



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRAS POLIMÉRICAS DE PLA-ZrO₂

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LAURA GUADALUPE HERNÁNDEZ TAPIA

TUTOR

DR. MARCO ANTONIO ALVAREZ PEREZ

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

CDMX.,

SEPTIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al dador de la vida, por que me mantuvo en este caminar dandome la fuerzas, salud y entendimiento para terminar esta etapa.

A mis padres, Juan Honorio H.B y Margarita T. G, siendo los pilares de este periodo de trabajo, ya que sin ellos no me hubiera sido posible concluir esta etapa.

A mis hermanos y cuñados; Ricardo, Tov, Yohanan, Patricia, Rebeca, Nadia, Miguel, Alheli y Diana. Por su apoyo, comprension y palabras de aliento en los momentos indicados que necesitaba su ayuda.

A mis amigos y compañeros de laboratorio con lo que comparti gran parte de mi tiempo, por sus aportes, conocimientos, y diversion.

A mi tutor el Dr. Marco Antonio A. P, por permitirme trabajar con el y abrirme las puertas de su laboratorio, por compartirme de sus conocimientos y enseñanzas, por guiarme durante el procesos de esta tesis.

Al Dr. Fernando Suaste Olmos por la asesoría, así como el importante y excelente apoyo técnico que me brindo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la UNAM, mi segunda casa, por permitirme ser parte de ella y abrirme las puertas a la educacion, formacion y seno científico.

Al CONACYT por el apoyo de otórgame una beca de maestría y darme la oportunidad de empezar este proyecto.

Se agradece el apoyo por parte de DGAPA-UNAM: PAPIIT en 210815 al proyecto que me ha permitido la realización de estas investigaciones.



DEDICATORIA

A mis padres:

Que con amor y cariño durante este caminar siempre me acompañaron, con su apoyo incondicional y un ejemplo de superación.

Y a mi familia que de una u otra forma buscaron siempre ayudarme.

Hoy se cumple una meta y cierro una etapa!



RESUMEN

En biomedicina la reparación de los defectos óseos se ha convertido en un desafío y busca alternativas para que el proceso de regeneración ósea sea de manera óptima. Los andamios compuestos cerámico/polímero han recibido gran atención en los últimos años ya que pueden tener amplias aplicaciones como substitutos biológicos para lograr un aumento o generar un reemplazo funcional de tejidos u órganos del cuerpo humano. Los andamios que pueden alcanzar nuevas propiedades únicas en su estructura, morfología y composición, cuyas propiedades participan en la interacción célula-material.

Este trabajo tiene el objetivo de sintetizar materiales compuestos, a partir de andamios hilados de poli-ácido láctico (PLA) y partículas de óxido de circonio (ZrO_2); para evaluar el efecto sobre la adhesión, proliferación y viabilidad celular de osteoblastos en cultivos *in vitro*.

Por medio de la técnica de hilado por propulsión de gas se obtuvieron andamios de PLA y PLA/ ZrO_2 , usando gas argón de 99.99% de pureza a una presión de 35 PSI; con una punta de 0.3mm, una distancia al colector de 11 cm. Los andamios se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (MEB), difracción de rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja (FTIR), pruebas mecánicas de tensión y ensayos de biocompatibilidad.

Nuestros datos muestran la obtención de andamios fibrilares de PLA mezclados con 0.1g y 0.5g de partículas de ZrO_2 , con escalas *nano-* y *micro-* métricas, y conservando su composición y morfología. Los ensayos de biocompatibilidad indican que los andamios compuestos mejoran la adhesión y proliferación de los osteoblastos, siendo biocompatibles y no tóxicos para la células.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la obtención de los andamios compuesto de PLA/ ZrO_2 permite mimetizar la matriz extracelular del tejido nativo. Así como los andamios de PLA/ ZrO_2 al 0.5g que aumentan significativamente la adhesión y proliferación de los osteoblastos en cultivos *in vitro*.



ABSTRACT

Bone defects today have become a global problema. In biomedical the repair these has become a challenge and are looking for alternatives to the bone regeneration process is optimally. Scaffolds ceramic/polymer composites are receiving an increasing attention as it can have such wide applications as biological substitutes; to achieve an increase or functional replacement tissues or organs of the human body, scaffolds that can achieve new unique properties in structure, morphology and composition, the properties involved in cell-material interaction.

The purpose is the synthesize composite materials from PLA scaffolds with nanoparticles of zirconium oxide (ZrO_2); to evaluate the effect of adhesion, cell proliferation and viability of osteoblasts in cultures *in vitro*.

For medium of the technique air jet spinning was use for obtain PLA and PLA/ ZrO_2 scaffolds, using argon gas (99.99%), at a preasure of 30 PSI; with a tip of 0.3mm, a distance of 11cm of the collector. The scaffolds were characterized by SEM, DRX, FTIR, mechanical stress tests and biocompatibility assay.

Our data show the obtaining of PLA nanofiber scaffolds and PLA/ ZrO_2 scaffolds (0.5g and 0.1g) in nano and micrometer scales, maintaining its composition anda morphology. Biocompatibility assay indicate that the composite scaffolds improve adhesion and proliferation of osteoblast, they're biocompatible andnontoxic to the cells.

In conclusion, we obtained a scaffold that permit mimic the extracellular matrix of bone tissue. The PLA/ ZrO_2 scaffolds significantly increase the adhesion and proliferation of osteoblasts in cultures *in vitro*.



INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura jerárquica del hueso cortical humano
Figura 2	Arquitectura de andamios y unión celular
Figura 3	Módulo elástico de diferentes tipos de polímeros biodegradables y cerámicas para tejido óseo
Figura 4	Técnica de hilado por propulsión de gas
Figura 5	Estructura química de los dos isómeros del PLA
Figura 6	Diagrama de la síntesis hidrotérmal
Figura 7	Procesamiento de probetas
Figura 8	Microfotografías de nanopartículas de óxido de circonio
Figura 9	Difractogramas de las nano partículas de ZrO_2
Figura 10	Cálculos de la ecuación de Scherrer
Figura 11	Micrografías de los andamios de PLA
Figura 12	Micrografías de los andamios nanocompuestos
Figura 13	Histograma del diámetro promedio de las fibras y diámetro del poro interfibrilar de los andamios compuestos
Figura 14	Espectrograma de FTIR de los andamios
Figura 15	Ensayo de Tensión. Módulo de Young
Figura 16	Ensayo de Tensión. Tensión a la ruptura
Figura 17	Adhesión celular
Figura 18	Ensayo de proliferación
Figura 19	Micrografías de Inmunofluorescencia Cell tracker Green
Figura 20	Micrografías de las células en los andamios de PLA- ZrO_2

TABLA DE ABREVIATURAS

MEC	Matriz extracelular
µm	Micrómetros
Nm	Nanómetros
HA	Hidroxiapatita
GPa	Gigapascales
MPa	Megapascales
PLA	Poli- ácido láctico
PCL	Poli- caprolactona
PGA	Poli- ácido glicólico
PHB	Poli-hidroxibutirato
FDA	Food and drug administration
ZrO₂	Óxido de circonio
DRX	Difracción de rayos X
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo de transformadas de Fourier
MEB	Microscopia electrónica de barrido
M	Monoclínica
C	Cubica
T	Tetragonal
hfOb	Osteoblastos fetales humanos
SFB	Suero fetal bovino
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
ELISA	Análisis de inmunoabsorción unida a enzimas
MTT	Ensayo de azul triazol
SRF	Sin rojo fenol
PFA	Paraformaldehido
AJS	Air jet spinning



INDICE

CAPITULO 1. FUNDAMENTO TEORICO

TEJIDO ÓSEO	2
PROPIEDADES MECÁNICAS DEL HUESO	4
INGENIERÍA DE TEJIDOS	6
ANDAMIOS PARA TEJIDO ÓSEO	7
TÉCNICA DE HILADO POR PROPULSIÓN DE GAS “AIR JET SPINNING”	12
POLÍMEROS	13
POLI-ÁCIDO LÁCTICO (PLA)	14
CERÁMICOS	16
ÓXIDO DE CIRCONIO (ZRO ₂)	16

CAPITULO 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
HIPÓTESIS	20
JUSTIFICACIÓN	20

CAPITULO 3. METODOLOGIA

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CIRCONIO POR LA TÉCNICA HIDROTHERMAL	22
DISEÑO Y FABRICACIÓN DE ANDAMIOS DE POLI ÁCIDO LÁCTICO (PLA)	23
FABRICACIÓN DE ANDAMIOS COMPUESTO DE PLA/ZRO₂	23
PRUEBA MECÁNICA “ENSAYO DE TENSIÓN”	24
CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS	25
ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD	26

CAPITULO 4. RESULTADOS

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ZRO₂	30
DISEÑO Y FABRICACION DEL ANDAMIO	33
DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO PROMEDIÓ DE LAS FIBRAS HILADAS Y TAMAÑO DE PORO.	36
ANÁLISIS DE FTIR	37



ENSAYO DE TENSIÓN	38
ADHESIÓN CELULAR	40
PROLIFERACIÓN CELULAR	41
INTERACCIÓN CÉLULA-MATERIA.	42
DISCUSION	44
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50



CAPÍTULO 1

Fundamento Teórico



TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo, que como otros tejidos conjuntivos, está integrado de células y matriz extracelular (MEC). La característica que distinguen a este tejido de los demás es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección¹.

El hueso es un tejido vivo complejo, tiene una excelente estructura jerárquica que va de una escala de nanómetros a macrometros. Es catalogado una estructura “composito” integrado de una fase orgánica (base en colágena) y una fase inorgánica (mineral) los cristales de calcio por lo que es considerado una estructura compuesta natural. Su conformación consta del 60% del mineral, 30% de matriz extracelular y 10% de agua². El mineral es el fosfato de calcio en la forma de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ¹ y la matriz extracelular ósea está constituida principalmente por la colágena tipo I, y en menor medida de colágeno tipo V. Todos los tipos de proteína colágena representan casi el 90% del peso total de las proteínas de matriz ósea. El otro 10% corresponde a proteínas no colágenicas. Hay cuatro grupos principales de proteínas no colágenicas:

- Proteoglucanos
- Glucoproteínas
- Proteínas osteo específicas
- Factores de crecimiento y citosinas.¹

La matriz extracelular (MEC) posee características biológicas esenciales que proporcionan una plataforma para la adhesión celular y la activación de vías de señalización altamente reguladas, así como también tiene una función importante en el crecimiento, la proliferación y el comportamiento celular^{3,4}.

A nivel macroscópico el hueso se divide en dos tipos, el hueso compacto o cortical y el hueso trabecular o esponjoso^{5,6}.

A nivel microestructural, el hueso cortical se compone de unidades de repetición de elementos cilíndricos llamados osteonas, que miden aproximadamente 250 μ m de ancho, mientras que el hueso esponjoso está formado de interconexiones de trabéculas con espacios llenos de médula ósea. Ambas unidades, osteonas y trabéculas se componen



de fibras de colágena⁶. En el centro de la osteona hay un canal vascular denominado “canal de Havers”, que contiene vasos sanguíneos y nervios, este se encuentra rodeado de 20-30 capas concéntricas de fibras, llamadas laminillas, que están ordenadas a $\pm 45^\circ$ entorno al canal central. Las láminas constan de matrices de fibras de colágena, fibras de 100-2000 nm de diámetro, compuestas de fibrillas de colágenas. Las fibrillas son un conjunto de moléculas de colágena que se estabilizan con enlaces cruzados y con nano partículas de minerales incrustadas entre las cabezas y las colas de las moléculas de colágena. Estos dos componentes forman una estructura compuesta en nanoescala. Las moléculas de colágeno forman una matriz, de tal manera que las moléculas de colágena están escalonados cada 67 nm con espacios de 50 nm entre las moléculas, en donde se encuentran las partículas del mineral que tienen un tamaño aproximado de 50 nm x 50 nm x 2 nm (Figura 1). Esta organización es considerada la estructura terciaria del hueso^{5, 6}.

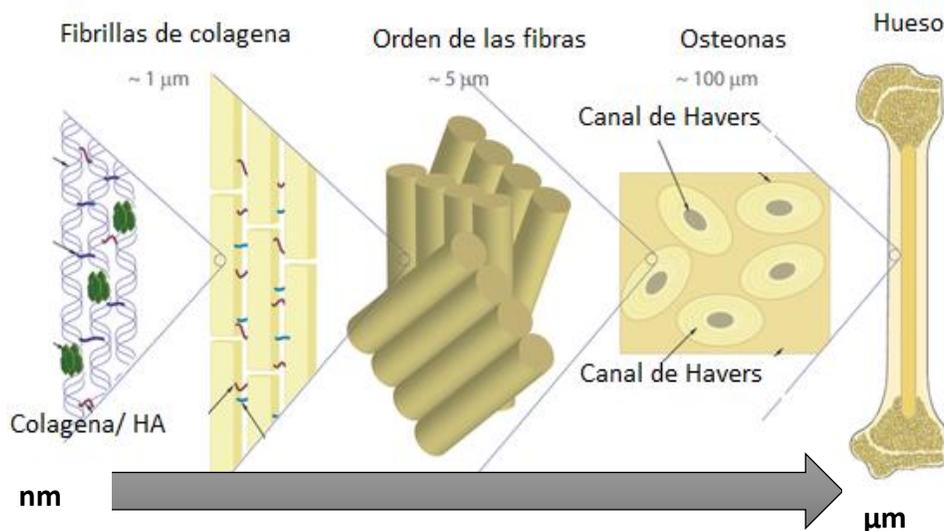


Figura 1. Estructura jerárquica del hueso cortical humano.⁵

PROPIEDADES MECÁNICAS DEL HUESO

En el cuerpo, el hueso tiene una variedad de funciones como son: proveer un soporte mecánico para los tejidos blandos (apoyo), sirve de anclaje con los músculos para generar movimiento, es por ello que juega un papel importante en la protección de órganos vitales.

La anisotropía estructural del hueso permite darle las excelentes propiedades mecánicas de ser elástico, semifrágil y duro. El componente orgánico del hueso es el responsable de la fuerza de tensión, es decir de su flexibilidad (tracción). El componente mineral del hueso permite que aumente la rigidez del hueso y la fuerza de compresión, debido a los cristales de HA que están implícitos en los espacios entre las moléculas de colágena.⁶

Para conocer las propiedades mecánicas del hueso se han aplicado ensayos que se utilizan para medir la forma en que un material resiste a una fuerza aplicada, los resultados de estas pruebas o ensayos serán las propiedades mecánicas de dicho material.⁵

Para el estudio de hueso una de las pruebas que es aplicable, es el ensayo de tensión, el cual mide la resistencia de un material a una fuerza estática o gradualmente aplicada y permite obtener información relacionada con la resistencia, rigidez y ductilidad de un material. Entre los resultados que arroja se encuentra el módulo elástico (módulo de Young).⁶

El modulo elástico describe la inflexibilidad o rigidez relativa de un material, que se mide mediante el plano inclinado de la región elástica del grafico de resistencia-deformación. El módulo de Young en las gráficas se representa con la letra E y se expresa en unidades de fuerza por unidad de área, normalmente en giganewtons por metro cuadrado (GN/m²) o gigapascales (GPa). El módulo elástico representa el coeficiente de fuerza elástica con respecto a la deformación elástica, por lo que cuanto menor sea la deformación causada por la fuerza dada, mayor será el módulo de Young.^{2, 6}

El hueso compacto tiene una fuerza de compresión entre un rango de 131-224 MPa y un módulo de Young entre rangos de 17 a 20 GPa. Mientras que la fuerza de compresión y



módulo de Young del hueso trabecular es de 5 -10 MPa y 50 –100 MPa respectivamente. El módulo de Young del hueso trabecular en un ensayo de tensión es de 500 a 700 MgP.² Sin embargo con esta buena resistencia mecánica es susceptible a fracturas como resultado de la resorción fisiológica, traumas por daño, patologías óseas, infecciones y enfermedades óseas.²

Los tratamientos convencionales o tradicionales para los defectos óseos de tamaño crítico son los injertos óseos como son:

- 1) Autógenos: Obtenidos de la misma persona, son considerados el estándar de oro ya que es un sustituto ideal y una de las técnicas más preferenciales. Entre sus limitaciones esta su morbilidad del sitio donador, tamaño del defecto óseo, problemas de anatomía y estructura y elevados niveles de resorción durante la cicatrización.²
- 2) Aloinjertos óseos: Son obtenidos de individuos de la misma especie, son huesos de cadáveres, entre sus desventajas pueden inducir una respuesta inmunológica debido a las diferencias genéticas y hay riesgo de obtener alguna enfermedad de transmisión e infecciones.
- 3) Xenoinjertos óseos: injertos obtenidos de origen animal, entre los más comunes de tipo porcino y vacuno, entre sus limitaciones se encuentran: el ser rechazados por las células, suelen ser costosos y requiere de segundas cirugías^{2, 7}.

A causa de las limitaciones de la interacción con el ambiente del huésped de estos tipos de tratamientos, la corrección de los defectos óseos ha cobrado gran importancia en el área de ingeniería de tejidos buscando mejorar las estrategias clínicas para su tratamiento.

La reparación y reconstrucción de defectos óseos requieren estrategias innovadoras con un montaje jerárquico del tejido, debido a que las propiedades del tejido óseo son fuertemente dependientes de la estructura, organización de la MEC que se extiende por varios órdenes de magnitud (nm a cm) y de las células^{4, 6}.

La necesidad de obtener un sustituto biológico usado con seguridad, que sea estéril y evitar segundas cirugías, ha puesto como enfoque alternativo a la ingeniería de tejidos.

INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos (TE) es un campo multidisciplinario centrado en el desarrollo y aplicación de los campos de conocimiento como de la química, física, ingeniería, ciencias de la vida y clínicas para dar solución a problemas médicos, como es la pérdida de la función de tejidos u órganos⁸⁻¹⁰. Tiene como objetivo implementar estrategias para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido^{8, 11}. Entre las que se encuentra el diseño de andamios para cultivos celulares, que permitan el crecimiento y nutrición de las células.¹² Para lograr la regeneración de tejidos, por lo general tres enfoques han sido investigados individualmente o en combinación: terapias basadas en células, factores de inducción de los tejidos, y andamios biocompatibles.¹¹

Tres clases principales de biomateriales modernos son utilizados para el diseño de andamios: bioinertes, biodegradables y bioactivos o materiales compuestos,^{13,14} materiales que pueden ser polímeros, cerámicos y metales que son diseñados para estimular la respuesta celular específicamente a nivel molecular.¹²

Las propiedades físicas y químicas así como la topografía superficial (morfología, textura, rugosidad y escala) son parámetros que influyen en la interacción célula-material. Estas características deben promover interacciones específicas con las células, su adhesión celular y procesos como la proliferación, la diferenciación, la organización y producción de matriz extracelular.⁸

La innovación de nuevos materiales se está abordando en todo el mundo ya que han ganado gran atención en los últimos años¹⁵. Se han desarrollado andamios biomiméticos que traten de imitar la biología de la MEC para promover la curación y la integración de los tejidos del huésped¹⁴. En un enfoque general, materiales que proporcionen un soporte poroso, que sirvan de molde temporal para cultivos celulares *in vitro* y permita la formación de tejido nuevo¹².

ANDAMIOS PARA TEJIDO ÓSEO

El concepto de “scaffolding” o “andamiaje” como una matriz porosa o como un implante que permite la infiltración de las células y regenerar el tejido local fue introducido por primera vez por Barth en 1893¹¹.

Un andamio es un biomaterial que estructuralmente permite el soporte de células de dicho tejido para promover su crecimiento, permitir el intercambio de nutrientes y formación de matriz extracelular por las células, proporcionando una superficie adecuada para la fijación celular, la proliferación, y diferenciación^{16, 17}.

El andamio ideal debe ser:

- Biocompatible, el material no debe provocar una respuesta inflamatoria o tóxica sostenida después de la implantación
- Bioabsorbible, el material debe tener la vida útil aceptable y el tiempo de degradación del material debe coincidir con el proceso de curación o regeneración.
- Una red altamente porosa, que permita una fácil invasión de los vasos sanguíneos con el fin de suministrar nutrientes a las células y permitir el transporte de desechos metabólicos.¹⁶
- Tridimensional, con una superficie apropiada para la adhesión celular, la proliferación y la diferenciación.^{16, 17}
- Con una buena resistencia mecánica, para mantenerse estable física y químicamente hasta la formación de tejido nuevo.¹⁸
- Los productos de degradación no deben ser tóxicos y deben ser metabolizados y eliminados del cuerpo.
- El material debe tener la permeabilidad y la capacidad de procesamiento apropiado para la aplicación prevista.¹⁸

Los andamios deben ser biodegradables con una tasa de degradación controlada y finalmente desaparecer cuando el nuevo tejido está completamente regenerado.¹²



La biocompatibilidad de un andamio va depender de su: composición química, peso molecular, solubilidad, forma y estructura, hidrofiliicidad, hidrofobicidad, la energía superficial, la absorción de agua, la degradación y el mecanismo de erosión.¹⁸

La arquitectura de los andamios afecta a la unión y la difusión celular. Como se muestra en la figura 2, los andamios con arquitecturas a nanoescala en comparación con los andamios con arquitectura de macroporos y microfibrilares tienen mayor área superficial para adsorber proteínas, presentando muchos más sitios de unión a receptores de membrana.¹⁹

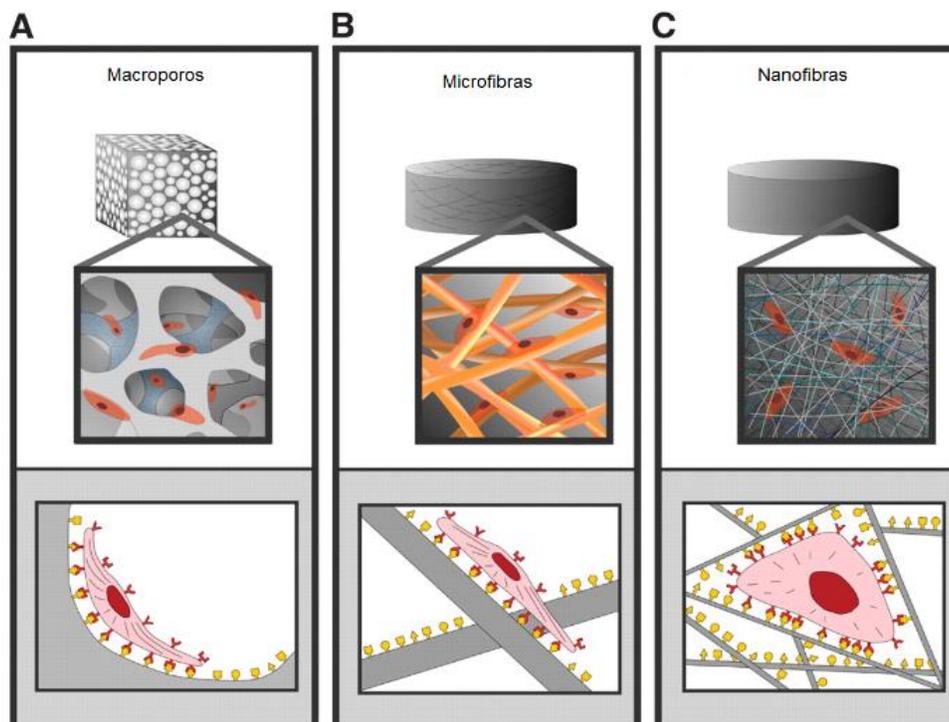


Figura 2. Arquitectura de andamios y unión celular. (a y b) La unión celular con los andamios a microescala es plana y las células se propagan como si se cultivaran en superficies planas. c) Los andamios a nanoescala aumentan el área superficial y aumenta los puntos de contacto con las células.¹⁹

En los últimos años se han diseñado andamios micro / nanofibrilares para aplicaciones biomédicas, debido a que las fibras son de muy pequeño tamaño, y la morfología se asemejan a las fibras de colágeno en la matriz extracelular (ECM) natural. Los andamios nanofibrilares tienen mayor área superficial en relación al volumen y su microestructura porosa con poros interconectados es propicio para el cultivo de células en el tejido,

proporcionando un sustrato más adecuado para la adhesión, el crecimiento, la proliferación y la migración celular^{3, 20, 21}. El tamaño de poro apropiado y una interconectividad del 100% no sólo proporcionan la migración y la proliferación celular, también permiten la difusión eficiente de los diversos factores de crecimiento y la rápida vascularización^{9, 22}.

Los andamios para tejido óseo deben ser osteoconductivos tales que las células osteoprogenitoras puedan adherirse, migrar, diferenciarse, y finalmente formar hueso nuevo después de la degradación completa del andamio temporal.

Los andamios fibrilares poliméricos para aplicaciones de ingeniería de tejidos ha tenido limitaciones como son: escasa biocompatibilidad, liberación de productos de degradación ácidos, pobre procesabilidad, baja resistencia mecánica y por ende una pérdida rápida de propiedades,^{21, 23} la mezcla de materiales inorgánicos en matrices de polímeros en una forma particular puede dar lugar a la formación de materiales de soporte multifuncionales, únicos y eficaces^{3,20}, conocidos como andamios compuestos, nanoestructurados, híbridos o nanocompuesto.^{20, 21, 24}

El uso de andamios nanocompuestos permite mimetizar la matriz extracelular y mejora significativamente el comportamiento celular^{7, 16,25}, ya que provee un microambiente de soporte e interacción molecular entre las células y los andamios. Como se ha reportado la MEC natural tiene una función importante en el crecimiento, la proliferación y el comportamiento de las células.^{10, 11, 25}

Los andamios compuestos han surgido en las últimas dos décadas como una estrategia eficaz para mejorar las propiedades estructurales y funcionales de los andamios monofásicos o convencionales (polímeros sintéticos) como son: rigidez, resistencia, peso, rendimientos a altas temperaturas, dureza, etc.)^{8, 26, 27}. Como se muestra en la figura 3 los andamios compuestos se han utilizado para obtener una resistencia mecánica similar a la del hueso trabecular y a la del hueso cortical²⁸.

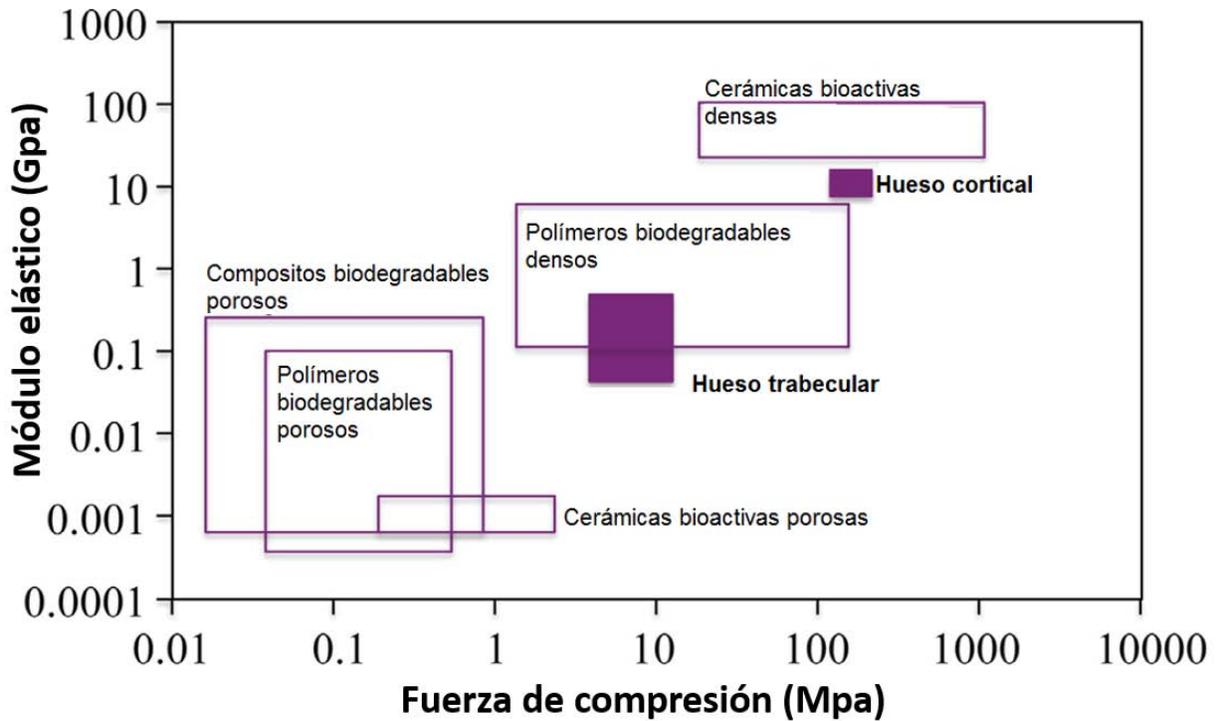


Figura 3. Módulo elástico de diferentes tipos de biomateriales (polímeros, cerámicas) en comparación con el hueso trabecular que va de un rango de los 100 a 700 (Mpa) y el hueso cortical de 10 a 20 (Gpa).²⁸

Los materiales compuestos se pueden clasificar en categorías: con partículas, fibras y laminares dependiendo de la forma de los materiales^{29, 30}. Esta interacción es un efecto sinérgico que conduce a la mejora de las propiedades del material con respecto a los componentes por separado^{2, 32, 34}. Cuando la fase inorgánica tiene al menos una dimensión en escala nanométrica, se le denomina nanocompuesto. Una estructura nanométrica es definida como aquellas que tienen una dimensión en el rango de 1 – 100nm^{2, 32, 35}.

Los materiales compuestos particulados contienen partículas, estas partículas pueden mejorar la rigidez, la resistencia al calor, la conductividad electrónica y al mismo tiempo mantiene bajo peso. En el área biológica no presentan citotoxicidad además de ser químicamente inertes^{24, 27, 29, 31}.

El uso de materiales nanocompuesto ofrecen ventajas para el uso en aplicaciones biomédicas, tales como:

- Aumento de la resistencia / dureza
- Tenacidad mejorada
- Menor módulo de elasticidad y menor ductilidad
- Reducción del riesgo de rechazo
- Mayor proliferación celular
- Promoción de osteointegración.^{12, 30, 32}

Es por ello que se proponen como excelentes opciones para diseño de andamios en ingeniería de tejido óseo^{8, 29, 33}, y no solamente la combinación de polímeros y nanoestructuras permiten nuevas perspectivas en el auto-ensamblaje de los nanomateriales también se ha reportado su aplicación biomédica, antibacteriana y también enfocados a otras áreas como fotocátalisis, sensores, almacenamiento de energía, filtración, etc.^{2, 8, 30}

En estudios *in vitro* se ha reportado que andamios con componentes nanométricos, la osteoconductividad se ve mejorada y las células osteoprogenitoras y osteoblastos mejoran procesos de adhesión, migración, diferenciar y síntesis de nueva matriz ósea^{12, 36-38}. Estas propiedades se ven relacionadas por: una mayor capacidad de humectación, de superficie específica y de energía de superficie que conducen a un aumento de la absorción de proteínas, mejoran la adhesión celular e influyen en el crecimiento espacial de las células en comparación con los biomateriales convencionales.^{6, 39, 40}

Debido a estas ventajas este tipo de andamios tienen amplias aplicaciones en la ingeniería de tejidos, con respecto a tejido óseo, cartílago y regeneración epidérmica.¹¹

41



TÉCNICA DE HILADO POR PROPULSIÓN DE GAS “AIR JET SPINNING”

El hilado por propulsión de gas es una técnica que permite la obtención y fabricación de andamios basados en la micro/nano fabricación, conocida también por sus siglas en inglés “Air jet spinning” (AJS) ⁴². Se caracteriza por ser un método sencillo, eficaz, de bajo costo, de proceso de preparación rápida y fácil. También permite la obtención de andamios nanocompuestos, híbridos orgánicos/inorgánicos con estructura micro/nanofibrilares porosa y altamente interconectados²⁰. Otra característica única de esta técnica es la alta tasa de producción en un corto período de tiempo (0.5ml / min).¹⁶

Básicamente consta de la utilización de:

- Un aerógrafo
- Colector
- Compresora/ tanque de Gas
- Solución polimérica

La técnica consta de la colocación de la solución del polímero en un aerógrafo que posteriormente será expulsado a una cierta velocidad y presión utilizando un gas inerte mediado por un regulador que está unido a un compresor o tanque, con el fin de expulsar y estirar la solución de polímero por la boquilla del aerógrafo y al mismo instante la evaporación del disolvente, permitiendo la formación de fibras finas. Las fibras formadas son depositan sobre un colector (figura 4).^{3, 20,16}

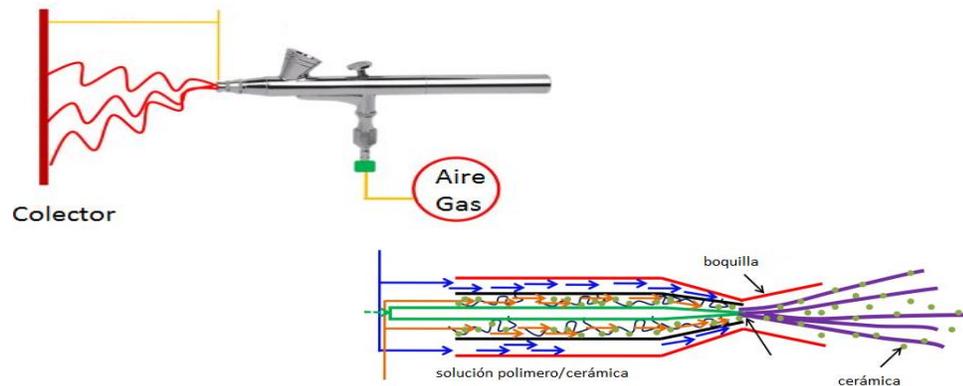


Figura 4. Técnica de hilado por propulsión de gas y mecanismo del AJS para andamios compuestos.²⁰

Los parámetros que intervienen para la exitosa obtención de fibras son: la velocidad de inyección, la presión del flujo de gas, la concentración de polímero, la solución de polímero-disolvente y la distancia de trabajo ¹⁶

POLÍMEROS

Los polímeros son moléculas orgánicas gigantes en cadenas. La polimerización es el proceso mediante el cual las moléculas más pequeñas se unen para crear estas moléculas gigantes. Comparados con la mayoría de los metales y de los cerámicos, los polímeros tienen baja resistencia, rigidez y temperatura de fusión.²⁹

Los polímeros utilizados en ingeniería de tejidos son de origen natural o sintético.

Naturales:

- Polisacáridos: Almidón, alginato, quitosan/quitina y derivados del ácido hialurónico).
- Proteínas: Soya, colágena, seda, gel de fibronectina.

Sintético:

- Poli-ácido láctico (PLA), poliácido -glicólico (PGA), poli-caprolactona (PCL), poli hidroxibutirato (PHB).^{2, 28}

Los polímeros sintéticos tienen relativamente buena resistencia mecánica, su tasa de degradación y forma pueden ser modificadas fácilmente, su superficie suelen ser hidrofóbica y no presenta señales de reconocimiento celular, mientras que los polímeros de origen natural tienen la ventaja de tener un reconocimiento biológico potencial, pero tienen bajas propiedades mecánicas.^{2, 33, 43}

La familia Poli (α -ésteres) son polímeros sintéticos termoplásticos biodegradables con enlaces éster alifáticos, hidrolíticamente lábiles orientados en su columna vertebral, comprenden la clase de polímeros más ampliamente investigados.^{2, 18, 44}

Ejemplos de este tipo de polímeros son el PGA, PLA, y sus copolímeros, como el poli-ácido glicólico (PLGA) que se utilizan con mayor frecuencia en la ingeniería de tejidos. Son biocompatibles y se degradan en componentes no tóxicos con una tasa de degradación controlable, aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para uso clínico.^{2, 44}



Debido a la relativa facilidad de su síntesis (a través de la apertura de anillo o polimerización por condensación) y la disponibilidad comercial, este tipo de polímeros, han sido investigados y usados hasta la fecha en el campo de la medicina, industria y en el área de la ingeniería de tejidos.²

POLI-ÁCIDO LÁCTICO (PLA)

El PLA es un polímero de la familia poliésteres alifáticos termoestables, con uso frecuente en ingeniería de tejidos^{2, 45}. El PLA es sintetizado a partir de L y D ácido láctico, que se produce a partir de la fermentación del azúcar y polisacáridos tales como: maíz de trigo, almidón y otras fuentes. La polimerización del ácido láctico puede ser por dos formas por apertura de anillo o polimerización por condensación.⁴⁶

El ácido láctico es una molécula quiral, existen dos formas estereoisoméricas que originan cuatro distintas formas morfológicas del PLA, es D-PLA, L-PLA, D, L-PLA y meso-PLA. El D-PLA y L-PLA son dos polímeros estereoregulares. La polimerización de estos monómeros conduce a la formación de polímeros semi-cristalinos^{18, 44}. El D, L-PLA es un polímero racimo obtenido de la mezcla del D- y L- PLA, y el meso-PLA puede ser obtenido del D, L-lactida.

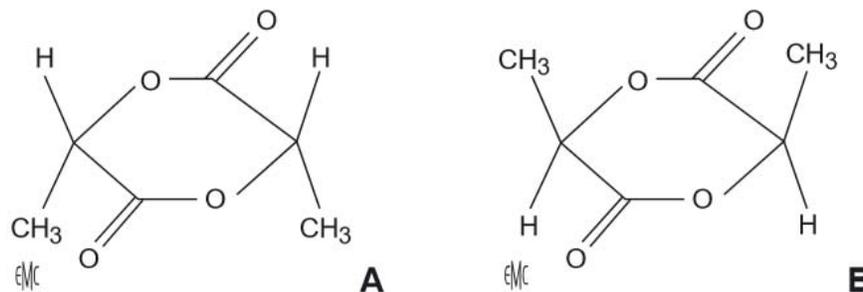


Figura 5. Estructura química de los dos isómeros del PLA. a) L- láctico b) D- láctico.¹³

El L-PLA es un polímero biocompatible, biodegradable, cristalino (~37% de cristalinidad). Tiene una temperatura de transición vítrea de 60 a 65°C y una temperatura de fusión de aproximadamente 175°C, tiene excelentes propiedades térmicas y mecánicas⁴⁷. Sus componentes no son tóxicos, y son de degradación controlable⁸, se degrada por hidrólisis de esterificación en ácido láctico, que se descompone en agua y dióxido de carbono a través del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs¹⁸, sus tasas de degradación se pueden modificar para satisfacer su utilización de varias semanas a varios años mediante la alteración de la composición, la cristalinidad, el peso molecular y distribución⁴¹. El PLA es de lenta degradación en comparación con PGA, tiene buena resistencia a la tracción, baja extensión y un alto módulo (aproximadamente 4,8 GPa), por tanto, ha sido considerado como un biomaterial ideal para aplicaciones de soporte de carga, tales como dispositivos en ortopedia. Por sus características el L-PLA es el más usado en comparación con el D-PLA⁴¹.

En su composición química el grupo metilo adicional en la unidad de repetición PLA (en comparación con PGA) hace que sea más hidrófobo, reduce la afinidad molecular al agua, y conduce a una velocidad de hidrólisis más lenta⁴⁸. Ensayos *in vitro*, *in vivo* han demostrado su capacidad de degradarse y de mantener su integridad hasta varios meses². A pesar de que aproximadamente en 6 meses el polímero empieza a perder su fuerza cuando se hidroliza, no presenta cambios significativos en la masa¹⁸. Se ha reportado que el alto peso molecular L- PLA puede tomar entre 2-6 años para su resorción total *in vivo*^{23, 41}.

Por sus características tan atractivas el PLA tiene una alta gama de aplicaciones en el área textil, industrial, farmacológica y médica. Es usado en suturas, implantes para tejido cartilaginoso y piel, en sistemas de liberación de farmacos^{2, 49} y en ingeniería de tejidos ha tenido una aplicación ósea, usado en dos formas: en andamios y densos².

CERÁMICOS

Los materiales cerámicos son compuestos químicos o soluciones complejas, que contienen elementos metálicos y no metálicos. Tienen una amplia gama de propiedades mecánicas y físicas. Debido a sus enlaces iónicos o covalentes, los materiales cerámicos por lo general son duros, frágiles, con un alto punto de fusión, tienen baja conductividad eléctrica y térmica, buena estabilidad química y elevada resistencia a la compresión²⁹.

Las cerámicas que son ampliamente usadas en la ingeniería biomédica y en el campo de la sustitución y regeneración ósea, como implantes dentales y en el sistema locomotor, son denominadas biocerámicas. Las biocerámicas pueden ser clasificadas en bionertes, bioactivas, biodegradables, porosas y densas. Las biocerámicas bionertes son aquellas que no reaccionan al ser implantadas *in situ* como la alúmina, el circonio entre otras. Las bioactivas se caracterizan por unirse directamente al hueso sin la formación de tejido fibroso, como ejemplo es la hidroxiapatita (HA). Las biocerámicas biodegradables se disuelven con el tiempo reemplazándose por neot Tejido, como ejemplo tenemos el fosfato β -tricalcico. Las biocerámicas densas, tienen nula porosidad y la unión con el hueso es morfológica; en contraste con las biocerámicas porosas donde presenta una unión mecánica y la fijación es biológica²⁹.

ÓXIDO DE CIRCONIO (ZrO_2)

El óxido de circonio comúnmente conocido también como circona, fue descubierto en 1789 por el químico alemán Martin Heinrich Klaproth quien lo obtuvo a partir del calentamiento de ciertas gemas⁵⁰.

La circonia presenta un polimorfismo es decir se puede encontrar en 3 fases cristalinas dependiendo de la temperatura: monoclinica (M), cúbica (C) y tetragonal (T)⁵¹⁻⁵³. La circona pura es monoclinica a temperatura ambiente, siendo esta fase estable hasta los 1170°C. Por encima de esta temperatura se transforma a fase tetragonal y posteriormente a fase cúbica por encima de los 2370°C. Durante el enfriamiento la fase



tetragonal se transforma a fase monoclinica en un rango de unos 100°C por debajo de los 1070°C.⁵⁴⁻⁵⁶

Por su buena resistencia al desgaste, su dureza, su resistencia a la corrosión y al choque térmico, su conductividad iónica a alta temperaturas tiene múltiples aplicaciones en la ingeniería, industria; como catálisis, electrodos y materiales de membrana, etc^{53, 56, 57}. El interés del uso del circonio como biomaterial radica en su alta estabilidad química y dimensional, su excelente resistencia mecánica y tenacidad a la fractura así como también un módulo de Young del mismo orden de magnitud que las aleaciones de acero inoxidable, tiene una baja citotoxicidad, su biocompatibilidad y respuestas biológicas son similares a las inducidas por el titanio.^{36, 51}

Por su alta dureza y biocompatibilidad tiene amplias aplicaciones en la cirugía ósea^{53, 58, 59}. La aplicación biomédica más importante de este material ha sido en la fabricación de las cabezas femorales que componen las prótesis ortopédicas empleadas en las reconstrucciones totales de cadera, los primeros reportes de utilización de circonio con este fin aparecieron en 1988^{54, 60-62}.

El ZrO₂ se ha utilizado para el diseño de andamios para ingeniería de tejido, como cerámica convencional (> 100nm) y como nanoestructura (< 100nm) combinado con otros materiales para aplicación en tejido óseo^{37, 63}, mejorando características como son: resistencia a la fatiga, biocompatibilidad y bioactividad, lo cual le ha permitido ser aplicados en terapias de cáncer, implantes y odontología^{60, 61, 64-66}.

CAPÍTULO 2

Diseño experimental



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la última década han ido en aumento los defectos óseos, esto puede atribuirse a diferentes factores como: enfermedades sistémicas, infecciones, patologías óseas, la edad etc., convirtiéndose en un problema de salud global y por ende la reparación de estos defectos óseo son un desafío en el área clínica. Siendo el hueso una estructura compleja y jerárquica se buscan sustitutos biológicos que permitan su reparación y regeneración ósea. En el área de la ingeniería de tejidos se busca un biomaterial que permitan procesos biológicos como: adhesión, proliferación migración y diferenciación celular para que se lleve de manera óptima el proceso de regeneración ósea. Se requiere de materiales que puedan combinarse y mejorar su aplicación en esta área, por ejemplo polímeros y cerámicas que al combinarse pueden mejoran sus propiedades en estructura, función y biológicas; para el desarrollo de andamios celulares que permitan el crecimiento y nutrición de las células, para que posteriormente puedan formar su propio tejido.

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar materiales compuestos, a partir de andamios hilados de PLA y partículas de óxido de circonio (ZrO_2); para evaluar el efecto sobre la adhesión, proliferación y viabilidad celular en sistema de cultivo celular de osteoblastos *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nano partículas ZrO_2 y su caracterización con MEB y DRX.
- Diseñar y fabricar andamios poliméricos compuestos de PLA mezclados a diferentes concentraciones de nanopartículas de ZrO_2
- Evaluar las propiedades mecánicas de los andamios de PLA y PLA/ ZrO_2
- Establecer el efecto de los andamios de PLA/ ZrO_2 en la adhesión y proliferación de las células osteoblásticas en cultivos celulares *in vitro*.



HIPÓTESIS

Los andamios hilados de PLA/ZrO₂ tendrán una influencia directa sobre la biocompatibilidad, modulando la respuesta de las células osteoblásticas en modelos de cultivos celulares “*in vitro*”.

JUSTIFICACIÓN

Los avances en los campos de la biomedicina de tejidos óseos han permitido el desarrollo de plataformas que actúan como un sustituto artificial de la matriz extracelular, que recapitulan las funciones básicas del proceso de formación del hueso, proporcionando soporte, forma y estructuras superficiales con características topográficas y estructurales que a nivel celular podrían ser óptimas. Esta optimización busca que la síntesis de nuevos materiales para implantes o de recubrimientos puedan promover las primeras fases del proceso de óseo-integración como la adhesión, interacción célula-sustrato, migración y proliferación celular de una manera coordinada para incrementar el éxito en los procesos de regeneración ósea. En este trabajo se pretende el diseño y fabricación de andamios hilados de PLA/ZrO₂ en rangos nanométricos que pueden conservar la integridad estructural, dimensional y mecánica con el suficiente tiempo para permitir las primeras fases del proceso de óseo-integración. Por lo tanto; en primer lugar, se ha elegido al PLA para ser hilado debido a las propiedades de biocompatibilidad y capacidad de biodegradación y en segundo lugar, generar las nano partículas de ZrO₂ las cuales podrán controlar el ritmo de los procesos de regeneración haciendo más estable el andamio para conducir en última instancia a la regeneración del tejido más eficientemente.

CAPÍTULO

3

Metodología



3.1 Material

Se utilizaron gránulos de PLA (192,000 g/mol) Nature Works D2002. Cloruro de circonio ($ZrCl_4$ 99.9%), e hidróxido de sodio (NaOH 99.9%). El disolvente usado para la mezcla fue cloroformo ($ChCl_3$) Baker, México y Etanol al 100%.

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CIRCONIO POR LA TÉCNICA HIDROTHERMAL

Se realizó la síntesis ZrO_2 por medio de la técnica hidrotermal a partir de dos sustancias precursoras el cloruro de circonio ($ZrCl_4$) y el hidróxido de sodio (NaOH). Se realizó una disolución en 100ml de agua, utilizando 5 g de cloruro de circonio ($ZrCl_4$) con 1.5 g de hidróxido de sodio (NaOH) con un pH de 14. Por medio de una reacción de sustitución se obtuvo: cloruro de sodio (NaCl) y tetra hidróxido de circonio (hidróxido de circonio IV).

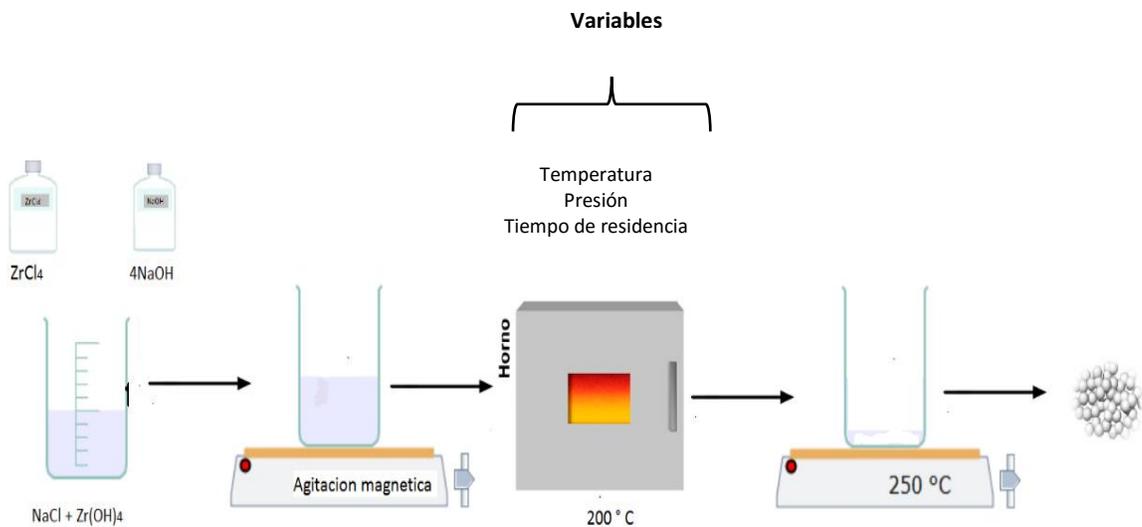
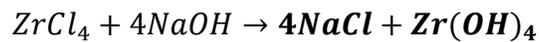


Figura. 6 Diagrama de la síntesis hidrotermal. Mezclando cloruro de circonio e hidróxido de sodio. Usando 200 °C y 250° C de temperatura.

Se realizan varios lavados con agua destilada para retirar el cloruro de sodio por medio de decantación. Posteriormente la disolución se coloca en un autoclave hidrotermal (reactor de teflón inerte) y se mete al horno hasta llegar a una temperatura de 200°C. Por presión a calor se disocia el grupo H_3O^+ , se pasa la disolución a un vaso precipitado, el cual se coloca en una estufa y se calienta hasta que llegue a 250°C para disociar el grupo hidroxilo (OH^-), (Figura 6).

El polvo obtenido se pulveriza en un mortero de ágata. El polvo obtenido se caracteriza con difracción de rayos X (DXR) y espectroscopia Infrarroja (FITR).

DISEÑO Y FABRICACIÓN DE ANDAMIOS DE POLI ÁCIDO LÁCTICO (PLA)

En el diseño del andamio primeramente se estandarizaron variables que modifican la obtención de las fibras, como son: el porcentaje de concentración del polímero, la distancia de la boquilla del aerógrafo al colector, la presión con la que se expulsa el gas y el tamaño de la boquilla del aerógrafo.

Se utilizaron 3 concentraciones de PLA al 6%, 7% y 10%, con una proporción de 3:1 de cloroformo y etanol dando 100 ml en total. Por cada 100ml del disolvente cloroformo y etanol se utilizó 6, 7, y 10 g de PLA. Primero se prepara la solución de PLA (10 g) con cloroformo (75ml) se dejan en agitación (magnética) por 24 horas. Posteriormente se coloca el etanol (25ml) y se deja en agitación 1 h.

La solución se colocó en un aerógrafo con una boquilla de 0.3mm de diámetro, a una distancia del recolector de 11cm y con una presión de 35psi de gas de Argón, con un tiempo de depósito de 15 minutos. El mismo día que se termina de preparar la disolución se realiza el depósito de las fibras por la técnica AJS.

FABRICACIÓN DE ANDAMIOS COMPUESTO DE PLA/ ZrO_2

Para obtener los andamios compuestos se preparo una la solución compuesta de PLA y ZrO_2 a diferentes concentraciones. En 100 ml de solución de PLA al 10% se agregaron 0.1g y 0.5g de ZrO_2 . Las nanopartículas de ZrO_2 se mezclaron en etanol y se colocaron

por 30 minutos a baño ultrasónico, posteriormente se mezcló con la solución de PLA 10% y nuevamente se colocaron en baño ultrasónico durante 1 hora.

PRUEBA MECÁNICA “Ensayo de tensión”

Los ensayos de tensión se basaron en la “Norma ASTM-D1708 plastic microtensile testing equipment” que es usada para medir las propiedades de tensión y elongación de materiales plásticos de pequeñas dimensiones. Las dimensiones y forma de las probetas para realizar los ensayos se muestran en la figura 7. Las dimensiones de la probeta son en rangos milimétricos. Para llevar a cabo el corte de las probetas en cada andamio se usó un suaje a fin de mantener las medidas normalizadas constantes. La medición de los espesores de cada probeta fue necesaria para la caracterización mecánica. Para la medición de espesores se utilizó un micrómetro con indicador digital Mitutoyo modelo 293-67N con un rango de 0-1 pulgada.

El ensayo se realizó en una maquina Instron 5567, se realizaron 10 probetas para cada tipo de andamio (PLA, PLA/ZrO₂) a las mismas condiciones.

El ensayo se realizó a una velocidad de 1mm/seg. Se realizó la estadística con ANOVA de 1 vía ($p > 0.05$).

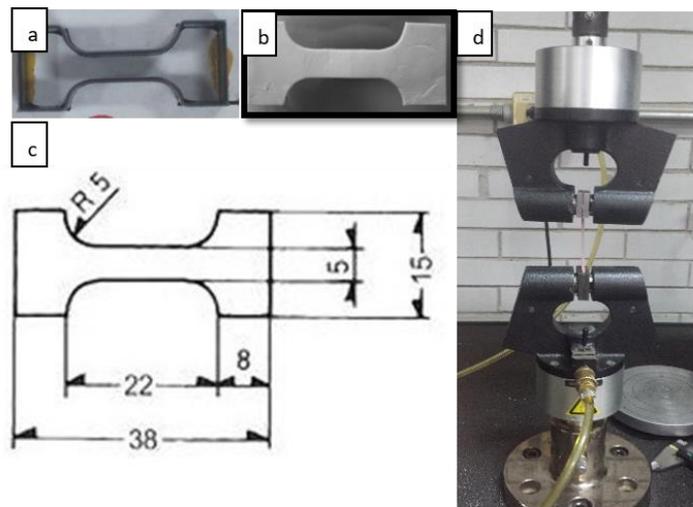


Figura.7 Procesamiento de probetas. a) Suaje con dimensiones que marca la norma ASTM D 1708-13 b) Andamios cortados por medio del suaje c) dimensiones de la probeta de acuerdo a la norma ASTM D 1708-13 d) Instron 5567.

CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS

Difracción de Rayos X

Para caracterizar y conocer la estructura de las partículas de la cerámica de ZrO_2 se realizó un análisis por rayos X. El cual nos permite conocer la fase estructural en la que se encuentra la cerámica y si es cristalina, por otro lado arroja datos para sacar el promedio de tamaño de nano partículas.

El tamaño de partícula del polvo se estimó mediante la ecuación de Scherrer:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

Para la caracterización de los grupos funcionales del PLA, PLA/ ZrO_2 se empleó la técnica de espectroscopia de FTIR. Para tal estudio se empleó un equipo Shimadzu IRAffinity. Al absorber la radiación infrarroja las moléculas perciben los cambios entre estados de energía vibracional lo que hace posible la caracterización de los principales grupos funcionales de la estructura molecular del compuesto. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en los intervalos de 4000 a 500 cm^{-1}

Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Se obtuvieron imágenes por la técnica MEB para conocer la morfología de las nanopartículas de ZrO_2 y de las fibras PLA, así como también la distribución de las partículas y de la homogeneidad de los andamios nanoestructurados. Se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FE SEM por sus siglas en inglés) JEOL JSM 7600F. El voltaje de operación para el haz de electrones fue 15 kV. Las muestras se prepararon previamente con un recubrimiento de una película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma para favorecer la conductividad de la muestra.



ENSAYOS DE BIOCMPATIBILIDAD

Cultivo celular

Se cultivaron y expandieron osteoblastos humanos fetales (hfOB 1.19) ATCC CRL-11372, en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml), 100mM de aminoácidos no esenciales y 100mM de piruvato de sodio. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad.

Ensayo de adhesión.

Se cortaron discos de 8mm de diámetro de los andamios de PLA y PLA-ZrO₂. Se esterilizaron en una solución de antibiótico con etanol durante 1 hora y se dejaron secar. Posteriormente se dejaron por 1 hora en UV. Se colocaron los discos en placas de cultivo de 24 pozos y se sembraron las células osteoblásticas a una densidad celular de 1×10^3 células/ mL y se cultivaron durante 4 y 24 horas. Al cabo del tiempo propuesto se realizaron tres lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) para remover las células que no se adhieran a las superficies. Las células adheridas al andamio se fijaron con paraformaldehído al 3.5% durante 1 hora. Posteriormente se realizaron lavados con PBS. La adherencia celular fue evaluada de acuerdo al método del cristal violeta. Se adicionan 300 µL de cristal violeta al 0.1% en cada pozo y se deja durante 30 min. Se realizan aproximadamente 3 lavados con agua bidestilada para remover el colorante no específico. Después de los lavados se adicionan 300 µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%, y se deja por 1 hora. De la solución obtenida se tomaron 200 µL que se colocaron en la placa de 96 pozos para ensayos de ELISA y fue leído en un lector para análisis de inmuno absorción unida a enzimas (ELISA), a una absorbancia de 560 nm. Los valores de la absorbancia obtenidos fueron extrapolados a una curva estándar para determinar la cantidad de células o el porcentaje de células adheridas en los andamios. Se usó como control las células sembradas sobre la misma placa de cultivo (plástico) y sobre membranas de PLA en ausencia de las nanopartículas. Los experimentos de adhesión celular se realizaron por triplicado, repitiéndose por lo menos tres veces.



Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad)

Se evaluó el efecto nanoestructurado de los andamios por la viabilidad celular con el ensayo de azul de triazol (MTT) basado en la habilidad de la enzima deshidrogenada mitocondrial para oxidar una sal de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y]-2-5 bromuro difeniltetrazolio) a un producto insoluble de color azul. El MTT se utiliza para evaluar la viabilidad celular como función del potencial redox. Las células respiratorias activas convierten el MTT soluble en agua en formazán morado insoluble. A continuación, el formazán se solubiliza y su concentración se determina mediante densidad óptica. Se sembraron 1×10^3 células/mL en los andamios de PLA y PLA/ZrO₂ y se incubaron por 3, 5, 7, 14 y 21 días. Después de cada periodo experimental, las células fueron incubadas con MTT (120 mg/ml) a 37°C por 4 horas. Pasado este tiempo, se les adiciono 400 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) y se dejó por 30min, el sobrenadante fue removido a una placa de 92 pozos y se llevó a un lector de ELISA, para obtener la densidad óptica a una longitud de onda de 545 nm. Debido a que la generación del producto azul es (directamente) proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, una disminución en los valores que se obtengan en la absorbancia a 545 nm nos indicaría una medida de la viabilidad celular. Los experimentos se realizarán por triplicado repitiéndose tres veces. Los cultivos control fueron las membranas hiladas de PLA en ausencia de las nanopartículas de circonio.

Interacción célula-material

Para observar la interacción de las células en lo andamios se utilizó el kit Cell Tracker Fluorescents. CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) es un colorante fluorescente que se utiliza para la localización y movimientos celulares. Después de cargarlo en las células, el medio de contraste es bien retenido, lo que permite el seguimiento de los movimientos celulares, el colorante tiene paso libre a través de la membrana. Se sembraron 10,000 células en los andamios, colocados en una placa de 48 pozos. Se dejaron por 24 horas. Posteriormente se lava con PBS (solución salina de fosfatos) y se incubaron a 37°C con medio sin rojo fenol y con el colorantes cell tracker a 1hr, pasando el tiempo indicado se retira el medio y se lava nuevamente con PBS. Se



deja con DMEM/SFB durante 2hr. Por último se lavan con agua destilada y se fijan con PFA 4%.

Por otro lado; se analizó también la interacción celular por medio de MEB. Las células sembradas en los andamios se fijaron con PFA 4% durante 30min, se lavaron posteriormente con PBS y se deshidrataron con etanol en diferentes concentración desde 25%, 50%, 75% durante 5min y los de 100% dos veces durante 3 minutos cada uno. Posteriormente se dejaron secar por 24 horas y fueron recubiertas de oro/paladio para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JEOL JSM 7600F).

Análisis estadístico

Todos los ensayos realizados se repitieron al menos tres veces, los datos obtenidos fueron analizados en el paquete estadístico GraphPad Prism. Se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías y Tukey Post-Hoc para la comparación entre grupos, representando la significancia \pm desviación estándar. Los resultados fueron considerados significativos con una $p < 0.05$.



CAPÍTULO 4

Resultados



SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ZrO_2

La técnica hidrotermal nos permitió la obtención de nanopartículas de óxido de circonio, la cantidad que se usó de las sustancias precursoras fue proporcional a la cantidad de polvo obtenido.

Las nanopartículas de ZrO_2 se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido, la cual nos permite observar la morfología superficial del material.

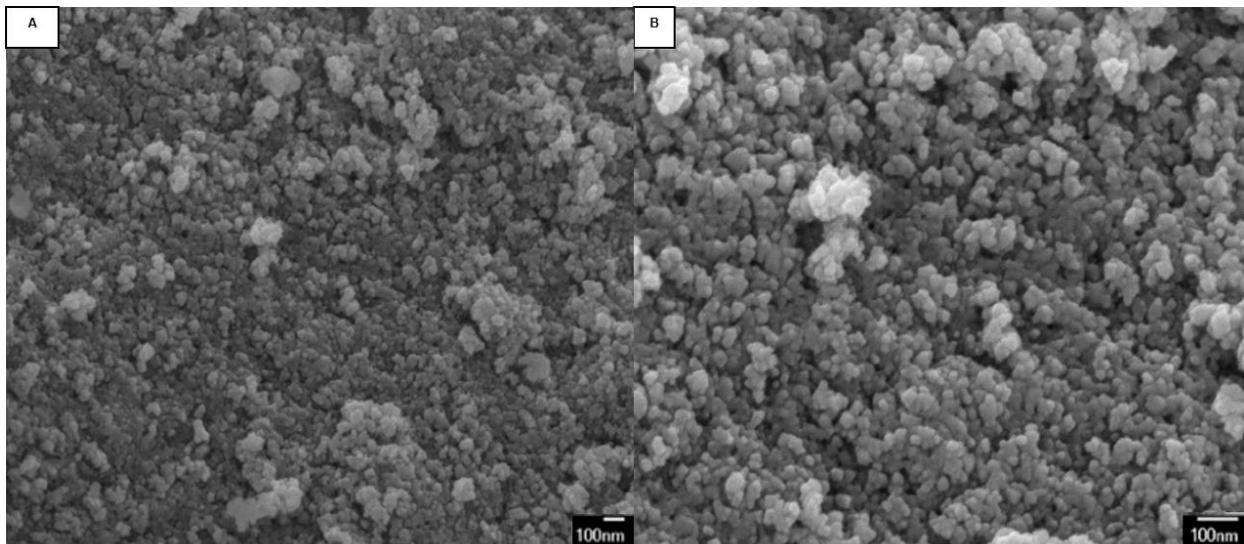


Figura 8. Microfotografías de nanopartículas de ZrO_2 por el método hidrotermal. A) Nanopartículas de ZrO_2 en un aumento de 40,000 X y B) Nanopartículas de ZrO_2 en un aumento 80,000X con morfología esférica y tamaños menores a 100nm.

Como se muestran en la figura 8, las partículas de ZrO_2 se encuentran con una morfología de granos semiesféricos y que tienden a formar aglomerados. Asimismo se pueden observar que los tamaños de grano se encuentran debajo de los 100 nm.

La síntesis hidrotermal fue eficiente para diseñar óxido de circonio nanoestructurado en las fases monoclinica y cúbica, además la concentración utilizada de cloruro de circonio e hidróxido de sodio, no alteran de forma significativa el tamaño de grano pero si la cantidad de polvo obtenido.

Por medio de difracción de rayos X, se identificaron las fases cristalinas del material y el tamaño de partícula promedio.

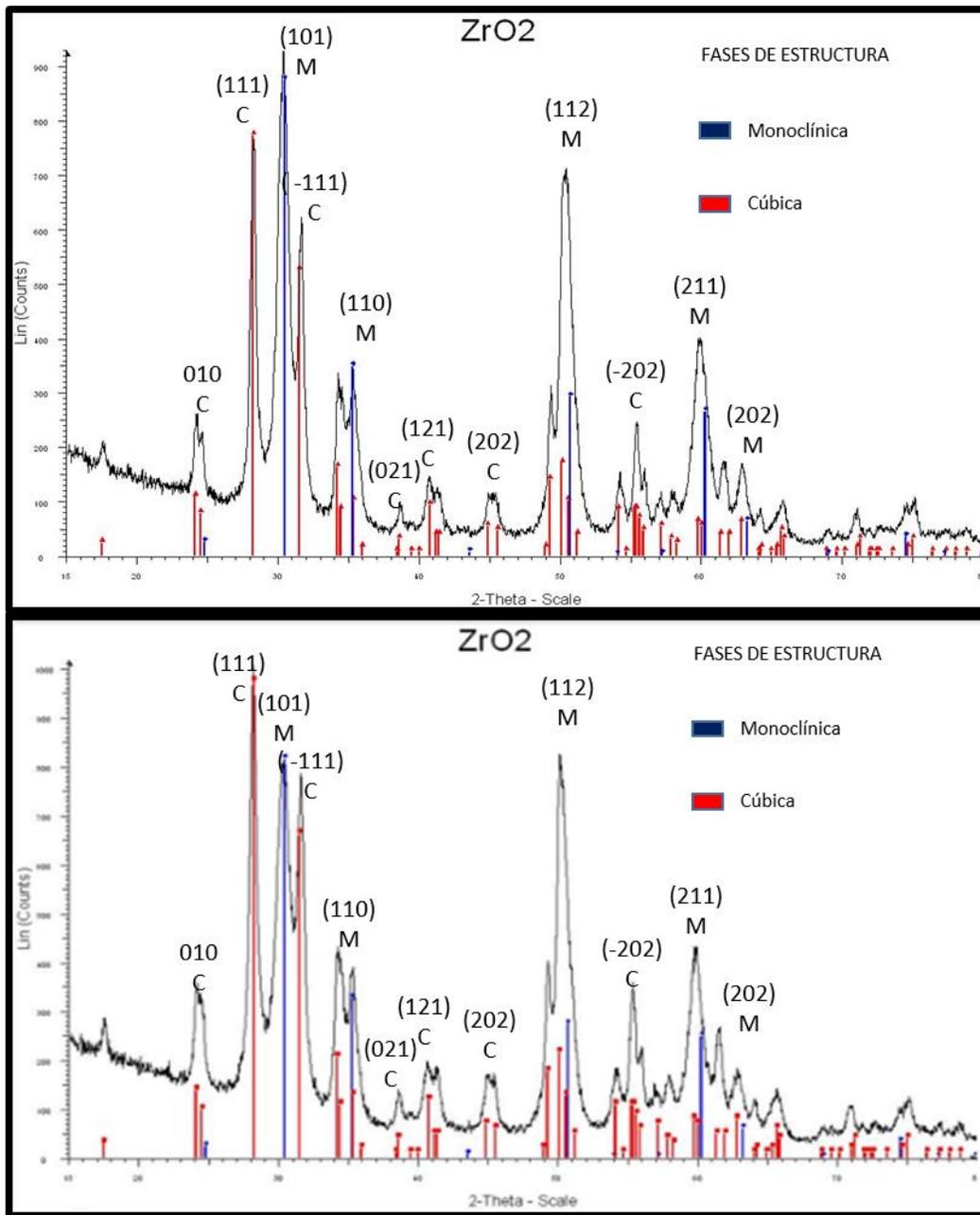


Figura 9. Difractogramas de las nanopartículas de ZrO₂.

De acuerdo a los patrones de difracción de rayos X (XRD) de las muestras, nos indican que el ZrO₂ es un material cristalino, que presenta dos fases de estructura, la fase monoclinica y la fase cúbica ya que muestran picos característicos de estas fases en: 30.5°, 31.7°, 35.2°, 50.2°, 60.1°, 63.2°. Son fases cristalinas características del óxido de circonio, estables químicamente a temperatura ambiente

Se calculó el tamaño del cristal por medio de la ecuación de Scherrer. Donde d es el tamaño promedio de la partícula, la K la constante Scherrer, λ es la longitud de onda, β representa el ancho del pico a la altura media (FWHM) expresado en radiales y θ el ángulo de bragg. La fórmula aplica a solo tamaños de cristal de 1- 100nm.

$$d = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

La fase cristalina monoclinica presenta tamaños de partículas con promedio de 25 nm, 35.6nm y la fase cubica de 14.4nm y 6.7nm

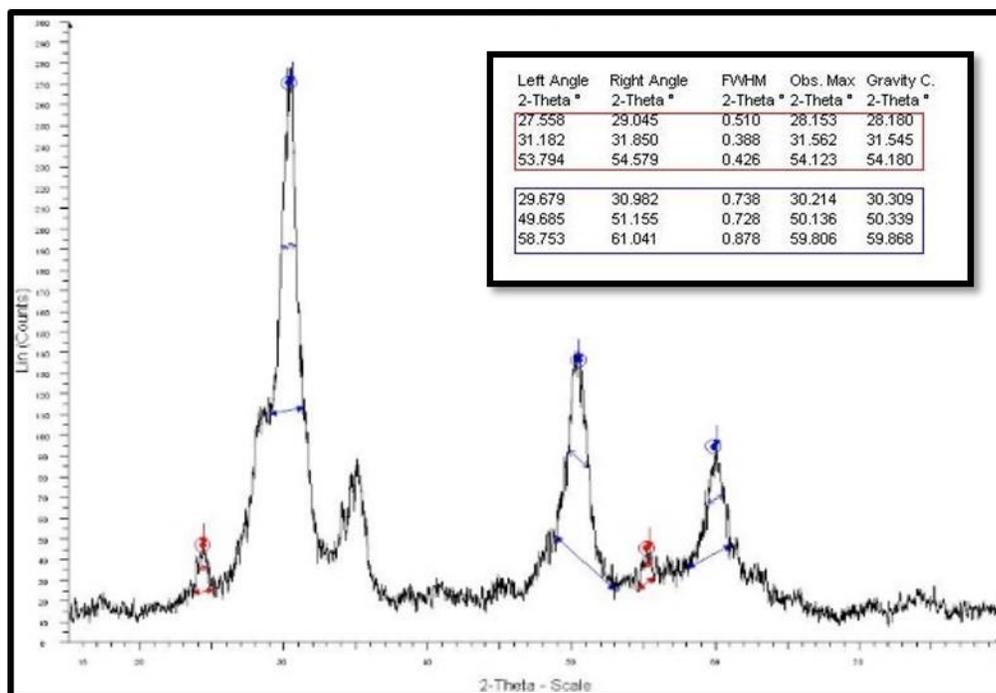


Figura 10. Calculo de la Ecuación de Scherrer. Mediciones para obtener β : representa el ancho del pico a la altura media (FWHM).

Formula de Scherrer

Fase Cúbica

$$D = \frac{1.54 \times 10^{-10}}{\frac{1.222}{2} \left(\frac{\pi}{180^\circ} \right) \cos \frac{50.320}{2}} = 144.46 \times 10^{-10} = 14.446 \text{ nm}$$

Fase monoclinica

$$D = \frac{1.54 \times 10^{-10}}{\frac{.710}{2} \left(\frac{\pi}{180^\circ} \right) \cos \frac{28.1570}{2}} = 256.24 \times 10^{-10} = 25.624 \times 10^{-9} \text{ nm}$$

Fase cúbica

$$D = \frac{1.54 \times 10^{-10}}{\frac{1.539}{2} \left(\frac{\pi}{180^\circ} \right) \cos \frac{59.981}{2}} = 66.19 \times 10^{-10} = 6.619 \times 10^{-9} \text{ nm}$$

Fase monoclinica

$$D = \frac{1.54 \times 10^{-10}}{\frac{.510}{2} \left(\frac{\pi}{180^\circ} \right) \cos \frac{28.153}{2}} = 356.67 \times 10^{-10} = 35.674 \times 10^{-9} \text{ nm}$$

DISEÑO Y FABRICACION DEL ANDAMIO

Se desarrollaron con éxito andamios monofásicos por la técnica de hilado a propulsión de gas (AJS), donde se obtuvieron andamios de 20 x 10 cm sobre el colector de papel encerado.

Se estandarizaron las variables para su obtención. (solvente, concentración de la solución, distancia de depósito) como se muestra en la tabla 1.



% de PLA	6%, 7%, y 10%
Cloroformo	75 ml
Etanol	25 ml
Distancia de deposito	11cm

Tabla 1. Variables para el diseño de andamios de PLA

Se obtuvieron imágenes por MEB de los andamios de PLA en las tres diferentes concentraciones (6%, 7%, y 10%), donde se puede observar fibras lisas, uniformes de un diámetro de 100nm a 1µm con una organización de manera aleatoria. Los resultados demostraron que el incremento de diámetro de fibra va relacionado con el peso molecular y la concentración de solución del polímero.

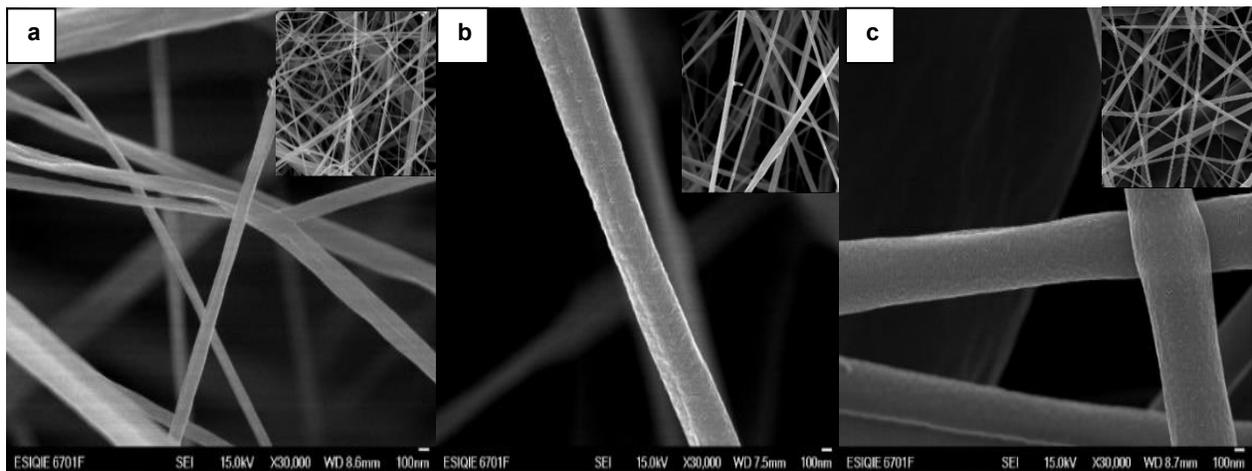


Figura 11. Micrografías de los andamios de PLA. a) 6%. b) 7% y c) 10%

En cuanto a las fibras de los andamios de PLA al 10% y con las variables ya estandarizadas (disolvente 3:1 cloroformo - etanol, a una distancia del colector de 11cm, a una presión de 35 psi, con un aerógrafo con una diámetro de punta de 0.3mm) se obtuvieron fibras estrechas, laxas, con una morfología uniforme, con menos defectos de polímeros o bulbos y con un diámetro variable que oscila entre los 100nm hasta mayores a 1µm.

Así mismo se obtuvieron micrografías de los andamios fibrilares dopados con nanopartículas de ZrO_2 como se muestra en la figura 13, se puede apreciar y comparar las diferencias morfológicas entre la constitución de las microfibras de PLA y la distribución de las nano partículas de ZrO_2 en concentraciones con 0.1g y 0.5g.

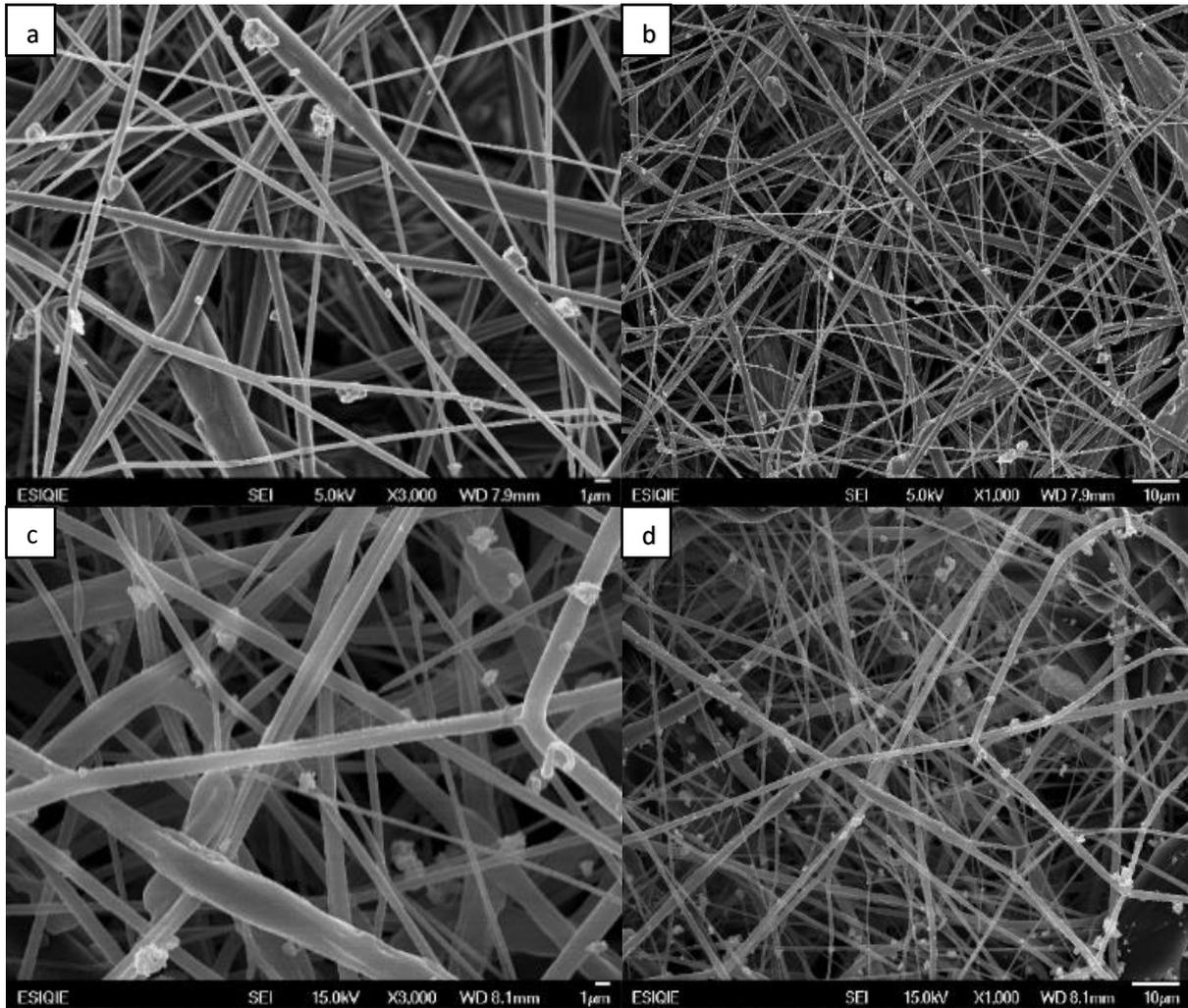


Figura 12. Micrografías de los andamios. a-b) PLA/ ZrO_2 0.1g c-d) PLA/ ZrO_2 0.5g

En las imágenes de la figura 13, se puede observar una disposición aleatoria de las fibras colectadas, generando con ello un traslape entre las fibras que a su vez dan lugar a una porosidad en todo el andamio, este fenómeno es propio del uso de la técnica. También es posible observar una morfología considerablemente homogénea, con fibras continuas y lisas, sin la presencia de bulbos, aparentemente con diámetros de fibras homogéneos,

la concentración de las nanopartículas es mayor en los andamios PLA/ZrO₂ 0.5gr y no modifica la estructura de las fibras.

DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO PROMEDIÓ DE LAS FIBRAS HILADAS Y TAMAÑO DE PORO.

A partir de las imágenes de MEB se midió el diámetro de las fibras de los andamios de PLA/ZrO₂ 0.5g por medio del software Imagen J. En la figura 14 se puede observar el histograma, donde se registra un rango de diámetro entre 100nm a 1.80μm con un diámetro promedio de las fibras es de 313 ± 395 nm, observando una desviación estándar considerable entre las mediciones realizadas, lo cual nos habla de la variación entre el tamaño de fibra que componen los andamios.

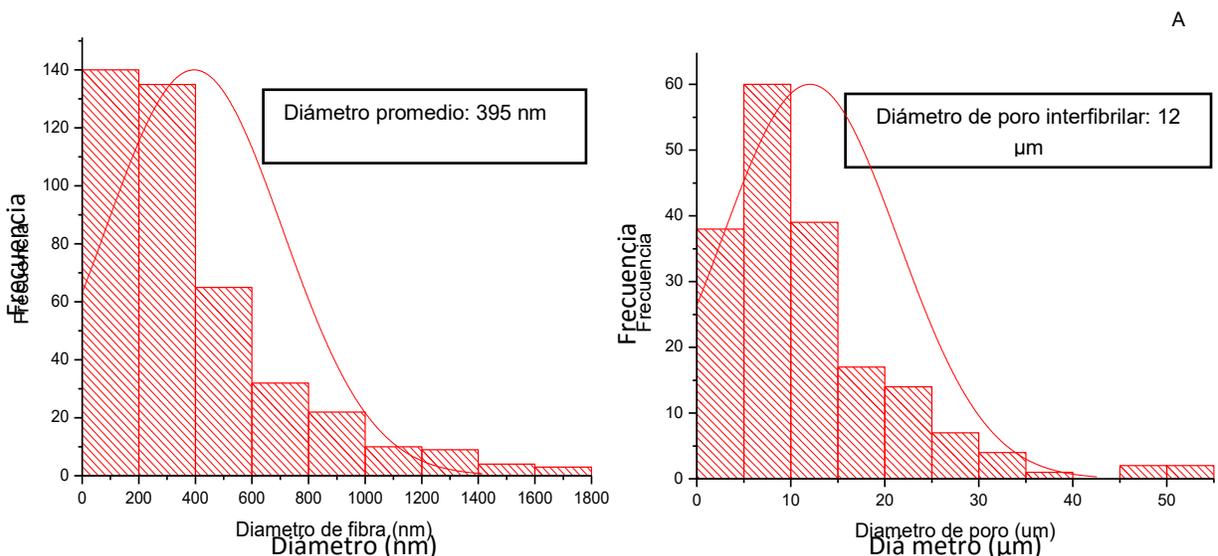


Figura 13. Histograma. a) Diámetro promedio de las fibras de los andamios compuestos. b) diámetro del poro inter-fibrilar de los andamios compuestos.

El tamaño de diámetro de los poros oscilan desde 1 μm a 50 μm con una media de 12 μm ± 9 μm. El tamaño de diámetro es muy irregular, este comportamiento en los diámetros y tamaño de poro de las fibras es propio del proceso de hilado.

ANÁLISIS DE FTIR

En los análisis de FTIR se identificaron cada uno de los grupos funcionales del andamio compuesto de PLA-ZrO₂, como se muestran en la figura 15, los espectrogramas de los andamios compuestos a 0.1 y 0.5g de nano partículas de -ZrO₂. Se muestran las bandas en 758 cm⁻¹, son correspondientes para caracterizar la unión del enlace (vibraciones Zr-O), en ambos espectrogramas.

Respecto al espectro infrarrojo en ambos tipos de andamios se muestra la banda de absorción característica a 1.750 cm⁻¹ que representa C=O el grupo carbonilo, y el C-O=C se extiende a 1,090-1,189 cm⁻¹ característica de los enlaces éster, además se observan tres bandas en el rango de 1300-1500 cm⁻¹ atribuido a los grupos funcionales CH y CH₃; las bandas anteriores son representaciones de PLA y son concordantes con estudios previos.²⁰

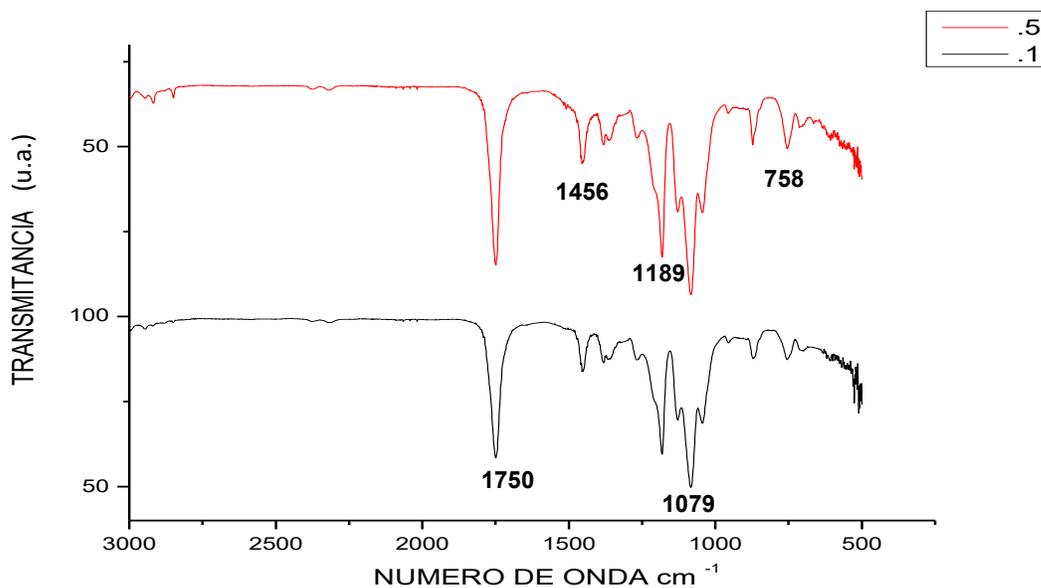


Figura 14. Espectrograma de FTIR. a) PLA/ZrO₂ 0.5g. b) PLA/ZrO₂ 0.1g

Composito	Posición (cm ⁻¹)	Enlace
PLA/ZrO ₂	1750	C=O
	1300-1500	CH, CH ₃
	1189	C-O
	1079	C-O=C
	758	ZrO ₂

Tabla 2. Bandas características de los grupos funcionales del compuesto PLA/ZrO₂

ENSAYO DE TENSIÓN

En la figura 17 se muestra el promedio de los valores del módulo de Young, donde cada barra corresponde a un tipo de andamio. El módulo de elasticidad promedio calculado del PLA 10% sin ZrO₂ es de 60 ± 8 MPa, en el caso de los andamios de PLA/ZrO₂ 0.1g la media del módulo de Young es de 173.8 ± 34 MPa y en los andamios de PLA/ZrO₂ 0.5g el promedio del valor del módulo elástico fue de 527 ± 130 MPa. Podemos observar que de los tres tipos de andamio el que tiene el 0.5g de ZrO₂ aumenta en comparación del andamio solo de PLA y PLA/ZrO₂ 0.1g.

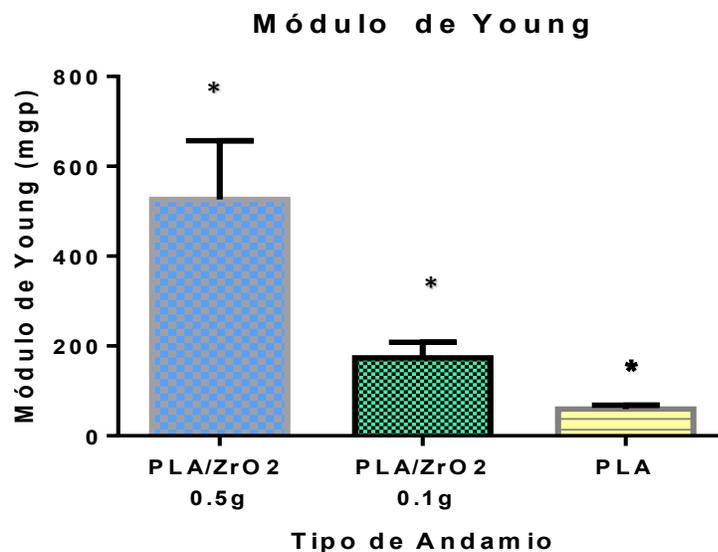


Figura 15. Ensayo de Tensión. Promedio del módulo de Young con una velocidad de 1mm/seg. ANOVA 1 vía, $p < 0.05$.

Las propiedades mecánicas de los andamios al agregar las nanopartículas de ZrO_1 son modificadas, aumentando el valor del módulo de Young, que son significativamente diferentes en comparación con el control que es el PLA.

En la figura 18 se muestra el ensayo de tensión graficando la tensión de rotura que es la máxima tensión a la que se ha sometido el material durante el ensayo. Nos habla de cuanto resiste el material hasta su ruptura, como se observa el andamio compuesto de PLA/ ZrO_2 en comparación con el PLA aumenta significativamente teniendo una resistencia que alcanza los 5.0 MPa.

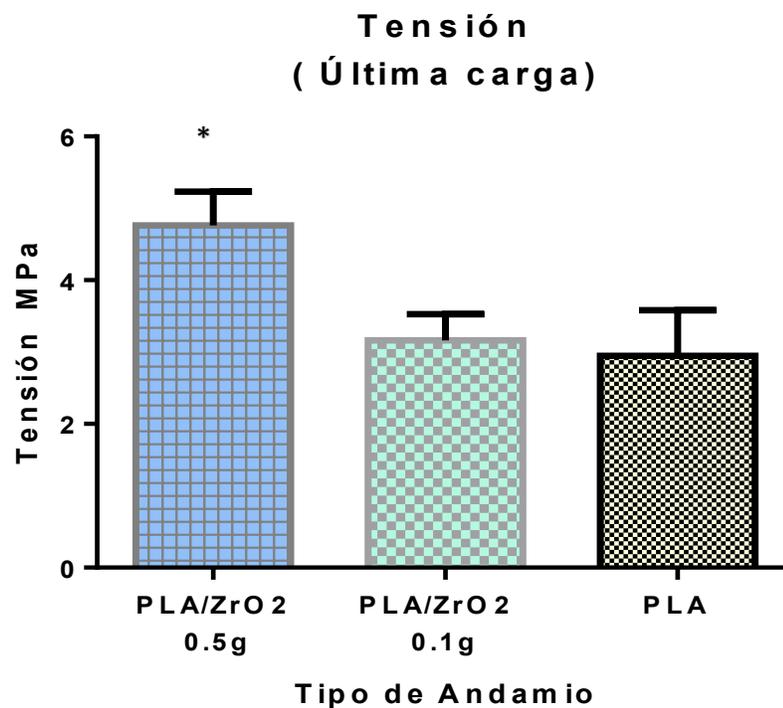


Figura 16. Ensayo de Tensión. Promedio de tensión a la última carga. Velocidad de 1mm/seg. ANOVA 1 vía, $p < 0.05$.

ADHESIÓN CELULAR

En la gráfica 2 se muestra la evaluación de la adhesión de los osteoblastos en un periodo de cultivo de 4 y 24 horas, los resultados se presentan como porcentaje de células adheridas al sustrato (andamio de PLA y PLA/ZrO₂), en relación al cultivo control que son las células osteoblásticas en los platos de cultivos. La adhesión de las células osteoblásticas se ve favorecida excediendo el 100% de adhesión, encontrándose diferencias significativas a $p < 0.05$ cuando se compara el proceso de adhesión de las células osteoblásticas en el los andamios compuestos con el control.

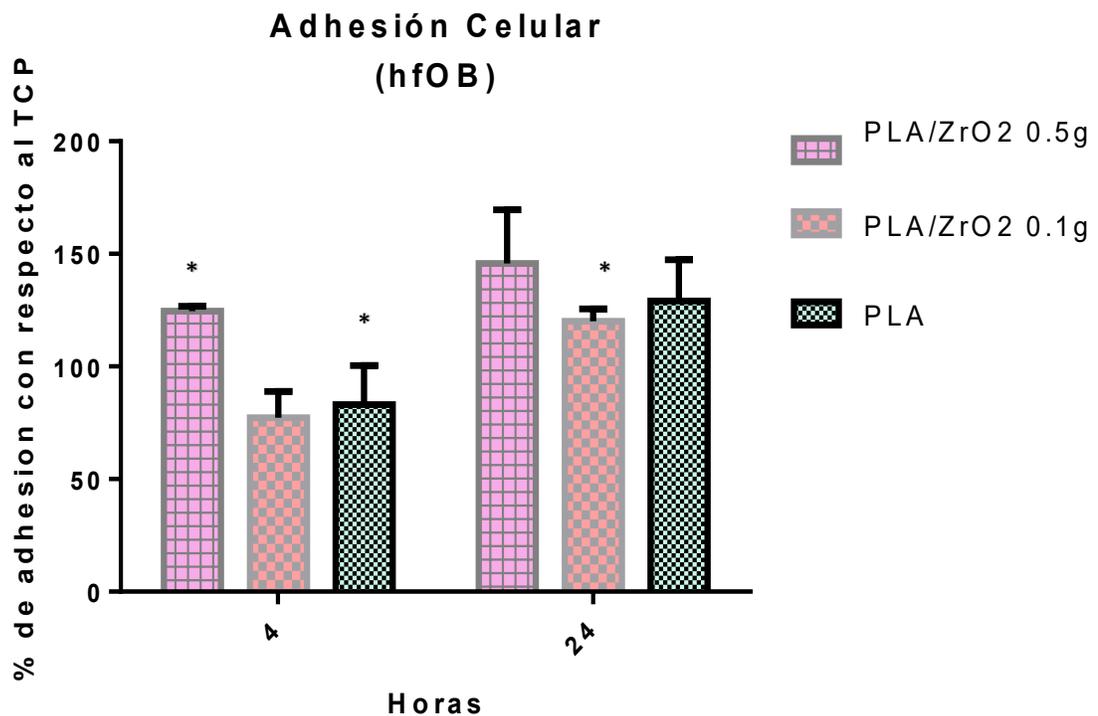


Figura 17. Adhesión celular a las 4 y 24 horas. Ensayos realizados con cristal violeta. $p < 0.05$

PROLIFERACIÓN CELULAR

Los resultados de viabilidad celular para evaluar la citotoxicidad de los andamios fueron analizados en el lector de ELISA a una absorbancia a 545nm. El ensayo se basó en la conversión de la sal de MTT donde se muestra en la gráfica 4.un incremento en dicha reacción comparada con el cultivo control (PLA) a los días 7, 14 y continuando hasta el día 21.

Este incremento es directamente proporcional al incremento de las células metabólicamente activas en los andamios, lo que indica que durante estos días las células están proliferando, creciendo y no existe algún efecto citotóxico del material hacia las células osteoblásticas.

En el ensayo de viabilidad celular se observa que los andamios que presentaron mejores resultados optimos fueron los andamios de PLA-ZrO₂ En los tres tipos de andamio se observa el mismo patrón de proliferación siendo los andamios compuestos los que mayor proliferación tiene hasta los 21 días. Siendo significativamente diferentes en el día 7 y 21 días, con una $p < 0.05$.

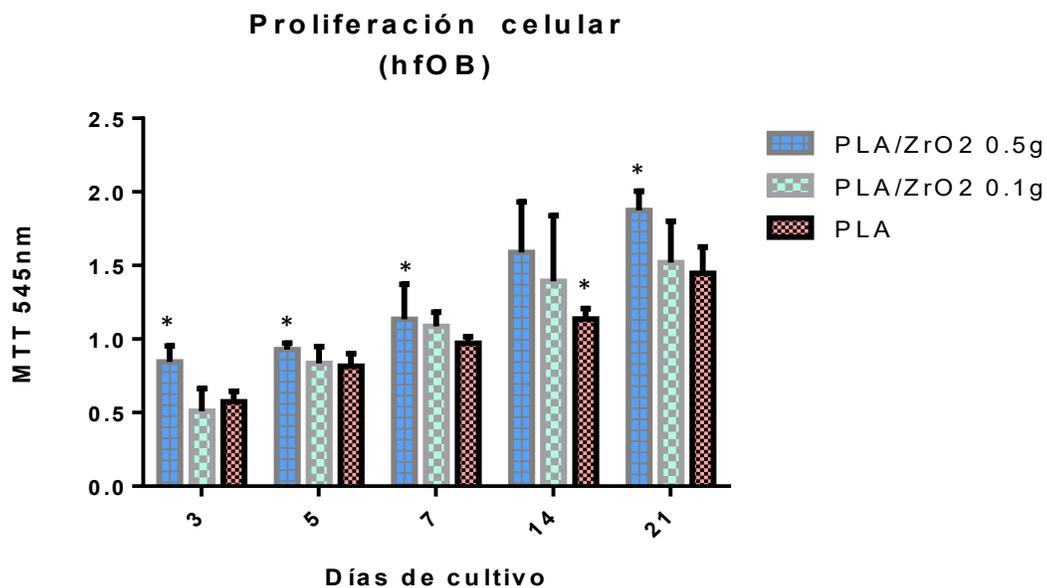


Figura 18. . Ensayo de proliferación a los 3, 5, 7, 14 y 21 días por MTT. $p < 0.05$

INTERACCIÓN CÉLULA-MATERIA.

En la figura 20 se puede observar la interacción célula osteoblástica con los andamios compuestos hilado PLA y PLA/ZrO₂ a las 24 horas. Se distingue como los osteoblastos cambian de morfología debido a que censan y siguen el patrón fibrilar de la superficie del andamio, en relación con el aumento de puntos de contacto en los andamios compuestos.

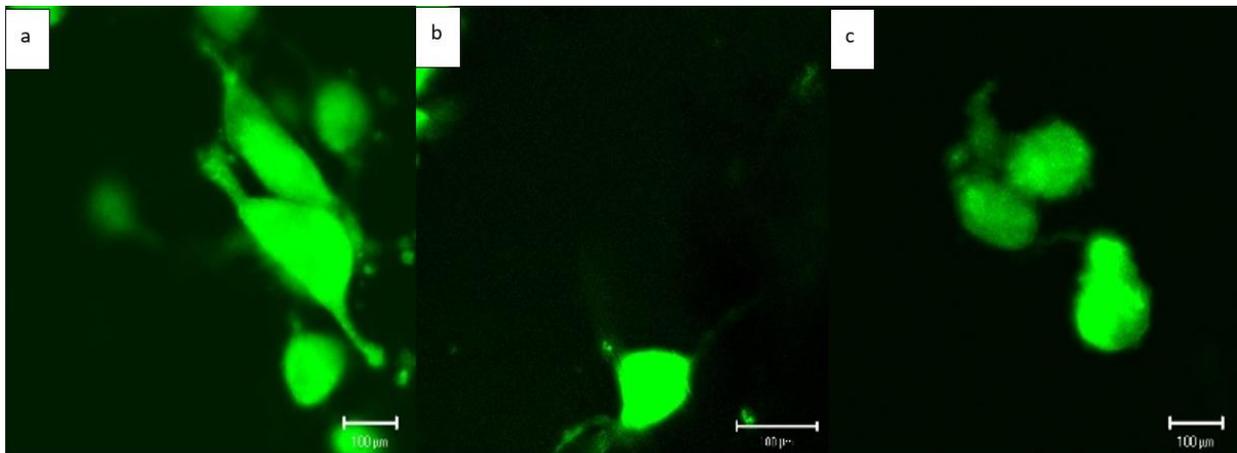


Figura 19. Micrografías de Inmunofluorescencia c/ Cell tracker green . a) PLA-ZrO₂ 0.5g b) PLA-ZrO₂ 0.1g c) PLA 10%.

En las micrografías obtenidas por MEB de los andamios de PLA-ZrO₂ 0.5g con osteoblastos cultivados a las 24 horas, podemos observar la morfología que adopta los osteoblastos. Las células se encontraron bien adheridas y extendidas sobre la superficie, mostrando una morfología plana y poligonal.

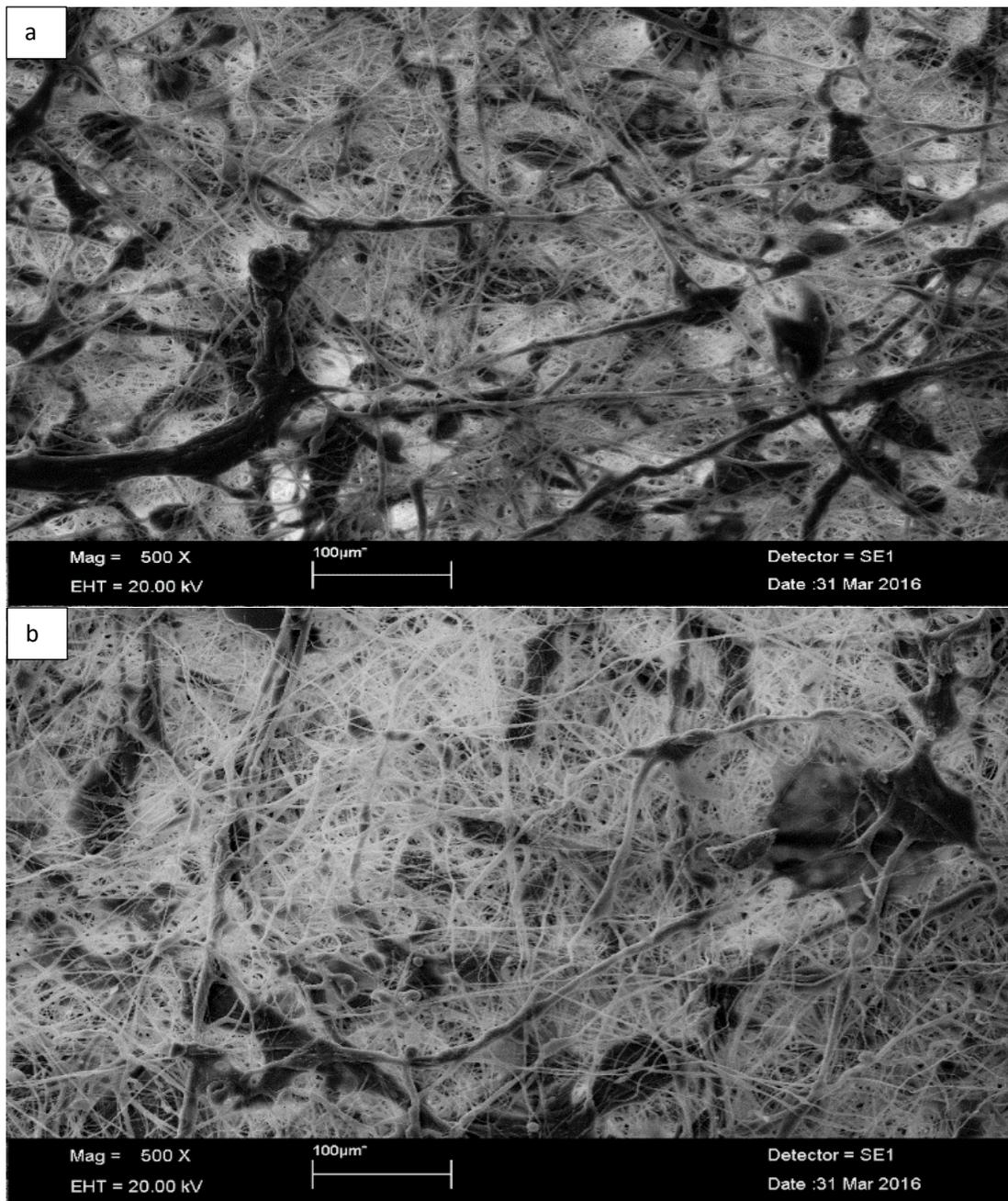


Figura 20. Microfotografías de los andamios de PLA-ZrO₂. a) 0.5g y b) 0.1g

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN



El diseño y fabricación de andamios comprende una serie de requisitos importantes para que puedan cumplir su objetivo, primeramente tienen que ser un soporte para que las células puedan crear su propia matriz extracelular posteriormente permitir la sustitución o regeneración del tejido dañado.^{3, 8, 20}

En el caso de los andamios nanocompuestos, es de gran importancia entender las técnicas por las cuales van a ser fabricados, ya que desde la obtención de cada material por separado va a repercutir en su funcionamiento, y a futuro la obtención de andamios que sean relativamente baratos, reproducibles, fáciles de fabricar y procesar para su producción en gran escala.¹⁵

Los andamios nanocompuestos se basan básicamente en una combinación física de dos materiales, en este caso fue un andamio con una matriz fibrilar polimérica reforzada de nanopartículas de ZrO_2 . La obtención de las nanopartículas se obtuvo por la síntesis hidrotérmica que se define como cualquier reacción homogénea o heterogénea en presencia de solventes acuosos en condiciones de temperatura y presión para disolver y recristalizar materiales que son insolubles a condiciones normales y a comparación de otros tipos de métodos como son: sol-gel, rocío pirolítico etc., resalta por sus ventajas como son: ahorro de energía, baja temperatura de operación, simplicidad, efectividad de costo, mejor control de nucleación, fases puras y materiales homogéneos.^{2, 69} Permite obtener partículas en escalas nanométricas a partir de los $100^\circ C$.³⁶

Las técnicas utilizadas en el procesamiento de la obtención de los materiales pueden alterar la composición de estos, es por ello que se realiza una caracterización de sus propiedades fisicoquímicas. La DXR es una técnica comúnmente utilizada para caracterizar estructuras cristalinas, el difractograma de las nanopartículas de ZrO_2 obtenidas, coincide con las fases estructurales monoclinica y cubica que oscilan entre los 30° , 50° , 60° que son específicos para el ZrO_2 y concuerda con lo reportado.^{55, 62, 67}

Los andamios fibrilares con alguna nanoestructura se han funcionalizado para tejido óseo, los andamios obtenidos en este trabajo fueron PLA y ZrO_2 . Debido a la escala en rangos nanométricos los andamios compuestos obtenidos en este trabajo pueden mimetizar la MEC de tejido nativo, sustituyendo la fase orgánica con el polímero y la fase inorgánica con la cerámica, cuyas dimensiones se encuentran en el rango en que se encuentran



ambas estructuras en el tejido óseo. Las Fibras poliméricas obtenidas por la síntesis de AJS oscilan de los 100nm hasta llegar a $1\mu\text{m}$ de diámetro con una media de 395nm, lo cual podría asemejar a las fibras de colágena cuyas medidas oscilan entre 50 a 500nm de diámetro. Por otro lado en cuestión de la fase mineral, la HA son nanopartículas que tiene un promedio de tamaño de 50 nm. En nuestro estudio con la síntesis hidrotermal se obtuvieron nanopartículas en rangos de 14 a 35nm las cuales podrían funcionar en las fibras poliméricas como la HA en la fase colagénica. Por ello; nuestros andamios compuestos podrían imitar tanto la fase orgánica como inorgánica del hueso así como sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas.^{5, 6}

Por medio del análisis de FTIR de los andamios, se puede detectar los grupos funcionales que corresponden de cada material, las nanopartículas muestran un banda energética en 758 cm^{-1} correspondiente a la interacción de los enlaces Zr-O y las bandas características de los grupos funcionales del PLA que son del grupo carbonilo, enlaces esteres, CH y CH_3 , no se encuentran bandas que se relacionen con los disolventes usados, lo cual la técnica de AJS y los parámetros usados para la obtención de la fibras permiten la eliminación de estos.^{21, 42, 59}

Se comprobó que la adición de una nanoestructura las propiedades mecánicas del andamio mejoran, los andamios compuestos aumenta significativamente su valor de módulo de Young, por lo cual se puede decir que el valor del módulo de Young tiende a incrementarse al aumentar la concentración de ZrO_2 . A mayor módulo de Young nos indica que el material es más rígido y tiene una menor deformación. Los valores entre las probetas fueron variables ya que la dispersión de las partículas de ZrO_2 en las fibras no es de manera homogénea y también se le atribuye a las propiedades anisotrópicas de las fibras hiladas. Los andamios de PLA/ ZrO_2 0.5g tienen un módulo de Young alrededor de los 527Mpa y se encuentra alrededor de los valores del módulo de Young del tejido mineral óseo que se encuentra en rangos desde los 500 a 700 Mpa.²⁸

Los ensayos biológicos nos permiten dar una noción del comportamiento que hay por parte de los osteoblastos y posible comportamiento *in vivo*.

En los ensayos de adhesión de los tres tipos de andamios fabricados PLA, PLA/ ZrO_2 0.1g, PLA/ ZrO_2 0.5g, el andamio compuesto al 0.5g de ZrO_2 a las 4y 24 horas, la adhesión es mayor con respecto al control y al andamio PLA/ ZrO_2 0.1g, de acuerdo con



la literatura el comportamiento celular va estar influenciado por numerosos aspectos como propiedades físicas, características derivadas de la nanosuperficie, carga de energía, hidrofobicidad y composición química, retomando lo reportado por Webster et al 2014, las propiedades biológicas se ven afectadas por la naturaleza de los materiales utilizados (membrana, de revestimiento, a granel, o de fibra) se confirma que los andamios nanocompuestos que mimetizan la matriz extracelular y con la introducción de una nanoestructura mejora significativamente la adhesión de los osteoblastos.^{21, 60}

La superficie y las propiedades de resistencia mecánicas afectan los procesos celulares, la literatura reporta que la rigidez de los andamios debe coincidir con la de las MEC del tejido nativo ya que deben resistir las fuerzas generadas por las células.

Cabe recalcar que en los andamios PLA y PLA/ZrO₂ 0.1g el patrón de adhesión celular es muy similar, recordemos que la integración de las nanopartículas al andamio es de forma física y la concentración de nano partículas es 4 veces menor a las del andamio de PLA/ZrO₂ 0.5g, así como también las distribución de las nano partículas no es de forma homogénea, lo cual se atribuye que las células tuvieron el mismo comportamiento ya que los andamios de PLA y PLA/ZrO₂ 0.1g son muy similares estructuralmente, como lo podemos observar en las microfotografías de cada andamio.

A las 24 horas podemos observar en las microfotografías por microscopia confocal la presencia de las células osteoblásticas vivas en los tres tipos de andamios, donde se observa un cambio de morfología en las células, siendo su morfología característica de polígono. Podemos sugerir que las células empiezan a reconocer un similar microambiente al del tejido nativo. En los andamios de PLA/ZrO₂ 0.5g en comparación con los otros tipos de andamios se puede ver un mayor cambio en la morfología del osteoblasto y probablemente la formación de prolongaciones tipo lamelopodios, que también nos puede indicar el reconocimiento o sensado a la superficie y que le permitirán migrar sobre el andamio fibrilar nanocompuesto, mientras que en los otros tipos de andamios se observa una inclinación a una morfología redonda. Así como también podemos observar en las microfotografías de MEB a las 24 horas de cultivo, la adhesión de los osteoblastos con su morfología característica de polígono o estrellado, algunas células distribuidas interfibrilar y dentro del andamio, lo cual con lo reportado, los andamios fibrilares poroso y con una interconectividad permitirán un aumento en la



adhesión celular y el transporte de fluidos y migración celular. Esta reportado que andamios con tamaños de poros de 10 a 50 μm permiten la vascularización e intercambio de nutrientes.^{20, 22}

La proliferación celular varia con cada tipo celular, una rápida proliferación nos hablaría de una rápida reducción de tejido de cicatrización y es un proceso que se requiere al igual que la migración celular para que el andamio pueda permitir el desarrollo de tejido nuevo. El comportamiento de proliferación celular en los 3 tipos de andamios siguen el mismo patrón de proliferación celular en los diferentes días, siendo el andamio de PLA/ZrO₂ 0.5g quien mostro una proliferación significativamente mayor hasta los 21 días en comparación de los demás. Este comportamiento celular en los andamios nanocompuestos va relacionado desde la adhesión, ya que esta se vio favorecida excediendo el 100% en comparación al control, lo que indica que nuestro andamio no es toxico. Por otro lado el papel de las propiedades físicas, químicas y de topografía superficial son de gran relevancia y de acuerdo con lo reportado son parámetros que van a inducir señales de reconocimiento celular hacia el andamio. El efecto de la superficie nanoestructurada estimula la proliferación y apoyan la diferenciación ya que proporcionan un sustrato más adecuado para la unión celular que mejora la absorción de moléculas de adhesión como son la fibronectina, vitronectina, laminina e integrina que pueden activar vías de señalización que cambian el comportamiento de las células, induciendo favorablemente la interacción célula- material y mantienen el fenotipo celular.^{7, 44.}

La inserción de nanopartículas permite conseguir mejor resistencia mecánica que le permite al andamio una mayor durabilidad y un proceso de degradación prolongado, esta característica influye en la nano-interface célula-material.^{22, 29, 30,35}

El ZrO₂ en diferentes estudios se ha reportado como una cerámica biocompatible y osteoconductiva ya que en comparación de otros tipos de aleaciones como el titanio mejoran la actividad de las células osteoblásticas en los procesos de adhesión, proliferación y diferenciación. Por ende el ZrO₂ puede considerarse como un material de autorregulación que puede modificar la deposición de MEC.^{7, 36,42, 52, 66}



CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Se sintetizaron partículas de ZrO_2 mediante el método hidrotérmal, a partir de polvos finos y de condiciones óptimas como temperatura y tiempo.

El tamaño de partícula que se obtuvo, se encuentran en el orden de nanómetros (10 a 35 nm). Se obtuvo un material cristalino en fase cúbica y monoclínica del ZrO_2 .

La técnica de hilado por propulsión a gas permitió la elaboración de andamios compuestos de fibras y partículas con un diámetro *micro-* y *nano-* métrico.

Los andamios compuestos aumentaron su módulo elástico a comparación del andamio de PLA, debido a la agregación de las nanopartículas de ZrO_2 . El valor del módulo de Young incremento 5 veces más en comparación con el de PLA.

Los andamios compuestos mejoran la adhesión de los osteoblastos en comparación con los andamios de PLA.

Los andamios compuestos PLA/ ZrO_2 0.5g incrementan significativamente la proliferación de los osteoblastos en cultivos *in vitro* en comparación con los andamios de PLA, debido a su estructura entrecruzada, interconectada y a su escala micro y nanométrica.

Por último podemos concluir que no solo se obtuvo un andamio compuesto, ya que por la presencia de una nanofibras y nano partículas es posible catalogarlo como un nanocompuestos, en los últimos años se han propuesto este tipo de andamios para mejorar las propiedades funcionales y estructurales de los biomateriales abriendo una perspectiva para aplicaciones biomédicas y en especial en la ingeniería de tejido óseo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ross M. Pawlina W. Histología: Texto y atlas a color con biología celular y molecular. 5 Ed. Buenos Aires: Panamericana; 2008.
2. Saiful I. Wan A. Biodegradable Polymers and their Bone Applications: A Review. *International Journal of Basic & Applied Sciences*.2012;12(1):31
3. Hoveizi E. Nabiuni M. Parivar K. Functionalization and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering. *Cell Biol Int*. 2014; 38(1):41-9.
4. Wang H. Chan L. Jia C. Biomimetic Design of Extracellular Matrix-Like Substrate for Tissue Regeneration. *Tissue and Organ Regeneration*. 2014; 199-230.
5. Zimmermann EA.Ritchie RO. Bone as a Structural Material. *Adv Healthc Mater*. 2015; 24; 4(9):1287-304.
6. Wang L. Skoracki R. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.2013; 101(2):387-97.
7. Liu XH. Smith LA. Ma PX. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009; 1(2):226-36.
8. Armentano I.Dottori M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering. *Polymer Degradation and Stability*. 2010; 95(11):2126–2146
9. Hardiansyah A. Tanadi H. Yang M. Electrospinning and antibacterial activity of chitosan-blended poly (lactic acid) nanofibers. *Journal of Polymer Research*.2015;22:59
10. Boffito M. Bernardi E.Sartori S. A mechanical characterization of polymer scaffolds and films at the macroscale and nanoscale.*J Biomed Mater Res A*. 2015; 103 (1): 162-9.
11. Gloria A. De Santis R. Ambrosio L. Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *J Appl Biomater Biomech*.2010; 8(2):57-67.



12. Garmendia N. Olalde B. Obieta I. Biomedical applications of ceramic nanocomposites. 2013;530-547
13. Marchetti E. May O. Girard J. Biomatériaux en chirurgie orthopédique. Techniques chirurgicales Orthopédie-Traumatologie.44-0128
14. Rahmany MB. Van DM. Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review. Acta Biomater.2013;9(3):5431-7
15. Morris AH. Kyriakides TR. Matricellular proteins and biomaterials. Matrix Biol. 2014; 37:183-91.
16. Abdalla AH. Salam HA. Abdelrazek K. A novel simple one- step airjet spinning approach for deposition of poly(vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants. Materials Science and Engineering. 2015; 46:681-690
17. Fujikura K. Obata A. Kasuga T. Cellular migration to electrospun poly (lactic acid) fibermats. Biomater Sci Polym Ed.2012; 23(15):1939-50.
18. Gunatillake PA. Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. Eur Cell Mater. 2003;20(5):1-16
19. Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. Science.2005; 310(5751):1135-8.
20. Abdal-hay A, Sheikh F, Lim J. Air jet spinning of hydroxyapatite/poly (lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. Colloid and Surfaces B: Biointerface. 2013; 102: 635-643.
21. Pachón E. Arévalo F. Sabina F. Characterisation and modelling of the elastic properties of poly (lactic acid) nanofibre scaffolds. Journal of Materials Science. 2013; 48(23):8308-8311
22. Jiang T. Carbone J. Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. Progress in Polymer Science. 2015; 46:1-24
23. Lakshmi SN. Cato TL. Biodegradable polymers as biomaterials Progress in Polymer Science.2007;(32)8-9:762-798
24. Ioannis SC. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process. A review. Journal of Materials Processing Technology. 2005; 167(2)3: 283-293



25. Morelli S. Salerno S. Osteogenic and osteoclastogenic differentiation of co-cultured cells in polylactic acid–nanohydroxyapatite fiber scaffolds. *Journal of Biotechnology*. 2015; 204:53-62
26. Delgado RA. Gomez MG. Aguilar SA. Human fetal osteoblast behavior on zirconia dental implants and zirconia disks with microstructured surfaces. An experimental in vitro study. *Clin. Oral Impl*. 2015;1-10
27. Abdul-Majeed A. Fabrication of yttria-stabilized zirconia nanofibers by electrospinning, *Materials Letters*. 2006; 60(1):67-72
28. Rezwan K. Chen QZ. Blaker J. Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials*. 2006; 27(18): 3413–3431
29. Donald RA. *Ciencia e ingeniería de materiales*. 5 Ed. Mexico: Internacional Thomson Editors; 2008.
30. Gopal Panthi, Mira Park, Kim HY. Electrospun polymeric nanofibers encapsulated with nanostructured materials and their applications: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2015; 24:1-13
31. Guller E. Generalova N. Petersen V. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified up conversion nanoparticles in human skin cells. *Nano Research*. 2015;8(5):1546-1562
32. Gao C. Deng Y. Feng P. Mao Z. Current progress in bioactive ceramic scaffolds for bone repair and regeneration. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(3):4714-32.
33. Tjong SC. Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites. *Materials Science and Engineering: R*: 2006; 53:(3-4).73-197
34. Martinez SL. Sólidos ordenados desde la nano a la macroestructuralmente. *An. Quim*. 2006; 102(1): 5-12
35. Yuan J. One-dimensional organic–inorganic hybrid nanomaterials. *Polymers* 2010; 51: 4015-4036.
36. Buyakov A. Kulkov S. Porous alumina, zirconia and alumina/zirconia for bone repair: fabrication, mechanical and in vitro biological response. *Biomed Mater*. 2015; 23:10(2).



37. Webster TJ. Ergun C. Richard W. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics *Biomaterials*. 2000; 21(17):1803-10
38. Montazerian M. Schneider J. Yekta B. Sol-gel synthesis, structure, sintering and properties of bioactive and inert nano-apatite-zirconia glass-ceramics *International* 2015; 41(9):11024-11045
39. Huang X. Qi Y. Li W. Shi Z. Enhanced integrin-mediated human osteoblastic adhesion to porous amorphous calcium phosphate/poly (L-lactic acid) composit. *Chin Med J (Engl)*. 2014; 127(19):3443-8.
40. Ito H. Sasaki H. Saito K. Response of osteoblast-like cells to zirconia with different surface topography. *Dent Mater J*. 2013; 32(1):122-9.
41. Shi S. Wang X H. Guo G. Fan M. Preparation and characterization of microporous poly (D, L-lactic acid) film for tissue engineering scaffold. *Int J Nanomedicine*. 2010; 5:1049-55
42. Teimouri A. Ebrahimi R. Nano-composite of silk fibroin-chitosan/Nano ZrO₂ for tissue engineering applications: fabrication and morphology. *Int J Biol Macromol*. 2015; 76:292-302.
43. Torricelli P. Giofrè M. Fiorani A. Co-electrospun gelatin-poly (l-lactic acid) scaffolds: Modulation of mechanical properties and chondrocyte response as a function of composition. *Materials Science and Engineering C*. 2014; 36: 130-138
44. Li W J. Tuan RS. Fabrication and application of nanofibrous scaffolds in tissue engineering. *Curr Protoc Cell Biol*. 2009; Chapter 25.
45. Xiao L. Wang B. Yang G. Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. *Biomedical science* 2012: 248-286
46. Julien JM. Bénézet JC. Development of poly (lactic acid) cellular materials: Physical and morphological characterizations. 2012; 53(25):5885–5895
- 47.4 Byrappa K. Yomishura M. Hydrothermal growth of crystals. *Prog crys grow. Handbook of hydrothermal technology*. NJ, USA. 2001;1-9
48. Yuan X. Liu D. Bhattacharyya D. Preparation of poly-(lactic acid) scaffolds reinforced with bacterial cellulose nanofibers
49. Chen X. Wang J. Qingzhu A. Electrospun poly (L-lactic acid-co-ε-caprolactone) fibers loaded with heparin and vascular endothelial growth factor to improve blood



- compatibility and endothelial progenitor cell proliferation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;128:106-114
50. Schweiz MZ. The osseointegration of zirconia dental implants. *Assal PA*. 2013; 123(7-8):644-54.
51. Cho Y D. Shin J C. Kim H L. Yoon H I. Comparison of the osteogenic potential of titanium- and modified zirconia-based bioceramics. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(3):4442-52.
52. Manicone PF. Rossi P. Raffaelli L. An overview of zirconia ceramics: basic properties and clinical applications. *J Dent*. 2007; 35(11):819-26.
53. Herath HM. Di SL. Evans JR. Response to zirconia surfaces with different topographies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015; 57:363-70
54. Delgado G. Morejon R. Cerámicas de zirconia para aplicaciones biomédicas. *Biomecánica*. 2003; 11: 46-52
55. Denry I. Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater*. 2008; 24(3):299-307.
56. Piconi C. Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999; 20(1):1-25.
57. Zhao Y. Tang Y. Guo Y. Bao X. Studies of electrospinning process of zirconia nanofibers *Fibers and Polymers*. 2010;11(8):1119-1122
58. Quan R, Yang D, Wu X, Wang H. In vitro and in vivo biocompatibility of graded hydroxyapatite-zirconia composite bioceramic. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 ;19(1):183-7
59. Zhao B. Van H C. Busscher H J. Osteoblast integration of dental implant materials after challenge by sub-gingival pathogens: a co-culture study in vitro. *Int J Oral Sci*. 2015; 7(4):250-8.
60. Hua J, Huang L, Chen W, Zhang T. Biocompatible Ni-free Zr-based bulk metallic glasses with high-Zr-content: Compositional optimization for potential biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;44: 400-410
61. Lee EG. Hae WK. Ceramic biomaterial as tissue scaffolds. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. 2015:163-174

62. Chevalier J. What future for zirconia as a biomaterial?. *Biomaterials* 27(4), February 2006:535–543
63. Fang G. Kai L. Haijian L. Zirconia Fiber Membrane Prepared by Electrospinning. *Key engineering material*. 2012: 443-446
64. Karunakaran G, Suriyaprabha R, Manivasakan P. Screening of in vitro cytotoxicity, antioxidant potential and bioactivity of nano- and micro-ZrO₂ and -TiO₂ particles. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013; 93:191-7
65. Chen P, Nagai A, Tsutsumi Y, Ashida M. Differences in the calcification of preosteoblast cultured on sputter-deposited titanium, zirconium, and gold. *J Biomed Mater Res A*. 2015.
66. Sung K. Won K. Development of titanium oxide layer containing nanocrystalline. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;131:47–53
67. Wan B. Shu X. Chen X. Feng Q. Hydrothermal synthesis and phase stability of Pb stabilized ZrO₂ nanoparticles. *Solid State Sciences*. 2014; 27:73-78
68. Hernández E. García S. Síntesis, caracterización y evaluación catalítica de un ZrO₂ con fase monoclinica. *Superficies y Vacío*. 2009;22(2):1-9
69. Serrano BJ, Hernández F, Álvarez PM. Caracterización y respuesta biológica de nanocerámicas de óxido de circonio sintetizado por el método de rocío pirolítico ultrasónico. *Superficies y Vacío* 2010; 23(S): 27-30.