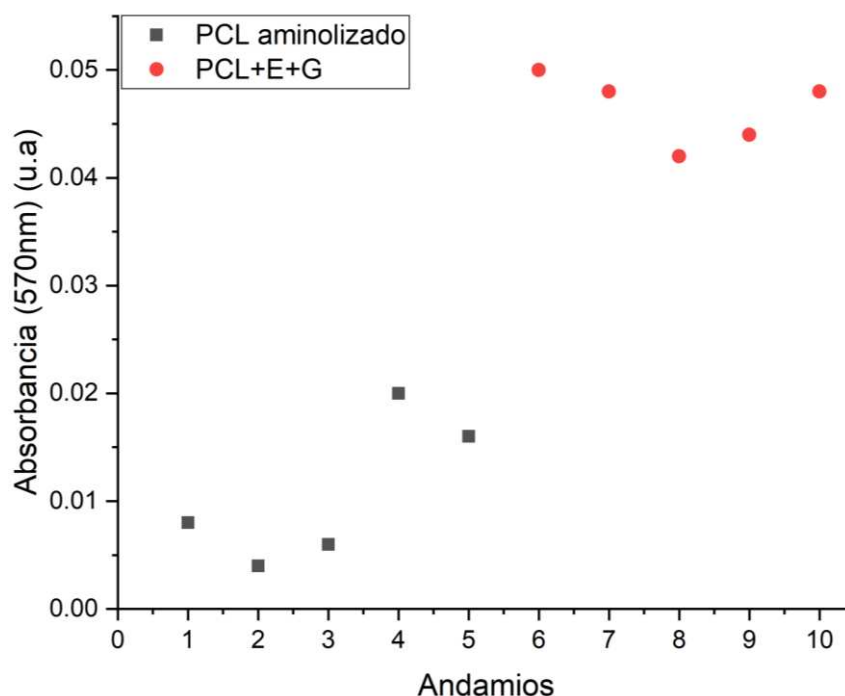


Figura 4.14.-Cuantificación de aminas en andamios PCL aminolizados y con gelatina inmovilizada.

Los resultados en la Figura 4.14 muestran que se incrementa la concentración de aminas una vez finalizado el proceso de inmovilización de gelatina [68]. Los efectos de la incorporación de aminas se discuten en los siguientes apartados.

4.4. Ángulo de contacto

En la Figura 4.15 se observa una gota de agua desionizada sobre la parte lisa en un andamio de PCL.

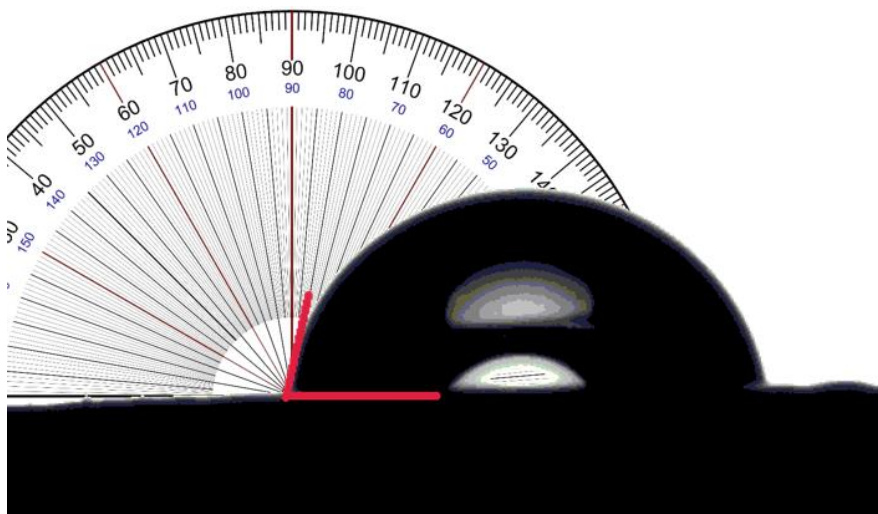


Figura 4.15.-Gota de agua sobre andamio de PCL.

Comparando las Figura 4.15 y 4.16 es posible observar una disminución en el ángulo de contacto, esto es debido a la incorporación de aminas sobre la superficie de los andamios (disminuye la hidrofobicidad en la superficie de la PCL) [69].

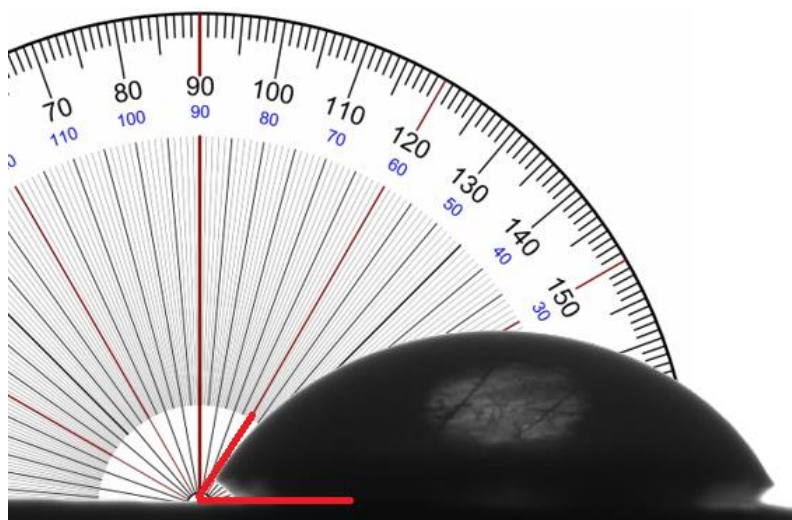


Figura 4.16.-Gota de agua sobre andamio de PCL aminolizado.

En la Figura 4.17 se observa una gota de agua sobre los andamios de PCL+E+G.

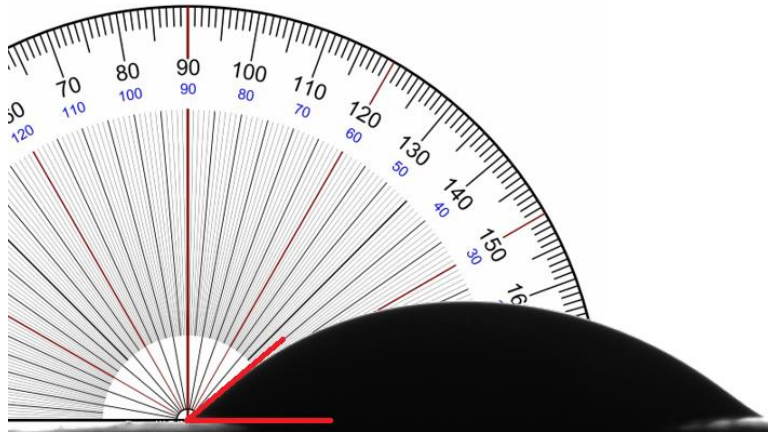


Figura 4.17.-Gota de agua sobre un andamio de PCL+electrohilado+gelatina.

En la Tabla 4.8 son mostrados los valores promedio en los ángulos de contacto en las mediciones realizadas a los 3 diferentes tipos de andamios.

Tabla 4.8.-Valores promedio de ángulos de contacto medidos.

PCL	80.10
PCL + aminólisis	60.00
PCL+E+G	40.73

Se puede observar que en cada uno de los dos pasos realizados para la inmovilización de las moléculas de gelatina genera un cambio en las propiedades hidrofílicas de los andamios, el cual es posible visualizar debido a la disminución del ángulo de contacto. En los ensayos de viabilidad celular, se ha demostrado que los andamios hidrofílicos presentan mejores resultados en biocompatibilidad y biodegradabilidad [70].

4.5. Degradación acelerada de los tres diferentes tipos de andamios.

En la Tabla 4.9 es posible vislumbrar el porcentaje degradativo por semana que tuvieron los tres tipos de andamios.

Tabla 4.9.-Porcentaje de la masa perdida en los 3 tipos de andamios por semana.

Semana	PCL (%)	PCL+E(%)	PCL+E+G (%)
1°	14.53	12.29	10.50
2°	29.32	20.01	23.57
3°	42.94	24.25	32.28
4°	43.39	31.56	41.89
5°	68.75	32.98	55.34

En la Figura 4.18 es mostrado el porcentaje degradativo acelerado en los 3 tipos de andamios durante 5 semanas.

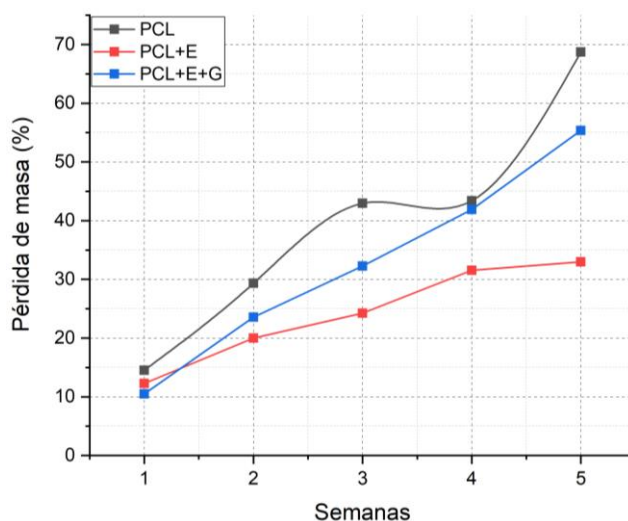


Figura 4.18.-Comparación del porcentaje degradativo en los diferentes tipos de andamios a lo largo de 5 semanas.

La información recabada indica que los andamios de PCL+E tienen una tasa degradativa menor a comparación de los andamios solo de PCL, esto ocurre debido a que el electrohilado alrededor de los andamios funciona como una barrera que ocasiona una difusión más lenta de la solución NaOH 5M hacia el interior de éstos. Los andamios de PCL+E+G demostraron una tasa degradativa mayor a comparación de los de PCL+E. En

la literatura se reporta que la PCL puede degradarse más rápido al incorporar grupos hidrofílicos en su superficie como las aminas e incluso grupos fosfato [71].

4.6. Ensayos biológicos de los andamios

4.6.1. Ensayos de citotoxicidad de los andamios con hAMSCs

En la Figura 4.19 son presentadas las hAMSCs con un aumento de 4x, 10x y 20x al sexto día de cultivo celular.

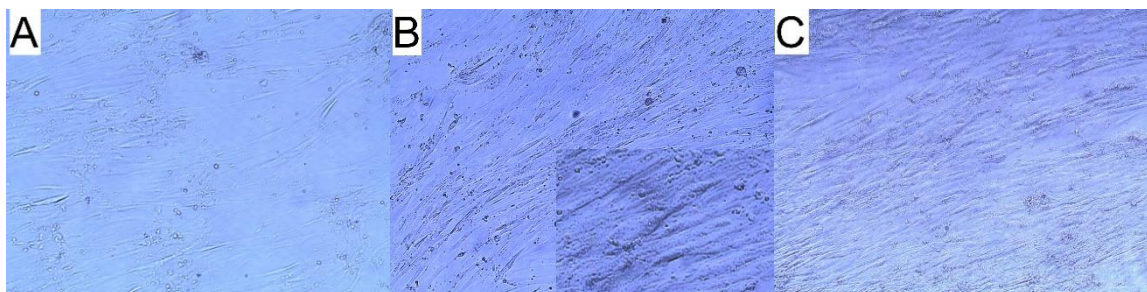


Figura 4.19.- hAMSCs vistas bajo el microscopio a un aumento de A) 4x, B) 10x y 40X, C) 20x.

Como es posible apreciar en la Figura 4.19 la morfología de las células cambió, al adherirse las células en la caja de cultivo estas adquieren una forma alargada y de husillo. En el sexto día pudo observarse confluencia celular en las cajas tipo T de 25cm y sin contaminación por hongos o bacterias, por lo cual fueron tripsinizadas para iniciar las pruebas de citotoxicidad.

En la Figura 4.22 son presentadas las gráficas de viabilidad celular utilizando hAMSCs a tres, siete y diez días

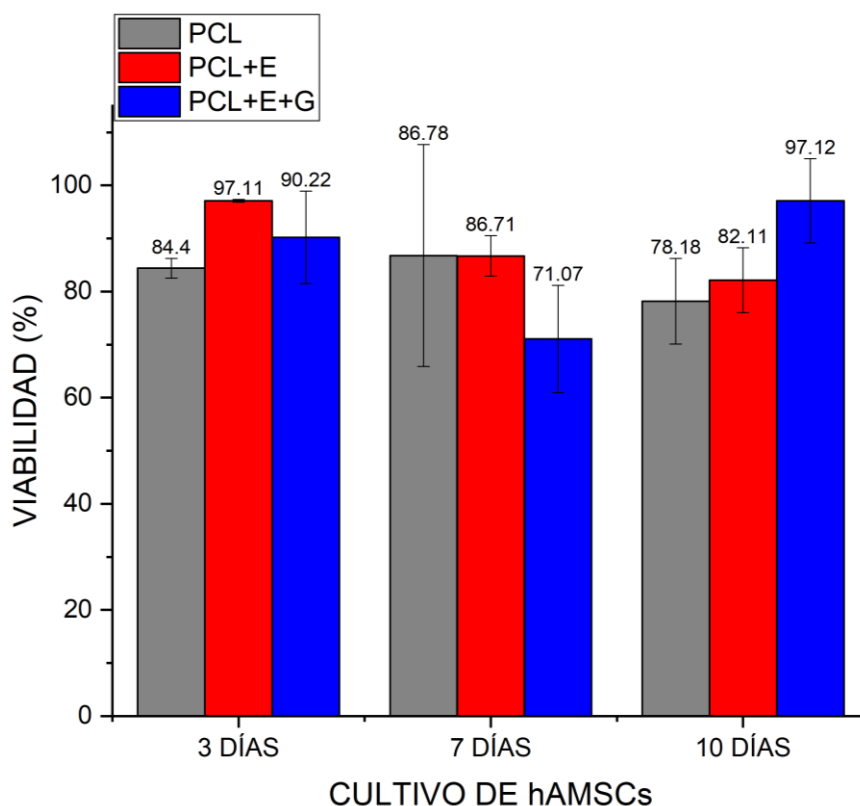


Figura 4.20.- Ensayos de citotoxicidad de los andamios evaluados a tres tiempos con hAMSCs.

En la Figura 4.22 se muestra el porcentaje de viabilidad y proliferación para las hAMSCs, dónde es posible identificar que al electrohilarse PCL de baja masa molecular, este parámetro se ve favorecido al tercer día (PCL comparado con PCL+E, $P < 0.05$); sin embargo, la incorporación de gelatina a este tiempo no tiene un efecto estadísticamente significativo, este comportamiento puede ocurrir debido a que el electrohilado en la periferia de los andamios proporciona área superficial extra en donde las células se adhieren. En cambio, en el día siete no existe diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan los tres tipos de materiales. La viabilidad en los andamios de PCL+E+G es estadísticamente significativa en el décimo día en comparación con los otros dos tipos de andamios;

Los resultados obtenidos en los andamios de PCL+E+G confirman que los continuos lavados debido a los procesos de esterilización llevados a cabo antes de las pruebas de viabilidad celular no eliminan las moléculas de gelatina inmovilizadas en la superficie.

4.6.2. Ensayos de citotoxicidad de los andamios con osteoblastos

En la Figura 4.21 pueden observarse osteoblastos adheridos en el fondo de la caja tipo T de 25 cm a 3 días de iniciado el cultivo primario utilizando un aumento de 10x.

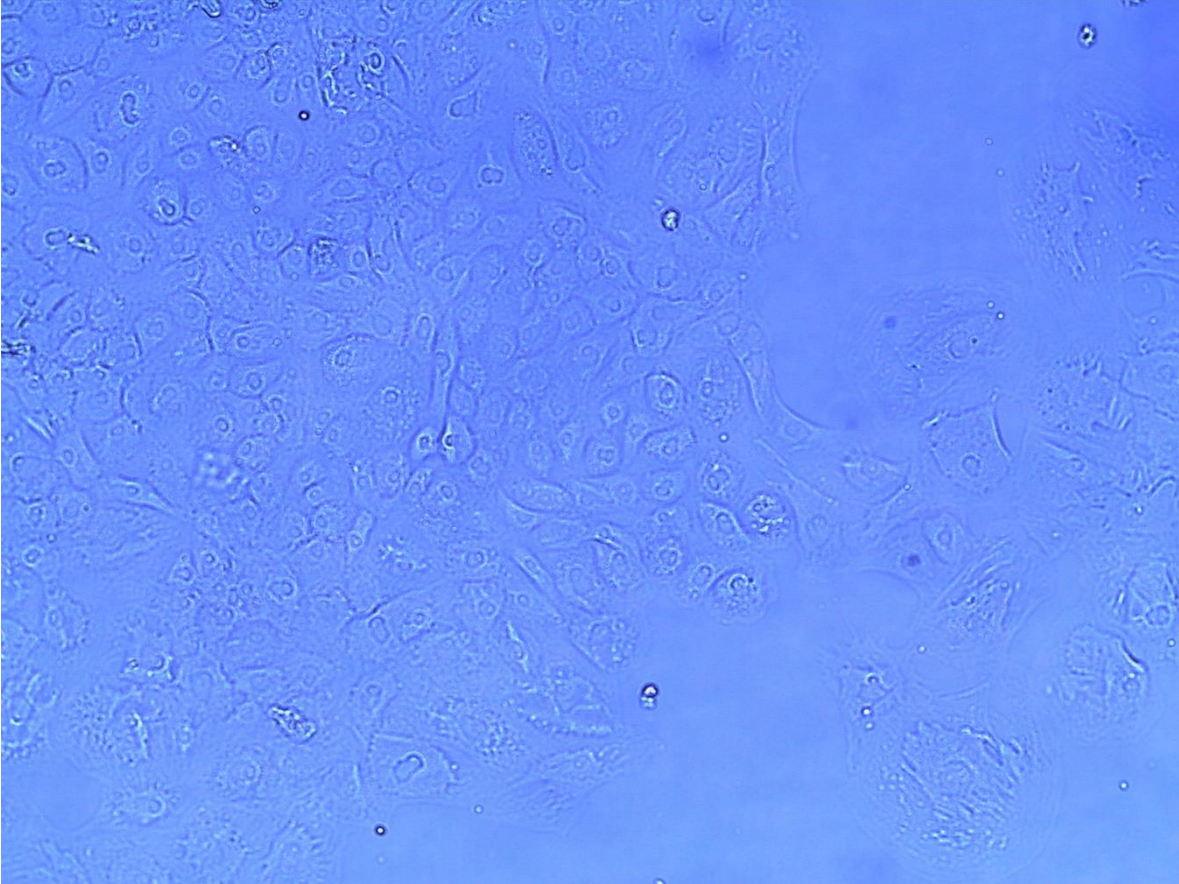


Figura 4.21.-Osteoblastos de huesos largos adheridos al tercer día de cultivo en la caja tipo T de 25 cm.

Los osteoblastos como puede observarse en la Figura 4.21 se encuentran adheridos en la caja tipo T de 25 cm; presentan forma poliédrica con elongaciones citoplasmáticas e incluso es posible ver el núcleo celular y las conexiones formadas entre las células.

Al incrementar el número de osteoblastos visibles bajo el microscopio después de siete días de cultivo en las cajas tipo T de 25 cm éstos fueron tripsinizados y sembrados en los pozos con andamios. En la Figura 4.22 se observan poblaciones de osteoblastos en la periferia de los andamios 30 minutos después de iniciadas los ensayos de citotoxicidad.

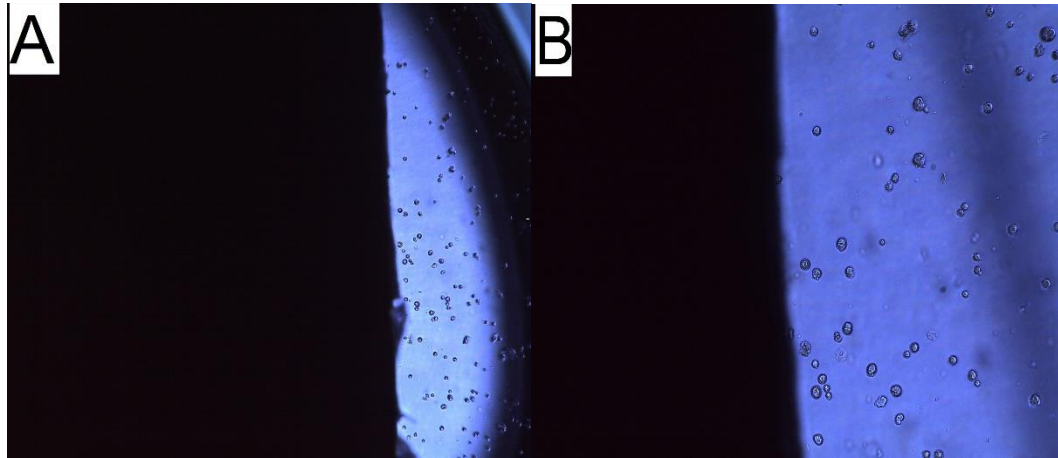


Figura 4.22.-Poblaciones de osteoblastos en la periferia de los andamios A) aumento a 4x, B) aumento a 10x.

Las células que no presentan adherencia tienen una morfología esférica como es visible en la Figura 4.22, en cambio cuando las células se encuentran adheridas comienzan a establecer conexiones con el medio que las rodea lo cual conlleva a un cambio en la morfología de éstas lo cual es posible observar en las Figuras 4.21 y 4.23.

En la Figura 4.23 se observan los osteoblastos de huesos largos a diferentes aumentos durante los ensayos de citotoxicidad.

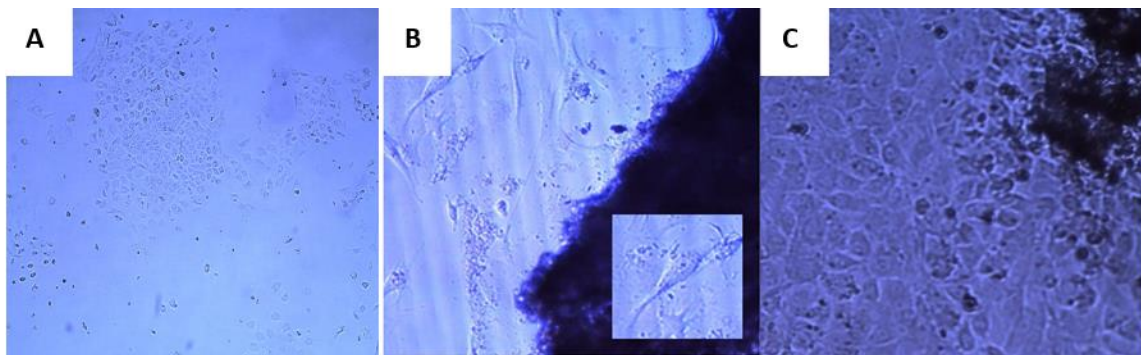


Figura 4.23.- Osteoblastos de huesos largos vistos bajo el microscopio a diez días de cultivo. A) aumento 4x, B) aumento 10x y 40x, c) aumento 40x.

Durante el cultivo para evaluar la citotoxicidad de los andamios utilizando osteoblastos de rata wistar no se apreció contaminación alguna debido a bacterias, hongos o células muertas.

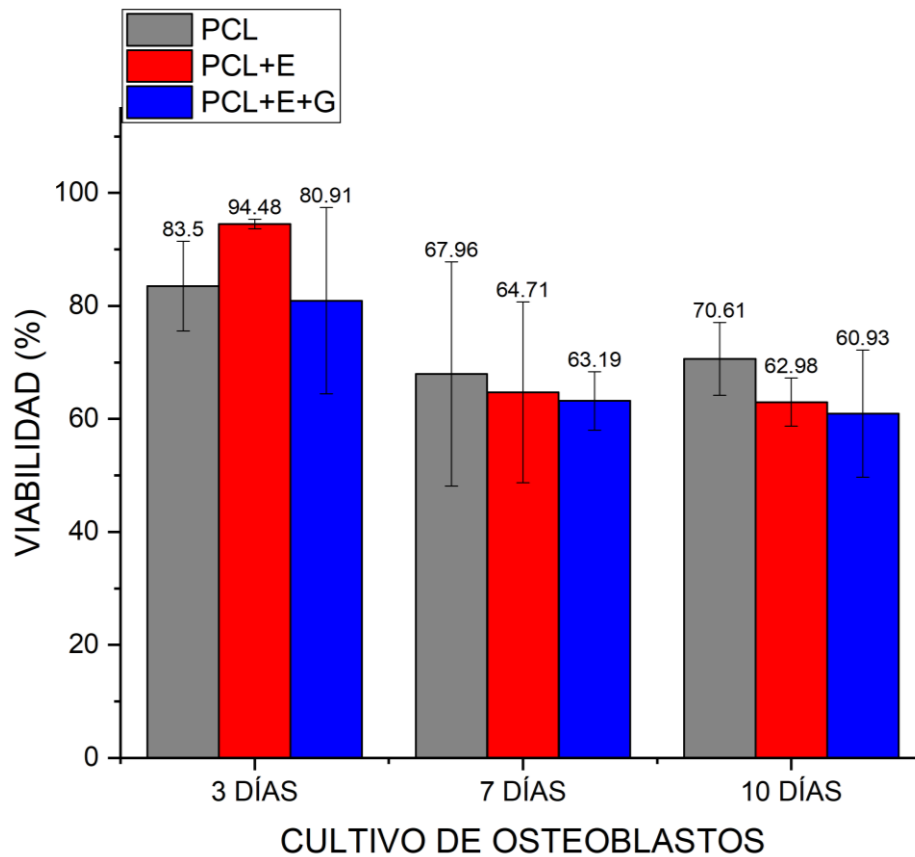


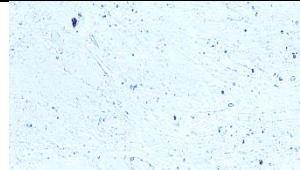

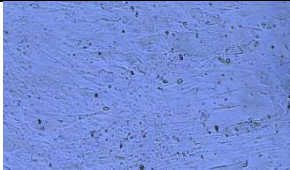

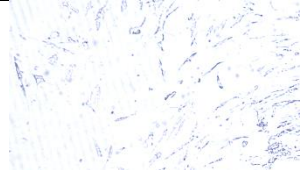

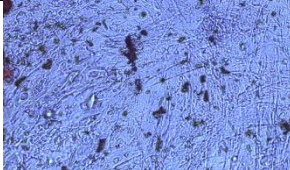



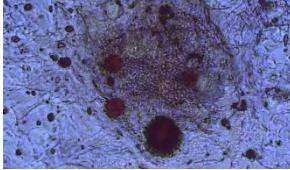
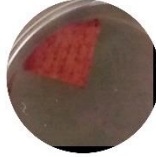


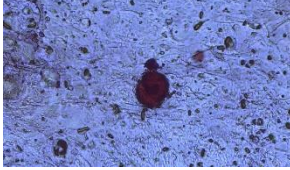

Figura 4.24.-Citotoxicidad de los andamios evaluados a tres tiempos con osteoblastos de huesos largos, donde se observa la viabilidad celular aceptable en el día 3; y disminución de la viabilidad y la proliferación celular en los días 7 y 10.

Los andamios de PCL+E presentaron mayor porcentaje de viabilidad y proliferación en comparación con los andamios de PCL y PCL+E+G como se observa en la Figura 4.24 a tres días de iniciado el cultivo. Comparando los cultivos a tres, siete y diez días. No se encuentra diferencia estadísticamente significativa entre cada tipo de andamio. Debido a que los osteoblastos no presentan división celular como las hAMSCs, Sin embargo, los porcentajes de viabilidad presentados muestran que los tres tipos de andamios no son tóxicos y pueden ser empleados en ensayos in vivo.

4.6.3. Diferenciación celular de hAMSCs a osteoblastos en los andamios

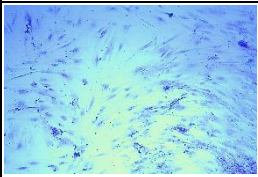
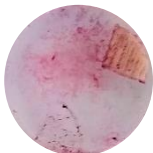
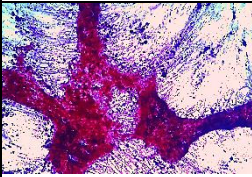
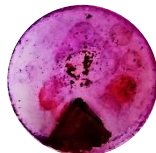
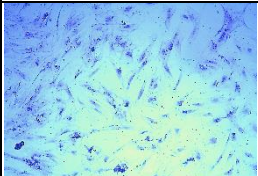
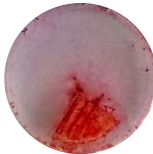
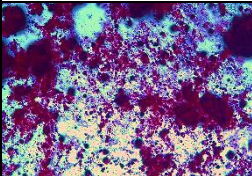

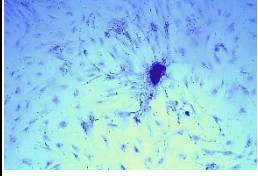
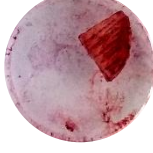
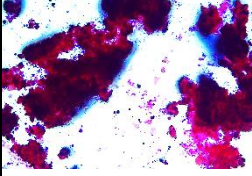
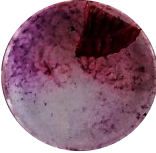
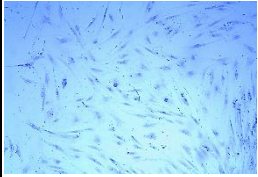
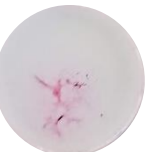
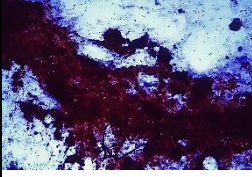
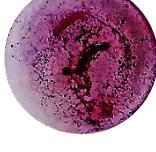
4.6.3.1. Evaluación de la mineralización ósea mediante tinción Von Kossa y Rojo de Alizarina

Tabla 4.10.-Tinciones de rojo de alizarina para los 3 diferentes tipos de andamios a 7 días de cultivo.

	DMEM	POZO (DMEM)	MEDIO OSTEOGÉNICO	POZO (MEDIO OSTEOGÉNICO)
PCL				
PCL +E				
PCL+E+G				
CONTROL				

En la Tabla 4.10 se pueden observar los resultados obtenidos en la tinción de rojo de alizarina a los tres tipos de andamios a 7 días de cultivo. Es posible darse cuenta en los resultados presentados en la Tabla 4.10 que la tinción de rojo de alizarina muestra la formación de minerales de calcio en los pozos que contienen medio osteoinductor, sobre todo a los andamios de PCL+E y PCL+E+G a comparación del pozo con el andamio de PCL. El proceso para la formación de los depósitos de calcio se encuentra reportado en la literatura que es posible visualizarse a partir del séptimo día de inducción[72].

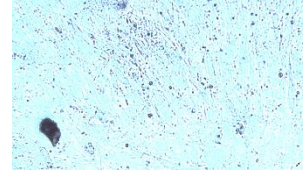
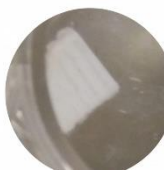
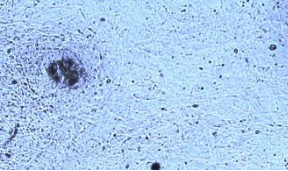

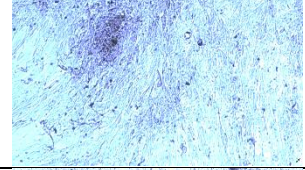

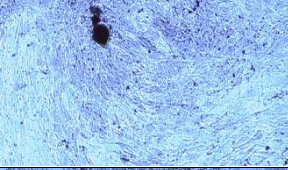
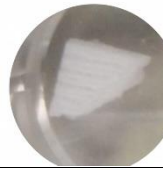
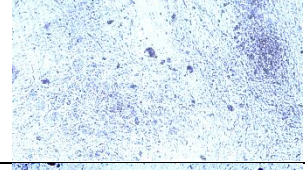

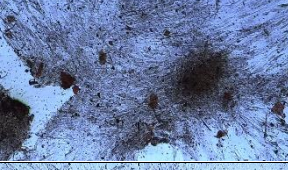

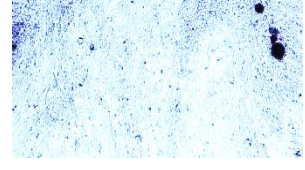
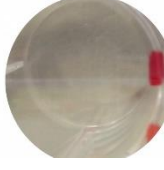


Tabla 4.11.-Tinción Rojo de Alizarina para los tres diferentes tipos de andamios a 21 días de cultivo.

	DMEM	POZO (DMEM)	MEDIO OSTEOGÉNICO	POZO (MEDIO OSTEOGÉNICO)
PCL				
PCL+E				
PCL+E+G				
CONTROL				

El cultivo a 21 días presentado en la Tabla 4.11 con la tinción de rojo de alizarina muestra la formación de grandes depósitos de calcio, en todos los andamios. Es posible cuantificar la cantidad de calcio presente en cada uno de los andamios utilizando cloruro de cetilpiridinio [73]. Sin embargo, la tinción de los depósitos cálcicos se utiliza para confirmar la diferenciación celular. Esto demuestra que el electrohilado y la inmovilización de las moléculas de gelatina no comprometen la capacidad de diferenciación celular.


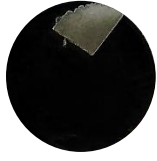




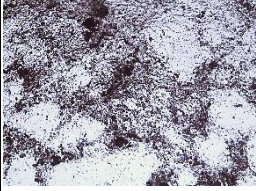
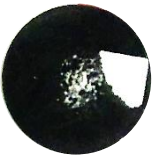






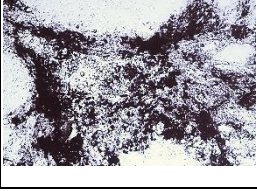

En la Tabla 4.12 se pueden observar los resultados obtenidos en la tinción Von Kossa a los tres tipos de andamios a 7 días de cultivo.

Tabla 4.12.-Tinción Von Kossa para los tres diferentes tipos de andamios a 7 días de cultivo.

	DMEM	POZO (DMEM)	MEDIO OSTEOGÉNICO	POZO (MEDIO OSTEOGÉNICO)
PCL				
PCL +E				
PCL+E+G				
CONTROL				

En la tinción Von Kossa se observa que existe depósitos minerales de fosfato cálcico en los tres tipos de andamios, sobre todo en los de PCL+E+G a los 7 días [74]. Este comportamiento es el esperado debido a que la gelatina presente en los andamios incrementa la viabilidad celular en concordancia con los resultados presentados en la Figura 4.28.

Tabla 4.13.-Tinción Von Kossa para los tres diferentes tipos de andamios a 21 días de cultivo.

	DMEM	POZO (DMEM)	MEDIO OSTEOGÉNICO	POZO (MEDIO OSTEOGÉNICO)
PCL				
PCL+E				
PCL+E+G				
CONTROL				

La tinción Von Kossa a 21 días presentada en la Tabla 4.13 revela la formación de depósitos cálcicos en los 3 tipos de andamios, aparentemente con mayor formación en los andamios de PCL+E. Comparando los resultados obtenidos a 7 y 21 días en los dos tipos de tinciones es observable la formación de los depósitos cálcicos en todos ellos. Sin embargo, en los andamios de PCL+E+G se observa la formación temprana de los depósitos cálcicos en los primeros 7 días de cultivo, lo cual es un indicativo del efecto osteoinductor de las moléculas de gelatina inmovilizadas en los andamios.

CONCLUSIONES

- Fueron establecidas condiciones para la síntesis de PCL utilizando dos catalizadores $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ y NaH. Sin embargo, el análisis de los polímeros obtenidos utilizando FTIR y DSC proporcionó información que permitió escoger al NaH con una concentración de 1.087 Mmol y utilizando e-cl a 54.144 Mmol como los parámetros para las reacciones de síntesis. El espectro FTIR confirma las bandas correspondientes a la PCL sin rastros de monómero o catalizador para cada uno de los productos de reacción.
- Los termogramas correspondientes al DSC realizados a la PCL $r=49.78$ y $r=94.18$ confirman que se obtienen dos tipos de PCL con porcentaje de cristalinidad del 60.72% y 70.67% respectivamente. Mediante viscosimetría capilar fue posible determinar la masa molecular de la PCL $r=49.78$, la cual fue de 47,279 Da.
- De las 3 condiciones propuestas para el electrohilado de PCL $r=49.78$ fue elegido aquel en donde se utiliza una concentración de PCL al 25 p/v, 14 Kv de voltaje aplicado, 0.6 mL/h a una velocidad de giro de 3 rpm como la condición de en donde se observó una formación de fibras constante sin la aparición de gotas.
- En los resultados de la prueba SEM realizados a la parte del electrohilado de los andamios PCL+E+G fue posible obtener el diámetro promedio de las fibras electrohiladas, así como un histograma en la distribución de las fibras generadas en platos colectores fijos.
- Fue posible obtener las siluetas de los huesos proporcionados (tibia y peroné) utilizando un escáner de la empresa Makerbot® modelo digitizer desktop 3D. Posteriormente, el software meshmixer de Autodesk® para dividir en partes los huesos de tibia y peroné (5 y 4 partes respectivamente) y el software de uso libre creo parametric CAD de la empresa PTC® fue posible obtener reconstrucciones porosas impresas con PLA diseñadas con un tamaño de poro de 300um con 4 capas dispuestas en diferentes ángulos (135° , 90° , 45° y 0°).
- No fue posible imprimir las reconstrucciones óseas con la impresora replicator dual utilizando PCL como material de impresión. Sin embargo, fueron diseñados e impresos andamios circulares de 10 mm de diámetro con el mismo entramado de las reconstrucciones para las pruebas degradativas y biológicas.

- Se realizó la deposición de fibras electrohiladas sobre el perímetro de los andamios circulares para la obtención de andamios bi-capa. Fueron inmovilizadas moléculas de gelatina en la superficie de los andamios de PCL + E, esto se comprobó gracias a los espectros FTIR obtenidos de los andamios.
- Se comprobó una disminución en el ángulo de contacto, así como un aumento en el porcentaje de pérdida de masa en los andamios de PCL+E+G a comparación de los andamios de PCL + E, como puede observarse en la Figura 4.18.
- Los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad celular demuestran que modificaciones físicas (electrohilado alrededor de los andamios) así como modificaciones químicas (inmovilización de moléculas de gelatina) influyen en la viabilidad celular de los andamios; los 3 tipos de andamios en cultivo con células hAMSCs fueron viables, sin embargo, mostraron mayores viabilidades los andamios de PCL+E y los de PCL+E+G. Los resultados mostrados con los osteoblastos confirman que los 3 tipos de andamios son viables.
- Las tinciones de Rojo de Alizarina y Von Kossa mostraron la formación de depósitos cálcicos en cultivos con medio osteoinductor a partir del séptimo día de cultivo en los andamios de PCL+E+G. En las tinciones a 21 días se pudieron apreciar depósitos cálcicos en todos los andamios.

RECOMENDACIONES

- Realizar cultivo con diferenciación condrogénica y adipogénica.
- Llevar a cabo pruebas de adhesión celular, por MEB y proteínas de adhesión.
- Inmunofenotipo de ambas líneas celulares.
- Ensayos de viabilidad y proliferación celular de ambas líneas en pozos.
- Caracterización por SEM a los andamios cultivados a 3, 7 y 10 días, así como aquellos en donde se realizó diferenciación celular.
- Pruebas in vivo en roedores.

ANEXOS

Anexo A

Extrapolación para obtención de masas moleculares

En la Figura A.1 y A.2 son presentadas las extrapolaciones de la viscosidad reducida e inherente.

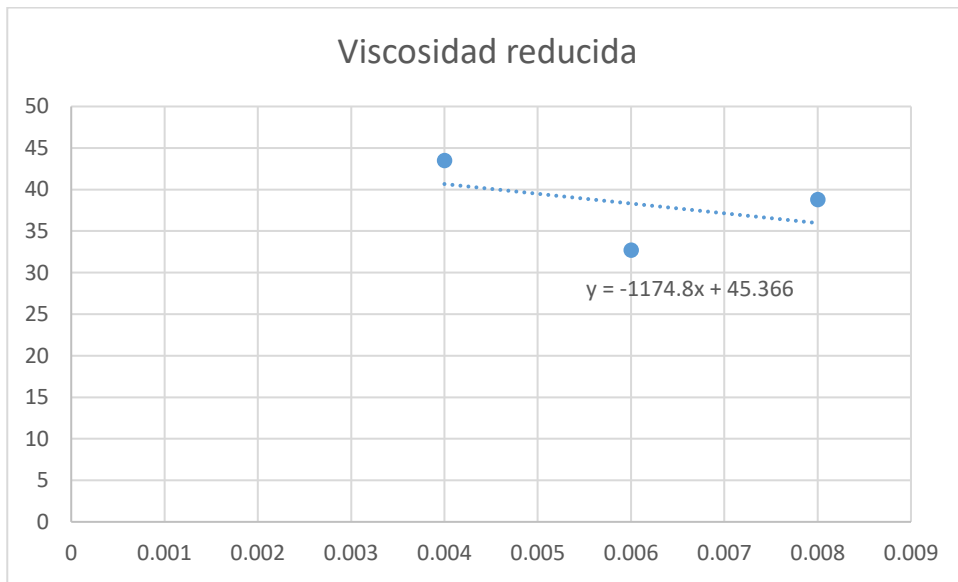


Figura A 1.-Extrapolación utilizando los datos calculados de la viscosidad reducida.

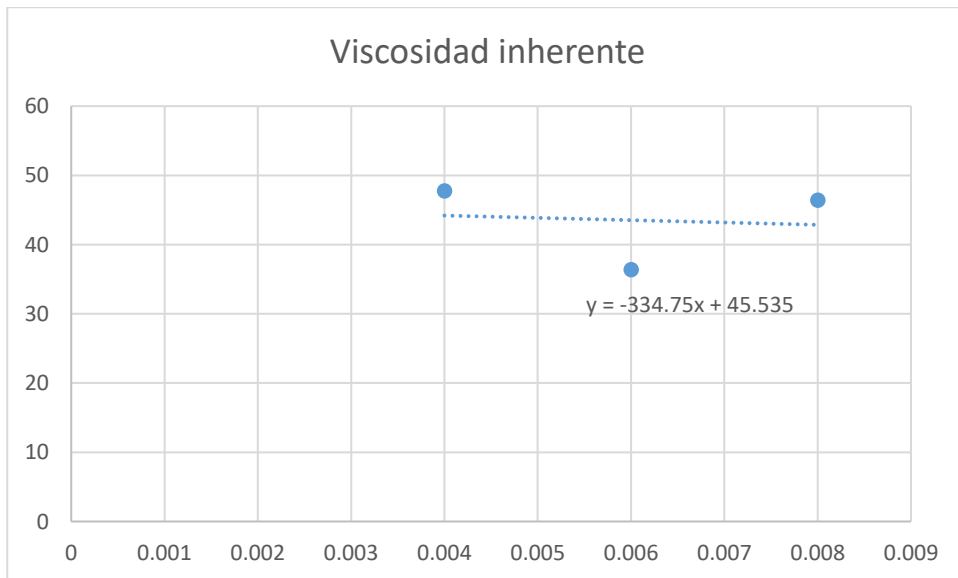


Figura A 2.-Extrapolación utilizando los datos de la viscosidad inherente.

Anexo B

Impresión 3D con PLA.

En la Figura B.1 se presenta como se visualizan ambos huesos utilizando el software para impresión 3D de la empresa Makerbot®.

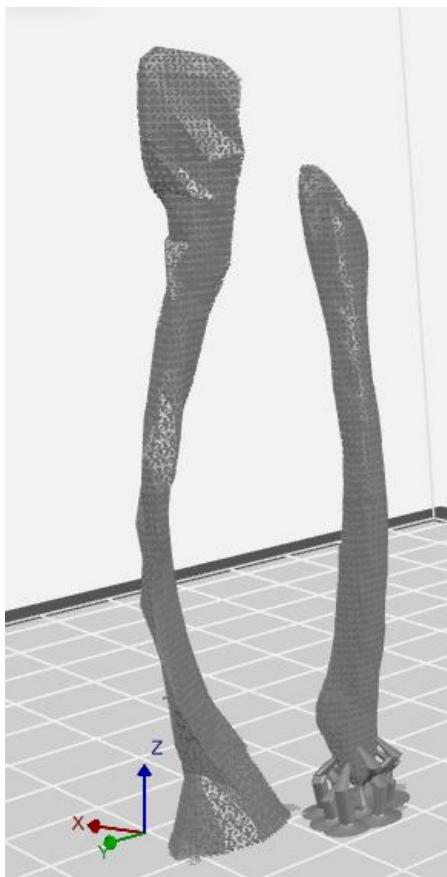


Figura B 1.-Visualización de las reconstrucciones de tibia y peroné.

En total para la creación de la tibia fueron generadas 406 capas, mientras que para la del peroné fueron 344, las dimensiones finales de ambas reconstrucciones son presentadas en la Tabla B.1.

Tabla B 1.-Dimensiones finales de las reconstrucciones

	Tibia(mm)	Peroné(mm)
Eje X	13.679	11.875
Eje Y	15.137	13.053
Eje Z	81.324	69.638

Con los parámetros establecidos en la Tabla B.1 localizada en la sección de metodología se lograron obtener impresiones homogéneas y replicables, se imprimieron 12 huesos en total 6 de tibia y peroné los cuales son mostrados en la Figura B.2.

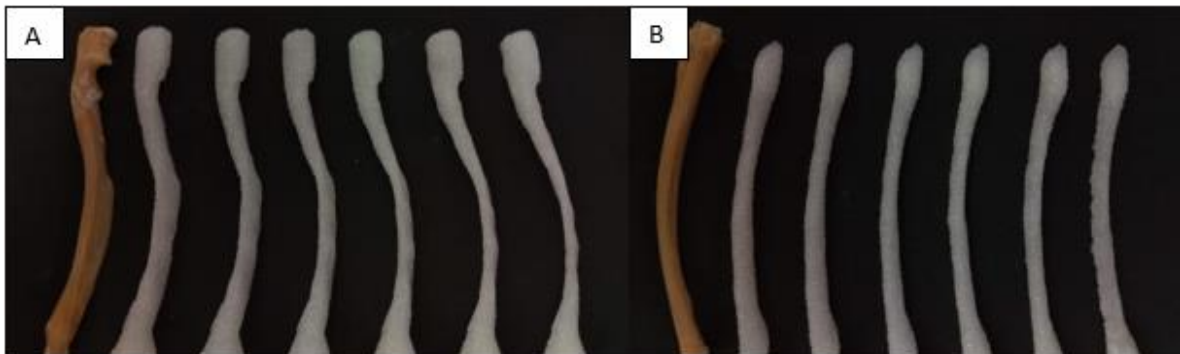


Figura B 2.-Impresiones con PLA A)Tibia, B)Peroné.



Figura B 3.-A) Huesos de tibia y peroné, B) Huesos reales e impresos.

En la Figura B.3 se muestra una foto comparativa en donde es posible visualizar a detalle los huesos originales y las reconstrucciones porosas obtenidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] G. J. Tortora and B. Derrickson, "El sistema esquelético: Tejido óseo," in *Principios de Anatomía y Fisiología*, 11th ed., Buenos aires: Editorial médica panamericana, 2006, pp. 173–196.
- [2] J. G. Sánchez, "Los huesos.," in *Bases Anatómicas Y Fisiológicas Para el Entrenamiento Deportivo*, 1st ed., vol. 1, Tenerife: lulu press, 2014, pp. 1–22.
- [3] L. M. Peinado Cortés, D. A. Garzón Alvarado, and R. P. Cárdenas Sandoval, "Proceso biológico del desarrollo epifisario:: aparición y formación del centro secundario de osificación," *Rev. Cuba. Ortop. y Traumatol.*, vol. 23, no. 2, pp. 1–25, 2009.
- [4] M. V. García and J. Reyes, "La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica," *Tip Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 9, no. 2, pp. 90–95, 2006.
- [5] P. Garcia florencio, "Tesis de Licenciatura: Estudio de la porosidad y la mineralización en el callo de Distracción Ósea," Universidad de Sevilla, Sevilla, 2017.
- [6] H. D. de M. Chaves Netto, S. Olate, M. das G. A. M. Chaves, J. R. de A. Barbosa, and R. Mazzone, "Análisis histológico del proceso de reparación en defectos óseos. Reconocimiento de defectos críticos," *Int. J. Morphol.*, vol. 27, no. 4, pp. 1121–1127, 2009.
- [7] A. Berner *et al.*, "Treatment of long bone defects and non-unions: From research to clinical practice," *Cell Tissue Res.*, vol. 347, no. 3, pp. 501–519, 2012.
- [8] N. Escudero Castaño, M. Perea García, J. Campo Trapero, and A. Bascones Martínez, "Regeneración ósea de un defecto circunferencial de tres paredes con hueso autólogo," *Av. en Periodoncia e Implantol. Oral*, vol. 20, no. 2, pp. 103–111, 2008.
- [9] E. Sachlos and J. T. Czernuszka, "Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds.," *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, pp. 29–40, 2003.

- [10] E. J. et al. Nassar, "Biomaterials and Sol-Gel Process: A Methodology for the Preparation of Functional Materials," in *Biomaterials Science and Engineering*, 1st ed., R. Pignatello, Ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2011, pp. 3–30.
- [11] G. M. Raghavendra, K. Varaprasad, and T. Jayaramudu, "Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications," *Nanotechnol. Appl. Tissue Eng.*, vol. 2, no. 11160073, pp. 21–44, 2015.
- [12] "Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds a strategy for tissue engineering," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed. ISSN*, vol. 28, no. 16, pp. 1797–1825, 2017.
- [13] U. E. Paulista, P. D. E. P. Em, and C. Biológicas, "Biomaterials and Manufacturing Methods for Scaffolds in regenerative Medicine: 2015," in *Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2nd ed., G. Khang, Ed. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd, 2017, pp. 1–54.
- [14] A. E. Viera Ruiz, "Tesis de Licenciatura: Obtención de andamios mediante la técnica de prototipado.," Instituto Tecnológico de Mérida, 2017.
- [15] P. pool Irma Merary, "Obtención de andamio bi-capa, PLLA-Gelatina con geometría hexagonal de poro para posible uso en quemaduras profundas," Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2018.
- [16] D. W. Hutmacher, T. Schantz, I. Zein, K. W. Ng, S. H. Teoh, and K. C. Tan, "Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 203–216, 2001.
- [17] M. Abedalwafa, F. Wang, L. Wang, and C. Li, "Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review," *Rev. Adv. Mater. Sci.*, vol. 34, no. 1, pp. 123–140, 2013.
- [18] G. Z. Tan and Y. Zhou, "Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: a review," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–14, 2019.
- [19] Y. Hu *et al.*, "Electrospun gelatin/PCL and collagen/PCL scaffolds for modulating

- responses of bone marrow endothelial progenitor cells,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 1, no. 1, pp. 3717–3726, 2019.
- [20] A. J. Abbushi, “Materiales Compuestos Basados en Brushita y Policaprolactona para Aplicación en Regeneración Ósea,” Universidad Complutense de Madrid, 2011.
- [21] R. Langer, “Polycaprolactone.pdf,” in *Biomaterials and biomedical engineering*, Second edi., Gary E. Wnek and Gary I. Bowlin, Eds. New York: Informa Healthcare, 2008, pp. 2197–2207.
- [22] V. Guarino, G. Gentile, L. Sorrentino, and L. Ambrosio, “Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications,” in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Third edit., New Jersey: John Wiley & Sons, 2017, pp. 1–36.
- [23] W. J. Hendrikson, J. Rouwkema, C. A. Van Blitterswijk, and L. Moroni, “Influence of PCL molecular weight on mesenchymal stromal cell differentiation,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 1, pp. 54510–54516, 2015.
- [24] H. Sun, L. Mei, C. S. Å, X. Cui, and P. Wang, “The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 1735–1740, 2006.
- [25] S. C. Woodward, P. S. Brewer, and F. Moatamed, “The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone),” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 437–444, 1985.
- [26] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, “The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, 2010.
- [27] A. Hamlekhan, F. Moztafzadeh, M. Mozafari, M. Azami, and N. Nezafati, “Preparation of laminated poly(ϵ -caprolactone)-gelatin-hydroxyapatite nanocomposite scaffold bioengineered via compound techniques for bone substitution,” *Biomatter*, vol. 1, no. 1, pp. 91–101, 2011.
- [28] J. M. Goddard and J. H. Hotchkiss, “Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 7, pp. 698–725, 2007.
- [29] C. González, “Tesis de Licenciatura: Mojabilidad, medición del ángulo de contacto por el método de la gota cautiva .,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.

- [30] F. J. M. Ruiz-Cabello, "Tesis Doctoral: Efecto de la rugosidad y heterogeneidad superficial en fenómenos de mojado," Universidad de Granada, 2009.
- [31] A. Dong, Han; Hua, Xu; Jia-Sheng, Dong, Guo-Xiong, Shen; Gang, Chai; Zhe-Yuan, yu; Wei-Jun, Lang; Song-Tao, "Rapid prototyped PGA/PLA scaffolds in the reconstruction of mandibular condyle bone defects," *Int. J. Med. Robot. Comput. Assist. Surg. MRCAS*, vol. 6, no. 1, pp. 66–72, 2009.
- [32] J. M. Sobral, S. G. Caridade, R. A. Sousa, J. F. Mano, and R. L. Reis, "Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 3, pp. 1009–1018, 2011.
- [33] M. Fimberger and F. Wiesbrock, "Microwave-assisted synthesis of polyesters and polyamides by ring-opening polymerization," *Adv. Polym. Sci.*, vol. 274, no. 1, pp. 149–182, 2014.
- [34] W. Y. Yeong *et al.*, "Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 6, pp. 2028–2034, 2010.
- [35] F. E. Wiria, K. F. Leong, C. K. Chua, and Y. Liu, "Poly- ϵ -caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering," *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–12, 2007.
- [36] N. P. Singh, A. K. Singh, A. K. Singh, U. Singh, and R. Kumar, "Hydrodynamically and thermally fully developed MHD flow between two horizontal parallel plates: Analysis with viscous dissipation and constant heat flux boundary conditions," *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. A - Phys. Sci.*, vol. 81, no. PART4, pp. 295–302, 2011.
- [37] H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai, and J. P. Vacanti, "A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 12, pp. 2077–2082, 2003.
- [38] A. Cipitria, A. Skelton, T. R. Dargaville, P. D. Dalton, and D. W. Hutmacher, "Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - A review," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 26, pp. 9381–9792, 2011.

- [39] G. J. Colmenares Roldán, Y. Quintero Martínez, L. M. Agudelo Gómez, L. F. Rodríguez Vinasco, and L. M. Hoyos Palacio, "Influence of the molecular weight of polymer, solvents and operational condition in the electrospinning of polycaprolactone," *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, no. 84, pp. 35–45, 2017.
- [40] G. E. Martín Pat and F. Hernández Sánchez, "Obtención y caracterización de un andamio a base de poli (caprolactona) y gelatina tipo A como posible material en regeneración de miocardio", Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2015.
- [41] L. A. Chi Uluac, "Obtención de un andamio bicapa mediante la técnica de electrohilamiento para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos de la piel," Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2015.
- [42] M. Moreno, M. H. Amaral, J. M. Sousa Lobo, and A. C. Silva, "Scaffolds for Bone Regeneration: State of the Art," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 22, no. 18, pp. 2726–2736, 2016.
- [43] K. F. Leong, C. M. Cheah, and C. K. Chua, "Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2363–2378, 2003.
- [44] Y. Tan, S. Cai, L. Liao, Q. Wang, and L. Liu, "Microwave-assisted Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Presence of Hydrogen Phosphonates," *Soc. Polym. Sci. Japan*, vol. 41, no. 10, pp. 849–854, 2009.
- [45] G. Gorrasi, D. Pappalardo, and C. Pellecchia, "Polymerization of ϵ -caprolactone by sodium hydride: From the synthesis of the polymer samples to their thermal, mechanical and barrier properties," *React. Funct. Polym.*, vol. 72, no. 1, pp. 752–756, 2012.
- [46] N. T. Nguyen, K. J. Thurecht, S. M. Howdle, and D. J. Irvine, "Facile one-spot synthesis of highly branched polycaprolactone," *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 8, pp. 2997–3008, 2014.
- [47] J.-G. Joseph, "Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 17, no. 1, pp. 474–478, 2006.

- [48] D. P. Bhattarai, L. E. Aguilar, C. H. Park, and C. S. Kim, "A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering," *Membranes (Basel)*, vol. 8, no. 3, 2018.
- [49] Y. Zhu, C. Gao, X. Liu, and J. Shen, "Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells," *Biomacromolecules*, vol. 3, pp. 1312–1319, 2002.
- [50] D. A. Abreu Rejón, "Estudio del efecto del grado de entrecruzamiento de gelatina electrohilada en su resistencia a la degradación.," Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2017.
- [51] C. X. F. Lam, M. M. Savalani, S. H. Teoh, and D. W. Hutmacher, "Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: Accelerated versus simulated physiological conditions," *Biomed. Mater.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–15, 2008.
- [52] A. Tissue and D. Stem, "Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo," vol. 28, no. 3, pp. 879–889, 2010.
- [53] I. P. Perpétuo, L. E. Bourne, and I. R. Orris, "Chapter 2: isolation and generation of osteoblasts.pdf," in *Bone Research Protocols*, A. I. Idris, Ed. Sheffield, 2019, pp. 21–38.
- [54] C. Pineda Molina and C. Londoño Peláez, "Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico," *Rev. Ing. Biomédica*, vol. 3, no. 5, pp. 58–65, 2009.
- [55] B. Delorme and P. Charbord, "Cells, Culture and characterization of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem," in *Methods in Molecular Medicine Tissue Engineering*, Second edi., H. Hauser and M. Fussenegger, Eds. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007, pp. 67–81.
- [56] I. R. Dégano, "Análisis del comportamiento de combinaciones de células troncales y biomateriales mediante un procedimiento de imagen fotónica no invasivo .," Universidad Autónoma de Barcelona, 2008.
- [57] T. Osswald, "Determination of Polymers Thermal Degradation by Color Change

Analysis,” *Ingeniería*, vol. 21, no. 1, pp. 19–30, 2016.

- [58] X. Fang, C. D. Simone, E. Vaccaro, S. J. Huang, and D. A. Scola, “Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactam and ϵ -caprolactone via microwave irradiation,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 40, no. 14, pp. 2264–2275, 2002.
- [59] A. Duda, S. Penczek, A. Kowalski, and J. Libiszowski, “Polymerizations of ϵ -caprolactone and L,L-dilactide initiated with stannous octoate and stannous butoxide - A comparison,” *Macromol. Symp.*, vol. 153, no. 1, pp. 41–53, 2000.
- [60] H. R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, and C. Boettcher, “Polylactones: 31. Sn(II)octoate-initiated polymerization of L-lactide: a mechanistic study,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 36, no. 6, pp. 1253–1259, 1995.
- [61] G. Odian, “Chapter 7: Ring-Opening Polymerization.pdf,” in *Principles of polymerization*, Fourth., New Jersey: John Wiley & Sons, 2004, pp. 544–618.
- [62] D. W. Van Krevelen, *Properties of polymers*, Fourth Edi. Amsterdam: Elsevier, 2009.
- [63] M. Monsalve, J. M. Contreras, E. Laredo, and F. López-Carrasquero, “Ring-opening copolymerization of (R,S)- β -butyrolactone and ϵ -caprolactone using sodium hydride as initiator,” *Express Polym. Lett.*, vol. 4, no. 7, pp. 431–441, 2010.
- [64] J. Miguel, J. Javier, J. Miguel, and J. Javier, “Aspectos de la polimerización bajo irradiación microonda de ϵ -caprolactona, usando hidruro de sodio como iniciador,” *Cienc. e Ing.*, vol. 34, no. 2, pp. 73–80, 2013.
- [65] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, and P. Dumas, “FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 273, no. 1, pp. 381–387, 2004.
- [66] J. C. Cañadas Lorenzo, “Tesis Doctoral: Estudio del efecto de la cristalización fría y del envejecimiento físico en las relajaciones de los polímeros mediante la técnica de corrientes estimuladas térmicamente,” Politècnica de catalunya, 2008.
- [67] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z. M. Huang, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, “Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 47, no. 8, pp. 2911–2917, 2006.

- [68] Y. Zhu, C. Gao, and J. Shen, "Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility," *Biomaterials*, vol. 23, no. 24, pp. 4889–4895, 2002.
- [69] G. Bracco and B. Holst, "Contact Angle and Wetting Properties," in *Surface Science Techniques*, First Edit., vol. 51, no. 1, B. Holst and G. Bracco, Eds. Berlin: Springer, 2013, pp. 1–34.
- [70] J. E. Báez, "Poli(ϵ -caprolactona), un polímero degradable: síntesis por triisopropóxido de aluminio $\text{Al}(\text{OiPr})_3$ como iniciador," *Educ. Química*, vol. 4, no. 17, pp. 458–463, 2006.
- [71] L. M. Orozco-Castellanos, A. Marcos-Fernández, and A. Martínez-Richa, "Hydrolytic degradation of poly(ϵ -caprolactone) with different end groups and poly(ϵ -caprolactone-co- γ -butyrolactone): Characterization and kinetics of hydrocortisone delivery," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 22, no. 4, pp. 430–436, 2011.
- [72] Z. Huang, E. R. Nelson, R. L. Smith, and S. B. Goodman, "The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors to osteoblasts in vitro," *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 9, pp. 2311–2320, 2007.
- [73] C. A. Gregory, W. G. Gunn, A. Peister, and D. J. Prockop, "An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction," *Anal. Biochem.*, vol. 329, no. 1, pp. 77–84, 2004.
- [74] M. Osmond, S. M. Bernier, M. B. Pantcheva, and M. D. Krebs, "Collagen and collagen-chondroitin sulfate scaffolds with uniaxially aligned pores for the biomimetic, three dimensional culture of trabecular meshwork cells," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 114, no. 4, pp. 915–923, 2017.