



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tesis:

**"Evaluación biológica *in vitro* de biomateriales de PLA-PCL-nHA
aplicables a la regeneración de tejidos óseos"**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Médica Cirujana y Partera
Rosalba Flores Macías

Dirección de tesis:
Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Edith Higareda Mendoza



Morelia, Michoacán,
México
Agosto 2017

El Comité Tutoral designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo aprobó la tesis presentada por:

Médica Cirujana y Partera
ROSALBA FLORES MACÍAS

PhD
Virginia Angélica Robinson Fuentes

Doctor en Biotecnología de Plantas
Gerardo Vázquez Marrufo

Doctor en Investigación Biomédica Básica
Marco Aurelio Pardo Galván

Doctora en Ciencias Químico Biológicas
Martha Eva Viveros Sandoval

La Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia
del CONACyT

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez” de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
agradece al CONACyT la beca que le fue otorgada
durante la realización de su tesis.

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

Laboratorio de Biología Celular Humana

Dirección de Tesis:

Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Edith Higareda Mendoza

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia y rodearme de personas que contribuyeron a mi crecimiento profesional y personal.

A la D. en C. Ana Higareda Mendoza por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo y de su vida, por compartir sus conocimientos, experiencia y orden, pero sobre todo gracias por su gran paciencia y protección.

Al D. en C. Marco Aurelio Pardo Galván por mostrarme lo apasionado que es el mundo de la investigación, por enseñarme a pensar y ordenar mis ideas, por preocuparse por mi crecimiento intelectual y personal. Gracias por esas largas charlas que parecían no tener fin pero sí mucho aprendizaje.

A la D. Virginia Angélica Robinson y el D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo por formar parte de mi comité tutorial y ayudarme a enriquecer mi trabajo y ver más allá de mis perspectivas.

A la D. en C. la D. en C. Martha Eva Viveros por su gran carisma y atención y por acceder a formar parte de mi comité revisor.

A Dulce y Areli. Dulce gracias por capacitarme y apoyarme el tiempo que estuviste con nosotros, por hacerme reír con tu poni satánico y tu rudeza. Areli gracias por tu gran apoyo, por ser tan dictadora y por todos los momentos de risas y enojos que pasamos. Solecitos, gracias por su amistad.

A Héctor y Aneth, por formar parte de este viaje y aguantar mis horas de desplante.

DEDICATORIA

A mi hermano Roberto Flores Macías† por enseñarme a nunca darme por vencida y ver la vida de otra manera. Siempre estarás en mi corazón.

A mis papás Roberto y Hermila por siempre alentarme a seguir mis sueños y ser mejor persona cada día, por enseñarme a ser perseverante y responsable. Gracias por ser mis padres.

A Nancy, hermana gracias por apoyarme en cada paso que doy y por todos los momentos que hemos pasado y por darme la oportunidad de tener momentos inolvidables al lado de Santi. Gracias a él por recordarme lo simple y hermosa que es la vida, por su inocencia y sabiduría.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN	1
II MARCO TEÓRICO	3
2.1 Hueso, función y estructura.....	3
2.2 Remodelado óseo.	6
2.3 Fracturas por osteoporosis.....	8
2.4 Terapias de reparación ósea.....	10
2.5 Ingeniería de tejidos.....	11
2.6 Biomateriales.	14
2.7 Técnicas de fabricación de andamios.	16
2.8 Antecedentes. Andamios de PLA/PCL/HA.....	21
III JUSTIFICACIÓN.	24
IV HIPÓTESIS.....	24
V OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo general.	25
5.2 Objetivos específicos.	25
VI MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 Andamios a evaluar.	26
6.2 Modelo acelular.....	26
6.3 Modelo celular.....	26
6.4 Síntesis y preparación de los andamios.....	27

6.5 Caracterización acelular de los andamios.....	28
6.6 Análisis biológicos.....	30
6.7 Análisis estadístico.....	34
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	35
7.1 Síntesis de andamios.....	35
7.2 Caracterización acelular de los andamios.....	39
7.3 Análisis biológicos.....	47
VIII CONCLUSIONES.	55
IX PERSPECTIVAS.	56
X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estructura del hueso	4
2. Células óseas.....	5
3. Remodela óseo.	6
4. Reabsorción ósea.	8
5. Pirámide poblacional México.....	10
6. Triada de la regeneración ósea.....	12
7. Técnicas para la fabricación de andamios porosos.....	17
8. Técnica de disolución y colada con liberación de partículas.	18
9. Fusión de granos de sal.	19
10. Técnica de electrohilado.....	20
11. Determinación del porcentaje de humedad con carta psicométrica.	35
12. Determinación del tiempo de incubación para la fusión de NaCl.	37
13. Imágenes MEB. Caracterización de andamios.....	39
14. Tamaño de poros y porcentaje de porosidad.	40
15. Mapping. Distribución de nHA sobre la superficie de los andamios.	41
16. Determinación de pH en agua destilada.....	43
17. Determinación de pH en PBS.....	44
18. Imágenes de MEB. Bioactividad.....	46
19. Porcentaje de adhesión celular.	48
20. Proliferación celular.	48

21. Adhesión celular MEB.	49
22. Expresión de colágeno.	50
23. Actividad fosfatasa alcalina.	51
24. Mineralización relativa. Tinción con rojo de alizarina.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

I. Características ideales de los andamios	13
II. Ventajas y desventajas de los biomateriales	16

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
BMU	Basic multicelular units
CO ₂	Dióxido de carbono
CSF	Factor estimulante de colonias
EDS	Espectroscopía de energía dispersa
HA	Hidroxiapatita
IGF-I y II	Factor análogo a la insulina I y II
IOF	International Osteoporosis Foundation
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
MEM- α	Medio Esencial Mínimo α
N	Normal
NaCl	Cloruro de sodio
nHA	Nanohidroxiapatita
nm	Nanómetros
mL	Mililitro
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Solución salina amortiguadora
PCL	Policaprolactona
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PLA	Ácido poliláctico
RANKL	Receptor activador del factor ligando nuclear $\kappa\beta$
SBF	Fluido corporal simulado
SFB	Suero fetal bovino
TGF- β	Factor transformante del crecimiento β
U.M.S.N.H	Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
μm	Micrómetros
w/w	Peso/peso
3D	Tridimensional

RESUMEN

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra en constante formación y reabsorción durante toda la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo. Este proceso se ve alterado por patologías en las que predomina la reabsorción sobre la capacidad regenerativa del hueso. Dentro de éstas se encuentra la osteoporosis, enfermedad metabólica ósea más frecuente, que constituye un problema de salud pública a nivel mundial, debido a las fracturas que ocasiona. El estándar de oro de tratamiento de las fracturas es el autoinjerto, sin embargo, la poca disponibilidad y la morbilidad asociada limitan su uso, por lo que se han ideado nuevas estrategias en las que la reparación del daño sea guiada. La bioingeniería de tejidos busca el desarrollo de materiales sintéticos bioactivos para el reemplazo de tejido óseo y que permitan la regeneración ósea guiada, lo cual implica que el material deberá tener una función temporal, ser reabsorbible y sustituirse progresivamente por tejido neoformado. Así, para lograr un estudio completo de regeneración ósea guiada se requiere de la caracterización fisicoquímica y de la evaluación biológica de los distintos biomateriales. **Objetivo general:** Evaluar *in vitro* la biodegradabilidad, biocompatibilidad, osteoinductividad y osteoconductividad de biomateriales de PLA-PCL-nHA diseñados como andamios de regeneración ósea. **Materiales y métodos:** Se utilizaron compositos polímero/cerámico: PLA/PCL: 3/7 w/w con 0, 5 y 10 % de nanohidroxiapatita (nHA). Para la evaluación acelular y celular de los andamios se utilizó fluido corporal simulado y preosteoblastos (línea celular MC3T3-E1), respectivamente. Se fabricaron los andamios mediante la técnica de disolución y colada con liberación de partículas, previa fusión del agente porógeno. Se realizaron las pruebas de azul de alamar, determinación de colágeno, fosfatasa alcalina y tinción de los depósitos de calcio para determinar el estímulo que ejercen los biomateriales sobre la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como en la mineralización ósea. **Resultados.** Se estandarizó la técnica disolución y colada con liberación de partículas y se fabricaron los andamios a las concentraciones establecidas. Las pruebas acelulares mostraron que los productos de degradación no modifican el pH del PBS y que la nHA mejoró la bioactividad de los polímeros. En las pruebas celulares se observó que los andamios con 10% de nHA promueven mejor la diferenciación celular. **Conclusiones.** Se estandarizó la técnica de disolución y colada con liberación de partículas, previa fusión de agente porógeno, para sintetizar andamios porosos tridimensionales interconectados de PLA/PCL con 0, 5 y 10% de nHA. Los andamios de PLA/PCL/10% nHA presentan mejores propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoconductividad y osteoinductividad que aquellos que tienen menores concentraciones de nHA.

Palabras clave: hueso, ingeniería de tejidos, regeneración ósea, biomateriales, compositos.

ABSTRACT

Bone is a dynamic tissue that is constantly in formation and resorption throughout life, but it is only until the third decade that the balance is positive. This process is altered by pathologies in which resorption predominates over the regenerative capacity of the bone. These include osteoporosis, the most frequent metabolic bone disease, which is a public health problem worldwide, due to the fractures it causes. The gold standard for treating fractures is autograft, however, poor availability and associated morbidity limit their use, so new strategies have been devised in which damage repair is guided. The bioengineering of tissues seeks the development of bioactive synthetic materials for the replacement of bone tissue and that allow the guided bone regeneration, which implies that the material must have a temporary function, be resorbable and be replaced progressively by neoformed tissue. Thus, to achieve a complete study of guided bone regeneration requires the physicochemical characterization and biological evaluation of the different biomaterials. Objective: To evaluate *in vitro* the biodegradability, biocompatibility, osteoinductivity and osteoconductivity of PLA-PCL-nHA biomaterials designed as bone regeneration scaffolds. Materials and methods: Polymer / ceramic composites: PLA / PCL: 3/7 w / w with 0, 5 and 10% nanohydroxyapatite (nHA) were used. For the acellular and cellular evaluation of the scaffolds, simulated body fluid and preosteoblasts (cell line MC3T3-E1) were used, respectively. The scaffolds were manufactured using the technique of dissolution and casting with particle release, after fusion of the porogen. Alamar blue tests, determination of collagen, alkaline phosphatase and staining of calcium deposits were performed to determine the biomaterials' stimulation on cell adhesion, proliferation and differentiation, as well as on bone mineralization. Results. The technique of dissolution and casting with particle release was standardized and the scaffolds were manufactured at the established concentrations. Acellular tests showed that the degradation products did not modify the pH of the PBS and that the nHA improved the bioactivity of the polymers. In cell tests it was observed that scaffolds with 10% nHA promote cell differentiation better. Conclusions. The technique of dissolution and casting with particle release, prior porogen fusion, was standardized to synthesize interconnected three-dimensional pore scaffolds of PLA / PCL with 0, 5 and 10% nHA. The scaffolds of PLA / PCL / 10% nHA have better biocompatibility, biodegradability, osteoconductivity and osteoinductivity properties than those with lower concentrations of nHA.

Key words: bone, tissue engineering, bone regeneration, composite biomaterials.

I INTRODUCCIÓN

Durante toda la vida, los huesos se encuentran en un constante proceso equilibrado de remodelado el cual se ve afectado por diferentes factores como la edad, traumatismos, neoplasias o patologías que comprometen la capacidad regenerativa del hueso. La patología más frecuente a nivel mundial que causa una disminución de la densidad ósea es la osteoporosis, la cual afecta principalmente a mujeres después de la menopausia o, de manera general, a hombres y mujeres después de los 50 años. Su importancia clínica radica en las fracturas que ocasiona y a las consecuencias asociadas a éstas. A nivel mundial produce 8.9 millones de fracturas al año, de las cuales 4.5 ocurren en América Latina y Europa. Se ha estimado que una de cada tres mujeres y uno de cada 5 hombres mayores de 50 años experimentarán una fractura debido a la osteoporosis. Dentro de las consecuencias que ocasionan se encuentran dificultad para caminar, dolor, y dependencia de terceros creando así una pérdida en la calidad de vida de las personas que la padecen.

Actualmente existen una variedad de alternativas terapéuticas para reparar los defectos óseos que incluye el uso de prótesis con materiales que recuperan la función mecánica del hueso y los injertos, entre ellos el estándar de oro es el uso de autoinjertos. Sin embargo, todos presentan características que limitan su función, que van desde la falta de integración al tejido hospedero de los injertos, la poca posibilidad de cubrir grandes defectos por los autoinjertos y el riesgo de transmisión de enfermedades o de crear reacciones inmunes severas con los aloinjertos y xenoinjertos.

Es por ello que surge la necesidad de buscar alternativas terapéuticas que permitan la restauración del daño óseo a través del uso de materiales que permitan la formación de tejido nuevo. En este campo, la ingeniería de tejidos óseos ha desarrollado andamios que se integran adecuadamente al tejido hospedero, son biodegradables y no causan reacciones inflamatorias severas; sin

embargo, el enfoque actual de esta área está en el buscar compositos que permitan, además de las características antes mencionadas, la diferenciación celular hacia un fenotipo controlado. Es por ello que es un campo amplio de investigación.

II MARCO TEÓRICO

2.1 Hueso, función y estructura.

El hueso es un tejido conjuntivo duro mineralizado que se encuentra en constante remodelado. Sus principales funciones son proteger órganos vitales, dar soporte para la movilidad del cuerpo, almacenar iones como calcio y fósforo, regular el pH y, mediante la hematopoyesis llevada a cabo en la médula ósea, sintetizar células óseas y sanguíneas (Alvarez, 2009; Velasco *et al.*, 2015).

Los huesos constituyen el componente central del sistema musculo esquelético y consisten de tejido óseo, médula ósea, endostio, periostio, cartílago, nervios y canales vasculares. De acuerdo a su estructura se distinguen dos tipos de hueso, el cortical o compacto (80%) y el trabecular o esponjoso (20%). **Figura 1.** El hueso cortical, presente principalmente en los huesos largos, está formado por laminillas óseas dispuestas de manera concéntrica alrededor de los conductos de Havers. Por otro lado, en el esqueleto axial prevalece el hueso trabecular en donde las laminillas se disponen en forma de red que delimitan cavidades que alojan a la médula ósea. El hueso trabecular es metabólicamente más activo que el cortical, sirve como reservorio de calcio y fósforo para la homeostasis mineral (Velasco *et al.*, 2015; Evia, 2011; Post *et al.*, 2010).

El tejido óseo está compuesto de células (5-10%) que se encuentran embebidas en una matriz extracelular la cual está compuesta de minerales (60%), proteínas (30%) y agua (5%). La fase mineral del hueso está formada principalmente por calcio, fosfato y carbonato en forma de cristales de hidroxiapatita y, en menor proporción, por magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. Estos minerales dotan al hueso de dureza, rigidez y le brindan resistencia a las fuerzas de compresión. Aproximadamente el 90% de la matriz orgánica u osteoide está compuesta de colágeno, del cual el 95% corresponde a colágeno tipo I y el 5% al tipo V. Éste le brinda al hueso resistencia a la tracción y flexibilidad. El resto de las

proteínas no colágenas corresponde a glicoproteínas (osteocalcina, osteonectina y fibronectina), proteoglicanos (condroitín, queratán sulfato) y citoquinas (Evia, 2011; Bernabéu *et al.*, 2006).

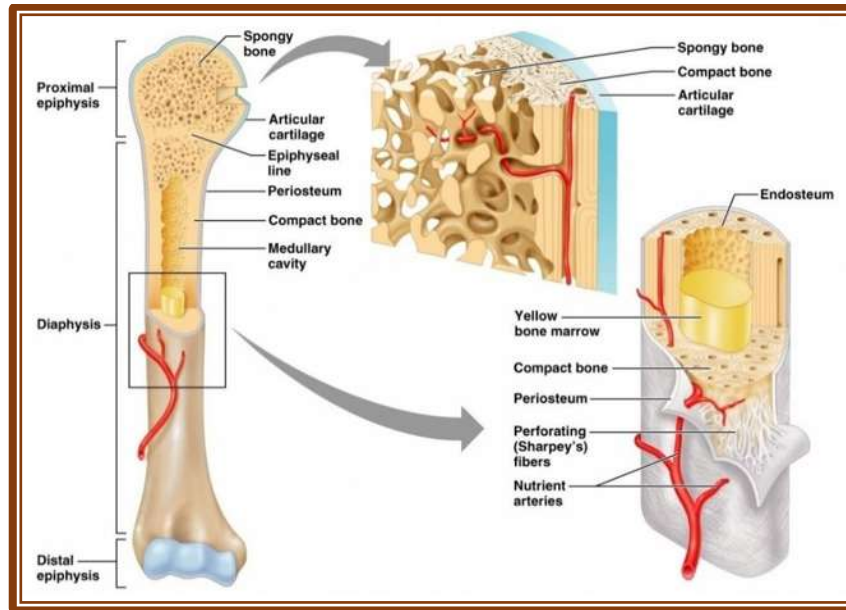


Figura 1. Estructura del hueso. (<https://humananatomywiki.com>)

Las células óseas derivan de dos líneas celulares, células madre hematopoyéticas en el caso de los osteoclastos y células madre mesenquimales en el de los osteoblastos y osteocitos (Alghazali *et al.*, 2015). **Figura 2.**

Los osteoclastos (100 μ m) son responsables de la reabsorción ósea. Para ello, se adhieren a la matriz mineral mediante su borde en cepillo, en donde liberan protones generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas que acidifican el pH, permitiendo así la reabsorción del hueso a través de la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después (Alghazali *et al.*, 2015).

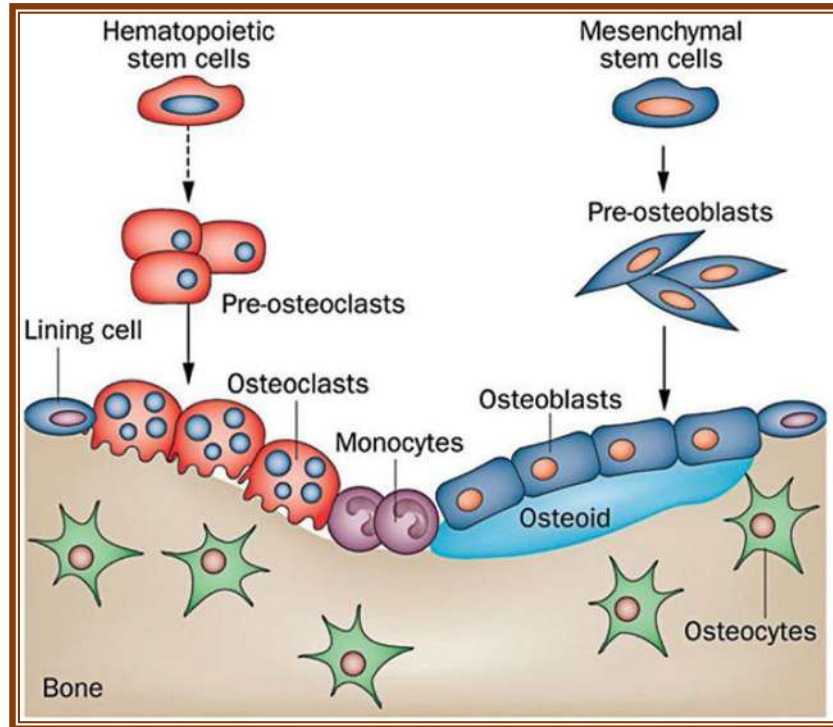


Figura 2. Células óseas. (Alghazali *et al.*, 2015)

Los osteoblastos (20-30 μm) sintetizan las proteínas de la matriz orgánica y regulan la deposición de los minerales a través de las proteínas no colágenas. Durante su diferenciación van expresando proteínas específicas que pueden utilizarse como marcadores osteogénicos. La primera evidencia de diferenciación osteogénica es la expresión del factor de transcripción Runx2 que alcanza niveles máximos en el preosteoblasto. El osteoblasto completamente diferenciado se caracteriza por expresar fosfatasa alcalina y colágeno tipo I. Al término de su vida media, que es de 1 a 10 semanas, los osteoblastos pueden sufrir apoptosis o transformarse, ya sea en células limitantes o en osteocitos, al quedar atrapados en la matriz mineral. Estos últimos son las células más abundantes del hueso y representan el estadio final de diferenciación de los osteoblastos. Tienen una forma estrellada con múltiples prolongaciones que les permite detectar las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción, y así controlar el remodelado óseo. Las células limitantes,

de forma elongada y plana, constituyen junto con el endostio una capa protectora de la superficie del hueso que participa en la activación del remodelado óseo. (Alghazali *et al.*, 2015; Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

2.2 Remodelado óseo.

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra en constante formación y reabsorción de manera equilibrada. Este proceso de remodelación permite mantener el volumen óseo, reparar el daño tisular y conservar la homeostasis del metabolismo del fósforo y calcio. En el adulto, se renueva cada año un 5% del hueso cortical y un 20% del trabecular, debido a que la superficie del hueso trabecular es mayor en comparación con la del cortical (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b).

El remodelado óseo se lleva a cabo en la superficie ósea en unidades básicas multicelulares o BMU (basic multicellular units) las cuales comprenden a los osteoclastos, osteoblastos y osteocitos dentro de la cavidad de remodelación ósea. Consta de 6 fases consecutivas denominadas: activación, reabsorción, reversa, formación, mineralización y quiescente (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b). **Figura 3.**

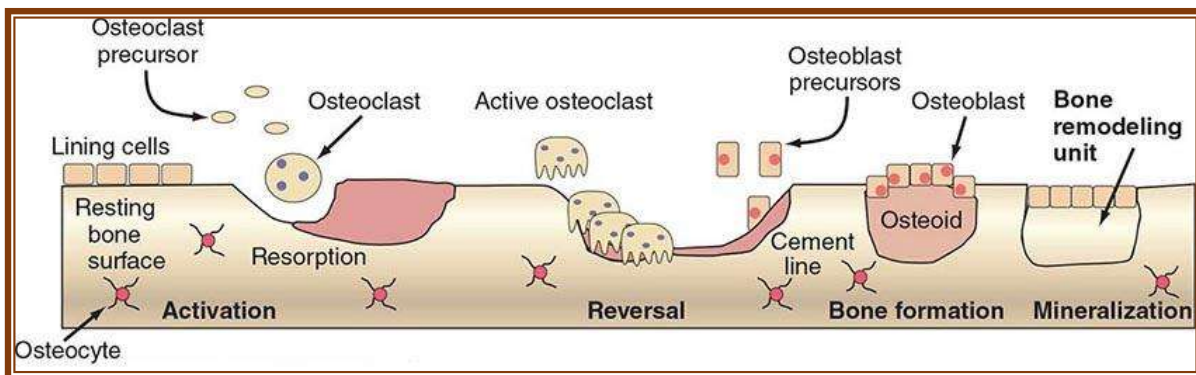


Figura 3. Remodelado óseo. (Bringhurst *et al.*, 2005).

En la primera fase se activa la superficie ósea que se encuentra en quiescencia mediante la retracción de las células limitantes y de la digestión de la membrana endostial por colagenasas, además se atraen al sitio preosteoblastos los cuales al

diferenciarse se adhieren a la matriz ósea a través de integrinas para comenzar la fase de reabsorción. Tanto la fase de activación como la de reabsorción se encuentran reguladas por la relación entre el receptor activador del factor ligando nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG), interleucinas 1 y 6, factor estimulante de colonias (CSF), hormona paratiroidea, 1,25-dihidroxitamina D y calcitonina. En la fase de reabsorción los osteoclastos primero disuelven la matriz mineral, mediante la liberación de iones hidrógeno a través de la bomba de protones ATPasa y canales de cloro al compartimento de reabsorción, acidificando el pH; y, posteriormente, a través de la secreción de fosfatasa ácida tártraro resistente, catepsina K, metaloproteínasa 9 y gelatinasa, los osteoclastos digieren la matriz osteoide formando en el hueso trabecular lagunas de Howship y en el cortical los conductos de Havers. **Figura 4.** Dicho proceso es terminado por macrófagos durante la fase reversa y permite la liberación de factores de crecimiento que se encuentran en la matriz, principalmente factor transformante del crecimiento β (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor análogo a la insulina I y II (IGF-I y II), que actúan sobre preosteoblastos como quimiotácticos y además estimulan su proliferación para dar inicio a la fase de formación. En esta fase los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante en donde se va a adherir el tejido nuevo. Una vez diferenciados en osteoblastos, comienzan a sintetizar la sustancia osteoide que rellena el área reabsorbida. Treinta días después comienza el proceso de mineralización, el cual finaliza a los 130 días en el hueso cortical y 90 días en el hueso trabecular; tras esto, el hueso regresa a un estado quiescente o de reposo (Clarke, 2008; Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b; Eriksen, 2010).

Este proceso de remodelada dura toda la vida, sin embargo, es hasta los 30 años que el balance es positivo, después se mantiene con pequeñas variaciones hasta los 50 años. A partir de aquí predomina la reabsorción y la masa ósea comienza a disminuir. En este proceso de desequilibrio, en el que la pérdida ósea supera la capacidad regenerativa del sistema, también participan factores mecánicos o traumáticos, procesos infecciosos, alteraciones hormonales, genéticas, vasculares, nutricionales, neoplasias, entre otras patologías (Suárez, 2012).

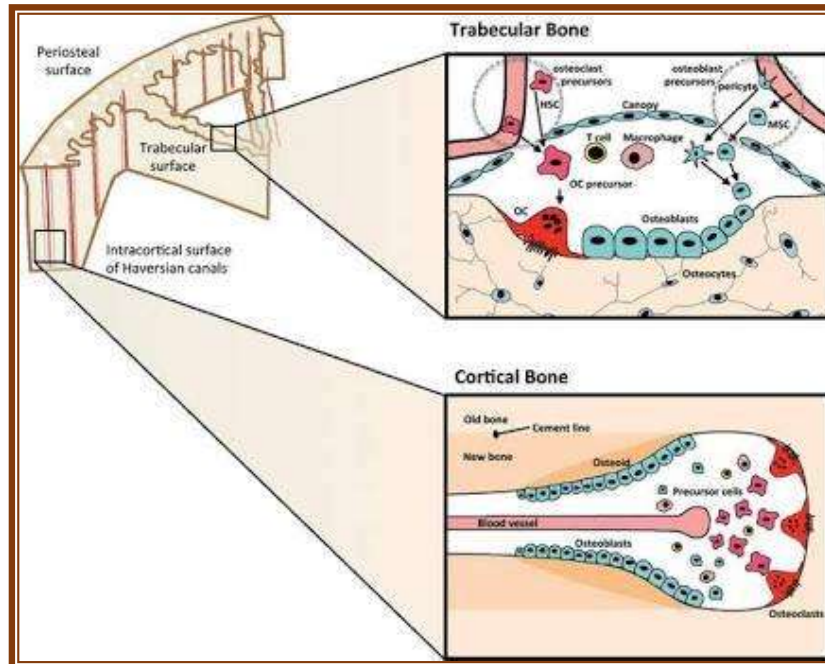


Figura 4. Reabsorción ósea. Formación de las lagunas de Howship y conductos de Havers. (Sims y Martin, 2014)

2.3 Fracturas por osteoporosis.

La osteoporosis, desorden común del remodelado óseo que constituye un problema de salud a nivel mundial, es la enfermedad metabólica más frecuente caracterizada por una masa ósea baja y deterioro estructural del hueso que causa aumento de la fragilidad ósea y susceptibilidad a las fracturas. (Guía de Práctica clínica; Peña *et al.*, 2015).

Su importancia clínica reside en las fracturas, consideradas como la mayor complicación de la osteoporosis, y las consecuencias que conlleva. En relación a las fracturas, los huesos que más frecuentemente sufren de éstas son el radio en su extremo distal, el fémur y húmero en el extremo proximal, y vértebras, debido a

que tienen mayor cantidad de tejido óseo esponjoso (Bracho, 2015). Datos de la International Osteoporosis Foundation (IOF) muestran que a nivel mundial se producen más de 8.9 millones de fracturas anualmente debidas a la osteoporosis, de las cuales, 4.5 ocurren en América Latina y Europa. Se estima que una de cada tres mujeres y uno de cada 5 hombres mayores de 50 años experimentarán una fractura por osteoporosis (IOF).

Dentro de las complicaciones que ocasionan estas fracturas se incluyen la dificultad para caminar, la dependencia de terceros, la deformidad, el dolor y los problemas psicosociales, que van desde la depresión hasta la disminución de la autoestima; las cuales llevan a una pérdida de la calidad de vida de las personas que la padecen. Las fracturas de cadera están asociadas con una mortalidad del 8 al 36% en el primer año, además, el 20% de los pacientes con esta fractura requerirán cuidados de enfermería, 10% quedan dependientes y sólo el 40% podrán recuperar completamente sus actividades habituales (Bracho, 2015; Cosman *et al.*, 2014).

En México y en el mundo, durante los últimos años, la población adulta ha venido incrementado debido al aumento en la calidad de vida y a la disminución del número de muertes por procesos infecciosos, por lo que la pirámide poblacional se está invirtiendo. **Figura 5.** Esto se encuentra acompañado por un proceso de transición epidemiológica en el que predominan las enfermedades crónico-degenerativas, lo que explica el aumento en la frecuencia de la osteoporosis y fracturas debido a ésta (Lucio *et al.*, 2012; Clark *et al.*, 2010). Para el año 2050 se estima que en América Latina las fracturas de cadera en personas de 50 a 64 años incrementarán un 400%, mientras que en mayores de 65 años en un 700% (IOF).

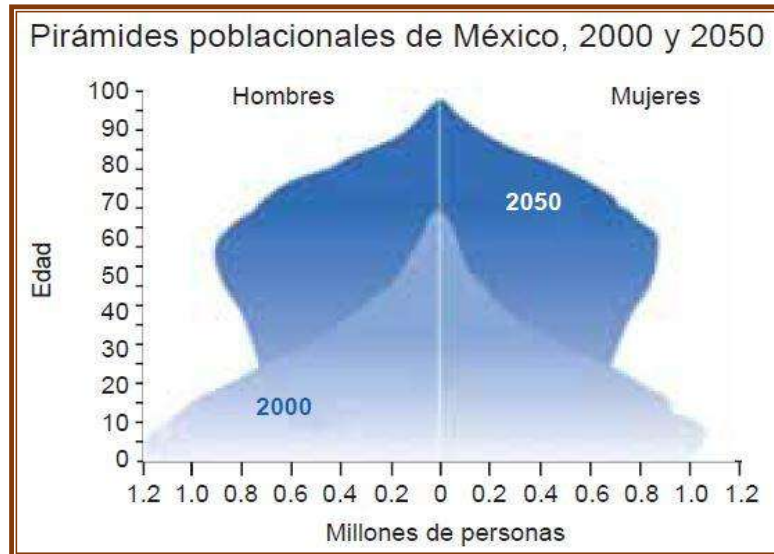


Figura 5. Pirámide poblacional de México. (Lucio *et al.*, 2012).

2.4 Terapias de reparación ósea.

La primera terapia empleada para reparar las lesiones óseas como las fracturas consiste en la implantación de prótesis hechas a base de materiales, como titanio y cementos óseos, que son capaces de restablecer el funcionamiento mecánico de los huesos. Sin embargo, ésta conlleva una serie de efectos secundarios que limitan su efectividad. Entre éstos se encuentran la falta de osteointegración, el desgaste del tejido circundante por las fuerzas de roce durante el movimiento, la fractura del implante y/o la infección posquirúrgica. Esto condujo a la búsqueda de otras terapias y es así como surgió el uso de injertos (Alvarez, 2009). Los autoinjertos consisten en fragmentos de tejido óseo obtenidos de una zona sana del paciente e implantados en el área afectada. Aunque son considerados el estándar de oro de trasplante óseo, por no generar respuestas inmunes y por integrarse bien, sus desventajas restringen su aplicación clínica, como lo es la poca disponibilidad para cubrir grandes defectos y la morbilidad de la región donadora (Alvarez, 2009; Khan y Ahmad, 2013). Por otro lado, los aloinjertos, que son fragmentos de tejido óseo obtenido de otro sujeto de la misma especie, tienen

una alta posibilidad de integrarse al huésped si son tratados adecuadamente, no obstante persiste el riesgo de transmisión de enfermedades, infección y rechazo (Alghazali *et al.*, 2015). Los xenoinjertos, fragmentos obtenidos de una especie diferente, son materiales de relleno osteoconductor inerte que sirven como andamios para la formación de hueso nuevo; empero poseen un alto potencial de generar reacciones inmunes severas y transmitir enfermedades (Alvarez, 2009; Liu y Kerns, 2014).

Para combatir las desventajas presentadas por los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, se ha desarrollado la ingeniería de tejidos óseos como alternativa terapéutica que produce implantes biocompatibles que pueden recuperar la funcionalidad del área afectada mediante la inducción de la formación de nuevo tejido (Alvarez, 2009; Stevens *et al.*, 2008).

2.5 Ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos se define como un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida para desarrollar sustitutos biológicos que se encargan de restaurar, mantener o mejorar la función tisular (Baino *et al.*, 2015). La ingeniería de tejidos óseos busca desarrollar implantes biomiméticos para reparar los huesos y guiar su regeneración hasta recuperar su funcionalidad. Los tres componentes básicos de la ingeniería tisular son células, andamios y moléculas bioactivas que, juntos, se conocen como la triada de la ingeniería de tejidos (Murphy *et al.*, 2013). **Figura 6.** Esta estrategia consiste en la extracción de una biopsia de tejido autólogo para aislar y expandir las células *in vitro*, las cuales posteriormente son sembradas en una matriz tridimensional o andamio con factores de crecimiento que intentan simular la matriz extracelular, para finalmente ser implantado en el área afectada y así estimular la regeneración ósea (Sabir *et al.*, 2009; Alvarez, 2009).

El proceso de ingeniería de tejidos comienza con la fabricación de un andamio, el cual es un elemento esencial en esta área, que se puede definir como una matriz tridimensional porosa que soporta la adhesión, proliferación y diferenciación

celular hacia un fenotipo osteoblástico para así promover la regeneración *in vitro* e *in vivo*. (Thavornyutikarn *et al.*, 2014).

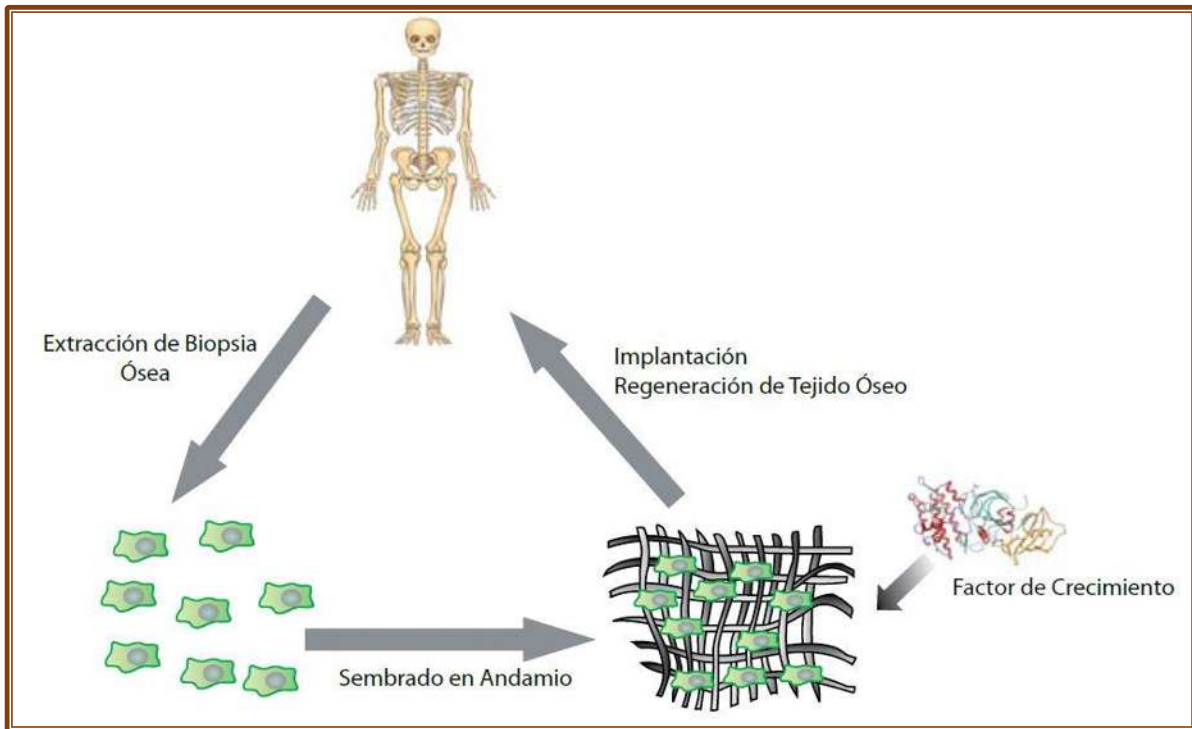


Figura 6. Triada de la regeneración ósea. (Alvarez, 2009).

Estos andamios deben cumplir con características que los hacen ideales para poder desempeñar su función, las cuales deben ser tomadas en consideración al momento de ser fabricados. Estas características (que se muestran en la **Tabla I**) dependen de la naturaleza de los biomateriales y del proceso de fabricación.

Tabla I. Características ideales de los andamios.

CRITERIO	DESCRIPCIÓN
<i>Biocompatibilidad</i>	Integración adecuada al tejido hospedero sin producir efectos tóxicos o respuesta inmune.
<i>Osteoinductividad</i>	Proceso mediante el cual se reclutan células madre y osteoprogenitoras en el sitio a regenerar, estimuladas para diferenciarse hacia la línea osteogénica.
<i>Osteoconductividad</i>	Los andamios deben actuar como soporte estructural que permitan la adhesión, proliferación y diferenciación de las células.
<i>Biodegradabilidad</i>	La degradación debe ser a un ritmo que permita la deposición de tejido nuevo para que, cuando la lesión esté totalmente regenerada, el andamio se haya degradado totalmente; además, los productos de degradación no deben ser tóxicos.
<i>Propiedades mecánicas</i>	Los andamios deben soportar la carga según el sitio donde serán implantados.
<i>Estructura porosa</i>	Deben ser altamente porosos y tener poros entre los 100 y 500 μm , interconectados para permitir la difusión de nutrientes y gases, remoción de desechos metabólicos y la vascularización.
<i>Fabricación</i>	Su fabricación debe ser fácil, reproducible y de bajo costo para su comercialización.

*Nota. Para la realización de esta tabla se hizo una revisión de varios artículos: Estrada *et al.*, 2006; Velasco *et al.*, 2015; Bains *et al.*, 2015; Thavornnyutikarn *et al.*, 2014.

2.6 Biomateriales.

Los biomateriales se pueden definir como un material que, solo o como parte de un sistema complejo, interactúa con sistemas biológicos para evaluar, tratar o reemplazar cualquier función, tejido u órgano. Dentro de los biomateriales que pueden ser utilizados para la fabricación de andamios se encuentran tres grupos, las cerámicas, los polímeros sintéticos y naturales, y sus composites (O'brien, 2011; Thavornnyutikarn *et al.*, 2014).

Los materiales cerámicos incluyen de manera general a los fosfatos de calcio y biovidrios; de éstos, los más utilizados son los fosfatos de calcio debido a que son osteoinductivos, es decir, permiten la proliferación y diferenciación osteoblástica; bioactivos, debido a su habilidad de formar en su superficie apatita ósea o hidroxiapatita carbonatada; y biocompatibles porque forman enlaces fuertes y estables entre el hueso y la interface del biomaterial. No obstante, cuentan con propiedades mecánicas bajas que los hacen frágiles, además no son moldeables y su ritmo de degradación no es controlable, lo que restringe su uso en la ingeniería de tejidos por sí solas (O'brien, 2011; Velasco *et al.*, 2015).

La hidroxiapatita (HA) es el fosfato de calcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) más utilizado para la fabricación de andamios debido a su estructura similar a la fase mineral del hueso, a su excelente biocompatibilidad y osteoconductividad. Sin embargo, sus aplicaciones clínicas en la ingeniería de tejidos son limitadas debido a sus propiedades mecánicas bajas y su lenta degradación (Baino *et al.*, 2015; Thavornnyutikarn *et al.*, 2014).

Los polímeros pueden ser de origen natural, como el colágeno, o sintéticos. Los primeros generalmente no causan reacciones inflamatorias ya que son biocompatibles, sin embargo, tienen propiedades mecánicas pobres y un alto ritmo de degradación, incluso persiste el riesgo de crear reacciones inmunes y transmitir enfermedades debido a cualquier impureza que haya quedado en el material durante el proceso de obtención, por lo que se limita su utilidad dentro de la ingeniería de tejidos (Stevens, 2008; Ozdil y Aydin, 2014).

Además de ser biocompatibles y biodegradables, los polímeros sintéticos en comparación con los naturales, tienen la ventaja de que su ritmo de degradación puede ser controlable variando la cantidad de polímero, sus propiedades mecánicas son reproducibles y predecibles, y pueden ser fabricados con formas y tamaños moldeables. Dentro de sus desventajas se encuentran el riesgo de rechazo debido a su baja bioactividad y el generar reacciones inflamatorias por sus productos de degradación, que son ácidos (Thavorniyutikarn *et al.*, 2014).

Los polímeros sintéticos más utilizados son los poliésteres, como el ácido poliláctico (PLA) y la policaprolactona (PCL), que se degradan mediante hidrólisis en productos metabólicos naturales. El PLA es de interés para la ingeniería de tejidos debido a su excelente biocompatibilidad *in vivo* y buena osteoinductividad, a esto se le añade que tiene un bajo índice de degradación con buenas propiedades mecánicas, por lo que es útil para la aplicación de grandes cargas (Velasco *et al.*, 2015; Thavorniyutikarn *et al.*, 2014; Ozdil y Aydin, 2014). Por otro lado, la PCL tiene propiedades similares al PLA, pero con un ritmo de degradación más lento (2-3 años) debido a su alta cristalinidad y propiedades mecánicas inferiores. La PCL tiene la habilidad de promover el crecimiento osteoblástico y mantener su fenotipo, es decir, es osteoconductor, por lo que se ha utilizado como implantes a largo plazo (Velasco *et al.*, 2015; Thavorniyutikarn *et al.*, 2014).

Para superar las limitantes de cada material por separado se han fabricado composites que combinan las mejores características de los diferentes materiales y alcanzar un efecto sinérgico entre éstas (Liu *et al.*, 2013). En un intento por imitar el hueso se están desarrollando composites polímero/cerámico, ya que combinan la osteoinductividad de los fosfatos de calcio con las propiedades mecánicas, degradabilidad y control de las características geométricas de los polímeros (Velasco *et al.*, 2015). Además, el agregar cerámicas bioactivas a una fase polimérica no sólo se contrarresta la baja bioactividad de los polímeros sino que también neutraliza los productos de degradación ácidos de los polímeros. (Thavorniyutikarn *et al.*, 2014; Stevens, 2008).

Las ventajas y desventajas de las cerámicas, los polímeros sintéticos PLA y PCL, y los compositos se muestran de manera resumida en la **Tabla II**.

Tabla II. Ventajas y desventajas de los biomateriales. (Modificado de Thavornyutikarn *et al.*, 2014).

BIOMATERIAL	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Polímeros sintéticos PLA PCL	Biocompatibles Biodegradables Buen procesamiento	Reacción inflamatoria por los productos ácidos de degradación Propiedades mecánicas limitadas Biodegradabilidad lenta
Fosfatos de calcio HA	Excelente biocompatibilidad Osteoconductividad	Frágiles Degradación lenta
Compositos	Excelente biocompatibilidad Osteoconductividad Degradación controlable Propiedades mecánicas mejoradas	Aún no son como la matriz natural del hueso Fabricación compleja

2.7 Técnicas de fabricación de andamios.

Para la fabricación de andamios se han desarrollado varios métodos, los cuales se han clasificado en dos categorías que incluyen las técnicas de fabricación convencional y prototipado rápido, también llamada técnica de fabricación sólida de forma libre (Thavornyutikarn *et al.*, 2014). Dentro de la primeras encontramos aquellas técnicas que nos permiten obtener andamios porosos, mediante el uso de agentes porógenos y fibras. Ejemplos de técnicas que permiten la fabricación de andamios porosos incluyen disolución y colada con liberación de partículas, saturación con gas, extracción congelante y separación de fases. **Figura 7.** De manera general, en esta categoría se utilizan materiales sólidos disueltos, a los

que se les incorporan porógenos para posteriormente procesar las mezclas según la técnica y finalmente remover los porógenos mediante evaporación o disolución. (Nigam y Mahanta, 2014).

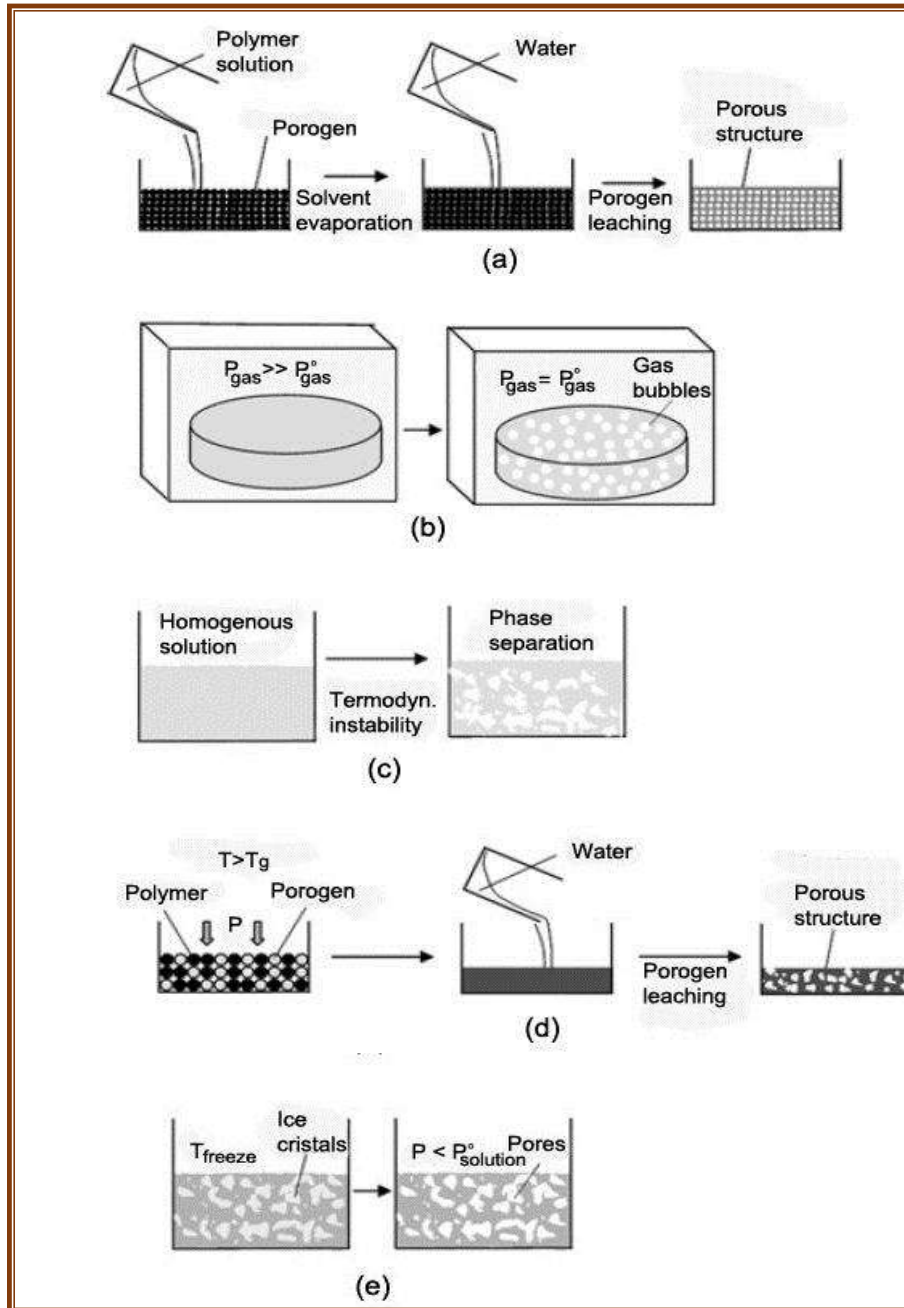


Figura 7. Técnicas para la fabricación de andamios porosos. a) disolución y colada con liberación de partículas b) formación de espumas por saturación con gas, c) separación de fases, d) proceso de moldeo, e) extracción congelante. (Modificado de Zhu y Chen, 2013)

La técnica de disolución y colada con liberación de partículas consiste en colocar una solución de polímero en un molde que contenga cualquier sal soluble como cloruro de sodio (NaCl) o citrato de sodio, posteriormente se deja evaporar el solvente quedando atrapados los cristales de la sal empleada en el polímero. La sal es eliminada sumergiendo los moldes en agua el tiempo necesario hasta que se disuelva por completo. **Figura 8.** Éste es un método simple y fácil que permite obtener andamios 3D al controlar el tamaño de los poros y la porosidad en base al tamaño de las partículas de sal y las concentraciones de sal/polímero utilizadas. Sin embargo, controlar la interconexión de los poros es una de las principales desventajas de éste método, a esto se le agrega una geometría de poros irregular y variación en los tamaños de éstos (Mallick *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2002).

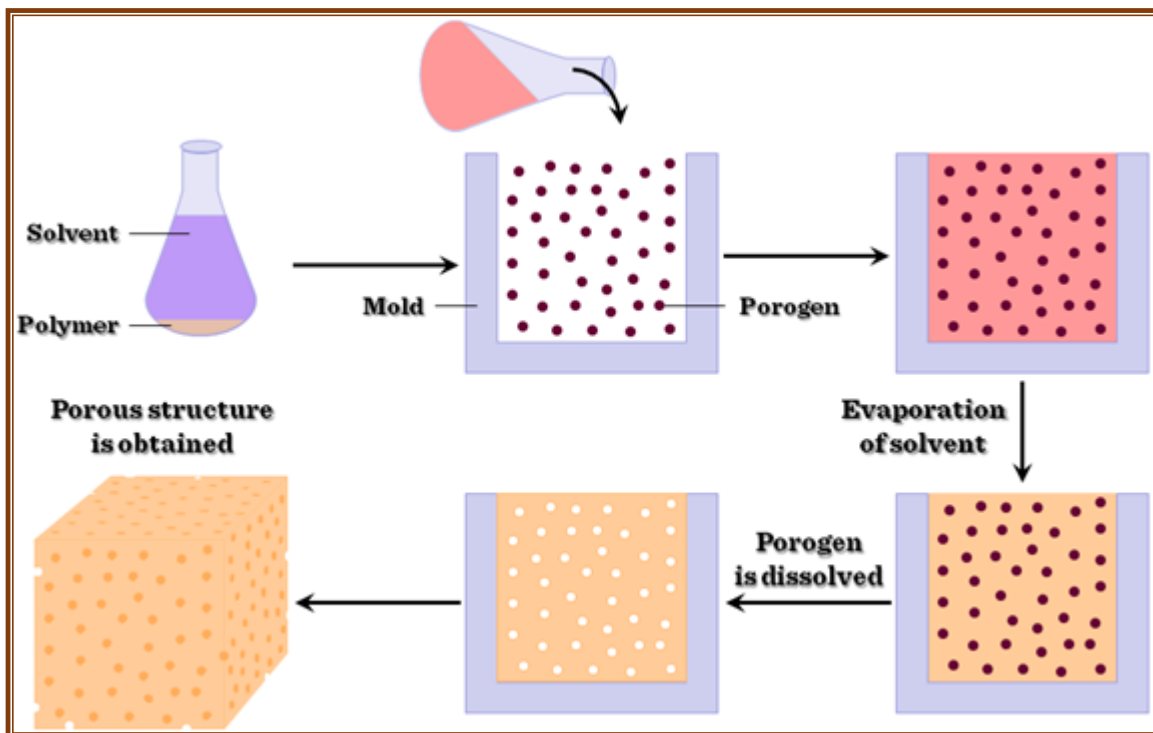


Figura 8. Técnica de disolución y colada con liberación de partículas (Bartys y Pongrácz, 2011).

Para superar las limitaciones de la técnica descrita, Murphy (2002) propone fusionar los cristales de NaCl sometiéndolos a 95% de humedad durante un periodo de 0 a 24 horas, permitiendo una mejor interconexión de poros. Este ambiente provoca cambios en la estructura de los granos de sal, en los que se resaltan el aumento de la curvatura de los bordes y esquinas de cada grano de sal, favoreciendo la formación de puentes entre éstos en sus puntos de contacto (Murphy *et al.*, 2002). **Figura 9.**

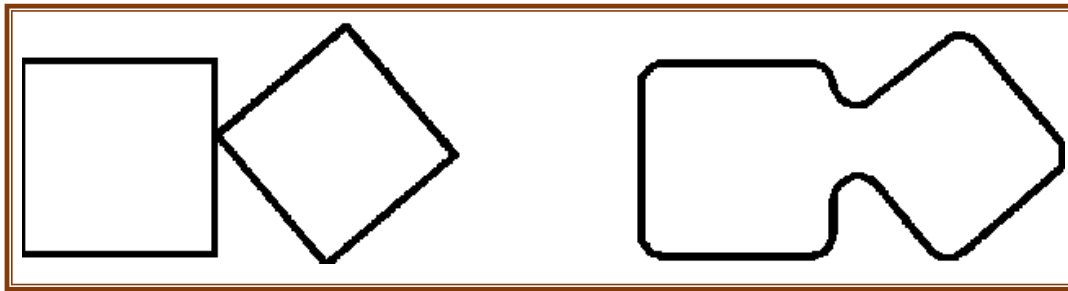


Figura 9. Fusión de granos de sal. Izquierda, sal aún no sometida a humedad. Derecha, cambios estructurales de los granos posterior a 95% de humedad (Murphy *et al.*, 2002).

El electrohilado, otro método convencional, es una técnica que utiliza voltaje eléctrico para producir fibras de una solución de polímero, como se observa en la **Figura 10**. Esta técnica permite la fabricación de varios patrones de fibras con diámetros que van de los nanómetros a los micrómetros, que proveen de una gran área de superficie. En el contexto de la ingeniería de tejidos se limita su uso debido a que los poros que genera son pequeños, impidiendo la infiltración de células, generación de nuevo tejido y vascularización. Las células, por consecuencia, quedan en la superficie del electrohilado y las respuestas del tejido en donde es implantado sólo se llevan a cabo en la periferia de estas fibras (Bhardwaj y Kundu, 2010; Bencherif *et al.*, 2013).

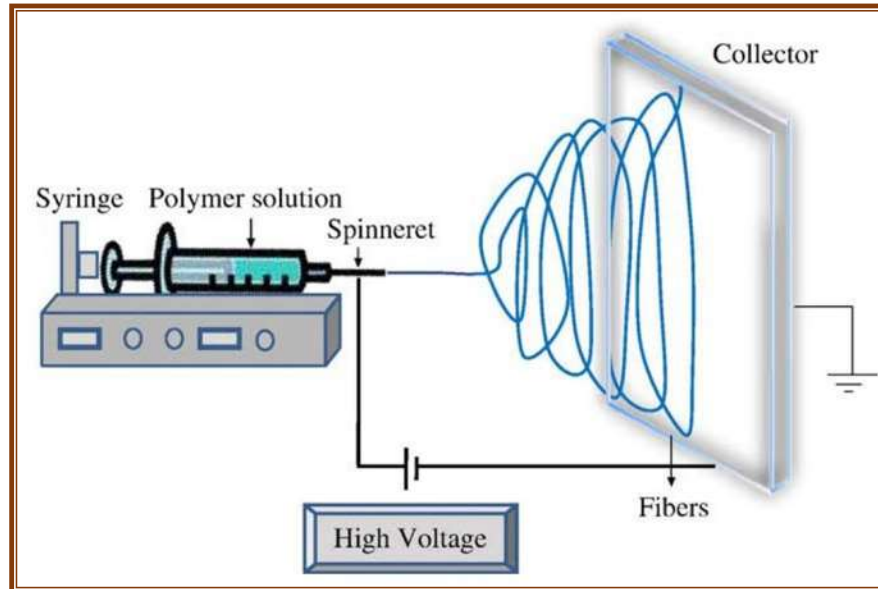


Figura 10. Técnica de electrohilado. (Bhardwaj y Kundu, 2010).

En el prototipado rápido se utilizan estrategias de fabricación en capas para crear andamios con características personalizadas desde un modelo 3D generado por computadora. Tiene las ventajas de poder controlar la distribución y tamaño de los poros, así como la pared del material; sin embargo, requiere de instalaciones específicas y tiene ciertas limitaciones en cuanto a la estructura tridimensional y el tamaño de poro (Bencherif *et al.*, 2013).

Cada técnica le confiere características especiales a los andamios fabricados, desde su arquitectura interna, como el tamaño de poro y su distribución, la porosidad, la interconectividad y hasta sus propiedades mecánicas. Por lo que, al momento de elegir el método más adecuado para fabricar un andamio, es necesario conocer las características que brindan dichas técnicas y las demandas específicas del tejido a tratar (Thavornnyutikarn *et al.*, 2014).

2.8 Antecedentes. Andamios de PLA/PCL/HA.

La tercera generación de andamios busca construir materiales que no sólo sean biocompatibles y biodegradables, sino que también promuevan la diferenciación a un fenotipo controlado de las células, es decir, que sean osteoinductivos. En un intento de imitar la matriz extracelular del tejido óseo es que en los últimos años ha venido un creciente incremento en la fabricación de andamios hechos a base de composites, para aprovechar las ventajas de cada material y reunirlos en un sólo andamio (Polo *et al.*, 2014; Baino *et al.*, 2015). Entre estos materiales, y por las características previamente descritas, se encuentra la hidroxiapatita y los polímeros sintéticos de policaprolactona y ácido poliláctico. Composites a base de éstos ya han sido fabricados con diferentes técnicas y estudiados con diferentes enfoques. No obstante, se debe recordar que la técnica a elegir deberá diseñar andamios con las características deseadas y, en el caso de la ingeniería de tejidos óseos, se busca construir andamios tridimensionales porosos e interconectados aunado a las demás características que los convierten en ideales para llevar a cabo su función, guiar la regeneración ósea.

En un primer trabajo realizado en el 2010 por Fang y colaboradores, se fabricaron andamios mediante electrohilado a base de PCL/PLA/HA con las mismas concentraciones de polímeros (1:1 peso/peso o w/w, por sus siglas en inglés) y concentraciones crecientes de HA. Como control utilizaron andamios de PCL/PLA 1:1 w/w. Lograron obtener nanofibras con estructura porosa y superficie rugosa que favoreció la adhesión y proliferación celular, siendo significativamente más alta en los composites con HA en comparación con aquellos andamios de PCL/PLA.

Otro estudio realizado en el 2011, mediante la técnica de electrohilado se fabricaron andamios con concentraciones de PCL/PLA de 8/4 w/w sin y con 20% de nanohidroxiapatita (nHA). En sus conclusiones describen que los andamios con nHA y con medio osteogénico mejoran la osteogénesis de las células y que, por lo tanto, puede ser propuesto como un relleno en defectos óseos (Bakhshandeh *et al.*, 2011).

Liao y colaboradores (2012) fabricaron membranas de PLA/PCL 1/1 w/w sin y con 10 y 20% de nHA mediante electrohilado. Como resultados obtuvieron que, a mayor porcentaje de nHA, los andamios presentan mayor porosidad y menor hidrofobicidad, parámetros que mejoraron la degradación de las membranas ya que los productos de degradación no mostraron ser citotóxicos para las células madre aisladas de tejido adiposo.

En el mismo año, Wu y colaboradores (2013) sintetizaron compositos de nanofibras, mediante la técnica extracción congelante combinada con la lixiviación de partículas, con PLA/PCL 70/30 w/w sin y con 20% de nHA. Estos compositos fueron sumergidos en fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés) para determinar su bioactividad, concluyendo que la nHA mejoró la actividad biológica de los compositos.

En el 2015 se llevó a cabo un estudio de degradación hidroelectrolítica a largo plazo con compositos de PLA/PCL 80/20 y 20/80 w/w sin y con 20% de nHA, elaborados con la técnica extracción congelante con lixiviación de partículas. Los participantes concluyeron que los productos de la hidrólisis no modifican el pH; además, que los andamios de PLA/PCL 20/80 con nHA mostraron mejores propiedades mecánicas y menor degradación (Rodenas *et al.*, 2015).

Finalmente se hizo un estudio donde se evaluó la bioactividad de nanofibras electrohiladas de PLA/PCL disueltos a diferentes concentraciones con y sin HA. De acuerdo a sus datos, los compositos con HA y en medio osteogénico presentan una excelente bioactividad (Qi *et al.*, 2016).

En la mayoría de los trabajos descritos hasta el momento, en el que sintetizan compositos de PLA/PCL/HA, utilizan el electrohilado. Los estudios realizados sobre estos compositos, independientemente de la técnica de fabricación utilizada, se dirigen hacia la evaluación de la degradabilidad, bioactividad y osteoinductividad; sin embargo, las primeras dos características se puede decir que están bien demostradas por los grupos de trabajo, en cambio, queda aún inconcluso el estudio de la capacidad de los compositos de estimular la

osteogénesis ya que los pocos trabajos enfocados a ésta lo realizan estimulando con medio osteogénico a las células, por lo que no se puede concluir que el material por sí solo induzca a la diferenciación celular.

Con esto queda en claro que, hasta el momento no se ha encontrado el material que cumpla con todos los requisitos necesarios, razón por la cual, la ingeniería de tejidos es un campo amplio de investigación.

III JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento de la población adulta y a la transición epidemiológica que la está acompañando, es que se ha visto un incremento en las enfermedades crónico-degenerativas como la osteoporosis. Ésta representa un problema de salud pública a nivel mundial debido a las fracturas y consecuencias que ocasiona. Para su tratamiento, actualmente las terapias cuentan con varias limitaciones, por lo que es necesario desarrollar y estudiar biomateriales que permitan estimular y conducir la regeneración ósea.

IV HIPÓTESIS

Los andamios con composiciones PLA/PCL (3/7 w/w) y 10% de nHA presentan diferencias significativas en sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoinducción y osteoconducción que aquellos que contienen menos proporción de nHA.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Evaluar *in vitro* la biodegradabilidad, biocompatibilidad, osteoinductividad y osteoconductividad de biomateriales de PLA/PCL/nHA diseñados como andamios de regeneración ósea.

5.2 Objetivos específicos.

1. Sintetizar y realizar la caracterización acelular de andamios de PLA/PCL/nHA.
2. Realizar estudios de viabilidad, citotoxicidad, adhesión y proliferación celular de preosteoblastos expuestos a andamios de PLA/PCL/nHA.
3. Validar el proceso de diferenciación osteogénico de preosteoblastos expuestos a andamios de PLA/PCL/nHA.
4. Identificar la o las composiciones que presenten diferencias significativas en sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoinducción y osteoconducción.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Andamios a evaluar.

Compositos polímero cerámico de ácido poliláctico-policaprolactona-nanohidroxiapatita (PLA-PCL-nHA) a concentraciones de PLA/PCL 3/7 w/w con 0, 5 y 10% de nHA en relación al peso de la mezcla polimérica. Para su síntesis se empleó la técnica disolución y colada con liberación de partículas y previa fusión de agente porógeno.

Se utilizó ácido poliláctico granulado GOODFELLOW, policaprolactona 45 000 de peso molecular en forma de pellets y hidroxiapatita en nanopolvo con una tamaño de partícula de <200 nm (Sigma Aldrich). Como disolvente se manejó el cloroformo y como agente porógeno el cloruro de sodio con tamaños entre 140 y 400 μm . Los moldes fueron de teflón con 1 cm de alto y 9 mm de diámetro interno.

6.2 Modelo acelular.

Para evaluar la bioactividad de los andamios a través de la formación de hidroxiapatita (HA) se utilizó la solución de Kokubo (se disuelven en 900 mL de H_2O : 7.996 g de NaCl, 0.350 g de NaHCO_3 , 0.224 g de KCl, 0.228 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.305 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 87.28 mL de HCl 35.4%, 0.278 g de CaCl_2 , 0.071 g Na_2SO_4 , 6.057 g $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$; se ajusta el pH a 7.25 con HCl y se afora a 1 L), también llamada fluido corporal simulado (SBF). La solución se preparó de acuerdo a lo establecido por Kokubo y Takadama (2006).

6.3 Modelo celular.

Se utilizó la línea celular de preosteoblastos de ratón (*Mus musculus*) MC3T3-E1 subclona 4 (ATCC CRL-2593) bajo condiciones de proliferación. Esta línea celular se caracteriza por tener un crecimiento adherente con morfología fibroblástica; exhibe altos niveles de diferenciación en medios de cultivo que contienen ácido

ascórbico y fosfato inorgánico, formando una matriz extracelular bien mineralizada después de 10 días (Wang *et al.*, 1999).

6.4 Síntesis y preparación de los andamios.

6.4.1 Síntesis de andamios con la técnica disolución y colada con liberación de partículas y previa fusión de agente porógeno.

Para la síntesis de los andamios se siguió la técnica disolución y colada con liberación de partículas modificada por Murphy (2002). De acuerdo a ésta, los moldes con NaCl se someten a 95% de humedad por periodos de 0 a 24 horas para fusionar los cristales de NaCl y así garantizar la interconexión de los poros. Después se continúan con los pasos de la técnica normal en donde los polímeros se disuelven en cloroformo con agitación durante 8 horas por separado y la nHA se sonica por 15 minutos antes de agregarse a la solución de polímeros. Posteriormente la solución, que se mantiene siempre en agitación, se agrega a los moldes que contienen la sal. A continuación se deja evaporar el cloroformo en un cuarto a temperatura ambiente durante 24 horas, se desmoldan las muestras y finalmente se hacen lavados continuos con agua destilada estéril para eliminar el agente porógeno y así obtener los andamios tridimensionales.

Para someter los cristales de NaCl a humedad se utilizó una incubadora (ThermoForma) sin eyección de CO₂. Se determinaron las condiciones necesarias para alcanzar la humedad requerida de 95%. Para ello se utilizó la carta psicométrica que permite establecer el porcentaje de humedad con las temperaturas de un bulbo seco y uno húmedo. Primero se colocaron dos litros de agua destilada estéril en una charola dentro de la incubadora y dos termómetros, uno con una gasa húmeda envolviendo al bulbo. Después, sin abrir la incubadora, se tomaron las temperaturas cada hora y se determinó el porcentaje de humedad con la carta sicométrica hasta que se obtuvo el 95% de humedad.

Una vez alcanzada la humedad, se estableció el tiempo necesario para que los cristales se fusionaran adecuadamente y así obtener andamios tridimensionales con poros interconectados. Se siguieron los pasos que a continuación se

describen. Se sintetizaron andamios de PLA sometiendo los cristales de NaCl a 95% de humedad durante 2, 4, 8, 12, 16, 20, 22 y 24 horas. Se observaron al microscopio electrónico de barrido (MEB) para determinar el tamaño de poro, la porosidad y la interconexión y así fijar las horas adecuadas para obtener los andamios con las características requeridas.

Una vez establecidas todas las condiciones, se procedió a elaborar los andamios con las diferentes composiciones.

6.4.2 Preparación del biomaterial.

Previo a su uso, en las pruebas de degradación, bioactividad y pruebas celulares, los biomateriales fueron esterilizados siguiendo el protocolo que a continuación se menciona: se colocaron los andamios en tubos cónicos de 14 mL por separado, se agregó la cantidad suficiente para recubrir los andamios de etanol al 70% durante 6 horas. Transcurrido el tiempo y bajo condiciones de esterilidad se retiró el etanol, se lavaron tres veces con agua tridestilada estéril y se pasaron a cajas de Petri estériles destapadas, en donde se dejaron secando por más de 8 horas en campana de flujo laminar y con luz ultravioleta. Se almacenaron en esterilidad hasta su uso.

6.5 Caracterización acelular de los andamios.

6.5.1 Morfología por MEB.

Para evaluar la interconexión, distribución y tamaño de poro, así como las características de superficie y distribución de partículas de nHA, los andamios fueron observados en el MEB del Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la U.M.S.N.H. Para ello, los andamios se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol al 25, 50, 75 y 98 % durante 10 minutos respectivamente, repitiendo el procedimiento con etanol al 98%. Se retiró el etanol y se dejaron secar en campana de flujo laminar por más de 8 horas. Una vez deshidratadas, las muestras fueron recubiertas con cobre por el personal técnico adjunto al Instituto para hacerlas conductoras. Además de las microfotografías, se realizó un análisis de espectroscopia de energía dispersa (EDS, por sus siglas en inglés) para

analizar la composición elemental de las muestras y “mapping” para determinar la distribución de la nHA sobre el andamio.

6.5.2 Porosidad.

Se utilizó el programa Image J para determinar la porosidad de los andamios. Para ello se utilizaron las imágenes captadas en el MEB y se siguió las recomendaciones del programa para su análisis.

6.5.3 Degradación de los andamios y su efecto en el pH.

Los andamios estériles se sumergieron en agua destilada estéril en tubos cónicos de 50 mL durante un mes, por cuadruplicado cada andamio. Se dejaron en condiciones de esterilidad en campana de flujo de laminar durante este tiempo. Para determinar el grado de degradación se tomaron dos muestras de cada composito cada 7 días (la primera semana un par de cada andamio, la segunda semana el siguiente par) y se colocaron en caja de Petri estéril donde se dejaron secar por 24 horas en campana de flujo laminar. A las 24 horas se tomaron los pesos de las muestras y se regresaron al tubo cónico con agua. El grado de degradación se calculó por diferencia en peso seco. Por otro lado, para determinar el efecto que ejerce la degradación de los andamios sobre el pH del agua, se midió el pH directamente cada dos días.

Una vez finalizado este tiempo, los mismo andamios se colocaron en una solución salina amortiguada por fosfatos (PBS 1X) 0.01 M en tubos cónicos de 50 mL durante una semana en campana de flujo laminar para determinar si los cambios de pH pueden ser amortiguados por el PBS. Para ello, se midió el pH de las muestras el día 1 y 7 directamente en el PBS.

2.4 Análisis de bioactividad de los compositos.

Para determinar la capacidad de formación de HA de los andamios, éstos se sumergieron en SBF (una muestra de cada composición por día). Para cada andamio se calculó el volumen de SBF a utilizar con la siguiente fórmula:

$$Vs = Sa/10$$

Donde: V_s es el volumen de SBF (mL) y S_a es el área de superficie aparente del espécimen (mm^2).

Para sumergir por completo los andamios estériles en la solución, se les puso un palillo de plástico previamente esterilizados en autoclave que los mantuvo en el fondo. Las muestras se incubaron a 36°C sin CO_2 durante 1, 7, 14 y 21 días. Una vez pasado el tiempo de incubación, se tomó la muestra y se lavó cuidadosamente con PBS 1X, se dejó secar durante 24 horas en campana para posteriormente ser pesadas y determinar la ganancia en peso seco. Finalmente las muestras fueron deshidratadas y llevadas al MEB para evaluar la formación de HA.

6.6 Análisis biológicos

6.6.1 Cultivos celulares.

Las células se sembraron en Medio Esencial Mínimo α (MEM- α , INVITROGEN) suplementado con suero fetal bovino (SFB INVITROGEN) al 10% y amikacina ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$). Los cultivos se mantuvieron en condiciones de proliferación exponencial a 37°C y en una atmósfera con 5% de CO_2 , realizando las resiembras cada tercer día.

Para las pruebas de adhesión, viabilidad y proliferación celular con azul de alamar, los andamios estériles se colocaron sobre placas de cultivo de 24 pocillos y se sumergieron en MEM- α durante 12 horas. Posteriormente el medio se retiró y los andamios fueron cultivados con 500 000 células en 1 mL de MEM- α aproximadamente. Se mantuvieron en incubación a 37°C con una atmósfera de CO_2 al 5% durante 4 horas para permitir la adhesión de las células al material y realizar la lectura con azul de alamar como se describirá más adelante. Al finalizar el ensayo se agregó medio nuevo a los andamios y se mantuvieron en incubación para repetir el procedimiento a las 24, 48, 72 y 120 horas.

Para evaluar el estímulo que ejercen los andamios sobre la diferenciación de los preosteoblastos, determinada con fosfatasa alcalina y colágeno, los andamios estériles se colocaron en placas de 24 pocillos con 500 000 células en 1 mL de MEM- α . Se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO_2 al 5%. Se cambió el

medio cada tercer día para renovar nutrientes. Se montaron los cultivos necesarios para sacrificar una muestra de cada condición a los tiempos establecidos.

Para evaluar el grado de mineralización mediante la tinción de rojo de alizarina los andamios estériles se sumergieron durante 12 horas en MEM- α en una placa de 24 pocillos antes de ser sembrados con 500 000 células en 1 mL de MEM- α . Se mantuvieron en la incubadora a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante 28 días con cambio de medio cada tercer día. Se tomaron muestras los días 1, 7, 14, y 21.

6.6.2 Ensayo de Azul de Alamar para medir la adhesión y proliferación celular.

El día en que los andamios fueron sembrados, día 0, se evaluó la adhesión celular; para ello, los andamios se cambiaron a un pozo nuevo con 1 mL de MEM- α en condiciones de esterilidad. A partir de aquí se siguió el protocolo sugerido por el proveedor. Primero el Azul de Alamar (INVITROGEN) se descongela y atempera. Posteriormente se agrega una proporción equivalente al 10% del volumen del cultivo a los pozos en donde se cultivaron inicialmente los andamios y a los pozos donde fueron recolocados. Además, se incluyen controles negativos que consisten de medio sin células con y sin azul de alamar. Las muestras se incuban a 37°C con 5% de CO₂ durante 4 horas. Pasado este tiempo, se colecta 1 mL de los sobrenadantes de cada muestra para realizar la lectura espectrofotométrica. Previo a ello, a los cultivos con andamios y al control negativo se les adiciona el MEM- α necesario y se regresan a incubar. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro visible a 570 nm que mide la cantidad de la forma oxidada (resazurina) y a 600 nm que mide la cantidad de la forma reducida (resorufina). Para determinar la proliferación celular se siguió este protocolo, con la diferencia de que el material ya no fue recolocado en otro pozo.

La concentración celular viable es proporcional al porcentaje de la forma reducida de Azul de Alamar. Ésta se determinó con la siguiente ecuación:

$$AR_{LW} = A_{LW} - (A_{HW} * R_O) * 100$$

Donde:

R_o = factor de corrección. $R_o = AO_{LW}/AO_{HW}$

$AO_{LW} = AO_{570}$ = Abs a 570 nm del medio con azul de alamar – Abs a 600 nm del medio solo.

$AO_{HW} = AO_{600}$ = Abs a 600 nm del medio con azul de alamar – Abs a 600 nm del medio solo.

$A_{LW} = A_{570}$ = Abs a 570 nm de la muestra – Abs a 570 nm del medio solo.

$A_{HW} = A_{600}$ = Abs a 600 nm de la muestra – Abs a 600 nm del medio solo.

6.6.3 Adhesión celular por Microscopia Electrónica de Barrido.

Para observar la adhesión de las células sobre los andamios, así como su proliferación, se tomó una parte de las muestras de rojo de alizarina una vez fijadas las células al biomaterial. En seguida los biomateriales se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol al 25, 50, 75 y 98 % durante 10 minutos respectivamente, repitiendo el procedimiento con etanol al 98%. Se retiró el etanol y se dejaron secar en campana de flujo laminar por más de 8 horas. Para observar las muestras al MEB, se llevaron al Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la U.M.S.N.H donde fueron recubiertas con cobre por personal técnico para hacerlas conductoras. Como controles de comparación se utilizaron andamios sin células y andamios sin células sumergidos en MEM- α durante 21 días.

6.6.4 Diferenciación de preosteoblastos.

6.6.4.1 Determinación de colágeno.

La determinación de colágeno se llevó a cabo los días 3, 7 y 14 posteriores al cultivo de células sobre los andamios. Se obtuvieron las muestras a procesar, se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X, se fijaron con 300 μ L de solución de Bovin's (15 mL de solución saturada de ácido pícrico más 5 mL de formaldehído al 35% y 1 mL de ácido acético glacial) durante una hora en agitación y oscuridad. Posteriormente se les agregó agua destilada hasta cubrir los andamios por 15

minutos y se decantó, se lavaron las veces necesarias hasta retirar el excedente de la solución fijadora. Se dejaron secar por aireado para agregar 300 μL de ácido pícrico saturado 1.2% w/v (BICCA), el cual se dejó durante 1 hora en agitación y oscuridad. Una vez pasado el tiempo se retiró el colorante y se lavó con ácido clorhídrico 0.01 N, se tomaron fotos representativas con un microscopio electrónico invertido y se adicionó 1mL de hidróxido de sodio 0.1 N para disolver el colorante, se mantuvo en agitación por media hora en oscuridad. Finalmente se recolectó el sobrenadante para hacer lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 550 nm utilizando como blanco hidróxido de sodio 0.1 N.

6.6.4.2 Determinación de fosfatasa alcalina con 4-MUP.

Este ensayo se realizó los días 1, 7, 14 y 21 posteriores al cultivo. En condiciones no estériles se lisaron las células de acuerdo al siguiente protocolo. Las muestras se lavaron dos veces con PBS 1X, se les agregó 400 μL de Igepal (0.2% en PBS 1X) por 30 minutos en agitación. El lisado se pasó a un tubo eppendorf el cual se centrifugó a 16 000 g's durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se guardó a -70°C hasta procesar las muestras con 4-MUP. Para realizar este ensayo se siguieron los pasos que a continuación se describen. En una placa negra de 96 pocillos se agregó 50 μL de cada uno de los lisados de proteínas obtenidos, a éstos se les adicionó 10 μL de una solución de TRIS 50 Mm, BSA 0.1% y 4-MUP 200 μM por 30 minutos para finalmente medir la fluorescencia en un espectrofluorómetro a una excitación de 360 nm y emisión de 450 nm. Los resultados fueron normalizados con el total de proteína, determinado mediante el método de Bradford.

6.6.4.3 Tinción histoquímica con Rojo de Alizarina S.

Se determinó el grado de mineralización ósea con la cuantificación de los depósitos de calcio a los 7, 14 y 21 días posteriores al cultivo. Para fijar las células adheridas al biomaterial, los andamios se lavaron dos veces con PBS 1X y se les adicionó 200 μL de solución fijadora (2% v/v paraformaldehído y 0.2% v/v glutaraldehído en PBS 1X) por 30 minutos, posteriormente se lavaron dos veces

con PBS 1X. Las muestras se tiñeron con 300 μ L de Rojo de Alizarina S 40 mM disuelta en etanol por 20 minutos en agitación y oscuridad. Se retiró el colorante y se lavó con agua tridestilada las veces necesarias para eliminar el exceso de rojo de alizarina (hasta que el agua salió clara). Posteriormente, para solubilizar el rojo de alizarina S fijado a los nódulos de calcio, se adicionó 1mL de solución de SDS al 5% en HCl 0.5 N por 30 minutos en agitación y en oscuridad. Se recuperó el sobrenadante en una celdilla para espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 415 nm. Como blanco se utilizó la solución de SDS al 5% en HCl 0.5 N. La absorbancia es proporcional al número de nódulos teñidos.

6.7 Análisis estadístico.

Se utilizó estadística descriptiva determinando medias y desviaciones estándar. Se aplicó el test de ANOVA para comparar las diferencias entre los grupos, y la prueba *post hoc* de Tukey para establecer las diferencias intra grupo; se consideró como diferencia significativa los valores de $p < 0.05$. El estudio de degradación y su efecto en el pH se realizó por cuadruplicado. Para determinar la frecuencia de los tamaños de los poros se utilizaron 3 imágenes de MEB a diferente magnitud y para la porosidad 4.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Síntesis de andamios.

Para la síntesis de los andamios se utilizó la técnica de disolución y colada con liberación de partículas y previa fusión del agente porógeno modificada por Murphy (2002); para ello primero se establecieron las circunstancias de humedad y tiempo de incubación necesarios para garantizar la interconexión de los poros.

7.1.1 Humedad al 95%.

De acuerdo a Murphy (2002), para fusionar los cristales de NaCl, éstos se deben someter a una humedad del 95%. Para ello se calcularon las condiciones necesarias para alcanzar dicha humedad colocando una charola con 2 litros de agua estéril en una incubadora que no inyecta CO₂. Se determinó la humedad con una carta psicométrica que utiliza la medición de temperatura de un bulbo seco y uno húmedo, lecturas tomadas cada hora hasta llegar a la humedad requerida. Los resultados se muestran en la **Figura 11**.

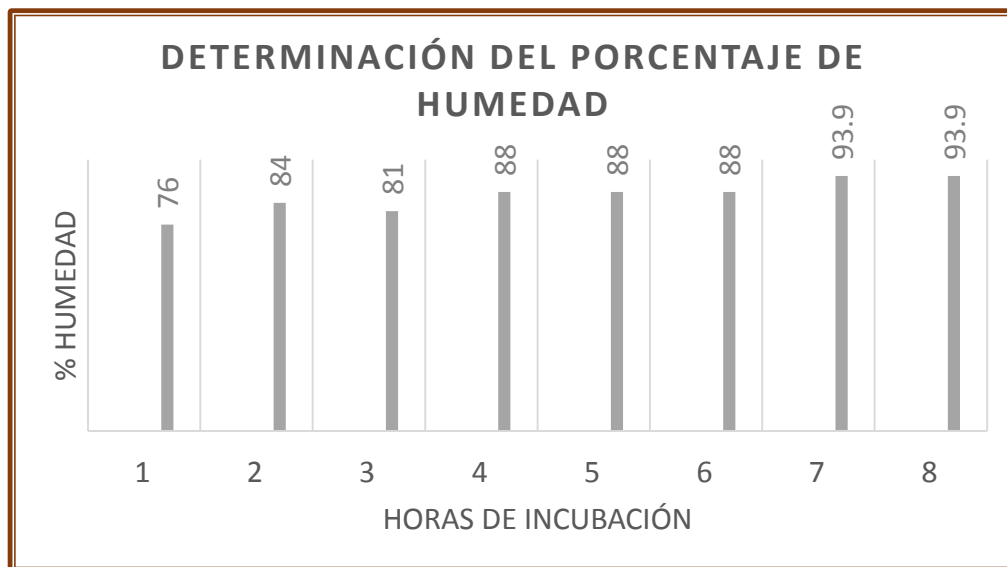


Figura 11. Determinación del porcentaje de humedad con carta psicométrica.

Como se puede observar, tras 7 horas de incubación se alcanza el 94% de humedad, el cual se mantiene sin variaciones conservando el volumen del agua y sin abrir la incubadora, dos aspectos muy importantes a tener en consideración una vez que se pongan los moldes con NaCl a incubar para fusionar los cristales.

7.1.2 Determinación del tiempo de incubación para la fusión de NaCl.

Los cristales de NaCl se sometieron a 95% de humedad durante 4, 8, 12, 16, 20, 22 y 24 horas para determinar el tiempo de incubación requerido para que éstos se fusionen y garanticen así la interconexión de los poros. Una vez fusionados se les agregó PLA para caracterizarlos mediante microscopía electrónica de barrido y así establecer la hora en la que se obtienen las características solicitadas.

La humedad en las muestras fue en aumento conforme las horas de incubación, observándose muestras bien hidratadas a partir de las 20 y 22 horas; a las 24 horas la humedad es tan considerable que llevó a una pérdida de volumen de la sal colocada.

De acuerdo a las imágenes de MEB (**Figura 12**) se puede observar que en las muestras incubadas a 95% de humedad durante 4 a 16 horas los cristales aún no están adecuadamente fusionados, ya que en éstas se pueden observar poros de menos de 300 μm en los que predominan los poros de menor tamaño, además éstos presentan la forma de los cristales de NaCl e incluso se observan cráteres. A las 22 y 24 horas de incubación se obtuvieron andamios con poros de 50-400 μm , adecuadamente interconectados, donde ya no predominan los poros pequeños y no se observan cráteres. Posterior a estos resultados, a las muestras de 22 y 24 horas de incubación se les calculó el porcentaje de porosidad con el programa Image J, los resultados obtenidos son de 60% y 70% de porosidad respectivamente. Finalmente con éstos datos podemos descartar la incubación de 24 horas debido a la gran humedad que produce y la pérdida de volumen, mientras que a las 22 horas se logra una humedad que permite la fusión del agente porógeno, demostrada con las imágenes de MEB en las que se observa una estructura de poros interconectados.

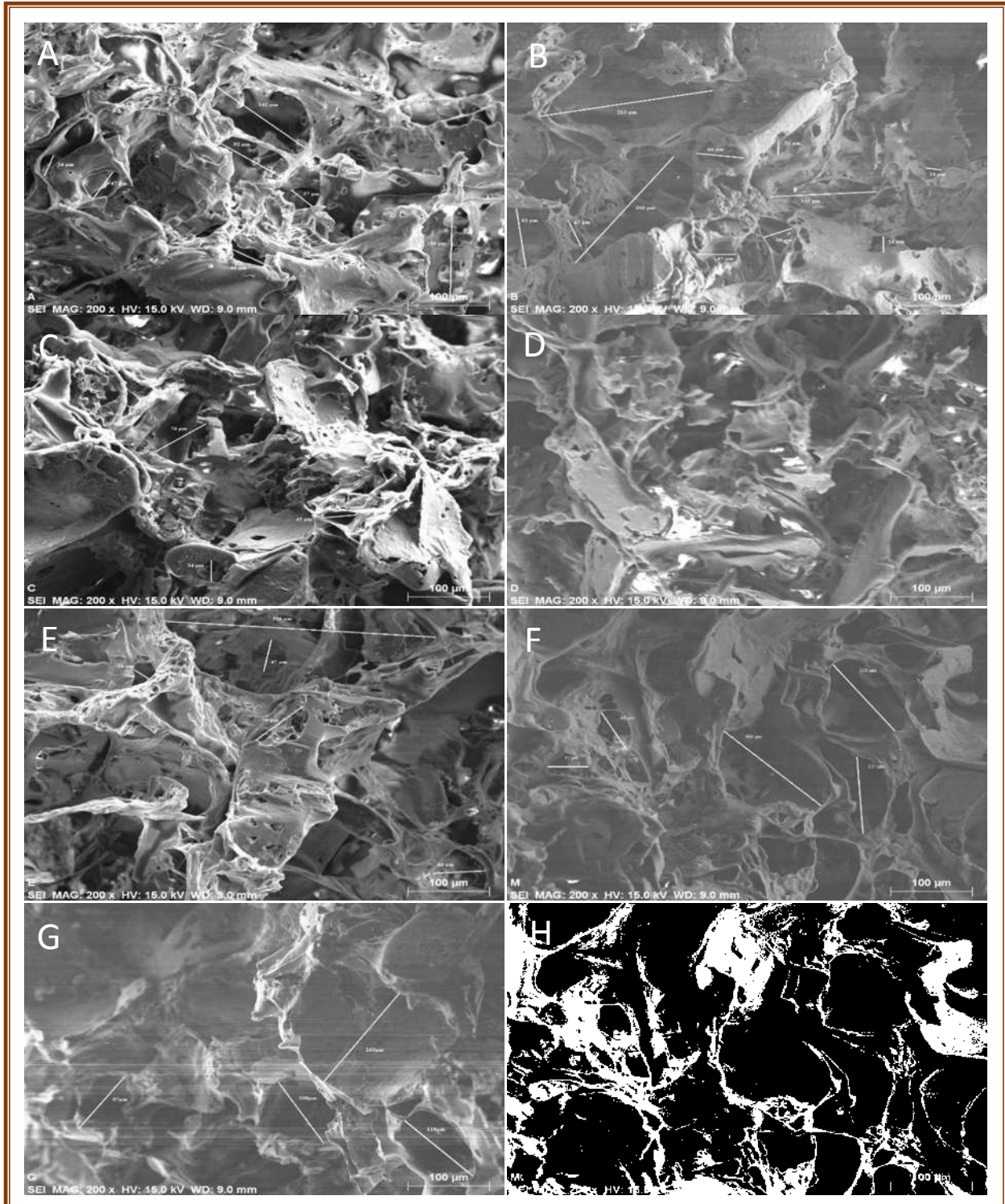


Figura 12. Determinación del tiempo de incubación para la fusión de NaCl. Imágenes de MEB de andamios de PLA cuyo agente porógeno (NaCl) se sometió a diferentes horas de incubación: **A)** 4 h, **B)** 8 h, **C)** 12 h, **D)** 16 h, **E)** 20 h, **F)** 22 h y **G)** 24 h. **H)** imagen del programa Image J para determinar el porcentaje de porosidad, que corresponde a la imagen F de 22 h.

Al momento de fabricar los andamios es necesario recordar las características que éstos han de cumplir para que desempeñen su función. Dentro de éstas particularidades se encuentran la estructura porosa tridimensional con poros interconectados que permite la migración de las células, nutrientes, productos de desecho metabólico y vascularización, que se encuentran relacionadas con la técnica de fabricación que se utilice. La técnica de disolución y colada con liberación de partículas permite obtener estructuras tridimensionales, sin embargo, una de sus desventajas es que no controla la interconexión de poros. Para ello Murphy (2002) busca eliminar esta restrictiva mediante la fusión de los cristales de NaCl sometidos a una humedad de 95% razón por la cual fue indispensable recrear este ambiente, el cual se logró colocando 2 litros de agua estéril destilada en una incubadora, que no inyecta CO₂, durante 7 horas. Murphy (2002) estableció que el tiempo de incubación requerido con estas condiciones y para que se fusionen los granos de sal es de 24 horas, tiempo con el que pudo obtener andamios con una alta porosidad (95%) y poros interconectados con tamaños de $78 \pm 21 \mu\text{m}$, los cuales no corresponden con los diámetros iniciales de sus granos $250\text{-}425 \mu\text{m}$, es decir hubo una disminución en el tamaño de su agente porógeno. Estos datos concuerdan con nuestros resultados, en donde a las 24 horas en los moldes con los cristales de NaCl hay pérdida del volumen de la muestra debido a la gran humedad que se generó; por ello, decidimos establecer el tiempo ideal para obtener una adecuada fusión de los granos de sal y así garantizar estructuras tridimensionales con poros interconectados que conserven sus tamaños, ello se logró tras 22 horas de incubación del NaCl a 95% de humedad.

Una vez establecidas las condiciones de humedad y tiempo de incubación para la fusión de los cristales de NaCl, se procedió a sintetizar los andamios a base de PLA/PCL con concentraciones en una relación 3/7 w/w con 0, 5 y 10% de nHA en relación al peso de los polímeros los cuales fueron almacenados hasta su uso.

7.2 Caracterización acelular de los andamios.

7.2.1 MEB. Morfología.

La morfología de las muestras se evaluó mediante MEB, determinando la interconexión, distribución y tamaño de poro, así como las características de

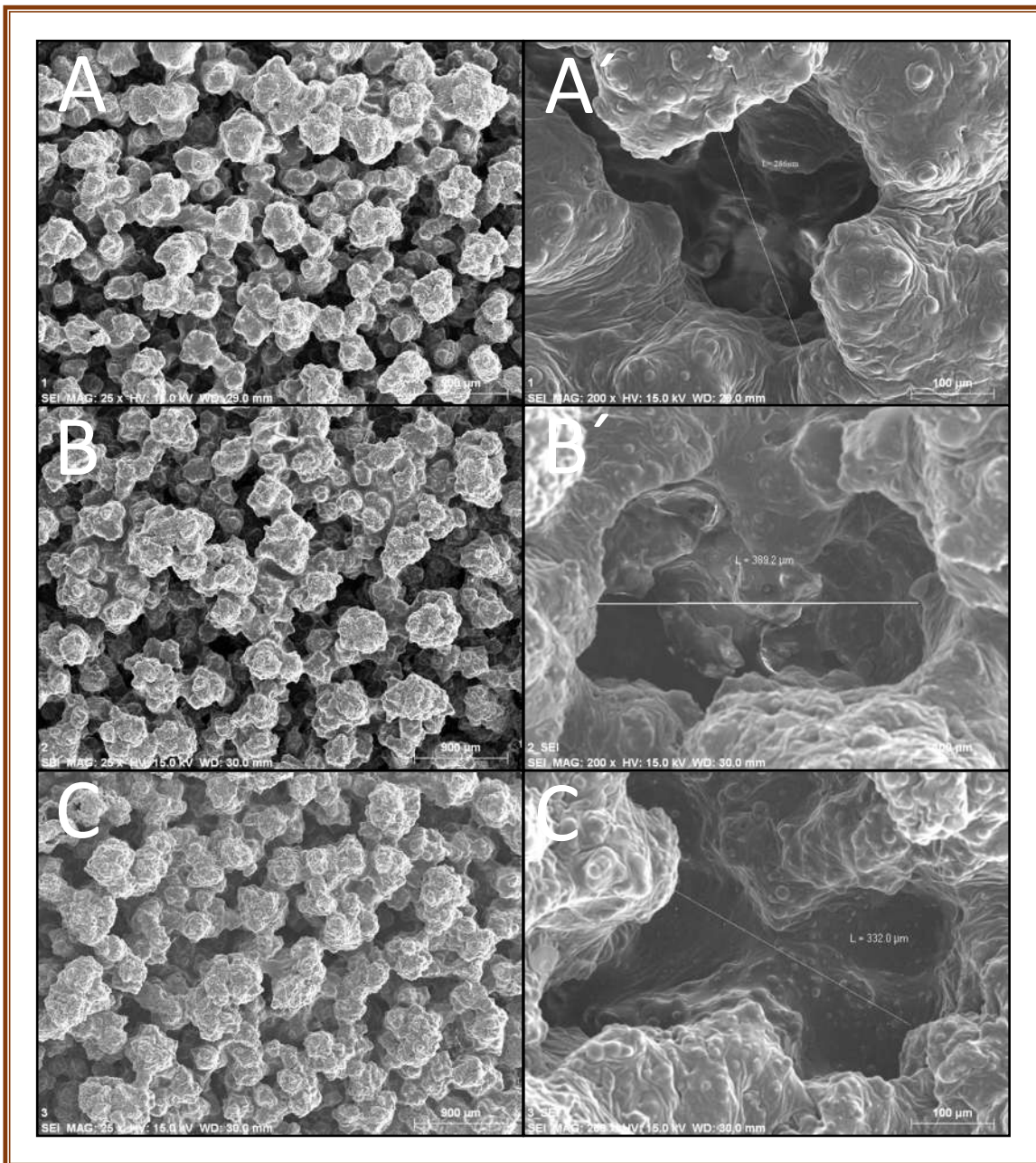
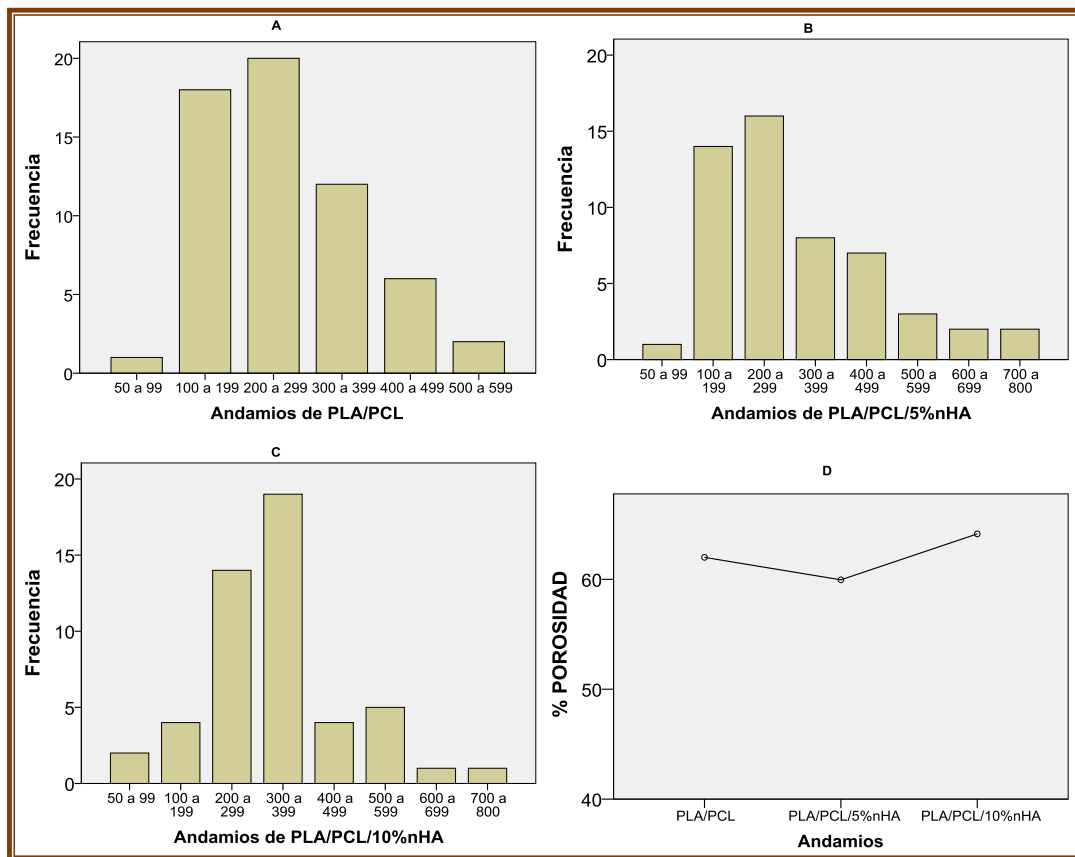


Figura 13. Imágenes de MEB. Caracterización de andamios.

A y A') PLA/PCL a 25x y 200x; B y B') PLA/PCL/5% nHA a 25x y 200x; C y C') PLA/PCL/10% nHA a 25x y 200x.

superficie y distribución de partículas de nHA. Como se observa en la **Figura 13**, todos los andamios sintetizados tienen estructuras tridimensionales con poros interconectados. Además, muestran una superficie rugosa, la cual va en aumento en relación a la cantidad de nHA que contienen, es decir, los andamios con 10% de nHA presentan una superficie más rugosa. La porosidad y los tamaños de poros se muestran en la **Figura 14**. El tamaño de poro para cada andamio fue de $266.74 \pm 107.36 \mu\text{m}$, $312.96 \pm 165.13 \mu\text{m}$ y $336.52 \pm 137.58 \mu\text{m}$, respectivamente. La porosidad, calculada con el procesador de imágenes Image J®, fue de 62, 60 y 64%. Los elementos encontrados mediante EDS de la superficie de las muestras fueron carbono (C) y oxígeno (O) en todos los andamios y en aquellos con nHA se encontró calcio (Ca) y fósforo (P), sin algún otro elemento contaminante. De acuerdo al mapping realizado a las muestras, las nanopartículas de HA se encuentran bien distribuidas por toda la superficie de los andamios (**Figura 15**).



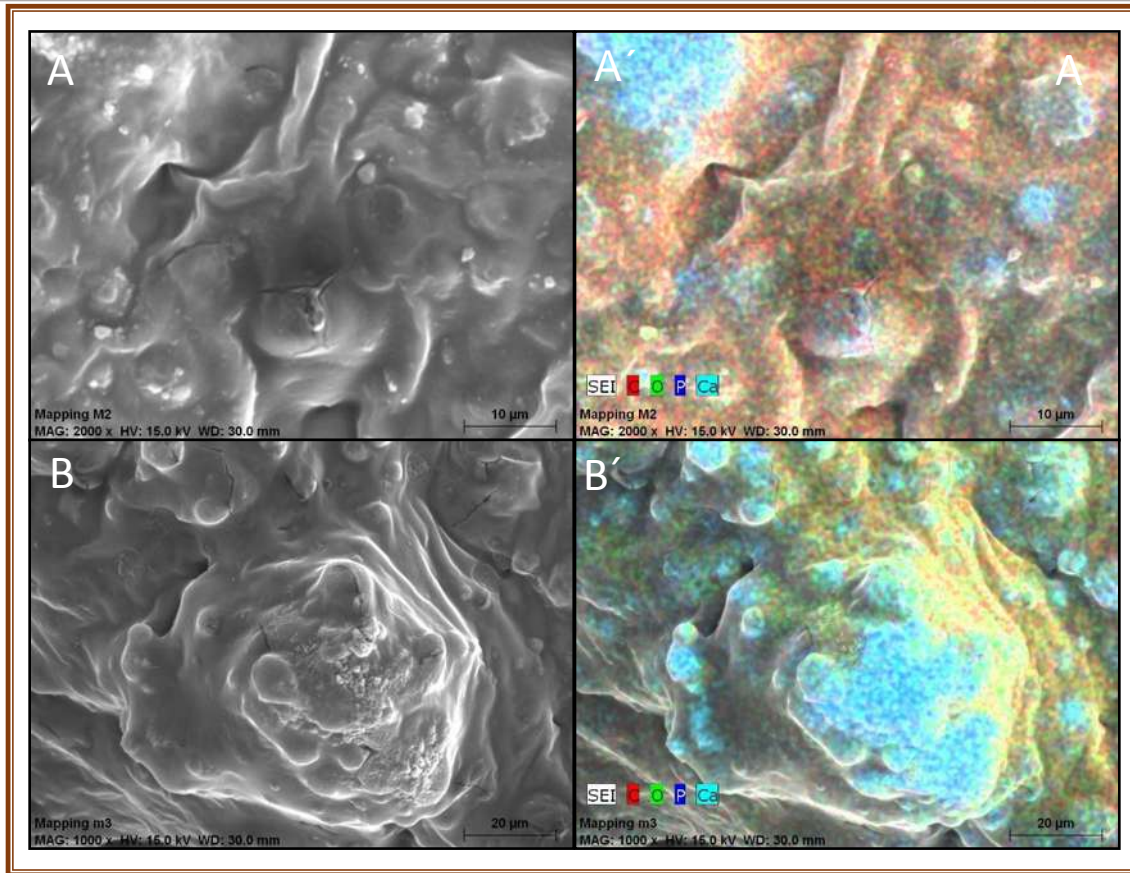


Figura 15. Mapping. Distribución de nHA sobre la superficie de los andamios. A y B representan el área donde se hizo el mapping y A' y B' corresponden al mapping de los andamios con 5 y 10% de nHA respectivamente.

La porosidad, el tamaño, la interconexión de los poros y las características de superficie son rasgos muy importantes que deben cumplir los andamios, ya que influyen en las propiedades mecánicas y de osteoconductividad de éstos debido a que proveen de una gran superficie en donde las células se adhieren, proliferan y se diferencian, además facilitan la vascularización y la conexión con el tejido circundante proporcionando estabilidad mecánica. Ya se han estudiado los efectos de los tamaños de poro en la regeneración tisular, en donde se ha demostrado que se requieren poros de 200 μm a 350 μm para permitir la osteoinducción, además, se ha visto que las células prefieren las superficies rugosas sobre las lisas para adherirse (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). Nuestros resultados muestran que los andamios fabricados tienen una estructura porosa interconectada y con los

tamaños de poro requeridos para una adecuada osteogénesis, además de la superficie rugosa presente en todos los andamios, situaciones que en otros trabajos realizados con estos compositos no se presenta. Es decir, por la técnica de síntesis, electrohilado, las estructuras que se obtienen son membranas con poros en la escala nanométrica y sólo aquellas muestras que tienen hidroxiapatita presentan fibras rugosas, comportándose como una superficie similar a la de un plato de poliestireno o frasco de cultivo (Fang *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2012). Rodenas y su equipo (2015) utilizaron el método de extracción congelante para fabricar membranas con PLA, PCL y nHA con una doble estructura porosa, es decir, macroporos de 300 a 400 μm y microporos de 1 a 10 μm , con una porosidad de 90%, para realizar un estudio de degradación a largo plazo. Con estos datos podemos determinar que hasta el momento no se había fabricado un andamio a base de estos biomateriales tridimensional con poros de un tamaño adecuado e interconectados.

7.2.3 Degradación y su efecto en el pH.

Para evaluar los efectos que tienen los productos de degradación de los compositos sobre el pH, se sumergieron las muestras en agua tridestilada estéril durante un mes, tiempo en el cual cada 2 días se midió el pH y cada 7 se tomó el peso seco para determinar la cantidad de material degradado. Finalmente, para corroborar si los cambios producidos en el pH se pueden amortiguar, se colocaron una semana en PBS 1X, tomándose el pH al primer día y a los 7 días después de haber sido sumergidos en éste. Como controles se utilizaron las mediciones de agua destilada o PBS de acuerdo al caso.

En la **Figura 16** se muestran las medias de las tomas de pH en agua con sus desviaciones estándar, podemos observar que todas las muestras presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$ por ANOVA y post hoc de Tukey) del pH en relación con el agua, que es el control (media 6.3 ± 0.108). El pH más bajo corresponde a los andamios de PLA/PCL con una media de 5.8 ± 0.09 , le siguen los andamios con 5 y 10% de nHA con medias de 5.9 ± 0.04 y 6 ± 0.08

respectivamente. La variación del pH para cada andamio y con respecto al tiempo fue despreciable. El peso final conservado en promedio fue de 94.53% para los compositos de PLA/PCL y de 97.37% y 96.75% para los que contienen 5 y 10% de nHA respectivamente.

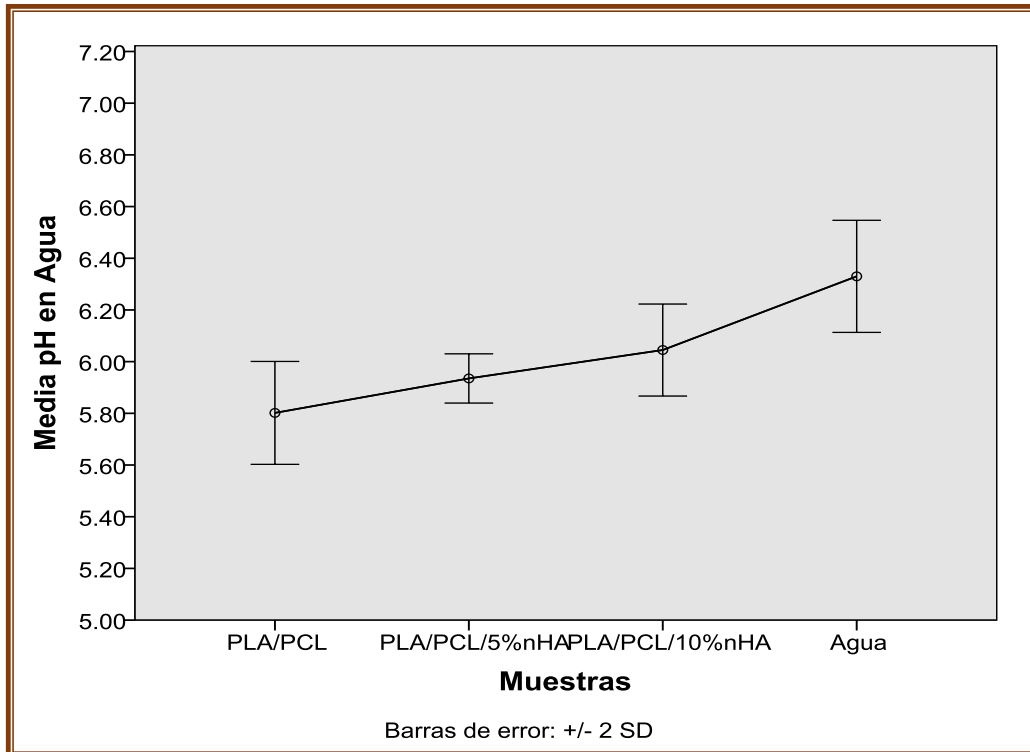


Figura 16. Determinación de pH en agua destilada.

La **figura 17** muestra que la disminución de pH causada por los productos de degradación de los compositos en el agua es regulada por el buffer de fosfatos. Es decir, los andamios sumergidos en PBS 1X no causaron modificaciones en el pH de éste.

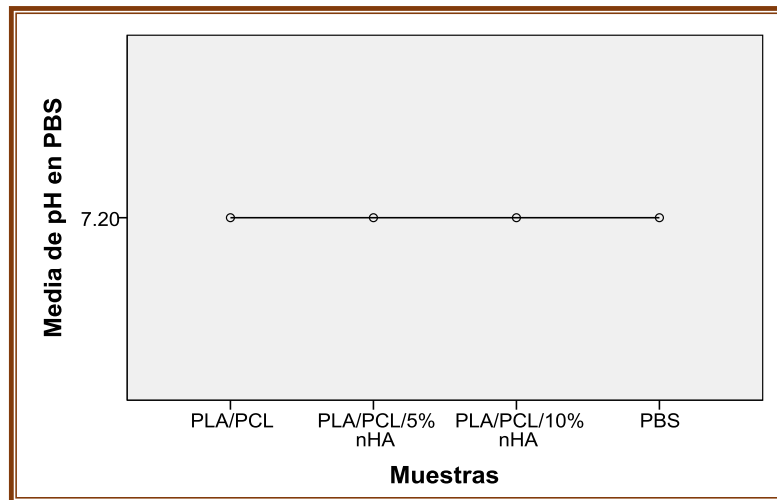


Figura 17. Determinación de pH en PBS.

Los poliésteres se caracterizan por degradarse mediante hidrólisis. Sus productos de degradación son ácidos por lo que tienden a disminuir el pH. Esto lo podemos corroborar con los compositos de PLA/PCL sumergidos en agua, que es donde hubo una mayor disminución del pH con respecto a las demás muestras. La incorporación de nHA a las matrices poliméricas, mediante su alcalinidad, neutraliza los productos de degradación ácidos de los polímeros (Thavornyutikarn *et al.*, 2014). Este efecto lo podemos observar en las muestras que contienen nHA, a mayor cantidad de ésta es mejor el control del pH. Rodenas y colaboradores (2015) evaluaron los cambios de pH a largo plazo de compositos de PLA/PCL/HA, concluyendo que aquellas muestras con HA no modifican el pH y que sus productos de degradación no son tóxico. Este estudio se llevó a cabo en PBS, por lo que sus resultados concuerdan con los que obtuvimos, una vez sumergidos en PBS nuestras muestras que inicialmente causaron una disminución del pH en el agua, corrigieron estas variaciones. Rodenas y colaboradores (2015) también observaron que los compositos con mayor cantidad de PCL tienen menor pérdida de peso que aquellos que tienen mayor cantidad de PLA. Dichos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que, nuestros compositos tienen una mayor cantidad de PCL (PLA/PCL 3/7 w/w) por lo que su degradación fue mínima.

7.2.4 Bioactividad.

Las muestras se sumergieron en SBF durante 1, 7, 14 y 21 días para evaluar su capacidad de formación de HA. Para demostrarlo las muestras se analizaron con MEB en donde también se les realizó un EDS y mapping para determinar la naturaleza de las partículas formadas.

De acuerdo a las imágenes de MEB en la **Figura 18** podemos observar que en los compositos de PLA/PCL la bioactividad es poca, ya que hay una formación de hidroxiapatita muy baja en comparación con las muestras que contienen nHA en todas las muestras. Entre estas últimas, los compositos con mayor bioactividad son los que tienen 10% de nHA, ya que, desde el primer día, se puede ver una gran diferencia entre las muestras. Los estudios de EDS y mapping evidenciaron que las partículas vistas corresponden a depósitos de HA.

En 2013 Fang y colaboradores demostraron que la bioactividad de compositos de PLA/PCL se vio mejorada al agregar nHA a los andamios y que, a su vez, la bioactividad es dependiente de la cantidad de HA agregada. Estos hallazgos los podemos observar en nuestros resultados obtenidos, los cuales coinciden con la literatura que describe que los polímeros carecen de bioactividad y que para contrarrestar esta deficiencia se fabrican compositos polímero/cerámico ya que, debido a la similitud a la fase mineral del hueso, la hidroxiapatita es capaz de formar enlaces fuertes con el tejido circundante mediante la deposición de nuevos cristales de HA, es decir, es un componente con una excelente bioactividad (Baino *et al.*, 2015).

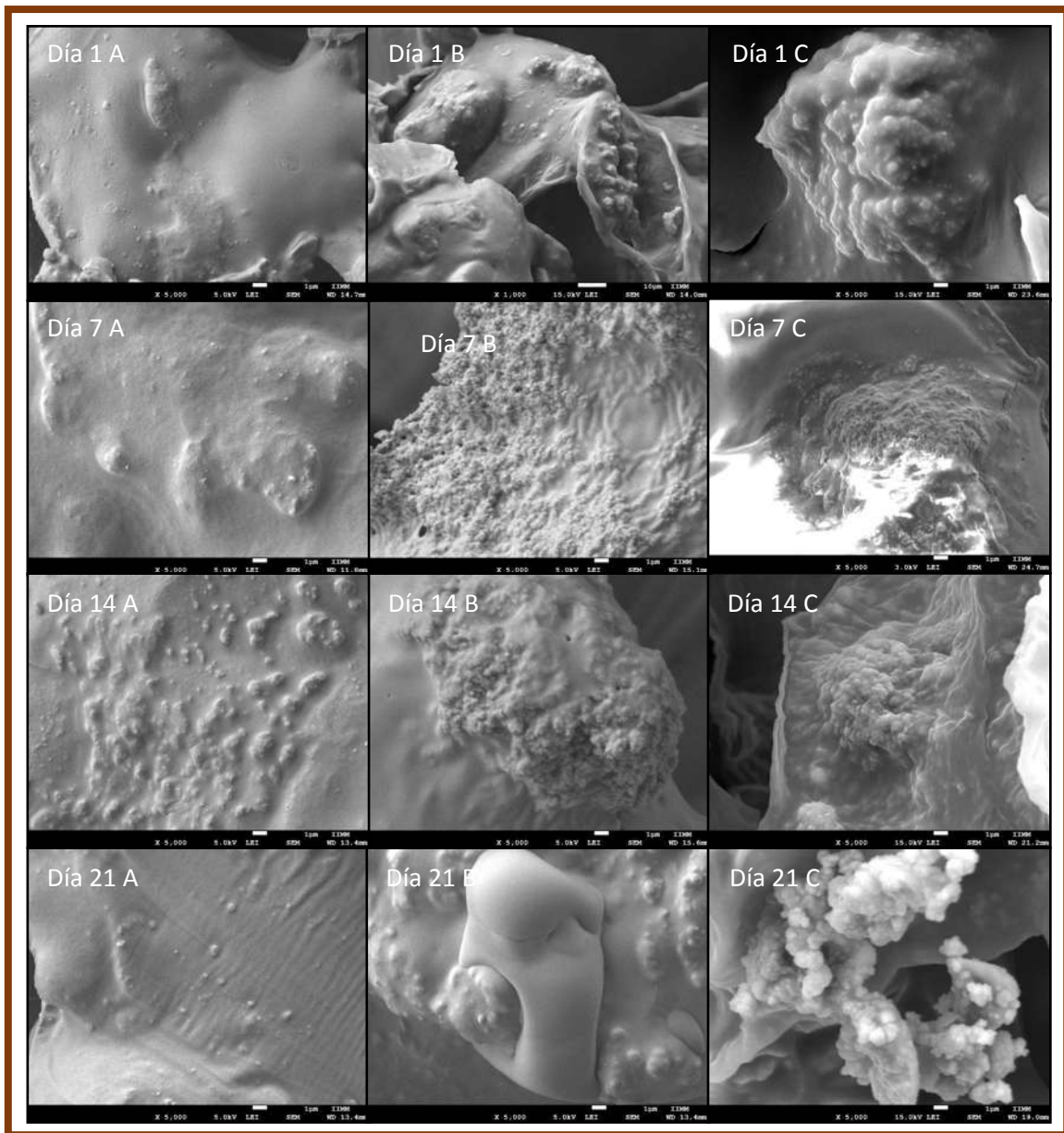


Figura 18. Imágenes de MEB. Bioactividad. A) PLA/PCL; B) PLA/PCL/5%nHA y C) PLA/PCL/10%nHA.

7.3 Análisis biológicos.

7.3.1 Adhesión y proliferación celular. Azul de Alamar y MEB.

Los andamios fueron sembrados con células de preosteoblastos de ratón MC3T3-E1 en una concentración de 500,000 células en 1 mL de MEM- α . En el día 0, tras 5 horas de incubación, los andamios fueron cambiados de pozo para determinar la cantidad de reducción de azul de alamar de éste, que corresponde a las células adheridas al biomaterial, y del pozo en el que inicialmente se encontraban los andamios (células que quedaron adheridas en el pozo), y así, mediante una diferencia de la reducción del andamio entre la reducción del total de las células determinar el porcentaje de células adheridas.

Como se muestra en la **Figura 19** hubo una adhesión del 40% de células en los compositos PLA/PCL y 25% en los que contienen nHA. Los días 1, 3 y 5 después del cultivo de los andamios con células, se determinó la tasa de proliferación celular midiendo la reducción relativa de resazurina. En la **Figura 20** podemos observar que en todos los compositos hubo un aumento en la reducción de resazurina del día 1 al día 3, es decir las células proliferaron. Al día 5 ya no se observa una proliferación celular, incluso se observa una disminución de la reducción de resazurina, esto es debido a que se genera una confluencia de las células que ya no les permite seguir dividiéndose alcanzando así la fase o estado estacionario.

En las imágenes de la **Figura 21** obtenidas en el MEB se puede observar que las células se adhirieron y proliferaron en todos los andamios. Como control se utilizaron andamios sumergidos en MEM durante 21 días, los cuales se observan diferentes a los cultivados con células, lo que permite reconocer las células claramente.

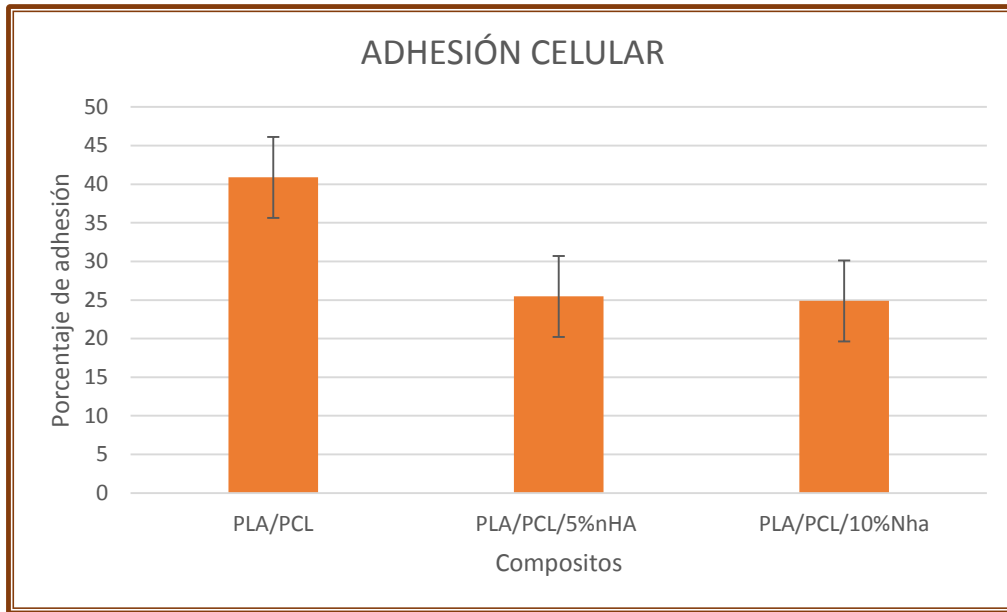


Figura 19. Porcentaje de adhesión celular.

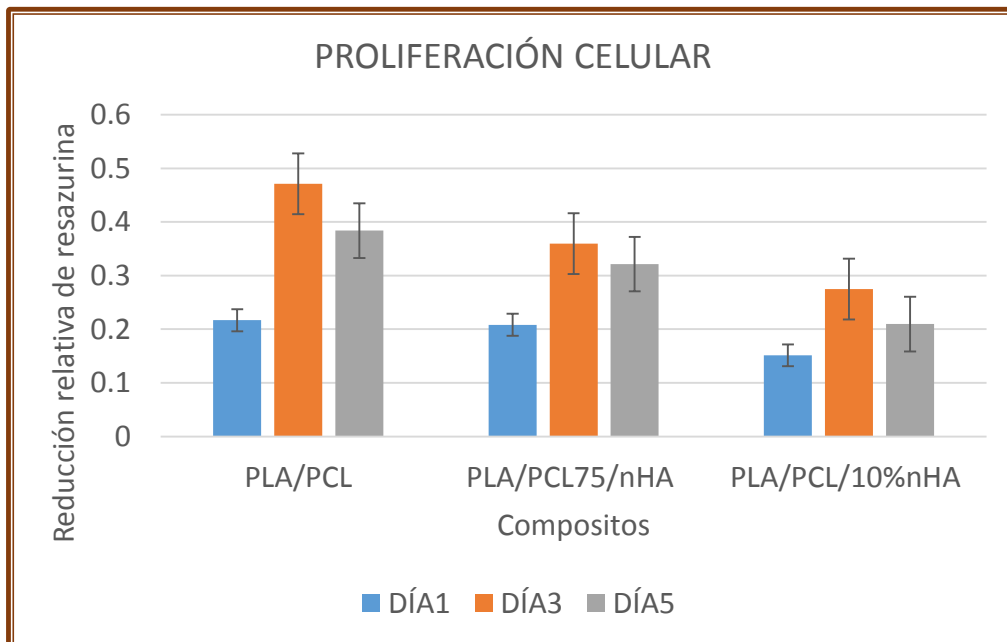


Figura 20. Proliferación celular.

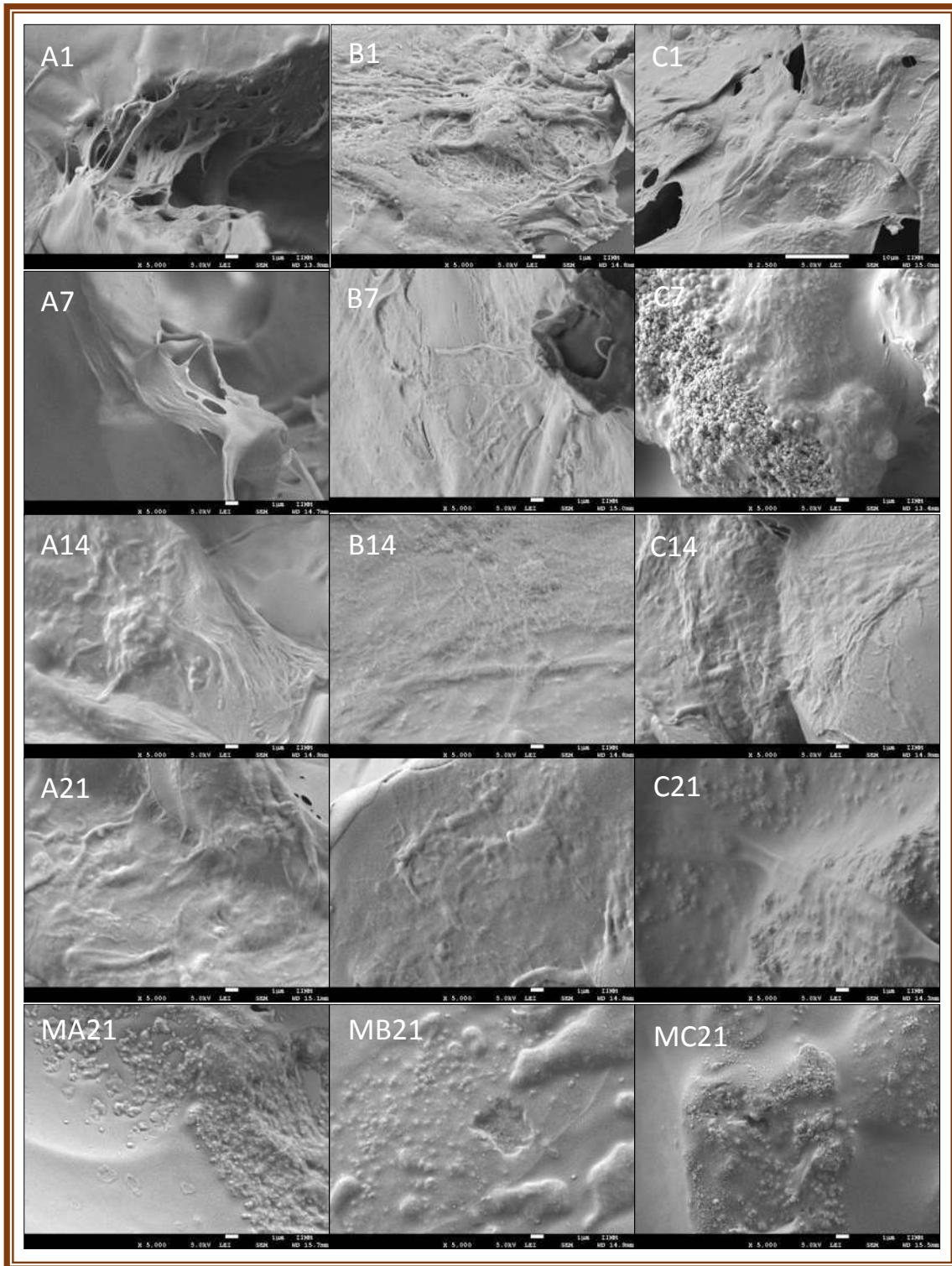


Figura 21. Adhesión celular MEB. A1, 7, 14 y 21 corresponde a andamios de PLA/PCL tomados a los días 1, 7, 14 y 21 del cultivo celular. B1, 7, 14 y 21 a los andamios de PLA/PCL/5%nHA, C1, 7, 14 y 21 a los andamios de PLA/PCL/10%nHA y AM21, BM21 y BM21 a sus respectivos controles, andamios sumergidos en medio durante 21 días.

En los trabajos de los grupos de Fang (2010) y Bakhshandeh (2011) llevados a cabo con este tipo de compositos, en donde se evalúa la proliferación celular, determinan que los andamios con hidroxapatita aceleran la proliferación de éstas, sin embargo estos ensayos se realizaron en compositos a bases de fibras electrohiladas que proveen de poros en escala nanométrica, por lo que no actúan como andamios tridimensionales sino como una membrana, por tanto el ambiente de crecimiento de las células es similar a las del cultivo en un plato de poliestireno. Por consiguiente, no hay un antecedente de este tipo para los estudios de proliferación celular en compositos de PLA/PCL/nHA con estructuras tridimensionales porosas.

7.3.2 Diferenciación de preosteoblastos.

7.3.2.1 Expresión de colágeno.

La diferenciación de preosteoblastos fue evaluada mediante la determinación de colágeno los días 3, 7 y 14 posteriores al cultivo de los andamios con las células. Esta expresión aumentó conforme los días de incubación en los tres tipos de biomateriales, al día uno el colágeno es similar para todas las muestras. Es hasta el día 14 en la que hay mayor expresión de colágeno, siendo mayor en aquellos andamios de PLA/PCL y PLA/PCL/10%nHA. **Figura 22.**

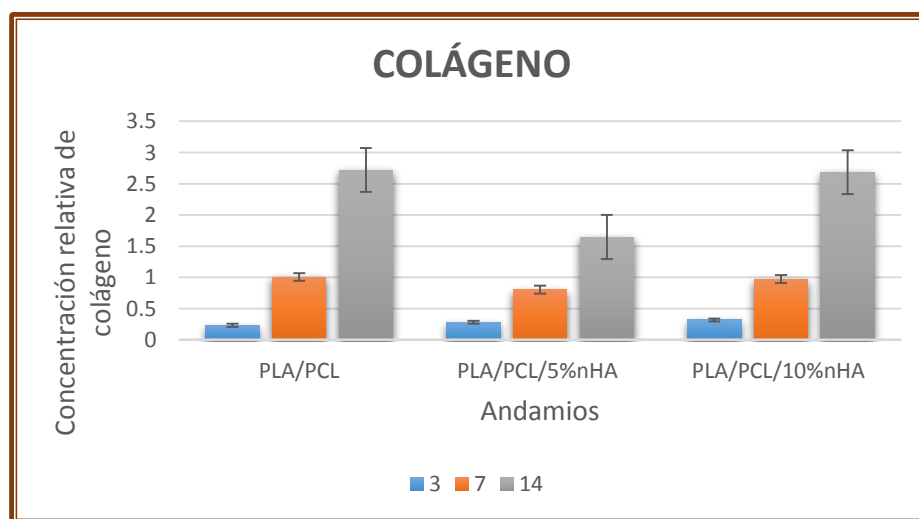


Figura 22. Expresión de colágeno.

7.3.2.2 Actividad de fosfatasa alcalina

Se monitoreó la actividad fosfatasa alcalina de las células MC3T3-E1 durante los días 1, 5, 7, 10, 14 y 21 posterior a su cultivo como parte de la evaluación de la diferenciación osteoblástica. Durante los primeros 7 días los valores se mantuvieron similares para todas las muestras y a partir de aquí se ve un aumento, expresándose los niveles más altos de actividad al día 21. Este efecto se ve de manera gradual en los compositos que contienen 5% de nHA, sin embargo la expresión al día 21 es mayor para aquellos con 10%. **Figura 23.**

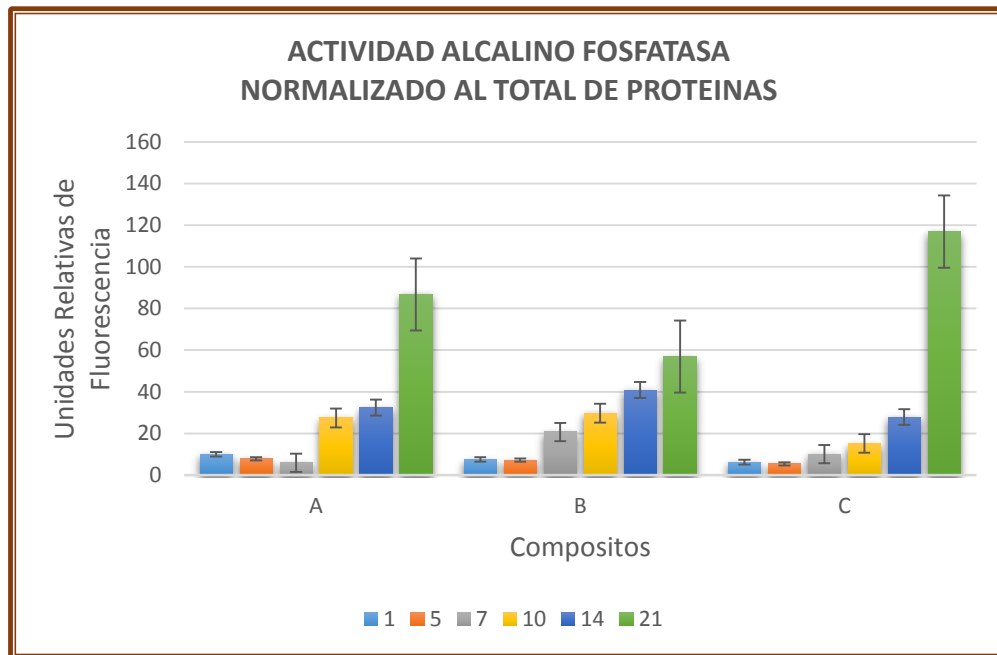


Figura 23. Actividad fosfatasa alcalina

Las distintas fases de diferenciación de los preosteoblastos de ratón MC3T3E-1 en cultivo celular son análogas a las que se llevan en el hueso *in vivo*. La primera fase de proliferación dura 10 días aproximadamente y se caracteriza por la expresión de genes de colágeno tipo I, biosíntesis y excreción de éste, además de una actividad de fosfatasa alcalina baja (Quarles *et al.*, 1992). Como se mencionó, todos los andamios presentan una expresión de colágeno similar, sin embargo, la literatura menciona que los compositos de PLA/PCL presentan una baja

osteoinductividad la cual puede mejorarse al agregarles hidroxiapatita (Tanodekaew *et al.*, 2013). De acuerdo a los resultados observados, los andamios de PLA/PCL presentan una expresión similar a los andamios que contienen 10% de nHA, esto se puede explicar por las células adheridas a los andamios que fue mayor en los que no contienen nHA además, los preosteoblastos expresan colágeno sin algún estímulo de diferenciación como lo observa Vergara (2017) con los preosteoblastos de ratón (MC3T3-E1) sembrados en plato de poliestireno con MEM- α , el cual es mayor al día 14, no obstante, en menor concentración que los inducidos a la diferenciación con ácido ascórbico en todos los días de cultivo. En estos últimos, también la mayor concentración se observó al día 14. Esto nos indica que los andamios por sí solos no están promoviendo la diferenciación de las células ya que los preosteoblastos producen colágeno sin un estímulo de inducción a la diferenciación. Por otro lado, la adhesión celular de los andamios con diferentes porcentajes de nHA fue del 25% para ambos; al comparar estos resultados con la expresión de colágeno podemos observar que aquellos andamios con 10% tienen una expresión visualmente mayor que los de 5% de nHA. Por lo tanto, podemos enunciar que los andamios que contienen 10% de nHA promueven la expresión de colágeno. Finalmente, la actividad de FA en las tres muestras es similar los primeros 5 días, baja en comparación con el resto de los días. Todos estos datos nos indican que las células se encuentran en la primera fase de diferenciación.

Pasando estos primeros diez días, comienza la fase de diferenciación en donde la actividad de fosfatasa alcalina comienza a aumentar y la célula comienza a depositar colágeno en la matriz extracelular (Quarles *et al.*, 1992). De acuerdo a los resultados, la expresión de colágeno al día 14 es mayor para todos los andamios respecto a los días anteriores, además, podemos ver una expresión de colágeno un poco mayor en los andamios de 10% de nHA que en aquellos que no contienen, reafirmando la capacidad de la HA de osteoinducción. Así mismo, como menciona la literatura, la actividad de fosfatasa alcalina va en aumento de acuerdo a los días. La última fase comienza a los 20 días del cultivo, aquí la matriz mineral comienza a calcificarse acompañada de un aumento en la acumulación de matriz

extracelular y actividad de fosfatasa alcalina lo cual se ve en los resultados, en donde en todos los andamios la mayor actividad de FA es al día 21, sin embargo es visualmente mayor para los andamios que contienen 10% de nHA.

Los grupos de Qi (2016) y Bakhshandeh (2011) determinaron la diferenciación de las células midiendo la actividad fosfatasa alcalina en compositos fabricados mediante electrohilado. En ambos grupos se indujo la diferenciación osteoblástica con medio osteogénico, el primer grupo encontró que la actividad de FA es mayor en las muestras que fueron inducidas en comparación con las no inducidas y el control. Por otro lado, en el segundo grupo la actividad de FA siempre fue mayor en su control, y en comparación con los compositos, fue más alta en los que contienen HA que en aquellos de solo PLA/PCL. Con estos datos no podemos concluir que por sí solo el biomaterial utilizado por estos grupos sea osteoinductivo, que es la principal característica buscada en los andamios de tercera generación. En nuestros resultados obtuvimos un aumento de la actividad fosfatasa alcalina en todos nuestros andamios, observándose una expresión tanto de colágeno como de fosfatasa alcalina mayor en los andamios de PLA/PCL/10%nHA en el último día de prueba en relación al resto de los andamios. Estos datos deben ser corroborados mediante la determinación del grado de mineralización, para así poder llegar a una adecuada conclusión.

7.3.2.3 Tinción histoquímica con Rojo de Alizarina S.

Para determinar el grado de mineralización, se tiñeron los andamios con Rojo de Alizarina los días 7, 14 y 21. Como se puede observar en la **Figura 24** los andamios con PLA/PCL/10%nHA son los que presentan un patrón de incremento creciente de los depósitos de calcio a diferencia de las otras muestras, sin embargo presenta valores similares del día 7 con los andamios que tienen 5% de nHA y el día 14 con los de PLA/PCL. Como se observa en la imagen, los resultados de la mineralización relativa presentan un comportamiento atípico en los andamios de PLA/PCL y con 5% de nHA debido a la técnica en la que no se pudo normalizar con la cantidad de Rojo de alizarina absorbida por los materiales sin células. Bakhshandeh (2011) determinó que los compositos PLA/PCL/20%nHA

sumergidos en medio osteogénico presentan mayor depósito de calcio que aquellos que no fueron inducidos a diferenciación, los cuales tienen depósitos de calcio similares a los controles que corresponden a células sembradas a platos de poliestireno debido a que, al ser una membrana, ésta se comporta de manera similar a la superficie del plato de poliestireno. Con esto y los resultados previos podemos indicar que los andamios con 10% de nHA promueven la diferenciación osteoblástica, es decir son osteoinductivos.

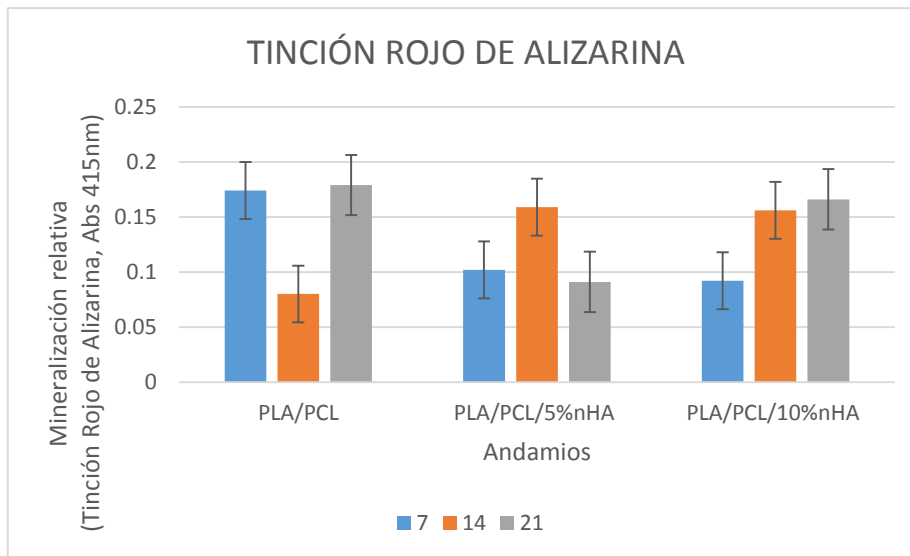


Figura 24. Mineralización relativa. Tinción con rojo de alizarina

VIII CONCLUSIONES

Se estandarizó la técnica de disolución y colada con liberación de partículas, previa fusión de agente porógeno, para sintetizar andamios porosos tridimensionales interconectados de PLA/PCL con 0, 5 y 10% de nHA.

Los andamios de PLA/PCL/10% nHA presentan mejores propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoconductividad y osteoinductividad que aquellos que tienen menores concentraciones de nHA.

IX PERSPECTIVAS

- * Realizar más pruebas para determinar el grado de mineralización con Rojo de Alizarina normalizado.
- * Evaluación física de los compositos. Para así poder determinar, y de acuerdo con las demás características, el sitio óseo en el que puedan ser aplicadas.
- * Evaluación *in vivo*. Esto nos permitiría tener un trabajo completo en esta área.
- * Fabricación de otras propuestas de biomateriales con la técnica implementada.

X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

1. Alghazali, K. M., Nima, Z. A., Hamzah, R. N., Dhar, M. S., Anderson, D. E., & Biris, A. S. (2015). Bone-tissue engineering: complex tunable structural and biological responses to injury, drug delivery, and cell-based therapies. *Drug metabolism reviews*, 47(4), 431-454.
2. Alvarez Barreto, J. F. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2).

B

3. Baino, F., Novajra, G., & Vitale-Brovarone, C. (2015). Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3.
4. Bakhshandeh, B., Soleimani, M., Ghaemi, N., & Shabani, I. (2011). Effective combination of aligned nanocomposite nanofibers and human unrestricted somatic stem cells for bone tissue engineering. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(5), 626.
5. Bartis, D., & Pongrácz, J. (2011). Three dimensional tissue cultures and tissue engineering. *Teach. Mater. Med. Biotechnol. Master's Program. Univ. Pécs Univ. Debrecen*, 15.
6. Bencherif, S. A., Braschler, T. M., & Renaud, P. (2013). Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry. *Journal of periodontal & implant science*, 43(6), 251-261.
7. Bernabéu Martínez, E., López-Oliva Muñoz, F., Larena Pellejero, A., Tur Gil, A., Gordo, P., & Montero Escobar, M. (2006). Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados. *Patol. apar. locomot. Fund. Mapfre Med*, 202-207.

8. Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, 28(3), 325-347.
9. Bracho, C. (2015). Fracturas osteoporóticas y costos asistenciales. En W. Aguirre, W. de la Torre y R. Jarvis (Ed.), *Osteoporosis 2015* (pp. 25-33). Quito, Ecuador: Sociedad Ecuatoriana de Metabolismo Mineral.
10. Bringhurst, F. R., Demay, M. B., Krane, S. M., & Kronenberg, H. M. (2005). Bone and mineral metabolism in health and disease. Recuperado de <https://clinicalgate.com/bone-and-mineral-metabolism-in-health-and-disease/>

C

11. Clark, P., Carlos, F., & Vázquez, D. (2010). Epidemiología, costos y carga de la osteoporosis en México. *Rev Metab Oseo y Min*, 8(5), 152-161.
12. Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131-S139.
13. Cosman, F., De Beur, S. J., LeBoff, M. S., Lewiecki, E. M., Tanner, B., Randall, S., & Lindsay, R. (2014). Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis international*, 25(10), 2359.

D

14. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science*, 2011.

E

15. Eriksen, E. F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 11(4), 219-227.
16. Estrada, C., Paz, A. C., & López, L. E. (2006). Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. *Revista EIA*, (5), 93-100.
17. Evia, J. B. (2011). Marcadores del Remodelado Óseo y Osteoporosis. *Revista Mexicana Patología Clínica*, 58(3), 113-137

F

18. Fang, R., Zhang, E., Xu, L., & Wei, S. (2010). Electrospun PCL/PLA/HA based nanofibers as scaffold for osteoblast-like cells. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 10(11), 7747-7751.
19. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Canto Pingarrón, M. D., & Blanco Jerez, L. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11(1), 47-51.
20. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Canto Pingarrón, M. D., & Blanco Jerez, L. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11(2), 151-157.

G

21. Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y Tratamiento de Osteoporosis en el Adulto, México: Secretaría de Salud; 2009.

K

22. Khan, F., & Ahmad, S. R. (2013). Bioactive Polymers and Nanobiomaterials Composites for Bone Tissue Engineering. *Biomimetics: Advancing Nanobiomaterials and Tissue Engineering*, 91-117.
23. Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915.

L

24. Liao, G. Y., Jiang, S., Xia, H., & Jiang, K. (2012). Preparation and characterization of aligned PLLA/PCL/HA composite fibrous membranes. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 49(11), 946-951.
25. Liu, J., & Kerns, D. G. (2014). Suppl 1: mechanisms of guided bone regeneration: a review. *The open dentistry journal*, 8, 56.

26.Liu, Y., Lim, J., & Teoh, S. H. (2013). Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology advances*, 31(5), 688-705.

27.Lucio, L. N., Cortés, E. A. Z., Hernández, A. R., González, S. C., Hernández, J. E., Briseño, R. T., & Elizarraraz, R. G. (2012). Consideraciones epidemiológicas de las fracturas del fémur proximal. *Ortho-tips*, 8(3), 135-139.

M

28.Mallick, S., Tripathi, S., & Srivastava, P. (2015). Advancement in scaffolds for bone tissue engineering: A review. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci*, 10, 37-54.

29.Murphy, C. M., O'Brien, F. J., Little, D. G., & Schindeler, A. (2013). Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad.

30.Murphy, W. L., Dennis, R. G., Kileny, J. L., & Mooney, D. J. (2002). Salt fusion: an approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds. *Tissue engineering*, 8(1), 43-52.

N

31.Nigam, R., & Mahanta, B. (2014). An overview of various biomimetic scaffolds: challenges and applications in tissue engineering. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 5(2), 1.

O

32.O'brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14(3), 88-95.

33.Ozdil, D., & Aydin, H. M. (2014). Polymers for medical and tissue engineering applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(12), 1793-1810.

P

34.Peña-Ríos, D. H., Cisneros-Dreinhofer, F. A., García-Hernández, P. A., Hernández-Bueno, J. A., Jasqui-Romano, S., Mercado-Cárdenas, V. M.,... & Vázquez-Alanis, A. (2015). Consenso de diagnóstico y tratamiento de la

osteoporosis en la mujer posmenopáusica mexicana. *Medicina Interna de Mexico*, 31(5).

35. Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., & Ramirez-Vick, J. E. (2014). Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(1), 15-56.
36. Post, T. M., Cremers, S. C., Kerbusch, T., & Danhof, M. (2010). Bone physiology, disease and treatment. *Clinical pharmacokinetics*, 49(2), 89.

Q

37. Qi, H., Ye, Z., Ren, H., Chen, N., Zeng, Q., Wu, X., & Lu, T. (2016). Bioactivity assessment of PLLA/PCL/HAP electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Life sciences*, 148, 139-144.
38. Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R., & Wenstrup, R. J. (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(6), 683-692.

R

39. Rodenas-Rochina, J., Vidaurre, A., Cortázar, I. C., & Lebourg, M. (2015). Effects of hydroxyapatite filler on long-term hydrolytic degradation of PLLA/PCL porous scaffolds. *Polymer Degradation and Stability*, 119, 121-131.

S

40. Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of materials science*, 44(21), 5713-5724.
41. Sims, N. A., & Martin, T. J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy reports*, 3.
42. Stevens, B., Yang, Y., Mohandas, A., Stucker, B., & Nguyen, K. T. (2008). A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance

bone regeneration in engineered bone tissues. *Journal of biomedical materials research Part B: applied biomaterials*, 85(2), 573-582.

43. Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials today*, 11(5), 18-25.

44. Suárez, D. (2012). Principios básicos en regeneración ósea guiada. *Acta bioclínica*, 2(3), 94-121.

T

45. Tanodekaew, S., Channasanon, S., Kaewkong, P., & Uppanan, P. (2013). PLA-HA scaffolds: preparation and bioactivity. *Procedia Engineering*, 59, 144-149.

46. Thavornnyutikarn, B., Chantarapanich, N., Sitthiseripratip, K., Thouas, G. A., & Chen, Q. (2014). Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. *Progress in biomaterials*, 3(2-4), 61-102.

V

47. Velasco, M. A., Narváez-Tovar, C. A., & Garzón-Alvarado, D. A. (2015). Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *BioMed research international*, 2015.

48. Vergara, A. (2017). *Evaluación de la eficacia de la osteoinducción y osteoconducción durante la interacción de preosteoblastos de ratón (MC3T3-E1) con biomateriales a base de poliuretano e hidroxiapatita* (tesis de pregrado). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.

W

49. Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., & Franceschi, R. T. (1999). Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct *in vitro* and *in vivo* differentiation/mineralization potential. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(6), 893-903.

50. Wu, G. F., Liu, J., Ma, Y. W., Jiao, J. J., & Xiao, X. F. (2013). Fabrication and Characterization of Hydroxyapatite/Poly (L-Lactic Acid-

Polycaprolactone Nanofibrous Composite Scaffolds. In *Advanced Materials Research* (Vol. 791, pp. 137-140). Trans Tech Publications.

Z

51. Zhu, N., & Chen, X. (2013). Biofabrication of tissue scaffolds. In *Advances in biomaterials science and biomedical applications*. InTech.