

UNIVERSIDAD ADOLFO IBÁÑEZ

TESIS DE MAGÍSTER

**Estudio de biocompatibilidad de biomateriales
poliméricos compuestos de Policaprolactona y
Biovidrio en distintas concentraciones, mediante
análisis celulares, moleculares y físico-químicos, para
su aplicación en ingeniería de tejidos**

Autor:

María Fernanda Álamos Salcedo

Profesores guía:

Dr. Juan F. Vivanco Morales

Dr. Carola Millán Giovanetti

*Tesis realizada acorde a los requerimientos para el grado de Magíster en Ciencias de la
Ingeniería mención en Bioingeniería y para el título de Ingeniero Civil en Bioingeniería de la*

Facultad de Ingeniería y Ciencias

14 de julio, 2025

UAI

FACULTAD DE
INGENIERÍA Y
CIENCIAS

UNIVERSIDAD ADOLFO IBÁÑEZ

Facultad de Ingeniería y Ciencias

Magíster en Ciencias de la Ingeniería, mención Bioingeniería y para el título de Ingeniero Civil
en Bioingeniería

ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD DE BIOMATERIALES
POLIMÉRICOS COMPUESTOS DE POLICAPROLACTONA Y BIOVIDRIO
EN DISTINTAS CONCENTRACIONES, MEDIANTE ANÁLISIS
CELULARES, MOLECULARES Y FÍSICO-QUÍMICOS PARA SU
APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

por María Fernanda Álamos Salcedo

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
3D	Tridimensional
β -TCP	Fosfato tricálcico beta (β -tricalcium phosphate)
ACE	Acetona
AR	Relación de aspecto (<i>Aspect ratio</i>)
BG	Biovidrio (<i>Bioglass</i>)
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
EDS	Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X
EthD-1	Homodímero de etidio -1 (<i>Ethidium Homodimer -1</i>)
hGMSC	Células madre/estromales mesenquimales gingivales humanas (<i>human Gingiva - derived Mesenchymal Stem Cells</i>)
MSC	Células madre/estromales mesenquimales (<i>Mesenchymal stem/stromal cells</i>)
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCL	policaprolactona (<i>Polycaprolactone</i>)
PLA	Ácido poliláctico (<i>Poly-lactic acid</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning electron microscopy</i>)
XRD	Difracción de rayos X (<i>X-ray diffraction</i>)

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional en todo este proceso.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
PROBLEMA U OPORTUNIDAD.....	7
ESTADO DEL ARTE.....	11
1. ESTRUCTURA ÓSEA	11
2. DETERIORO DEL TEJIDO ÓSEO	13
3. INGENIERÍA DE TEJIDOS PARA REGENERACIÓN.....	15
4. CÉLULAS MADRE Y SU USO EN MEDICINA REGENERATIVA	16
5. BIOMATERIALES.....	17
5.1. BIOMATERIALES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	17
5.2. TÉCNICAS DE FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS PARA EVALUACIÓN DE BIOMATERIALES	18
5.3. BIOCOMPATIBILIDAD DE BIOMATERIALES.....	20
5.4. BIOMATERIALES PARA REGENERACIÓN ÓSEA	22
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
METODOLOGÍA.....	28
1. FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL BIOMATERIAL.....	28
2. CULTIVO CELULAR DE hGMSC PARA ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD	31
3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS PARA SEMBRADO EN BIOMATERIALES	32
4. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA EL PROCESO DE ADHESIÓN CELULAR	32
5. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD	35
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
RESULTADOS.....	47
DISCUSIÓN.....	86
CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO.....	102
REFERENCIAS.....	105

RESUMEN

Uno de los tejidos implicados en el deterioro con el envejecimiento a nivel mundial, es el tejido óseo, donde la remodelación ósea se ve afectada por distintas patologías. En este contexto, la ingeniería de tejidos se enfoca en el desarrollo de métodos que permiten regenerar tejidos dañados mediante el uso de células madre, biomateriales y factores de crecimiento. Dentro de los biomateriales estudiados para regeneración ósea, se destaca la combinación de policaprolactona (PCL) y partículas bioactivas como el biovidrio (BG), con un alto potencial para aplicaciones médicas. La biocompatibilidad es esencial para el desarrollo de estos biomateriales, evitando respuestas adversas al momento de integrarlos en pacientes. Sin embargo, no se ha abordado de manera exhaustiva un análisis de biocompatibilidad para cuantificar y comprender la interacción entre células madre y el biomaterial. En este estudio, se fabricaron biomateriales de PCL y BG para estudiar el efecto de la adición de distintas concentraciones de BG (0, 10 y 20%) sobre la biocompatibilidad. Mediante imágenes SEM, análisis EDS y XRD, se realizó una caracterización físico-química de los biomateriales, confirmando la presencia de elementos y fases de cristalinidad propios del PCL y BG. En el ámbito de la biocompatibilidad, se realizaron tratamientos superficiales con acetona en los biomateriales para favorecer la adhesión celular, mejorando significativamente en células sembradas sobre PCL con 10% de BG, evidenciándose un aumento tras 24 horas del sembrado al compararse con la adhesión celular en biomateriales sin tratar. Se realizaron análisis de viabilidad/citotoxicidad, proliferación y cambios morfológicos de hGMSC al interactuar sobre los biomateriales compuestos de PCL y BG, mediante técnicas de análisis de actividad metabólica y marcajes moleculares y celulares específicos. Mediante ensayos MTS y marcaje de células vivas y muertas, se reveló que el grupo con 20% de BG presentó un 60% de muerte celular, con una baja viabilidad hasta el día 14 del sembrado. Se detectó un aumento significativo en la proliferación de hGMSC en PCL y PCL con 10% de BG a los días 7 y 14 tras el marcaje de la proteína Ki67 como indicador de proliferación. Tras el marcaje de filamentos de actina y cuantificación de descriptores de morfología (circularidad, AR, redondez y solidez) se observaron cambios morfológicos en las células durante el proceso de adhesión sobre PCL y PCL con 10% de BG, como formación de protrusiones y organización de filamentos de actina, presentando alta variabilidad morfológica de las células cuantificadas para ambos grupos. Estos resultados revelan la importancia de optimizar la concentración de BG para evitar toxicidad y mejorar las propiedades biológicas de biomateriales para futuras aplicaciones clínicas.

PROBLEMA U OPORTUNIDAD

El envejecimiento en la población da lugar al deterioro de diferentes tejidos dentro del organismo, lo cual implica complicaciones en la salud de un individuo, aumentando la morbilidad y mortalidad. Uno de los tejidos implicados en el deterioro con el envejecimiento, es el tejido óseo, demostrándose que existe una disminución ósea a partir de los 30 años (Portal-Núñez et al., 2012).

A lo largo de los años los huesos se adaptan para soportar los niveles de carga a los que se encuentran sometidos, lo cual conlleva a modificaciones en la masa y arquitectura ósea. En el proceso de remodelación ósea normalmente no se observan cambios en la masa y resistencia de hueso. Sin embargo, en una remodelación ósea anormal debido a patologías, como la osteoporosis, se genera una reducción de la masa y resistencia del hueso (Feng, X. & McDonald, 2011). Adicionalmente, las células envejecidas asociadas al tejido óseo poseen una sensibilidad reducida para adaptarse de acuerdo con la carga, lo cual puede verse asociada a la disminución ósea en adultos mayores (Javaheri & Pitsillides, 2019).

Un factor relevante, es el déficit de regeneración y formación ósea tras el envejecimiento, lo cual indica que hay una disminución de la capacidad de los osteoblastos para formar nuevamente el hueso. Esto puede verse relacionado a una menor diferenciación de células madre mesenquimales (MSC) en tejido óseo, optando por otros linajes de diferenciación, tales como condrocitos, fibroblastos o adipocitos (Portal-Núñez et al., 2012).

En el contexto a nivel del país, estudios sobre el índice de envejecimiento en Chile, indican que para el año 2050, se espera observar una esperanza de vida que superaría los 85 años. Además, la población de personas mayores de 60 años podría representar un tercio de la población total del país (Rojas F. et al., 2022), proyectándose una proporción de 177 personas mayores de 65 años, por cada 100 personas menores de 15 años (Quevedo et al., 2020). De esta manera, la población chilena se podría ver afectada por el deterioro del tejido óseo y el déficit de regeneración y formación ósea.

Una de las patologías del hueso más comunes en los adultos mayores, es la osteoporosis, la cual es una enfermedad esquelética relacionada a una disminución en la masa del hueso, aumentando el riesgo a la fractura. A causa de esto, las fracturas clásicas se presentan en vertebras, muñeca y cadera (Quevedo et al., 2020). Se ha observado una prevalencia de fracturas de un 18%, de los cuales, un 25,1% se presenta en adultos mayores de 55 años (Roman et al., 2020), registrándose a nivel nacional en el año 2017, 8.322 altas hospitalarias en Chile por fracturas relacionadas a osteoporosis en adultos mayores de 65 años. Así mismo, la incidencia de hospitalizaciones por osteoporosis es al

menos dos veces mayor que el número de hospitalizaciones por cáncer de mama, accidentes cerebrovasculares o enfermedades pulmonares obstructivas (Quevedo et al., 2020).

Por otro lado, a nivel mundial, 4 millones de personas requieren cirugía de injerto o remplazo óseo cada año, por lo que se hace relevante clínicamente, el desarrollo de tratamientos efectivos para los defectos óseos. Los injertos óseos son altamente utilizados para este ámbito, sin embargo, las estrategias actuales tienen limitantes, como la disponibilidad de suministro óseo cuando los defectos son de gran tamaño. Adicionalmente, cuando los defectos óseos exceden los dos centímetros, el proceso de curación pierde eficiencia y la reparación del tejido se vuelve compleja (C. Xu et al., 2024).

A partir de esto, la ingeniería de tejidos logra ser uno de los campos promisorios que puede aportar en la regeneración de tejidos. Esta se enfoca en el desarrollo de diferentes métodos que permiten regenerar tejidos dañados, además de permitir la creación de modelos para comprender mecanismos de desarrollo de tejidos y así generar nuevos fármacos (Ji & Guvendiren, 2017). Para estas aplicaciones, existen tecnologías de manufactura aditiva (AM) que permiten personalizar productos relacionados al área de la salud, tales como implantes, prótesis entre otros (Zadpoor & Malda, 2017). Adicionalmente, estas permiten desarrollar estructuras tridimensionales personalizadas como *scaffolds* o andamios porosos, los cuales son diseños de matrices artificiales, que deben cumplir con propiedades biológicas, reológicas y mecánicas, para tener la capacidad de regenerar tejidos corporales y degradarse luego del proceso de curación (Eltom et al., 2019). Por lo tanto, el uso de estas tecnologías permiten desarrollar tejidos humanos, lo cual hace posible simular las características de los órganos al combinar biomateriales y células en una misma arquitectura, ya que puede proporcionar una plataforma realista (Ramasamy et al., 2021) para estudiar distintos tejidos en el cuerpo.

Para estos propósitos, se utilizan biomateriales que interactúan con sistemas biológicos, los cuales permiten sustituir parcial o totalmente los tejidos (Eldeeb et al., 2022). A partir de esto, el campo de medicina regenerativa logra combinar el uso de 3 componentes: células madre, factores de crecimiento y andamios compuestos por biomateriales, para promover una regeneración más rápida del tejido de interés.

Dentro del desarrollo de biomateriales para este propósito, una opción es combinar materiales poliméricos con materiales bioactivos, para estimular el crecimiento y diferenciación celular, y al mismo tiempo desempeñarse mecánicamente de acuerdo con el tejido de interés. En este contexto,

se ha utilizado la tecnología de impresión 3D para desarrollar nuevos materiales con aplicaciones en el ámbito clínico, para la personalización de implantes y prótesis, construcción de modelos biomédicos e impresión de andamios vivos para la medicina regenerativa (Tappa & Jammalamadaka, 2018). Un enfoque prometedor en este ámbito es la escritura directa con tinta (DIW), la cual permite un control en la deposición del material a través de una presión neumática, temperatura y velocidad de extrusión (Contreras et al., 2025).

En general, polímeros como la policaprolactona (PCL) compuesta con partículas de vidrio bioactivo (biovidrio, BG), tienen un alto potencial para aplicaciones biomédicas con enfoque en regeneración ósea o cicatrización de heridas (Dash et al., 2023). El BG se caracteriza por ser un material que participa en la activación de genes que controlan la osteogénesis, presentando una alta bioactividad, que al combinarse con polímeros como PCL, permiten generar estructuras osteoestimulantes, con un alto desempeño mecánico (Dziadek et al., 2021). Sin embargo, se necesitan más estudios para optimizar su composición y propiedades para aplicaciones específicas (Dash et al., 2023). De esta manera, la preparación de tintas compuestas de PCL y BG para desarrollar estructuras 3D mediante DIW, es comprometedora, pero presenta diferentes desafíos.

Estudios en el Centro de Bioingeniería de la Universidad Adolfo Ibáñez se han enfocado en el desarrollo de tintas compuestas de PCL con BG y fabricación de estructuras tridimensionales mediante DIW en el ámbito de regeneración ósea, para caracterizarlas desde una perspectiva química, física, mecánica y biológica. Uno de los estudios recientes, evaluó los efectos de distintos parámetros de fabricación de biomateriales compuestos de PCL y BG, tales como la influencia del tipo de disolvente, temperatura de extrusión y cantidad de BG, sobre la imprimibilidad, propiedades mecánicas y propiedades biológicas de los biomateriales compuestos (Contreras et al., 2025). Se demostró la importancia de cada parámetro en el proceso de fabricación, sobre las diferentes propiedades. Sin embargo, la interacción de los parámetros debe evaluarse de manera cuantitativa para optimizar el rendimiento de este biomaterial.

Con respecto a la caracterización biológica, no se ha abordado de manera exhaustiva un análisis de biocompatibilidad para cuantificar y comprender de manera profunda la interacción entre células madre y el biomaterial. Es relevante comprender la relación entre las propiedades estructurales de los biomateriales y cómo estos influyen en la biocompatibilidad al momento de interactuar con células, para el desarrollo de dispositivos médicos y/o biomateriales. Desde un punto de vista ingenieril, el estudio de biocompatibilidad de biomateriales se enfoca en cómo sus propiedades

estructurales, fisicoquímicas y mecánicas afectan a su interacción con su entorno biológico, para contribuir al funcionamiento correcto de un implante o andamio.

En el presente estudio se fabricarán estructuras tridimensionales de PCL y BG, para investigar con profundidad la biocompatibilidad del biomaterial compuesto con distintas concentraciones de BG. Así, se procederá a evaluar distintos aspectos biológicos, tales como adhesión, citotoxicidad/viabilidad, proliferación y morfología celular, para entender la interacción de células madre mesenquimáticas con biomateriales compuestos de PCL y BG. Esto se realizará mediante marcadores celulares, lo cual permitirá complementar y profundizar los estudios realizados por el equipo de investigación del Centro de Bioingeniería de la Universidad Adolfo Ibáñez. Adicionalmente, aunque en la literatura se han realizado ensayos biológicos para evaluar la biocompatibilidad de este biomaterial compuesto, estos ensayos han sido aislados. En este estudio se propone realizar un análisis exhaustivo, empleando diversas técnicas que se complementan entre sí, para comprender con mayor profundidad las interacciones célula-biomaterial.

ESTADO DEL ARTE

1. ESTRUCTURA ÓSEA

El hueso es un tejido conectivo dinámico y multifuncional, el cual desempeña un papel fundamental en el soporte y protección de tejidos blandos, movilidad del organismo y almacenamiento de calcio y fósforo (Florencio-Silva et al., 2015).

La composición del hueso se compone aproximadamente un 10% de células, 30% de una matriz orgánica y un 60% de minerales como calcio y fósforo, en forma de cristales de hidroxiapatita (Feng, X. & McDonald, 2011). Así, la matriz orgánica del hueso, compuesta principalmente por colágeno de tipo I, forma una estructura sobre la cual se produce la mineralización, siendo esta última la que entrega la rigidez al hueso, mientras que el colágeno aporta en la resistencia a la tracción y elasticidad del hueso (Ralston, 2021).

La estructura del hueso se divide principalmente en el hueso cortical y hueso trabecular. El hueso cortical se caracteriza porque es denso y forma un revestimiento de todo el tejido óseo, aportando como un soporte mecánico y protector. Por otro lado, el hueso trabecular tiene una densidad menor y ocupa el centro de los huesos, aportando en la resistencia mecánica y desempeñando un papel fundamental en el metabolismo (Feng, X. & McDonald, 2011) (Ralston, 2021). Ahora bien, el hueso trabecular es el sitio principal en donde se produce la remodelación ósea. De esta manera, pasa a ser la zona principal en la cual se desarrollan las enfermedades que implican remodelación ósea (Feng, X. & McDonald, 2011).

El hueso se repara y renueva constantemente mediante el proceso de remodelación ósea, lo cual ocurre, en condiciones normales, en aproximadamente el 10% del esqueleto de un adulto (Ralston, 2021). La remodelación ósea requiere la acción coordinada de cuatro tipos de células del hueso, conocidas como: células del revestimiento óseo, osteocitos, osteoclastos y osteoblastos, donde cada una de estas cumple con una función específica (Feng, X. & McDonald, 2011). De esta manera, las células del revestimiento óseo consisten en una monocapa de células pertenecientes al linaje de los osteoblastos, que recubren el hueso. Luego, los osteocitos actúan en la detección de deformación ósea generada por carga mecánica o micro daños, transmitiendo señales para dar inicio a la remodelación ósea. Adicionalmente, producen los componentes inorgánicos de la materia ósea. Siguiendo, los osteoclastos actúan en el proceso de resorción ósea, mientras que los osteoblastos son células formadoras de la parte orgánica del hueso, que provienen de las células madre

mesenquimales a través de una vía de diferenciación (Feng, X. & McDonald, 2011) (Florencio-Silva et al., 2015) (C. Xu et al., 2024).

El proceso de remodelación ósea consta principalmente de cuatro fases (Figura 1): (a) inicio o activación de remodelación ósea, asociada a un sitio en específico de acuerdo con un daño generado, (b) resorción ósea guiado por los osteoclastos y reclutamiento de células madre mesenquimales (MSC) y osteoprogenitores, (c) diferenciación y acción de los osteoblastos y (d) mineralización y finalización de la remodelación ósea (Feng, X. & McDonald, 2011).

Ahora bien, en el proceso de remodelación normalmente no se observan cambios en la masa y resistencia de hueso. Sin embargo, en una remodelación ósea anormal debido a patologías, como la osteoporosis, se genera una reducción de la masa y resistencia del hueso (Feng, X. & McDonald, 2011).

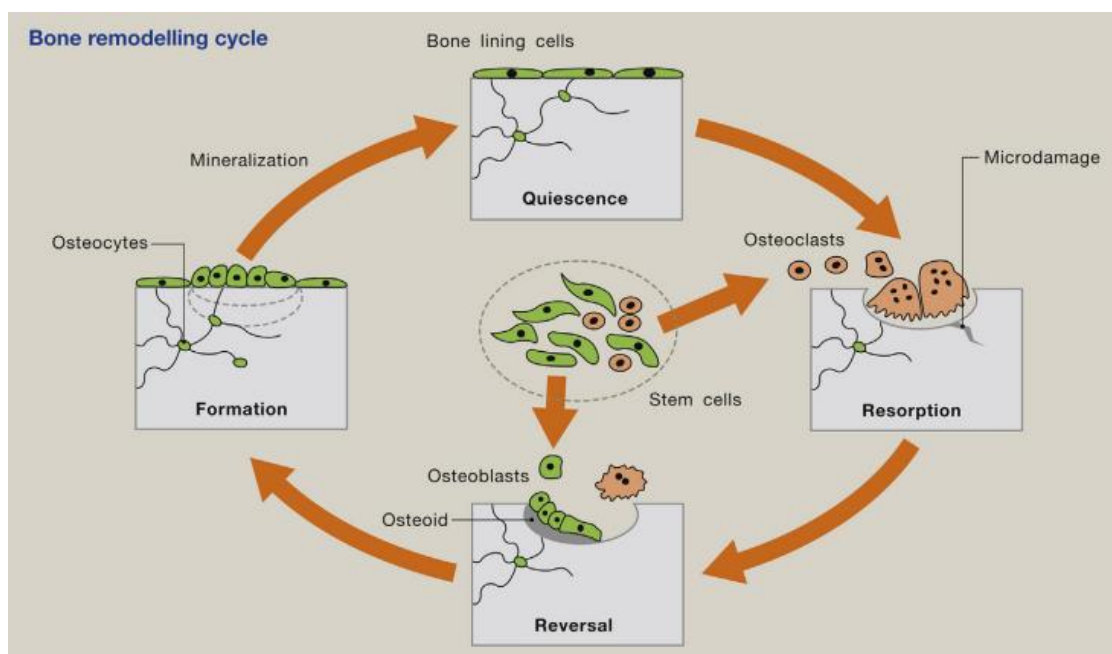


Figura 1. Modelo de remodelación ósea.

El proceso de remodelación ósea consta de cuatro fases principales, que consisten en la detección de una deformación y activación de la remodelación en un sitio específico. Luego, se produce la resorción ósea por osteoclastos, mientras que comienza el reclutamiento de células madre mesenquimáticas, continuado por el proceso de diferenciación de células madre a osteoblastos, junto con la acción de los osteoblastos. Finaliza con el proceso de mineralización y finalización del proceso de remodelación ósea. Extraído de (Ralston, 2021).

2. DETERIORO DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo posee la capacidad de repararse y regenerarse por sí mismo. Sin embargo, existen diferentes razones, tales como fracturas, infecciones, tumores o enfermedades, por las cuales este proceso puede verse afectado, generando defectos óseos (C. Xu et al., 2024).

La mayoría de las enfermedades óseas resultan presentarse por anomalías en el proceso de reparación o una remodelación deficiente. Un ejemplo de esto es la osteopetrosis, una enfermedad que se caracteriza por un aumento considerable en la masa ósea debido a mutaciones en genes que afectan la función de osteoclastos (Ralston, 2021). Otro ejemplo, es la osteoporosis, enfermedad que se caracteriza por una menor densidad ósea en el hueso trabecular (Adejuyigbe et al., 2023), el cual se debe a que, con la edad, la cantidad del hueso reabsorbido excede a la cantidad de hueso que se forma (Figura 2). Esto puede deberse tanto a factores genéticos como ambientales, los cuales pueden provocar un mayor recambio óseo y por lo tanto, una disociación entre resorción y formación ósea (Ralston, 2021).

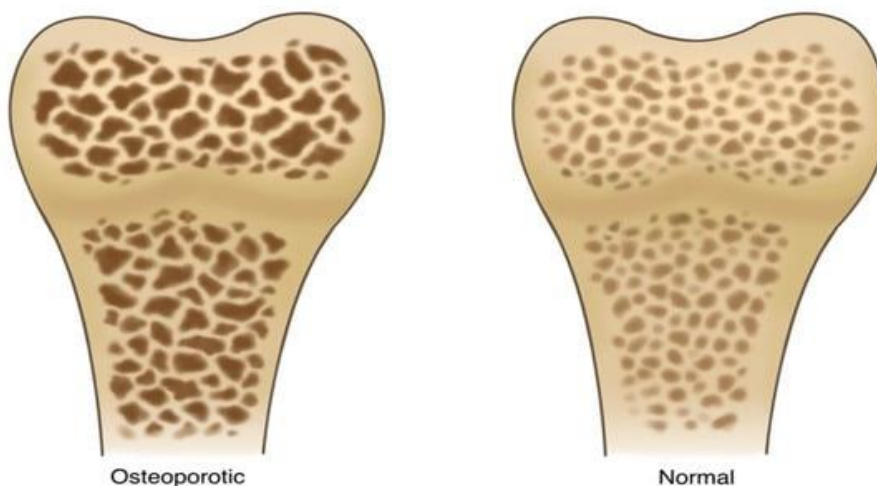


Figura 2. Representación de la estructura ósea de un hueso osteoporótico y sano.

A la derecha, estructura de un hueso normal con estructura trabecular gruesa, con alta mineralización y calcio. A la izquierda, hueso osteoporótico, con reducción de densidad y espesor trabecular. Poros representan zonas comprometidas en la resistencia. Extraído de (Adejuyigbe et al., 2023).

Por otro lado, en un individuo sano, la formación y resorción ósea se encuentran en un estado de equilibrio. Sin embargo, durante las etapas de desarrollo y envejecimiento, este equilibrio puede verse modificado, generando que la estructura ósea cambie en respuesta a la carga a la que se ve sometida, señales hormonales y factores de crecimiento. De esta manera, a medida que la estructura del hueso cambia, su capacidad funcional también puede verse modificada o afectada. De esta manera, tanto en animales como en humanos, el hueso se vuelve más rígido con la edad y el área transversal, conocida como la superficie trabecular, disminuye. Esto implica que la tensión y deformación en el hueso aumenta, pudiendo provocar fracturas en huesos frágiles (Boskey & Coleman, 2010).

Así, en la actualidad el tratamiento eficaz del deterioro del hueso es de gran importancia clínica. Estudios han reportado considerables deficiencias, limitaciones y complicaciones de tratamientos clínicos actuales, los cuales incluyen autoinjertos y aloinjertos (Amini et al., 2012).

Los autoinjertos han sido parte de un estándar para los injertos óseos considerando la compatibilidad con el paciente, además de poseer los componentes esenciales para lograr una osteoinducción, osteogénesis y osteoconducción. Sin embargo, este procedimiento es de alto costo y puede provocar lesiones y afectar en la morbilidad del paciente, siendo también útil solo para reparar lesiones pequeñas, pues, los injertos óseos autólogos suelen estar limitados por la escasa cantidad de hueso disponible (Alonzo et al., 2022), (Amini et al., 2012).

Por otro lado, los aloinjertos representan una segunda técnica común, que implica el trasplante de tejido óseo de un donante, el cual suele ser un cadáver. Aun así, en comparación con los autoinjertos, los aloinjertos se asocian a riesgos de respuestas inmunológicas y transmisión de infecciones, prestando también propiedades osteoinductoras reducidas y carecen de componentes celulares (Amini et al., 2012).

A partir de lo anterior, ha sido de importancia desarrollar tratamientos más fiables y eficientes para evitar las problemáticas relacionadas a los tratamientos aplicados para regenerar tejido óseo dañado (C. Xu et al., 2024). Así, la ingeniería de tejidos se ha convertido en una estrategia alternativa que eliminaría el riesgo de afectar a la morbilidad de la zona donante, disponibilidad limitada, rechazo inmunitario y transmisión de infecciones (Amini et al., 2012).

3. INGENIERÍA DE TEJIDOS PARA REGENERACIÓN

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario, que se basa en la aplicación de métodos de ingeniería, medicina y fisiología, con el objetivo de obtener nuevos tejidos funcionales, para regenerar un tejido de interés (Ostadfar, 2016). Si bien, el cuerpo posee propiedades de regeneración y autocuración, este proceso puede verse afectado debido al desarrollo de enfermedades.

Esta área hace uso de biomateriales que pueden ser diseñados como estructuras tridimensionales que, junto con células y moléculas bioactivas, imitan el entorno del huésped para la formación de un tejido (Lee et al., 2014). Esta estrategia, consiste en generar productos a partir del cultivo y sembrado de células madre *in vitro*, las cuales idealmente aíslen del mismo paciente y sean sembradas sobre un biomaterial, el cual permite generar estructuras interconectadas tridimensionales que promueven el crecimiento, proliferación y diferenciación de las células. De esta manera, la combinación de biomateriales, células madre y factores de crecimiento, permiten desarrollar un tejido autólogo *in vitro*. Finalmente, el objetivo es implantar este producto en el mismo paciente, para favorecer la regeneración de un tejido de interés (Figura 3) (Przekora, 2019).

Este campo se basa en principios de micro y nanotecnología, como es la aplicación de andamios o materiales con microestructuras que facilitan la adhesión celular primaria y la formación de tejido. Adicionalmente, la ingeniería de tejidos necesita de la comprensión de la fisiología celular, considerando que hay distintos procesos celulares que desempeñan un papel fundamental en este ámbito. Una de las células madre conocidas para su uso en este campo, son las células madre mesenquimales, las cuales se caracterizan por ser células que pueden diferenciarse en varios tipos celulares (Ostadfar, 2016).

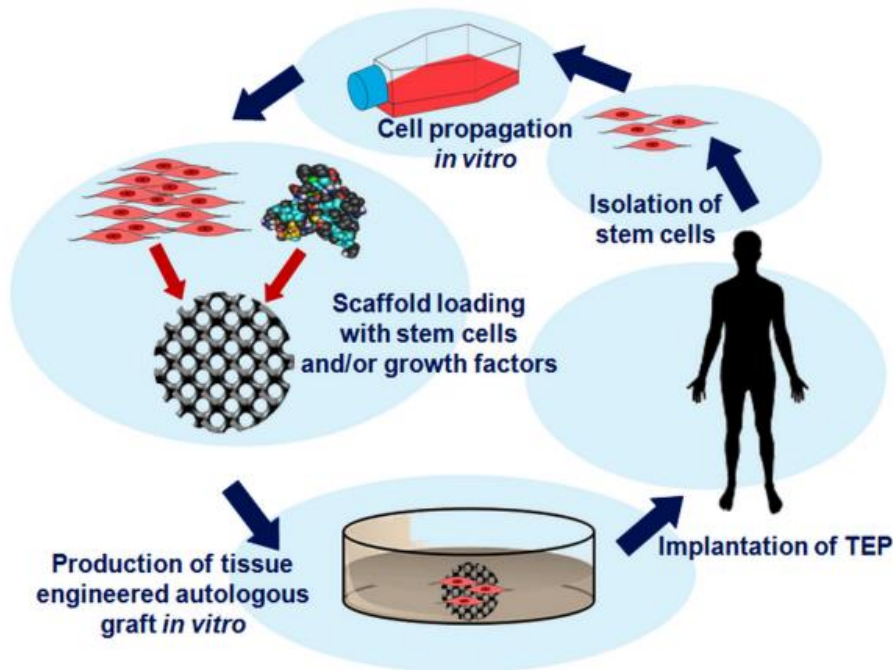


Figura 3. Representación del proceso de regeneración de tejidos.

Modelo de ingeniería de tejidos que comienza con la extracción de células madre, cultivo y proliferación in vitro, sembrado de células en *scaffolds*, junto con factores de crecimiento, desarrollo del tejido autólogo in vitro e implantación del producto. Extraído de (Przekora, 2019).

4. CÉLULAS MADRE Y SU USO EN MEDICINA REGENERATIVA

Como se ha mencionado previamente, la ingeniería de tejidos implica el uso de biomateriales, células madre y factores de crecimiento para promover la regeneración. Para estas aplicaciones, las células madre corresponden a células sin diferenciación que son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en distintos tipos celulares (Millan et al., 2018). Existen distintos tipos de células madre, las cuales se clasifican según su potencialidad de diferenciarse y su origen. Las células madre mesenquimales (MSC) corresponden a células multipotentes, diferenciándose principalmente en tres líneas celulares: condrocitos, osteocitos y adipocitos; para formar cartílago, hueso y tejido adiposo respectivamente.

Las MSC pueden obtenerse de la médula ósea, tejido gingival, cordón umbilical, placenta, grasa, entre otros (Q. Chen et al., 2016). Ahora bien, pese a compartir características, la obtención de estas

de distintos tejidos conlleva el desarrollo de distintos procedimientos y, por lo tanto, presenta diferentes riesgos. Un ejemplo de esto son las MSC en el tejido gingival humanas (GMSC), las cuales comparten características con las que se obtienen de la médula ósea, sin embargo, poseen ventajas debido a se utilizan procedimiento menos invasivos para su obtención (Millan et al., 2018).

Las principales características que poseen las MSC que las hacen utilizables en medicina regenerativa, son que poseen un alto nivel de proliferación, propiedades de inmunomodulación y antimicrobianas, y la capacidad de migrar a los tejidos dañados (Caplan, 2017), (Fu et al., 2019). Por lo tanto, las MSC pueden generar un microambiente inmunotolerante, reduciendo el riesgo de rechazo de implantes desarrollados con biomateriales, lo cual es importante para controlar la respuesta inmunitaria frente al uso de implantes para la regeneración de tejidos.

Por otro lado, una de las principales preocupaciones relacionada al uso de implantes en medicina regenerativa, es el riesgo de infección al utilizarse biomateriales. De esta manera, al ejercer las MSC efectos microbianos, generan factores antimicrobianos a partir de la producción de proteínas antibacterianas o regulando la respuesta inmunitaria, contribuyendo al uso de biomateriales para la ingeniería de tejidos (Millan et al., 2018).

Así es como, la combinación de biomateriales con MSC, junto con factores de crecimiento, hace posible que la ingeniería logre ingresar al campo de regeneración de tejidos.

5. BIOMATERIALES

5.1.BIOMATERIALES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

En el contexto de ingeniería de tejidos, es importante considerar el tipo de biomateriales a utilizar según el tejido de interés, pues, se debe tener en cuenta que, para su desempeño en el proceso de regeneración, estos participan en conjunto con células madre y factores de crecimiento.

Un biomaterial se define como una sustancia, que puede ser sintética o natural, la cual se encuentra en condiciones para interactuar de manera directa con componentes de un sistema vivo (Achermann et al., 2015). De esta manera, se utilizan para dirigir el curso de cualquier procedimiento terapéutico o diagnóstico en medicina humana o veterinaria (Williams, 2009), empleándose principalmente como soportes estructurales para facilitar la curación y restaurar la funcionalidad (Mateu-Sanz et al., 2024).

Dentro de la ingeniería de tejidos, un biomaterial debe ser capaz de transportar de manera eficaz tanto células como factores de crecimiento para estas, proporcionando al mismo tiempo propiedades mecánicas que sean compatibles con el tejido de interés (Lee et al., 2014).

Adicionalmente, el uso biomateriales para ser utilizados en regeneración de tejidos debe cumplir con ciertos requisitos, por ejemplo, ser biocompatibles y bioactivos, para evitar una respuesta inmunitaria en el individuo al ser implantado y que, al mismo tiempo, genere una respuesta celular. Los biomateriales deben ser biodegradables en un período de tiempo determinado, para degradarse dentro del individuo a una velocidad comparable a la del crecimiento de un nuevo tejido (Lee et al., 2014); deben ser esterilizables, para incorporarse con seguridad a los tejidos in vivo, y finalmente, bioactivos, lo que significa que promuevan respuestas en los tejidos que favorezcan la regeneración (Eldeeb et al., 2022).

Por otra parte, en el campo de los biomateriales, se reconocen los biomateriales compuestos, los cuales consisten en la combinación de dos o más componentes, los cuales tienen propiedades diferentes, tales como su composición química, morfología, propiedades físicas, entre otros. Estos se desarrollan con el fin de obtener un material que posea propiedades físicas, mecánicas, químicas y biológicas específicas, de tal manera que permitan representar procesos naturales, tales como la reparación o regeneración de un tejido (Bhaskar et al., 2021). De esta manera, existen diferentes combinaciones de biomateriales, las cuales permiten adaptar sus propiedades según el tejido de interés, haciendo posible la fabricación de diferentes estructuras a partir de tecnologías de impresión 3D para su evaluación.

5.2.TÉCNICAS DE FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS PARA EVALUACIÓN DE BIOMATERIALES

La capacidad de construir implantes o estructuras personalizadas para cada paciente, han revolucionado las tecnologías de fabricación en el campo médico. En la actualidad, existe una amplia variedad de biomateriales los cuales se utilizan en la manufactura aditiva para fines clínicos, tales como metales, cerámicas, polímeros y materiales compuestos (Tappa & Jammalamadaka, 2018). El éxito de los distintos procesos de impresión 3D depende en gran parte, de la optimización de los diferentes parámetros (Tappa & Jammalamadaka, 2018). Con esto, se hace relevante seleccionar técnicas de fabricación aditiva adecuada, parámetros de impresión y diseño de la microarquitectura de los biomateriales para aplicaciones biomédicas. De esta manera, las

tecnologías de manufactura brindan oportunidades para una disposición precisa para desarrollar arquitecturas complejas (Mirzaali et al., 2022).

A partir de lo anterior, las normativas reconocen diferentes categorías de manufactura aditiva, clasificadas como: (i) en base a polvo: inyección de aglutinante (*binder jetting*), fusión de lecho en polvo (*powder bed fusion*); (ii) en base a líquido: laminación de láminas (*sheet lamination*), fotopolimerización (*vat polymerization*); (iii) en base a sólido: inyección de material (*material jetting*), deposición de energía dirigida (*directed energy deposition*) y extrusión de material (*material extrusion*) (Altıparmak et al., 2022) (Mirzaali et al., 2022).

Centrándose en el proceso de extrusión del material, a diferencia de fabricación aditiva basada en líquido o polvo, el material se calienta hasta formar una masa viscoelástica, la cual fluye al ser expulsada por una boquilla extrusora. Una tecnología específica dentro del proceso de extrusión es la escritura de tinta directa (DIW). Esta es una tecnología prometedora para la impresión 3D, la cual se basa en un proceso de extrusión por una boquilla, donde el material extruido suele ser una tinta que se deposita sobre una capa previamente depositada, para fabricar estructuras 3D personalizadas para aplicaciones en ingeniería de tejidos. El éxito del proceso DIW está relacionado a la optimización de parámetros, junto con la correcta formación de la tinta o biomaterial, la cual definiría la calidad de la impresión. Esto es de alta relevancia debido a que se debe garantizar que se mantenga la fidelidad de la forma y estabilidad estructural en el proceso de fabricación, para mantener una calidad que permita evaluaciones en otros ámbitos. Sin embargo, existen pocos estudios disponibles que analizan la importancia de la optimización de los parámetros en este proceso, para mejorar la precisión estructural de materiales fabricados mediante DIW (Mirzaali et al., 2022).

Con esto, es importante determinar los parámetros óptimos para el proceso de DIW, tales como temperatura, presión, velocidad de impresión para la tinta específica, definición de la tinta, entre otros, para obtener una estructura estable con un rendimiento mecánico y biológico para sus aplicaciones (Vallejos et al., 2021) (Altıparmak et al., 2022), pues, se ha demostrado que, por ejemplo, la biocompatibilidad puede verse afectada por las condiciones específicas de fabricación de la estructura (Joseph Rey et al., 2021).

5.3.BIOCOMPATIBILIDAD DE BIOMATERIALES

Desde el punto de vista biológico, se mencionó que para que un material pueda utilizar en ingeniería de tejidos, este debe cumplir con ciertos requisitos, los cuales indican que este debe ser bioactivo, biodegradable y biocompatible. De esta manera, un material que es biocompatible, se puede llamar “Biomaterial” (Riza et al., 2020).

La biocompatibilidad es esencial para el desarrollo de dispositivos médicos y/o biomateriales. De esta manera, para la aplicación de estos y que logren entrar en contacto con pacientes u organismos vivos, se exigen pruebas de biocompatibilidad para asegurar que no se produzcan reacciones adversas en el organismo (Mateu-Sanz et al., 2024). Sin embargo, la definición de este concepto ha evolucionado a lo largo del tiempo.

El concepto de biocompatibilidad no hace referencia solo a una propiedad de un biomaterial, sino que consiste en una propiedad relacionada a cómo este reacciona a su entorno, describiendo la capacidad que posee un material para generar una respuesta biológica acorde a su desempeño o aplicación dentro de un organismo (Perrotti et al., 2016).

De acuerdo a lo anterior, la biocompatibilidad es un término compuesto que describe la dinámica de la interacción del material, asociado a (1) propiedades del material: físicas, químicas, geométricas, superficiales (tamaño, porosidad, textura, entre otros) y proporcional de acuerdo al tejido de interés; (2) interface: la interacción entre el material y los componentes biológicos (3) locación del material: asociado al tejido de interés para su aplicación; (4) duración del material: tiempo de exposición o duración al ser implantado. A partir de esto, la biocompatibilidad se define como el conjunto de atributos que describen la capacidad de un material para desempeñarse en una función deseada durante un período de tiempo definido, sin generar un riesgo significativo, tales como respuestas adversas locales o sistémicas, irritaciones, toxicidad o cualquier tipo de evento adverso en el receptor (Mateu-Sanz et al., 2024).

Existe una falta de métodos optimizados y validados que permitan el uso de modelos *in vitro* para la evaluación compleja de biocompatibilidad de materiales. En general, estudios se centran en la evaluación de citotoxicidad y proliferación celular en la superficie del biomaterial, y luego se procede directamente a modelos *in vivo*, sin aprovechar el máximo el potencial de los modelos *in vitro* (Przekora, 2019). Aun así, se pueden realizar diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, que evalúan distintos aspectos biológicos los cuales se complementan, por lo cual el grado de biocompatibilidad no es fácil de definir. Adicionalmente, para el desarrollo de biomateriales avanzados, estos deben

ser evaluados a nivel de la integración tisular parcial, por lo que esto hace aún más compleja la evaluación de biocompatibilidad de materiales (Mateu-Sanz et al., 2024).

Comenzando con la caracterización *in vitro*, se pueden emplear métodos que se enfocan en evaluar distintos procesos celulares, tales como la adhesión, citotoxicidad, viabilidad celular, proliferación, migración, evaluación cualitativa y cuantitativa de morfología, entre otros (Torres-Mansilla et al., 2023), (Mateu-Sanz et al., 2024). Así, los métodos para evaluar estos procesos celulares, pueden incluir ensayos de células vivas/muertas, potencial mitocondrial, colorantes vitales, mediciones metabólicas, marcadores fluorescentes, entre otros (Mateu-Sanz et al., 2024).

Los biomateriales implantables deben ser, en primer lugar, no tóxicos para las células (Przekora, 2019). Para esto, la evaluación de citotoxicidad, indica el grado en el que una sustancia puede causar daño celular, provocando su muerte (Mateu-Sanz et al., 2024). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, faltan normativas o métodos optimizados que permitan el uso de modelos *in vitro* para la evaluación compleja de biocompatibilidad de materiales (Przekora, 2019).

Por otro lado, la adhesión celular es esencial para los procesos celulares fundamentales, tales como la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular. Esta hace referencia a la unión de la integrina del receptor de la membrana celular con la matriz extracelular, proporcionando una conexión entre los entornos intracelulares y extracelulares. La adhesión celular se ha evaluado mediante el recuento celular y ensayos de actividad celular, lo cual informa sobre la respuesta de las células adheridas (J. Y. Chen et al., 2018).

A partir de lo anterior, se pueden analizar los cambios morfológicos de manera cualitativa y cuantitativa, que se generan en el proceso de adhesión celular. Este proceso indica que cuando una célula entra en contacto con el sustrato y se adhiere débilmente, se aplana y comienza a extender su membrana en la superficie del sustrato. Al mismo tiempo, la célula comienza a formar complejos de adhesión que conecta la matriz extracelular con los filamentos de actina intracelulares, a través de las integrinas. Estos complejos, anclan la célula finalmente a la superficie del sustrato (Figura 4) (Xi & Y. Chen, 2013). En el proceso de adhesión celular, las células se adhieren al sustrato y se expanden considerablemente con el tiempo, presentando cambios morfológicos detectables (J. Wang et al., 2016). En general, las dinámicas celulares suelen detectarse mediante observación con un microscopio óptico convencional, sin embargo, al adherirse a cerámicas, es difícil observarlas debido a la naturaleza opaca del material (Kotobuki et al., 2005a), por lo que una opción para evaluar estos cambios es mediante marcadores celulares fluorescentes.

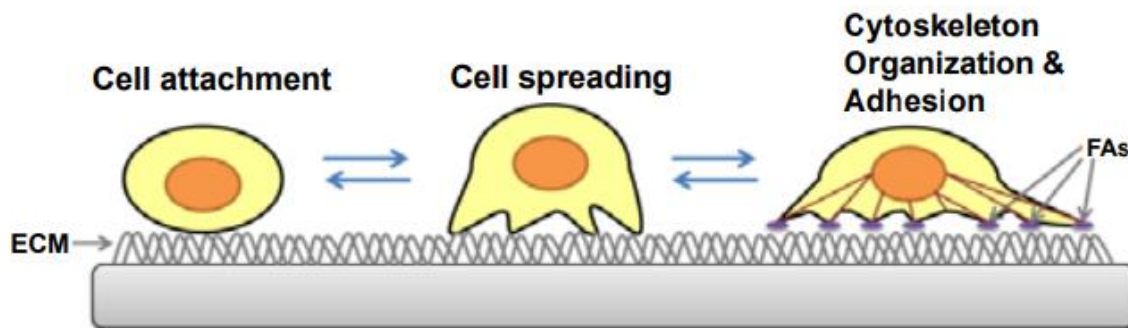


Figura 4. Proceso de adhesión celular.

Una célula entra en contacto con el sustrato, se adhiere débilmente, se aplanar y comienza a extender su membrana sobre la superficie del sustrato. Simultáneamente, la célula forma complejos de adhesión que conectan la matriz extracelular (MEC) con los filamentos de actina intracelulares a través de la integrina. Estos complejos de adhesión conducen al establecimiento de adherencias focales (AF), que anclan la célula firmemente a la superficie del sustrato. Extraído de (Xi & Y. Chen, 2013).

La proliferación y viabilidad celular son parámetros importantes para el estudio biológico, que contribuyen al análisis de biocompatibilidad de un material. La proliferación celular, se define como la tasa de crecimiento celular o cuantificación de las células hijas. Por otro lado, la viabilidad celular es la cuantificación de las células viables/vivas (Fang & Trewyn, 2012). Este parámetro se puede expresar como el porcentaje de células vivas en relación con el total de células.

5.4.BIOMATERIALES PARA REGENERACIÓN ÓSEA

La medicina regenerativa ortopédica busca diseñar andamios e implantes, con el objetivo de replicar las propiedades biomecánicas del hueso. De esta manera, para la regeneración ósea, un andamio debe ser biocompatible y debe poseer propiedades osteoinductores y osteoconductoras (Girón et al., 2021). Lo anterior, se relaciona a la capacidad de promover la diferenciación a de las células progenitoras a osteocitos y que sean aptos para favorecer el crecimiento óseo respectivamente (Stevens, 2008). Otra característica importante para los andamios óseos es la capacidad de osteointegración. Esto significa que el andamio y el hueso se puedan integrar de tal

manera, que solo una fractura puede separar el material del andamio del hueso recién regenerado. Esta propiedad está relacionada con las propiedades físicas del andamio, su microestructura, como porosidad, y sus propiedades superficiales, tales como topografía y química superficial (Torres-Mansilla et al., 2023).

Es relevante considerar que un andamio en el contexto de regeneración ósea sea biodegradable, pues funciona como una estructura temporal dentro del tejido durante el proceso de regeneración. Por esto, la biodegradabilidad debe lograr un equilibrio entre el proceso de descomposición del material y la formación del hueso, para mantener la estabilidad (Torres-Mansilla et al., 2023).

Adicionalmente, un andamio debe poseer características estructurales que proporcionen estabilidad sin afectar a la bioactividad. La microestructura de un material influye en sus propiedades mecánicas. Al mismo tiempo, esta influye también en aspectos biológicos, pues, por ejemplo, la porosidad definida en un andamio puede permitir la migración celular y el transporte de nutrientes y desechos, por lo que la cantidad, tamaño, forma y conectividad de los poros deben ser suficientes para proporcionar estas características, sin comprometer la estabilidad y propiedades mecánicas (Torres-Mansilla et al., 2023).

En este contexto, existen materiales que cumplen con estas características, tales como cerámicas bioactivas, vidrios bioactivos y polímeros biológicos o sintéticos, los cuales pueden ser combinados para formar un biomaterial compuesto. De hecho, algunos de estos materiales también poseen una composición similar a la fase mineral del hueso (Stevens, 2008).

En cuanto a la composición de los materiales, se han estudiado tanto cerámicos como polímeros, debido a su compatibilidad con el tejido vivo. Los cerámicos naturales o sintéticos se caracterizan por su resistencia a la corrosión y pueden estimular la formación del hueso, sin embargo, son frágiles. En este contexto, estos materiales incluyen hidroxiapatita, fosfato de calcio, fosfato β -tricalcico (β -TCP), BG, entre otros (Girón et al., 2021).

En general, los materiales a base de fosfato de calcio se utilizan en la ingeniería de tejido óseo, debido a la abundancia de este mismo en el hueso humano, sin embargo, poseen menor resistencia a la fractura en comparación a otros biocerámicos como el biovidrio (Stevens, 2008). Luego, la hidroxiapatita es una de las biocerámicas más utilizadas en este campo, debido a su excelente biocompatibilidad y propiedades osteoinductivas. El TCP se caracteriza por promover la proliferación de células, sin embargo, presenta una menor estabilidad que la hidroxiapatita, con un proceso de degradación más rápido y mayor solubilidad (Girón et al., 2021). En esta misma línea,

el biovidrio se compone principalmente de Si_2O , Ca_2O , and P_2O_5 , por lo que, al contener calcio y fósforo, permite generar una capa de apatita hidroxycarbonatada, la cual se adhiere al tejido biológico. Además, el BG suele tener mejores propiedades de degradación y bioactividad que la hidroxiapatita y β -TCP, lo cual es beneficioso dado que al degradarse, libera de iones permite activar vías de señalización, las cuales favorecen a la diferenciación celular, pudiendo alcanzar la osteogénesis más rápido que otros materiales (Nikolova & Chavali, 2019), (Civinini et al., 2012), (Szwed-Georgiou et al., 2023).

Con respecto a los polímeros utilizados en el contexto de regeneración ósea, se incluye colágeno, quitosano, alginato, PCL, ácido poliláctico (PLA), entre otros. Considerando que la fase orgánica del hueso se compone principalmente de colágeno, se han utilizado andamios de este polímero para proporcionar un entorno que imite componentes formadores de hueso y aumente la proliferación celular. Adicionalmente, se puede combinar con cerámicas, carbono y otros polímeros para mejorar la resistencia mecánica. Por otro lado, polímeros como PCL y PLA se caracterizan por sus propiedades mecánicas comparables con el tejido óseo, pudiendo modificarse y combinarse con cerámicos, para mejorar sus propiedades mecánicas y obtener propiedades biológicas deseadas según sus aplicaciones deseadas (Girón et al., 2021).

5.5.MATERIALES COMPUESTOS DE PCL Y BIOVIDRIO PARA REGENERACIÓN ÓSEA

Considerando las ventajas del BG para la regeneración de tejido óseo mencionadas anteriormente, este se destaca y logra ser un material de interés que libera iones que intervienen en la activación de genes que controlan la osteogénesis, presentando una alta bioactividad (Dziadek et al., 2021). Ahora bien, su fragilidad es el principal inconveniente de este material, por lo que en general se combina con materiales poliméricos biodegradables, tales como PCL y PLA, entre otros. De esta manera, la estructura fabricada puede poseer una mayor resistencia a la compresión sin comprometer su bioactividad (Dziadek et al., 2021). Existen diferentes métodos de fabricación, los cuales incluyen aplicaciones de altas temperaturas o uso solventes tales como acetona, cloroformo o diclorometano (DCM) para combinar ambos materiales y lograr un biomaterial compuesto uniforme (Soni et al., 2019), (Dziadek et al., 2021).

Los compuestos de PCL y BG se han convertido en biomateriales prometedores para diversas aplicaciones biomédicas. Estos, tienen un alto potencial para promover la regeneración ósea y

cicatrización de heridas en la ingeniería de tejidos, donde la incorporación de BG en el PCL puede mejorar su bioactividad y biocompatibilidad (Dash et al., 2023). Luego, para aplicaciones clínicas, el BG más utilizado es el BG45S5, compuesto por SiO₂, Na₂O, CaO y P₂O en porcentaje en peso presentado en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de BG 45S5 utilizado en aplicaciones médicas y dentales (Hench et al., 2014).

Fases	Composición (% peso)
SiO ₂	45
Na ₂ O	24.5
CaO	24.5
P ₂ O	6

Estudios han demostrado que los compuestos de PCL y BG se pueden utilizar en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos, actuando como transporte de factores de crecimiento, antibióticos y antiinflamatorios, lo cual puede controlarse a partir de la composición del compuesto (Dash et al., 2023). A partir de esto, es importante considerar que la capacidad de regeneración ósea de este material compuesto puede variar por las proporciones PCL/BG, pues estudios *in vitro* han demostrado que al agregar BG de un 0% a un 5% (en peso) a estructuras de PCL y quitosano, la actividad mitocondrial celular y la actividad de fosfatasa alcalina, enzima asociada a la diferenciación celular, aumentaron con una concentración del 3% de BG, las cuales luego disminuyeron al llegar a un 5% de BG (Haddadi et al., 2023). Así mismo, otros estudios han presentado que la concentración de biovidrio desde 0% hasta el 40% en estructuras tridimensionales compuestas con PCL, ha aumentado la actividad celular y presencia de genes osteogénicos. Sin embargo, se ha demostrado que en altas concentraciones, el BG puede ser tóxico y por lo tanto, inhibir la proliferación celular (Soto, 2017). Al mismo tiempo, a medida que aumenta la concentración de BG hasta un 75% en un polímero de PCL, la degradación del biomaterial también aumenta, por lo que esto permite una mayor liberación de iones que promueven la osteogénesis (Soni et al., 2019). Por esto, es relevante definir una dosis adecuada de biovidrio en una estructura compuesta, para promover las propiedades biológicas.

Por otro lado, se han presentado diferencias en la dureza del material en estructuras compuestas con distintos porcentajes de biovidrio, lo cual es crucial para su desempeño mecánico y cumplir con

las propiedades mecánicas asociadas al hueso (Dziadek et al., 2021). Otros factores que afectan la capacidad de regeneración se basan en el proceso de fabricación de la estructura tridimensional. Así mismo, las propiedades geométricas tales como porosidad, tamaño de poro e interconectividad de poros, también son factores importantes que afectan en el rendimiento mecánico y biológico de los andamios (El-Rashidy et al., 2017).

Si bien, los compuestos de PCL y BG tienen un gran potencial en diversas aplicaciones biomédicas, se necesitan más estudios para optimizar su composición, estructura y propiedades para aplicaciones específicas. Por lo tanto, la optimización de materiales y parámetros del biomaterial compuesto debe ser uno de los focos en la investigación, investigando la adición de partículas de BG a andamios poliméricos para crear un biomaterial donde se mejore su osteoconductividad con una mayor resistencia mecánica (Dash et al., 2023).

En este contexto, resulta relevante estudiar la biocompatibilidad de biomateriales de PCL y BG, con el fin de entender en profundidad cómo la incorporación de distintas concentraciones de BG puede influir en diversos aspectos de la respuesta biológica de hGMSC con un biomaterial polimérico compuesto.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A partir de lo anterior, biomateriales compuestos de PCL y BG se han convertido en biomateriales prometedores para la regeneración ósea. Sin embargo, aún faltan análisis en los cuales se explore profundamente su biocompatibilidad, lo cual presenta dificultades para comprender cómo las propiedades estructurales y físico-químicas pueden influir en la interacción célula-biomaterial. De esta manera, resulta relevante estudiar cómo la incorporación de distintas concentraciones de BG puede influir en diversos aspectos de la respuesta biológica de hGMSC con un biomaterial polimérico compuesto. Así, abordar esta brecha se vuelve esencial para optimizar el desarrollo de biomateriales que aseguren una interacción efectiva y funcional con el entorno biológico. A partir de esto, surge la pregunta ¿Cómo influye la variación de concentración de biovidrio en la biocompatibilidad de un biomaterial compuesto de PCL y biovidrio?

Hipótesis

La biocompatibilidad de un biomaterial compuesto de PCL mejora con la adición de una concentración óptima de biovidrio.

Objetivo general

Evaluar la biocompatibilidad de biomateriales compuestos de PCL en función de distintas concentraciones de vidrio bioactivo (biovidrio), fabricados mediante DIW.

Objetivos específicos

- Fabricar y caracterizar química y estructuralmente biomateriales compuestos de PCL-BG.
- Desarrollar una metodología eficiente para el proceso de adhesión celular en biomateriales compuestos de PCL-BG.
- Evaluar viabilidad y proliferación celular de hGMSC durante la interacción *in vitro* con biomateriales compuestos de PCL-BG.
- Analizar distribución, cambios morfológicos y proliferación de hGMSC tras la adhesión celular en biomateriales compuestos de PCL-BG.

METODOLOGÍA

1. FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL BIOMATERIAL

1.1. Fabricación del biomaterial compuesto de PCL con distintas concentraciones de BG.

El biomaterial compuesto para el análisis biológico combina un biopolímero y vidrio bioactivo, como modelo para promover la regeneración ósea. Los materiales utilizados fueron policaprolactona (PCL, peso molecular 45.000 g/mol, Sigma Aldrich) y biovidrio (BG) sintetizado de acuerdo a lo reportado en (Sugumaran et al., 2022). Para homogeneizar la solución, se utilizó acetona (ACE) (99,5%, grado analítico, VWR Chemicals BDH®) como solvente, debido a que se considera como uno de los solventes menos tóxicos en la industria. El proceso de homogenización se llevó a cabo en un agitador magnético a una temperatura de 50°C por 30 minutos.

Se mezclaron los biomateriales en cuatro grupos (Tabla 2): PCL, compuestos por 0% biovidrio (control, sin ACE); PCL/10BG, con 10% biovidrio (grupo experimental, con ACE); PCL/20BG, con 20% biovidrio (grupo experimental, con ACE) y PCL/ACE, con 0% biovidrio, utilizando acetona para mantener las mismas condiciones con los grupos experimentales (control). La mezcla de los materiales compuestos con acetona se dejó secar por 24 horas.

Tabla 2. Condiciones de fabricación de biomateriales compuestos de PCL y BG.

Condición	Porcentaje de PCL (%p/p)	Porcentaje de BG (%p/p)
PCL	100%	0%
PCL/ACE	100%	0%
PCL/10BG	90%	10%
PCL/20BG	80%	20%

Las estructuras tridimensionales de biomateriales compuestos fueron diseñadas a partir del software Autodesk Inventor Professional. Estos, se caracterizan por tener un diseño circular sólido de diámetro 5 mm y una altura de 1,2 mm, con un desnivel al centro como forma de pocillo, con el objetivo de que sea posible sembrar células y realizar ensayos de biocompatibilidad (Figura 5), sin considerar el efecto estructural sobre las distintas propiedades.

Las estructuras de biomateriales compuestos de PCL y BG fueron fabricados a partir de tecnologías de impresión 3D, con un 3D-Biplotter system® (EnvisionTEC, Alemania), el cual se caracteriza por poseer un sistema neumático, es decir, que utiliza un controlador de presión de aire para extruir el material. De esta manera, se fabricaron las estructuras de los 4 grupos de materiales preparados, con una temperatura de extrusión de 110°C (Vallejos et al., 2021).

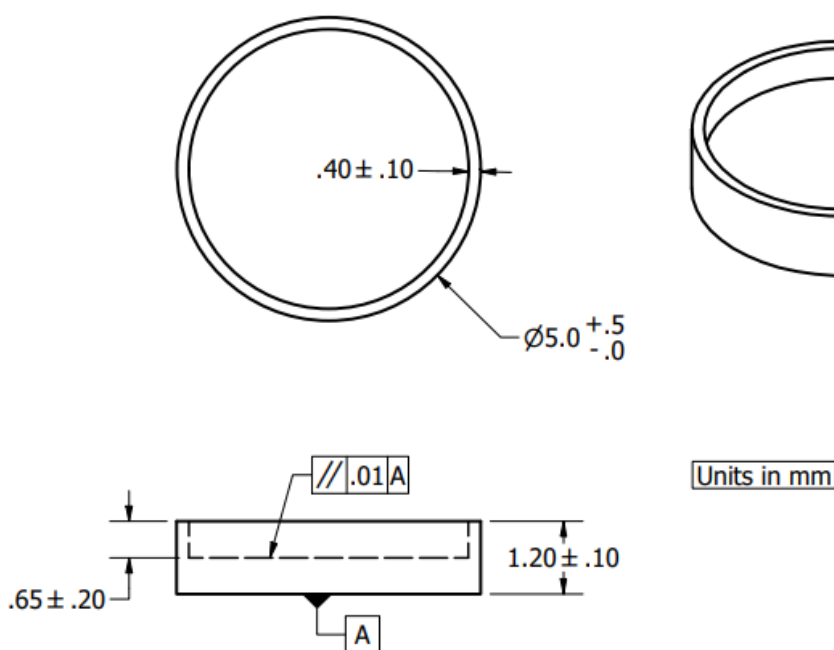


Figura 5. Dimensiones de la estructura de biomaterial en formato.

Modelo en formato .DWG, mediante Autodesk Inventor Professional.

1.2. Caracterización del biomaterial

Con el objetivo de caracterizar las propiedades físico-químicas y estructurales de los biomateriales de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, se llevaron a cabo distintos análisis enfocados en describir composición elemental, estructural y morfología. Esta última se evaluó tanto analizar la distribución de los componentes dentro del biomaterial compuesto, y analizar la superficie útil para cultivo celular en las estructuras impresas, como se describe en la Figura 6.

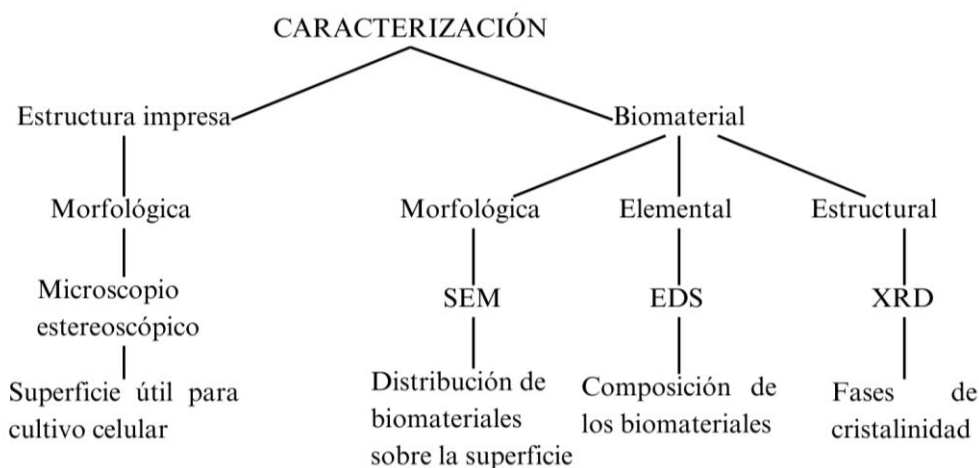


Figura 6. Esquema descriptivo de caracterización de los biomateriales de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG.

La caracterización del biomaterial consistió en tres principales análisis, los cuales se basaron en una caracterización morfológica mediante SEM, para evaluar la distribución de los biomateriales sobre la superficie; una caracterización elemental con EDS para analizar la composición de los biomateriales y una caracterización estructural mediante XRD, para analizar las fases de cristalinidad de los biomateriales compuestos. Por otro lado, se analizó la morfología de las estructuras impresas mediante imágenes tomadas con un microscopio estereoscópico, para evaluar la superficie útil disponible para cultivo celular en las estructuras.

1.2.1. Caracterización morfológica y elemental del biomaterial por SEM y EDS

Se realizó una caracterización morfológica y elemental de los biomateriales mediante SEM y EDS respectivamente. Dos réplicas por condición fueron seleccionadas y se fijaron a un portaobjetos

de aluminio, recubriéndose por pulverización catódica con una capa de carbono de 10 nm (Safematic CCU-010, Suiza).

Las imágenes SEM se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 650 FEG 230, EE.UU.) en modo de alto vacío, y se analizó la distribución del BG en la superficie de cada réplica para cada condición. Para la obtención de imágenes se utilizaron electrones retrodispersados. Adicionalmente, se realizó un análisis químico con un espectroscopio de dispersión de energía de rayos X (EDS, EDX detector Oxford X-Max SDD) para verificar la presencia de los principales elementos de la superficie recubierta en la muestra impresa (Vallejos et al., 2021).

1.2.2. Análisis de cristalinidad por difracción de rayos X (XRD)

Se estudiaron los patrones de difracción de rayos X (XRD) de los biomateriales de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG. Para el análisis de rayos X se utilizaron muestras en polvo. Los patrones de XRD se obtuvieron con un Panalytical X'Pert Pro (Países Bajos), radiación $\text{CuK}\alpha$, equipado con un monocromador de 15 a 60 $2\theta^\circ$, como se reporta en (Vallejos et al., 2021).

1.3. Caracterización morfológica de la estructura impresa

Para evaluar la calidad de impresión y el área de la superficie, se seleccionaron 10 muestras por cada condición de biomaterial (PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG), y se capturaron imágenes con un microscopio estereoscópico (Leica EZ4 HD, Leica Microsystems, Alemania). A partir de las imágenes, se procedió a cuantificar el área de la superficie de cultivo mediante el software ImageJ (versión 1.52a, incluido con Java 1.8.0_112, National Institutes of Health, USA).

2. CULTIVO CELULAR DE hGMSC PARA ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Se utilizaron células madre mesenquimales humanas gingivales (hGMSC) previamente caracterizadas y preservadas en un congelador a -80°C , en el Centro de Bioingeniería de la Universidad Adolfo Ibáñez. Estas células se obtuvieron previamente a partir de biopsias del tejido

gingival de pacientes sanos, quienes cuentan con un consentimiento informado firmado, aprobado por el comité de bioética de la universidad (Benjumeda Wijnhoven et al., 2020). Para el cultivo celular, se utilizó Medio Eagle Modificado de Dulbecco (GIBCO, Life Technologies) suplementado con 10% suero de bovino fetal (Bovogen Biologicals), 1% de penicilina/estreptomicina (GIBCO, Life Technologies) y 0,1% de Fungizona (GIBCO, Life Technologies), denominado a partir de ahora denominado como medio de cultivo o DMEM completo. Los experimentos se realizaron con hGMSC de pasajes entre 6 y 10, los cuales alcanzaron una confluencia de 80%. Adicionalmente, el cultivo se mantuvo en una incubadora (Incubadora de CO₂, SHEL LAB, Estados Unidos) con condiciones ambientales de 37°C y 5%CO₂.

3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS PARA SEMBRADO EN BIOMATERIALES

Los pasos previos al sembrado de células en el biomaterial consistieron en la tripsinización de las células de una placa con 80% de confluencia, siguiendo el manual de protocolos propio del grupo de investigación. Para células cultivadas en Frascos T75, se extrajo el medio de cultivo y se lavó 2 veces con 5 mL de solución salina tamponada con fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS 1X) (Santa Cruz Biotechnology). Se agregaron 2 mL de tripsina/EDTA 0,05% (Genesee Scientific) cubriendo el monocapa celular y se llevó a la incubadora a 37°C por 5 minutos. Al observar las células desprendidas y con un cambio de morfología de alargadas a circulares, se agregaron 8 mL de medio de cultivo (razón tripsina-medio 1:4) y se traspasó la solución a un tubo falcon. Se realizó conteo celular mediante el contador automático Luna-II (Logos Biosystems), con azul de tripán (GIBCO). Se centrifugó la solución con células a 1500 RPM por 5 minutos para obtener un pellet con las células, y según la cuantificación celular, se diluyeron en la concentración deseada para cada análisis.

4. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA EL PROCESO DE ADHESIÓN CELULAR

4.1. Tratamiento superficial en biomateriales compuestos de PCL y BG

Para evaluar una metodología para que el proceso de adhesión celular sea eficiente en los biomateriales compuestos de PCL y BG, se llevó a cabo un tratamiento superficial en las muestras.

En este tratamiento, se utilizó acetona (99,5%, grado analítico, Vimaroni) como solvente para tratar la superficie de los biomateriales. Los biomateriales se agitaron en 50 mL de acetona por 2 horas en un agitador magnético.

Se sembraron 50.000 hGMSC de pasaje 12 diluido en 20 μ L de medio de cultivo por cada réplica (n=2). El análisis se realizó en biomateriales de PCL/10BG con y sin tratamiento de acetona, con el fin de evaluar la efectividad del tratamiento de acetona para el proceso de adhesión celular. La evaluación se realizó mediante un marcaje de fluorescencia nuclear con Hoechst (1:1000) (Life Technologies) y de filamentos de actina del citoesqueleto con Faloidina (1:1000) (Sigma Aldrich) y para analizarse mediante microscopía confocal y de epi-fluorescencia. Adicionalmente, se agregaron controles positivos de células en placa, y controles negativos del biomaterial sin células, para evaluar autofluorescencia.

Tras 24 horas del sembrado se procedió a fijar las muestras con células con paraformaldehído 4% (Electron Microscopy Sciences) por 20 minutos a temperatura ambiente.

Tras 3 lavados con PBS 1X, se procedió a marcar los filamentos de actina del citoesqueleto con Faloidina (1:1000, Sigma Aldrich), diluido en PBS 1X con BSA1% (Santa Cruz) + tritón 0,2% (AppliChem), y se incubó por 2 horas en una cámara húmeda en la oscuridad. Los biomateriales con células se lavaron con PBS 1X, y se realizó tinción nuclear con Hoechst (1:1000, Life Technologies) por 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Tras 3 lavados adicionales con PBS 1X, los biomateriales se observaron con un microscopio de epi-fluorescencia (Olympus IX-81, Universidad Adolfo Ibáñez) y confocal (Nikon C1 Plus, Universidad de Valparaíso). La longitud de onda de excitación/emisión con la que se observaron las muestras en el microscopio de epi-fluorescencia 350 ± 25 460 ± 25 nm y 545 ± 15 620 ± 30 nm para Hoechst y Faloidina respectivamente, mientras que para el microscopio confocal se utilizaron filtros de 403 y 543 nm respectivamente. Las imágenes capturadas fueron procesadas mediante software ImageJ (versión 1.51j8, National Institutes of Health, USA).

La estrategia que explica por qué se utilizaron microscopios de epi-fluorescencia y confocal para el análisis, se explica en virtud de que la microscopía confocal se considera un estándar alto de calidad y resolución para la obtención de imágenes de fluorescencia, en comparación a la microscopía de epi-fluorescencia. Sin embargo, la obtención de estas imágenes requiere mucho tiempo y su acceso es más limitado (Honzel et al., 2024). De esta manera, se utilizó el microscopio de epi-fluorescencia Olympus IX-81 para obtener las primeras impresiones visuales de los

experimentos y la obtención de imágenes destinadas a cuantificación y en algunos casos, imagen representativa de los resultados. Sin embargo, en casos donde la calidad de la imagen se encontró comprometida dado un aumento de luz en el fondo y desenfoque, se utilizó la microscopía confocal para capturar imágenes representativas de los resultados obtenidos.

A partir de ahora, todos los biomateriales compuestos de condiciones PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, fueron sometidos a tratamientos superficiales con acetona para análisis de biocompatibilidad.

4.2. Definición de densidad celular para sembrado en biomateriales compuestos de PCL y BG.

Con el objetivo de definir una densidad celular eficiente para sembrar en los biomateriales compuestos de PCL y BG, que permitan analizar la biocompatibilidad de biomateriales de PCL y BG, se realizó un ensayo en el cual se sembraron 10.000 y 20.000 hGMSC a 1, 7 y 14 días, sobre réplicas de biomateriales compuestos de la condición PCL/10BG (n=3). La evaluación se realizó a partir del marcaje nuclear Hoechst y de filamentos de actina con Faloidina para analizar la adhesión y proliferación celular, mediante microscopía de epi-fluorescencia. Adicionalmente, se agregaron controles positivos de células en placa, y controles negativos sin células, para evaluar para autofluorescencia del biomaterial.

En los tiempos correspondientes, los biomateriales con células siguieron la metodología de fijación y marcaje con Faloidina y Hoechst, descrita en el inciso 4.1.

Las condiciones con distinta densidad de hGMSC sembradas a distintos tiempos, se observaron con un microscopio de epi-fluorescencia a las longitudes de onda descritas previamente. Las imágenes capturadas fueron procesadas mediante software ImageJ (versión 1.51j8, National Institutes of Health, USA).

5. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Para evaluar la biocompatibilidad de los biomateriales de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PC/20BG, se analizó la viabilidad, citotoxicidad, proliferación y proceso de adhesión celular mediante distintas técnicas, las cuales se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Técnicas para evaluar distintos parámetros de biocompatibilidad.

Parámetro	Técnica	Evaluación
Viabilidad	MTS - Colorimetría	Metabolismo celular
Citotoxicidad	Marcaje de fluorescencia	Identificación de células vivas y muertas
Proliferación celular	Marcaje de fluorescencia	Identificación de células en proceso de proliferación
Adhesión celular	Marcaje de fluorescencia	Cambios morfológicos

5.1.EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

5.1.1. Análisis de actividad metabólica

Para evaluar la viabilidad celular, se sembraron 20.000 hGMSC de pasaje 7 diluido en 20 uL de DMEM completo por cada réplica, sobre triplicados para cada condición (PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG) a 4 tiempos distintos: 1, 3, 7 y 14 días (Vallejos et al., 2021). Cada réplica para cada condición se mantuvo en un pocillo distinto en una placa de 48 pocillos. Cumplido el tiempo de 3 horas de incubación, se agregó medio de cultivo hasta cubrir todos los pocillos con biomateriales y controles, y se cambió medio de cultivo cada 3-4 días.

A partir del análisis de viabilidad mediante la actividad mitocondrial con el kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell proliferation Assay (MTS, Promega), fue posible evaluar la adhesión celular a 1 día del sembrado, y los cambios en la actividad celular a través del tiempo, analizándose a los 3, 7 y 14 días. Como control positivo, se sembró la misma cantidad de hGMSC en 3 pocillos por tiempo, mientras que, como control negativo, se mantuvieron pocillos con y sin biomaterial para cada tiempo, con medio de cultivo sin células.

En los tiempos correspondientes, grupos experimentales y controles se lavaron con PBS 1X. Los biomateriales se trasladaron a una placa de 48 pocillos nueva, manteniendo cada réplica en un pocillo distinto. Se agregó 500 uL de DMEM-completo, seguido por 100 µl de MTS en cada pocillo con las muestras experimentales y controles. Las muestras se incubaron por 2 horas a 37 °C en oscuridad. Finalmente, para medir absorbancia, se utilizaron 200 µl de cada sobrenadante, por duplicado, para realizar la medición de densidad óptica a 490 nm en una placa de lectura.

Los controles negativos de biomaterial y medio de cultivo se utilizaron debido a la existencia de una absorbancia espontánea en el medio de cultivo incubado con el reactivo MTS. De esta manera, se eliminó la interferencia de los resultados para obtener la absorbancia generada solo por la actividad celular a partir de la siguiente fórmula:

$$Absorbancia = \frac{Absorbancia\ con\ células\ (C)}{Absorbancia\ control\ negativo\ sin\ células\ (C)}$$

Donde (C) hace referencia a la condición experimental Control +, PCL, PCL/ACE, PCL/10BG o PCL/20BG.

Una vez eliminada la interferencia en los resultados, a partir de la diferencia de superficie disponible entre los biomateriales de las diferentes condiciones experimentales, los resultados de las condiciones PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG se normalizaron por el área de la superficie de cultivo de la condición PCL, para analizar los resultados en base a la misma superficie de biomaterial.

Los resultados al día 1 del sembrado se expresaron como porcentaje de eficiencia de adhesión celular para las condiciones de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, siguiendo la metodología publicada en (Vallejos et al., 2021), con respecto al control positivo (Control +). Por otro lado, los resultados a los días 3, 7 y 14 se expresaron como el promedio de la densidad óptica para las condiciones PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG.

5.1.2. Citotoxicidad

El análisis de citotoxicidad permite evaluar la viabilidad en función de la integridad de la membrana plasmática y de la actividad esterasa presente en el citoplasma celular. Para medir la

citotoxicidad del material, se realizaron ensayos con Calceína AM (Santa Cruz) y Homodímero de Etidio – 1 (EthD-1) (ThermoFisher), los cuales permiten marcar el citoplasma de células vivas de color verde, y el núcleo de células muertas de color rojo respectivamente. Adicionalmente, se agregó el marcador Hoechst, para tener una mejor visualización de los núcleos de las células totales (Parekh et al., 2021).

La calceína AM es un compuesto liposoluble no fluorescente, que cruza pasivamente la membrana de las células vivas. La actividad esterasa de las células vivas hidroliza la calceína AM, removiendo los grupos acetoximetil (AM), lo cual se convierte en calceína, que es una molécula altamente fluorescente, la cual marca de color verde el citoplasma. De esta manera, marca solo el citoplasma de células vivas (Invitrogen Molecular Probes, 2005). Por otro lado, el Homodímero de etidio – 1 es una molécula fluorescente, que aumenta su fluorescencia 40 veces al unirse a los ácidos nucleicos. Sin embargo, solo marca las células muertas debido a que ingresa a las células con membranas dañadas debido a su carga y tamaño. Así, marca de color rojo los núcleos de las células muertas o células con la membrana plasmática comprometida (Invitrogen Molecular Probes, 2005). Finalmente, Hoechst es una molécula permeable, con alta afinidad por las zonas ricas en adenina y timina en las cadenas del DNA, por lo que, al unirse a los nucleótidos, su fluorescencia aumenta hasta 30 veces.

Definición de concentraciones Calceína AM y Homodímero de Etidio – 1

Para definir las concentraciones de los reactivos para tener una visualización efectiva de las células vivas y muertas, se procedió a realizar 3 experimentos consecutivos de estandarización de técnica, en los cuales se modificaron las concentraciones de Calceína AM y Homodímero de Etidio – 1 (Tabla 4). En estos experimentos, se prepararon 3 grupos de células en distintas condiciones de viabilidad celular: Vivas, Vivas/Muertas y Muertas.

El grupo de células “Vivas” se definió como los grupos de células sembradas, sin someterse a procedimientos para muerte celular. Para la muerte celular del grupo “Vivas/Muertas”, se agregó metanol (Merck) al 70% por 10 minutos sobre los grupos correspondientes. Para la muerte celular del grupo “Muertas”, se agregó metanol (Merck) al 70% por 30 minutos sobre los grupos correspondientes con células muertas, de acuerdo con lo indicado en el protocolo *LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells** (Molecular Probes).

Para cada experimento, tras la preparación de células bajo las condiciones de viabilidad células (vivas, vivas/muertas y muertas), se lavaron todos los grupos con PBS 1X y se agregaron soluciones con Calceína AM, Homodímero de Etidio – 1 y Hoechst a la concentración establecida. Tras una incubación de 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, se observaron las muestras en un microscopio de epi-fluorescencia (Olympus IX-81, Universidad Adolfo Ibáñez). La longitud de onda de excitación/emisión con la que se observaron las muestras en el microscopio de epi-fluorescencia 350 ± 25 460 ± 25 nm, 545 ± 15 620 ± 30 nm y 500 ± 10 535 ± 15 para Hoechst, Homodímero de etidio – 1 y Calceína AM respectivamente.

Tabla 4. Resumen de experimentos y condiciones experimentales del proceso de estandarización de la concentración de reactivos para análisis de viabilidad/citotoxicidad.

La última columna indica los reactivos utilizados para cada condición y sus concentraciones. “C” hace referencia a Calceína AM, “E” hace referencia a Homodímero de Etidio – 1 y “H” hace referencia a Hoechst. N/A en el sembrado de hGMSC indica que no se sembraron células, por lo que se utilizó como control negativo de autofluorescencia. (*) (Parekh et al., 2021), (**) (Rosales-Ibáñez et al., 2021).

Experimento	Material	hGMSC sembradas	Condición celular	Réplicas por tiempo	Marcaje
1 (*)	Vidrio	20.000	Vivas	2	C (2 μ M)
	Vidrio	20.000	Muertas	2	E (4 μ M)
	Vidrio	20.000	Vivas	2	C y E (2 y 4 μ M)
2 (**)	Vidrio	20.000	Vivas	2	C (0.5 μ M)
	Vidrio	20.000	Vivas	2	E (2 μ M)
	Vidrio	20.000	Vivas	2	C y E (0.5 y 2 μ M)
	Vidrio	20.000	Muertas	2	C (0.5 μ M)
	Vidrio	20.000	Muertas	2	E (2 μ M)
	Vidrio	20.000	Muertas	2	C y E (0.5 y 2 μ M)
	Vidrio	20.000	Vivas/Muertas	2	C (0.5 μ M)
	Vidrio	20.000	Vivas/Muertas	2	E (2 μ M)
	Vidrio	20.000	Vivas/Muertas	2	C y E (0.5 y 2 μ M)
	Vidrio	20.000	Vivas	2	C, E y H (0.5 μ M, 2 μ M y 1:1000)
	Vidrio	20.000	Vivas	2	H (1:1000)
	Vidrio	20.000	Vivas	2	C y H (0.5 μ M y 1:1000)
3	Placa	20.000	Vivas	2	C, E y H (0.5 μ M, 3 μ M y 1:1000)
	PCL/10BG	20.000	Vivas	2	C, E y H (0.5 μ M, 3 μ M y 1:1000)
	PCL/10BG	20.000	Vivas	2	C, E y H (0.5 μ M, 3 μ M y 1:1000)
	PCL/10BG	N/A	N/A	1	C, E y H (0.5 μ M, 3 μ M y 1:1000)

Evaluación de citotoxicidad

Una vez definidas las concentraciones a utilizar de cada reactivo, se sembraron 20.000 hGMSC sobre triplicados de los biomateriales para las condiciones PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20GB a 2 tiempos: 1 y 5 días, tiempos definidos de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad MTS en combinación a lo reportado en (Anselmi et al., 2024).

Como control de un cultivo de células vivas y muertas, se sembraron 20.000 hGMSC en 3 pocillos para cada condición. Adicionalmente, se agregaron controles positivos para de células muertas para las condiciones PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20GB y controles negativos para evaluar autofluorescencia.

En los tiempos correspondientes, se prepararon los grupos de células muertas siguiendo la metodología descrita en el inciso 5.2.1. Una vez preparadas las muestras, se agregó a todos los grupos una solución de Calceína AM (0,5 μ M), Homodímero de etidio – 1 (3 μ M) y Hoechst (1:1000), diluido en PBS 1X hasta cubrir los biomateriales y pocillos. Luego de incubarse a temperatura ambiente por 30 minutos, se procedió a lavar una vez las células con PBS 1X y se agregó medio de montaje (DAKO). Las muestras se observaron en un microscopio de epi-fluorescencia (Olympus IX-81, Universidad Adolfo Ibáñez) y confocal (Nikon C1 Plus, Universidad de Valparaíso). La longitud de onda de excitación/emisión con la que se observaron las muestras en el microscopio de epi-fluorescencia se reportaron previamente en la sección 5.2.1. Las imágenes capturadas fueron procesadas mediante software ImageJ (versión 1.51j8, National Institutes of Health, USA).

Para la cuantificación de citotoxicidad y viabilidad celular, se tomaron imágenes de 4 campos distintos por cada réplica para cada condición. Sin embargo, el análisis se realizó seleccionando 8 imágenes, considerando la calidad de imagen que permitiera identificar las células vivas y muertas.

La citotoxicidad (muerte celular) se midió basándose en la siguiente fórmula:

$$Muerte\ Celular\ (\%) = \frac{M \cdot 100}{M + V}$$

Donde M es el número de células muertas, cuantificado por la cantidad de núcleos marcados de color rojo. V, es el número de células vivas, definido por el número de células marcadas con

citoplasma verde, sin marcarse el núcleo rojo. M + V es la suma de número de células muertas y vivas, considerándose como el total de células.

Sin embargo, al visualizarse alta confluencia en controles positivos, o aglomeraciones de células en biomateriales, lo cual dificultó la identificación de límites entre las células vivas y, por lo tanto, su cuantificación, la fórmula para cuantificar la muerte celular se modificó de la siguiente manera (Parekh et al., 2021):

$$\text{Muerte Celular (\%)} = \frac{M \cdot 100}{T}$$

Donde M es el número de células muertas, cuantificado por la cantidad de núcleos marcados de color rojo. T, es el número de total de células, determinado por la cantidad de núcleos marcados con Hoechst.

Adicionalmente, a partir de la cuantificación de las células muertas (M) y totales (T), se procedió a calcular el porcentaje de viabilidad celular de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{(T - M) \cdot 100}{T}$$

Donde T – M representaría el número total de células vivas en cada campo.

5.2. PROLIFERACIÓN CELULAR DE HGMSC SOBRE BIOMATERIALES DE PCL Y PCL/10BG

Para analizar la proliferación celular, se realizó un marcaje de fluorescencia e inmunofluorescencia con Faloidina, Hoechst y el marcador de proliferación celular Ki67 (Benjumeda Wijnhoven et al., 2020), para analizarse mediante microscopía de epi-fluorescencia y confocal.

Dentro de los marcadores mencionados, el marcador de proliferación, permite identificar las células que están en las etapas G1, S, G2 y Mitosis del ciclo celular, mediante la expresión de la proteína Ki67, la cual no se expresa en las etapas de reposo (Sun & Kaufman, 2018).

Se sembraron 20.000 hGMSC en 20 uL de DMEM completo por cada réplica, sobre triplicados para cada condición en una placa de 24 pocillos, a 2 tiempos distintos: 7 y 14 días, tiempos determinados a partir de los resultados observados en el análisis de viabilidad celular. Adicionalmente, se agregaron los respectivos controles positivos y negativos para cada condición (Tabla 5). Cumplido el tiempo de 3 horas de incubación, se agregó medio de cultivo hasta cubrir todos los pocillos con biomateriales y controles y se cambió medio de cultivo cada 3-4 días.

Tabla 5. Condiciones experimentales y controles evaluados a 7 y 14 días del sembrado de hGMSC.

Condición	Sembrado	Réplicas por tiempo	Marcadores
Control +	20.000 hGMSC	3	Faloidina – Hoechst – Ki67 (1° y 2° AB)
PCL	20.000 hGMSC	3	Faloidina – Hoechst – Ki67 (1° y 2° AB)
PCL/10BG	20.000 hGMSC	3	Faloidina – Hoechst – Ki67 (1° y 2° AB)
Control +	20.000 hGMSC	1	Faloidina – Hoechst – Ki67 (2° AB)
PCL	20.000 hGMSC	1	Faloidina – Hoechst – Ki67 (2° AB)
PCL/10BG	20.000 hGMSC	1	Faloidina – Hoechst – Ki67 (2° AB)
PCL	N/A	1	Faloidina – Hoechst – Ki67 (1° y 2° AB)
PCL/10BG	N/A	1	Faloidina – Hoechst – Ki67 (1° y 2° AB)
PCL	N/A	1	Faloidina – Hoechst – Ki67 (2° AB)
PCL/10BG	N/A	1	Faloidina – Hoechst – Ki67 (2° AB)

En los tiempos correspondientes, los biomateriales con células y controles se lavaron dos veces con PBS 1X, y se procedió a fijarlos, siguiendo el protocolo descrito en el inciso 4.1.

Luego de 3 lavados con PBS 1X, se procedió a marcar los filamentos de actina del citoesqueleto con Faloidina (1:1000, Sigma Aldrich), junto con la proteína Ki67 con el primer anticuerpo (AB) *Ki67 Antigen - Monoclonal Mouse - Anti-Human* (1:100, DAKO) diluido en PBS 1X con BSA1% + tritón 0,2%, y se incubó *over night* en una cámara húmeda en oscuridad. Los biomateriales con células se lavaron con PBS 1X 3 veces, y se agregó el segundo anticuerpo Alexa 488 (1:200, AbCam), en PBS 1X y BSA1%. Luego de incubarse 2 horas en la oscuridad, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se realizó el marcaje nuclear con Hoechst (1:1000, Life Technologies) por 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Los biomateriales y células se lavaron 3 veces con PBS 1X, y se observaron con un microscopio de epi-fluorescencia confocal explicados anteriormente. La longitud de excitación/emisión utilizada para el marcaje de la proteína Ki67 fue de 485/519 nm . Las imágenes capturadas fueron procesadas mediante software ImageJ (versión 1.51j8, National Institutes of Health, USA).

Para la cuantificación de proliferación celular, se capturaron imágenes de 4 campos distintos por cada réplica para cada condición de biomateriales (n=12), y seleccionaron un total de 10 imágenes por cada condición según la calidad de estas. Se determinó la cantidad total de células por cada campo a partir de la cuantificación de núcleos marcados con Hoechst. Luego, la cantidad de células que se encontraban en proceso proliferación celular se determinó a partir de la cuantificación de los núcleos que expresaban la proteína Ki67. A partir de estos valores, se calculó el porcentaje de células en proceso de proliferación con relación al total de células, siguiendo la siguiente fórmula:

$$Proliferación\ celular\ [\%] = \frac{Núcleos\ con\ expresión\ de\ proteína\ Ki67}{Total\ de\ núcleos} \times 100$$

5.3.CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE hGMSC SOBRE BIOMATERIALES DE PCL Y PCL/10BG

Para analizar los cambios morfológicos de hGMSC al interactuar con biomateriales compuestos de PCL y BG, se realizó un marcaje de fluorescencia en tiempos cortos para analizarse mediante microscopía de epi-fluorescencia y confocal. Los marcadores utilizados fueron Faloidina y Hoechst, para la visualización de los filamentos de actina del citoesqueleto y los núcleos de las células respectivamente.

Se sembraron 10.000 hGMSC en 20 uL de DMEM completo por cada réplica para las condiciones PCL y PCL/10BG (n=3) en una placa de 24 pocillos, a 3 tiempos distintos: 1, 5 y 24 horas, de acuerdo con la metodología reportada en (Kotobuki et al., 2005b). Como control positivo se sembraron 10.000 hGMSC en 3 pocillos, manteniendo las mismas condiciones. Adicionalmente, se agregaron controles negativos de autofluorescencia, resumiéndose todas las condiciones en la Tabla 6.

En los tiempos correspondientes, los biomateriales y controles se fijaron y se marcaron con Faloidina y Hoechst, siguiendo el protocolo descrito previamente en el inciso 4.1.

Las células sembradas en las distintas condiciones de observaron con un microscopio de epi-fluorescencia y confocal explicados anteriormente. Las imágenes fueron procesadas mediante software ImageJ (versión 1.51j8, National Institutes of Health, USA).

Tabla 6. Condiciones experimentales y controles evaluados a 3 tiempos: 1, 5 y 24 horas.

Condición	Sembrado	Réplicas por tiempo	Marcadores
Control +	10.000 hGMSC	3	Faloidina - Hoechst
PCL	10.000 hGMSC	3	Faloidina - Hoechst
PCL/10BG	10.000 hGMSC	3	Faloidina - Hoechst
Control – PCL	N/A	1	Faloidina - Hoechst
Control – PCL/10BG	N/A	1	Faloidina - Hoechst

Para el estudio de la morfología celular durante el proceso de adhesión al biomaterial, evaluaron 4 descriptores de morfología reportados previamente en (Uynuk-Ool et al., 2017), que analizan la forma y formación de protrusiones:

$$1. \text{Circularidad} = 4\pi \times \frac{[\text{Área}]}{[\text{Perímetro}]^2} (\text{Medido entre 0 y 1})$$

$$2. \text{AR} = \frac{[\text{Eje mayor}]}{[\text{Eje menor}]}$$

$$3. \text{Redondez} = 4 \times \frac{[\text{Área}]}{\pi \times [\text{Eje mayor}]^2} (\text{Medido entre 0 y 1})$$

$$4. \text{Solidez} = \frac{[\text{Área}]}{[\text{Área convexa}]} (\text{Medido entre 0 y 1})$$

Uynuk-Ool et al., 2017 reporta que los valores de redondez y AR actúan de manera inversa, pues, un valor cercano a 1 en la redondez describirá una forma más redonda de las células, mientras que un AR más alto describirá una forma elíptica. Luego, la circularidad y solidez se utilizan mayormente para evaluar las protuberancias de la membrana, las cuales son relevantes para el proceso de adhesión celular. De esta manera, valores altos en estos descriptores indicarán menor cantidad de protuberancias (Figura 7).

								
Circularidad	1	0.8	0.6	0.4	0.1	0.25	0.5	1
AR	1	2	4	8	1	1	1	1
Redondez	1	0.5	2.5	0.1	0.85	0.9	0.95	1
Solidez	5	5	5	5	0.7	0.8	0.9	1

Figura 7. Rango de formas observadas en hGMSC para representar cambios morfológicos cuantificables.

Ejemplo de cómo afectan los cambios morfológicos en la forma y formación de protuberancias en los parámetros de Circularidad, AR, Redondez y Solidez. Figura de elaboración propia en base a (Uynuk-Ool et al., 2017).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los resultados que presentaron distribución normal pero no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianzas entre grupos, se realizó un ANOVA de Welch y una prueba de diferencias significativas con el ensayo Games-Howell (Welch, 1951), (Liu, 2015).

Para los resultados que no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con un análisis de diferencias significativas con la prueba de Dunn (Ostertagová et al., 2014)(Mckight2010, n.d.).

Para todos los casos, se estableció una significancia estadística con $p\ value = 0.05$. La normalidad se verificó mediante un análisis q-q Plot, mientras que la igualdad de varianzas se verificó mediante la prueba de Lavene (Loy et al., 2016).

RESULTADOS

1. Caracterización química y elemental de biomateriales compuesto de PCL-BG.

Las propiedades de los materiales están relacionadas con sus características microestructurales internas, lo cual implica la cristalografía, morfología y composición química. Estas propiedades ejercen una gran influencia sobre su interacción con las células y rendimiento in vivo en aplicaciones biomédicas (Sampath Kumar, 2013). Con el objetivo de analizar la distribución y composición de los materiales, se realizó una caracterización morfológica y elemental de los biomateriales mediante imágenes SEM y EDS respectivamente. Adicionalmente, se realizó un análisis cristalográfico mediante un XRD para identificar las fases presentes en la estructura del material.

Los biomateriales de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG se prepararon mezclando con agitador magnético las partículas de PCL y BG, con acetona como disolvente. Se analizó la distribución y composición de los biomateriales de las muestras de cada condición.

Los espectros EDS de una región de interés para las condiciones PCL y PCL/ACE, confirmaron la presencia de los elementos que componen PCL – C, O (Figura 8 A, B, C, D). Adicionalmente, conociendo la composición de los biomateriales, las imágenes SEM confirman la ausencia de BG en cada muestra, demostrando homogeneidad de PCL en el biomaterial (Figura 8 A, C). Por otro lado, los espectros EDS de dos regiones de interés para las condiciones PCL/10BG y PCL/20BG, confirmaron la presencia de elementos que componen PCL – C,O, y BG – Si, Ca, Na, P (Figura 8 E, F, G, H). Sin embargo, las imágenes SEM en los grupos PCL/10BG y PCL/20BG mostraron aglomeraciones de BG en la superficie, mostrando una distribución heterogénea sobre PCL (Figura 8 E, G).

Para complementar el análisis químico de los biomateriales, se realizó un análisis estructural de cristalinidad para cada condición mediante XRD. Los espectros XRD presentados en la Figura 9 indican que los biomateriales presentan estructuras cristalinas. Además, la presencia de BG en los biomateriales de PCL/10BG y PCL/20BG revela modificaciones en las fases de cristalinidad en comparación con biomateriales de PCL y PCL/ACE, identificándose las fases características de PCL y BG. Esto se observa debido a que los espectros de PCL y PCL/ACE muestran dos picos principales, que pertenecen a la misma fase cristalina. Por otro lado, los espectros de las condiciones PCL/10BG y PCL/20BG muestran los dos picos principales asociados a la fase característica de

PCL mencionada previamente, adicionando más picos principales los cuales pertenecen a las fases de cristalinidad entregadas por BG.

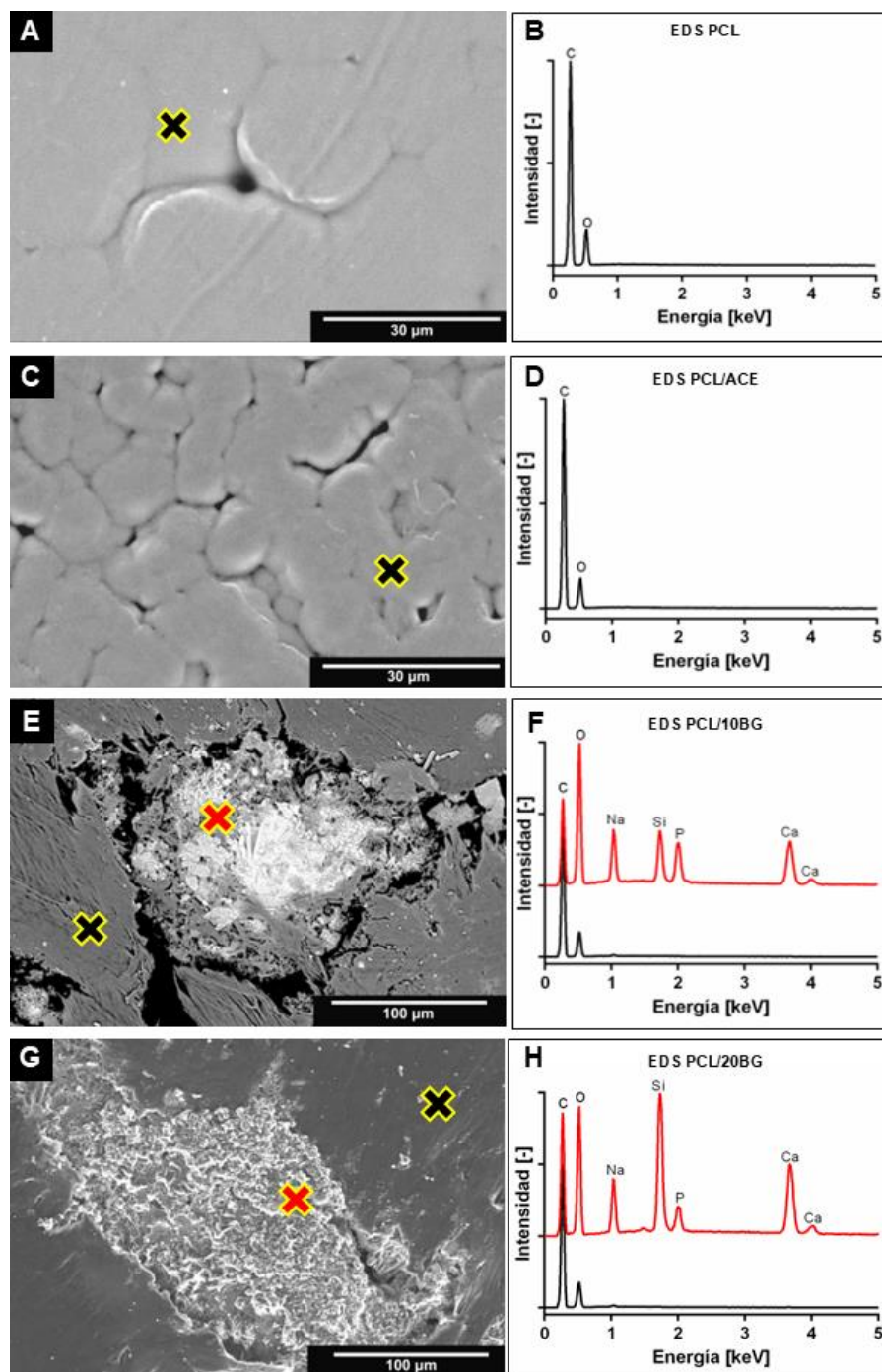


Figura 8. Distribución y análisis elemental de los compuestos de PCL y BG mediante SEM y EDS. (A, C, E, G) Imágenes SEM que permiten ver la morfología de los biomateriales de PCL y distintas concentraciones de BG, mostrando la distribución de ambos biomateriales en la superficie. (B, D, F, H)

Espectros EDS que permiten ver la composición elemental de zonas específicas de los biomateriales. (A) SEM que muestra un área de PCL. La cruz negra muestra una zona sin partículas de BG. Los espectros EDS correspondientes a PCL se muestran en negro (B). (C) SEM que muestra un área de PCL/ACE. La cruz negra muestra una zona sin partículas de BG. Los espectros EDS correspondientes a PCL se muestran en negro (D). (E) SEM que muestra un área de la condición PCL/10BG. La cruz negra muestra una zona sin partículas de BG y la cruz roja muestra una zona con partículas de BG. Los espectros EDS correspondientes a PCL Y PCL/ BG se muestran en negro y rojo respectivamente (F). (G) SEM que muestra un área de la condición PCL/20BG. La cruz negra muestra una zona sin partículas de BG y la cruz roja muestra una zona con partículas de BG. Los espectros EDS correspondientes a PCL y PCL/BG se muestran en negro y rojo respectivamente (H).

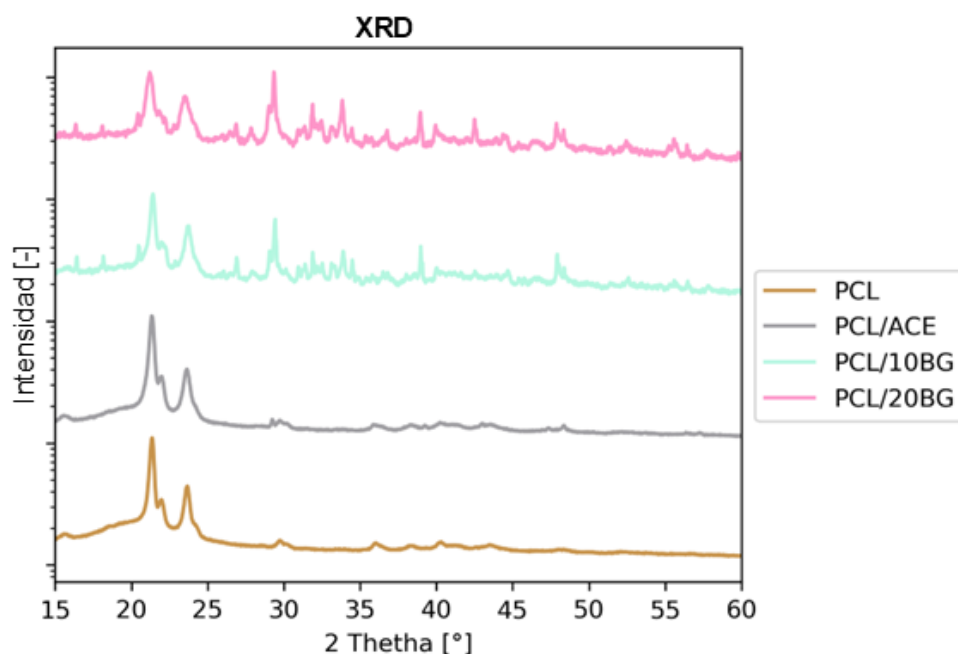


Figura 9. Propiedades cristalográficas del material compuesto de PCL y BG analizadas mediante XRD.

Espectros XRD de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG. Los picos en los espectros indican que los biomateriales presentan una estructura interna cristalina. Los espectros de color café y gris, de PCL y PCL/ACE respectivamente presentan dos picos característicos del PCL, mientras que la presencia de BG en los biomateriales de PCL/10BG y PCL/20BG, identificados en los espectros de color rosado y celeste respectivamente, presentan tanto picos característicos de PCL como de BG, presentando modificaciones en la cristalinidad.

En resumen, el análisis morfológico y elemental con SEM y EDS confirmó la presencia de los elementos que componen el PCL en los grupos de PCL y PCL/ACE, y que componen PCL y BG en los grupos de PCL/10BG y PCL/20BG, pudiendo distinguir aglomeraciones de BG en estas últimas. Por otro lado, el análisis XRD permitió identificar las fases cristalinas presentes en los biomateriales de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, demostrando los picos característicos de PCL en todas las condiciones, y picos característicos de BG en las muestras con 10 y 20% de BG. Estos resultados sientan las bases para entender las propiedades de los biomateriales que influyen en la interacción con las células, por lo que a continuación, se presenta un análisis de la superficie útil de los biomateriales para cultivo celular, para evaluar el área disponible de los biomateriales en los cuales se sembraron hGMSC para evaluar la biocompatibilidad.

2. Evaluación de la superficie útil de los biomateriales para cultivo celular.

Una vez obtenida la caracterización química y estructural de los biomateriales, tras la fabricación de muestras para cada condición experimental, se realizó una evaluación de la superficie útil de los biomateriales de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, con el fin de analizar si es que todas las muestras disponen de la misma área para sembrar hGMSC y evitar posibles fuentes de error para los experimentos de biocompatibilidad en los cuales superficie de cultivo disponible puede ser un factor que influye en los resultados.

Tras en análisis, se observaron diferencias estructurales físicas entre los distintos grupos, a pesar de que todas fueron fabricados en base al mismo diseño y parámetros de impresión 3D, identificándose irregularidades en grupos con BG. Con el fin de evaluar la superficie del biomaterial disponible para el cultivo celular, se tomaron imágenes de muestras de cada condición. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 10 A, donde se evidencian diferencias significativas en la superficie entre las condiciones evaluadas. En particular, los biomateriales de PCL mostraron una mayor superficie, seguidos por PCL/ACE, PCL/20BG y PCL/10BG.

A partir de estos resultados, se calculó el porcentaje de superficie de cultivo de las condiciones PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, en función de la condición PCL (Figura 10 B). Estos resultados fueron utilizados para normalizar datos en análisis biológicos según correspondiera. Luego, imágenes representativas de los biomateriales de las condiciones PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y

PCL/20BG se observan en la Figura 9 C, D, E, F respectivamente, mostrando las irregularidades en los biomateriales PCL/10BG y PCL/20BG (Figura 10 E, F).

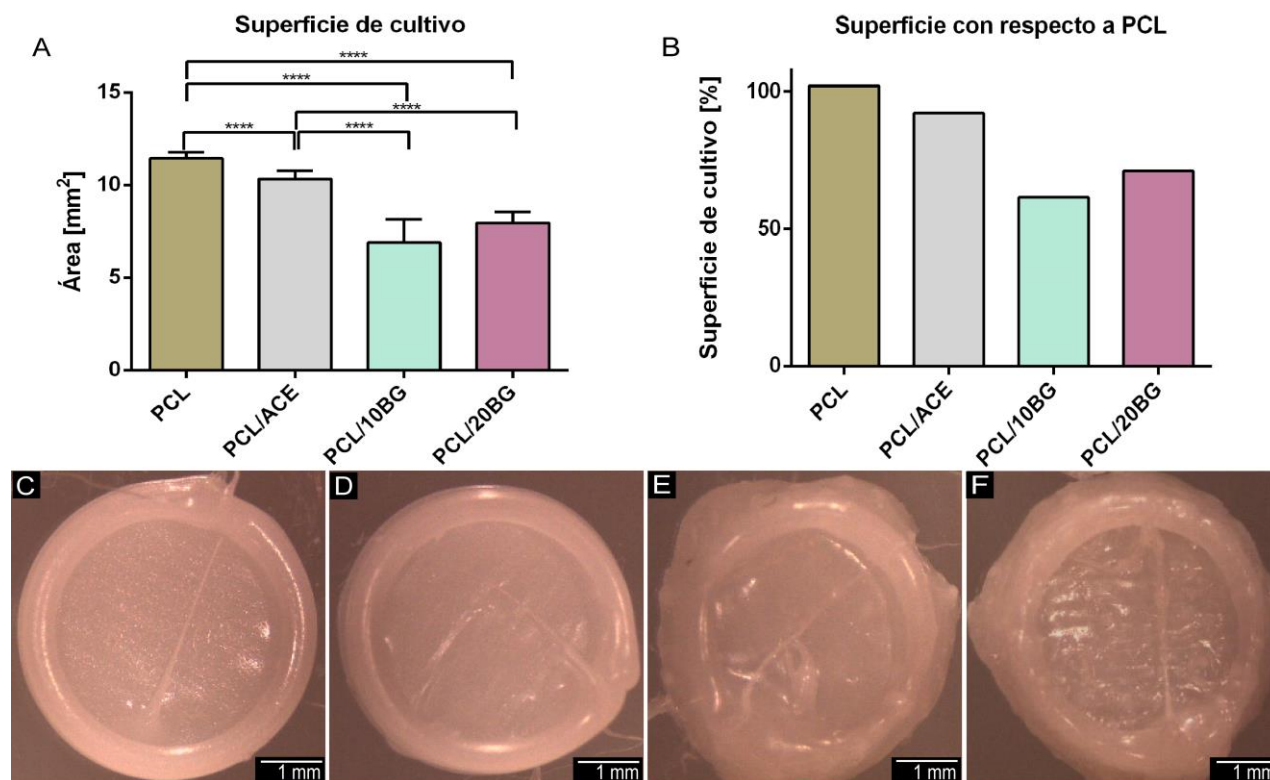


Figura 10. Análisis de la superficie de disponible para cultivo celular en biomateriales de PCL y distintas concentraciones de BG.

(A) Superficie de cultivo celular para condiciones de biomateriales con distinto porcentaje de biovidrio, n=10. (B) Superficie de cultivo celular de biomateriales PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG en relación con la superficie de biomateriales de PCL. En (A) las barras representan la media con la desviación estándar para todos los casos. Los corchetes representan la significancia estadística en una prueba de Games Howell después de un Anova de Welch (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$). (C, D, E y F) imágenes representativas de la superficie de cultivo de biomateriales de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG respectivamente.

En términos generales, el estudio de la superficie útil de los biomateriales para cultivo celular mostró diferencias en el área entre los grupos PCL, PCL/ACE, PCL10BG y PCL/20BG, donde las muestras de PCL puro presentaron mayor superficie útil para cultivo celular en comparación a las muestras con BG. Esto debe considerarse al momento de realizar ensayos de biocompatibilidad donde la superficie disponible para cultivo es relevante. En este contexto, para analizar la viabilidad celular mediante técnicas que midan la actividad celular total, se debe normalizar por la superficie de cultivo. Aun así, antes de evaluar la actividad celular al interactuar con biomateriales, es importante desarrollar una metodología eficiente para que las hGMSC se adhieran correctamente al biomaterial, lo cual se analiza mediante marcadores nucleares y del citoesqueleto para visualizar las células adheridas.

3. Tratamiento superficial de acetona en biomateriales para mejorar la adhesión celular en biomateriales compuestos de PCL-BG.

Dada que la biocompatibilidad de un material se evalúa a partir de la interacción con células, se realizó un tratamiento superficial con acetona sobre las muestras del grupo PCL/10BG, para desarrollar una metodología eficiente para la adhesión celular. Es importante asegurar una correcta adhesión celular, pues, a partir de este proceso, es que se puede evaluar desde la viabilidad/citotoxicidad, proliferación, cambios morfológicos, hasta la proliferación celular. Como se mencionó anteriormente, la adhesión celular de hGMSC antes y después del tratamiento se evaluó mediante marcadores celulares, los cuales fueron validados a continuación.

3.1 Validación de marcadores específicos para núcleo y citoplasma.

Para evaluar la adhesión celular de hGMSC sembradas en biomateriales de PCL/10BG con y sin tratamiento superficial, se realizó un marcaje con Faloidina y Hoechst, para identificar los filamentos de actina del citoesqueleto y los núcleos de las células adheridas al biomaterial.

El control y validación del marcaje nuclear y del citoesqueleto de células sembradas en placa, se presenta en la Figura 11, donde se observa la especificidad de los marcadores, en donde se muestra: la expresión de actina a través de la unión de Faloidina con los filamentos de actina, por lo cual se marca el citoesqueleto de color rojo (Figura 11, A); los núcleos marcados debido a la unión de los

nucleótidos con Hoechst (Figura 11, B); y la sobreposición de ambos componentes celulares (Figura 11, C).

A partir de estos resultados, se confirma la especificidad y eficacia de los marcadores Faloidina y Hoechst para marcar el citoesqueleto y núcleos celulares de hGMSC, validando su aplicación para futuros experimentos. Sin embargo, antes de aplicar estos marcadores en células cultivadas sobre biomateriales, es fundamental descartar señales que intervengan con la detección de los componentes específicos. Por esto, se evaluó la autofluorescencia del biomaterial con el fin de asegurar una correcta interpretación al realizar los análisis biológicos.

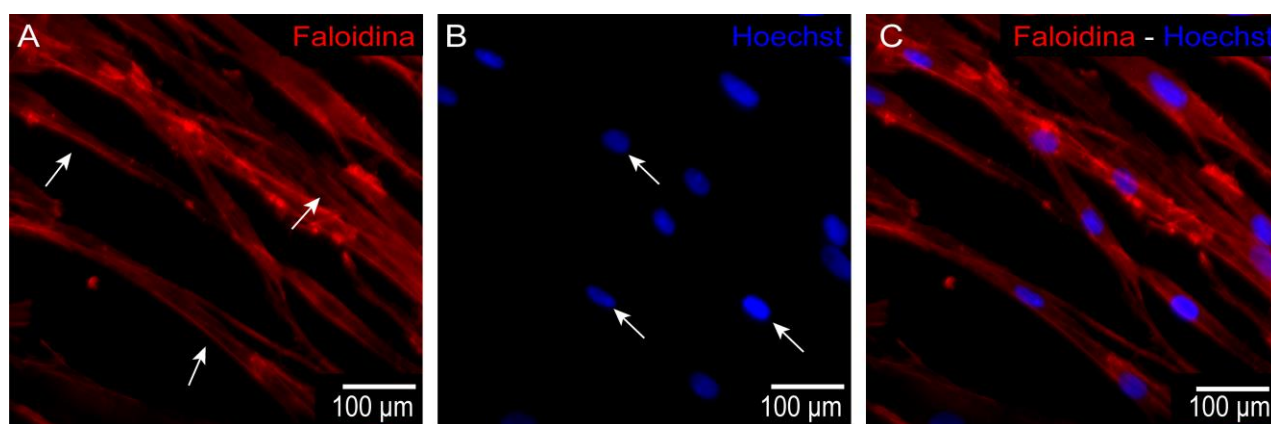


Figura 11. Análisis de la especificidad de marcadores Faloidina y Hoechst para identificar el citoesqueleto y núcleo de hGMSC sembradas en placa.

(A, B, C) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía de epifluorescencia de hGMSC marcadas con Faloidina y Hoechst. (A) En rojo, citoesqueleto de hGMSC marcado a partir de la expresión de actina unida a la Faloidina. La actina se concentra debajo de la membrana plasmática, formando una red densa que da soporte a la forma de las células. Las flechas blancas, indican los filamentos de actina de hGMSC. (B) En azul, núcleos de hGMSC marcados con Hoechst. Las flechas azules indican 3 núcleos celulares marcados con alta especificidad. (D) Sobreposición de (A) y (B).

3.2 Evaluación de autofluorescencia en biomateriales para determinar la efectividad de marcaje molecular.

Con el fin de analizar posibles señales no provengan de las células al momento de realizar los marcajes, se agregó un control negativo, que consistió en el biomaterial de PCL/10BG, sin células y con marcadores. Este control demostró la presencia de fluorescencia en el mismo rango de

emisión/absorción que el marcador Hoechst, mostrando, por lo tanto, una autofluorescencia o marcaje inespecífico (Figura 12). Es importante mencionar que, la autofluorescencia de un biomaterial podría presentar dificultades para analizar los resultados, si es que no se considera al momento del análisis de marcadores celulares específicos.

A partir de esto, se continúa con el análisis de la eficiencia del tratamiento superficial con acetona, de los biomateriales de PCL/10BG, donde ya se conoce la especificidad de los marcadores Hoechst y Faloidina, y autofluorescencia del biomaterial en el rango de emisión/absorción del marcador Hoechst, el cual se debe considerar al momento de realizar el análisis para no obtener conclusiones erróneas.

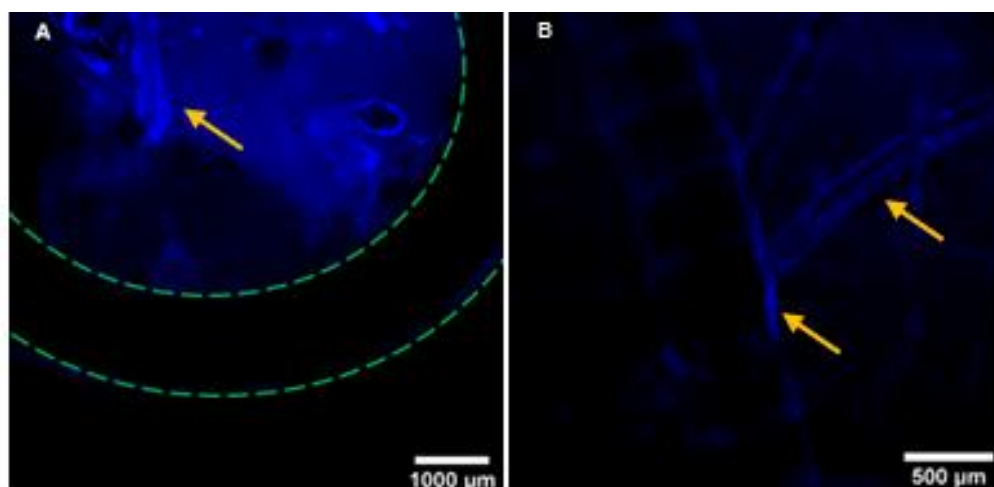


Figura 12. Análisis de la autofluorescencia de biomaterial de PCL/10BG al realizar marcaje con Hoechst.

(A) Visión general del control negativo de PCL/10BG sin hGMSC, marcada con Hoechst. La flecha amarilla indica el fondo del biomaterial, el cual emite fluorescencia de color azul sin la presencia de células, por lo que no existe marcaje nuclear. La circunferencia punteada de color verde delimita el borde del biomaterial. (B) Enfoque del centro del biomaterial de la condición PCL/10BG utilizado como control negativo, sin hGMSC, marcada con Hoechst. Las flechas amarillas indican filamentos de biomaterial al centro de este, los cuales emiten fluorescencia de color azul sin presencia de células, por lo que no existe marcaje nuclear. Se muestra autofluorescencia del biomaterial por sí solo.

3.3 Tratamiento superficial de acetona en biomateriales compuestos de PCL-BG.

Para asegurar una correcta adhesión celular en los biomateriales compuestos de PCL y BG, se realizó un tratamiento superficial con acetona sobre las muestras del grupo PCL/10BG. Esta metodología se realizó debido a que, en estudios iniciales, se adhirieron pocas células al biomaterial tras el sembrado de hGMSC, observándose solo en zonas con mayor rugosidad, como en los bordes del biomaterial o cercano a los restos de filamentos. Por esto, el tratamiento de acetona se realizó con el fin de aumentar la rugosidad del biomaterial con una metodología de bajo costo.

Para determinar la adhesión celular, se sembraron hGMSC en el biomaterial con forma de pocillo, y se analizó tras 24 horas del sembrado. Se utilizaron marcadores moleculares fluorescentes para identificar los núcleos (Hoechst) y citoesqueleto (Faloidina). Esto permitió hacer un seguimiento del proceso de adhesión celular en las hGMSC que fueron sembradas sobre las distintas condiciones experimentales.

Tras 24 horas del sembrado de hGMSC sobre biomateriales de PCL/10BG y el marcaje nuclear Hoechst y de filamentos de actina con Faloidina, se observaron diferencias notables entre el grupo sin tratamiento y con tratamiento de acetona (Figura 13). En la Figura 13 A, B, se detectó que las células se adhirieron al biomaterial sin tratamiento de acetona, principalmente en zonas con restos de filamento provenientes de errores de impresión 3D. Estos filamentos se identificaron como zonas irregulares en la superficie del biomaterial, en el que las células se aglomeraron para adherirse. Sin embargo, en zonas regulares de la superficie del biomaterial, no se observaron células adheridas. De esta manera, las células ocuparon menos de un 10% de la superficie del biomaterial.

Por otro lado, los resultados presentados en la figura Figura 13 C, D, indicaron que las células se adhirieron al biomaterial sometido al tratamiento con acetona, a lo largo de toda la superficie del biomaterial, ocupando más de un 80% de esta. Se pueden observar regiones de alta confluencia celular y zonas donde no se ven células, posiblemente a que, debido a la alta densidad, se soltaron de la superficie. Se observó una diferencia significativa en la adhesión celular entre los grupos con tratamiento y sin tratamiento, demostrando que el tratamiento de acetona es una metodología que aumenta la eficiencia de adhesión celular.

Es importante mencionar que, la autofluorescencia de un biomaterial podría presentar dificultades para analizar los resultados, si es que no se considera al momento del análisis de marcadores celulares específicos. En la Figura 13 A, B se observaron filamentos y parte de la superficie de color

azul con ausencia de células, evidenciado por la inexistencia de filamentos de actina. Esto indica la autofluorescencia del biomaterial.

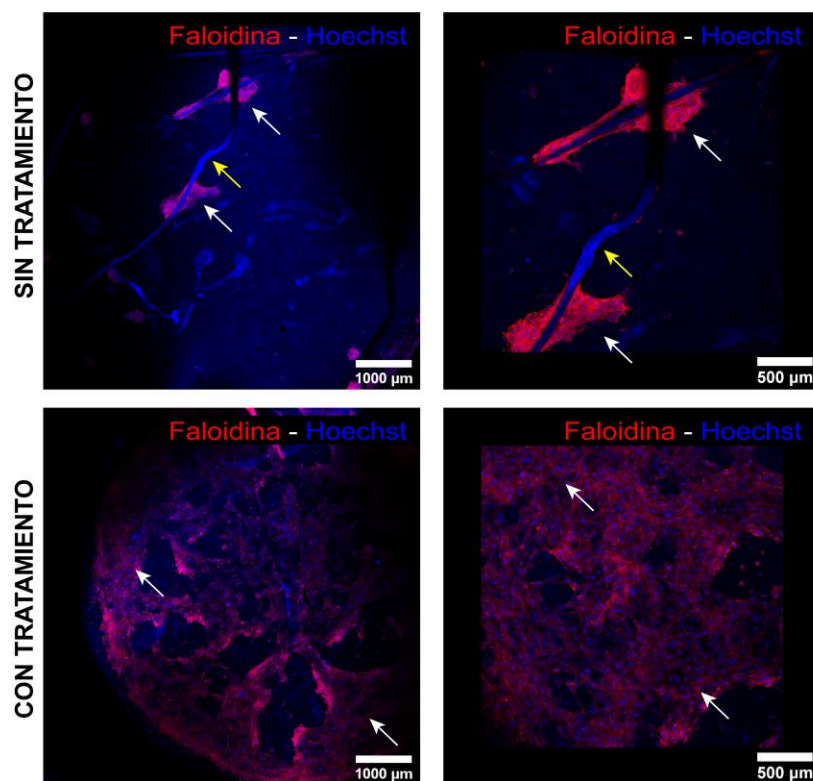


Figura 13. Tratamiento superficial con acetona aumenta la adhesión celular de hGMSC en biomateriales de PCL/10BG.

(A, B) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal después de 24 horas del sembrado de hGMSC, sobre PCL/10BG en aumentos 4X y 10X. En rojo, marcador de F-actina con Faloidina, en azul, marcador nuclear Hoechst con presencia de autofluorescencia. Las flechas amarillas indican zonas donde se encuentran hGMSC adheridas al biomaterial. Las flechas verdes indican filamentos o zonas de la superficie que presentan autofluorescencia con Hoechst, en zonas con ausencia de hGMSC. (C, D) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal después de 24 horas del sembrado de hGMSC, sobre PCL/10BG tratado previamente con acetona, a distintos aumentos. En rojo, marcador de F-actina con Faloidina, en azul, marcador nuclear Hoechst con presencia de autofluorescencia. Las flechas amarillas indican zonas donde se encuentran hGMSC adheridas al biomaterial. Experimento realizado 2 veces (n=2).

En términos generales, el tratamiento superficial con acetona sobre los biomateriales de PCL/10BG demostró beneficiar la adhesión celular, en comparación a los biomateriales sin someterse al tratamiento. Por estas razones, para los siguientes experimentos se optó por someter todos los biomateriales a tratamientos de acetona, para evaluar distintas características que describen la biocompatibilidad del biomaterial. Ahora bien, para futuros experimentos, es relevante sembrar una cantidad de células adecuada que permita observar la interacción célula-biomaterial a distintos tiempos, por lo que se realizó un estudio para definir la densidad celular a sembrar.

4. Definición de densidad celular a sembrar sobre biomateriales para análisis de biocompatibilidad.

De acuerdo con los resultados obtenidos del experimento anterior, a las 24 horas del sembrado de 50.000 hGMSC sobre biomateriales tratados con acetona, la superficie se observó con una confluencia cercana a un 80%. Por esto, se decidió continuar con desarrollo de metodologías, para definir una densidad celular adecuada para sembrar en biomateriales, para el tipo de experimento y las características de las células que se desean analizar. Dado esto, se sembraron 10.000 y 20.000 hGMSC sobre biomateriales de PCL/10BG, y se analizó la confluencia y distribución celular a los tiempos 1, 7 y 14 días mediante marcaje nuclear Hoechst y filamentos de actina con Faloidina.

Tras 1 día del sembrado de 10.000 hGMSC sobre PCL/10BG, se observaron células aisladas y distanciadas entre sí, lo que permitió identificar los límites de cada célula y una morfología que, variada entre alargada y circular, presentando una baja confluencia (Figura 14 A). Luego, tras el sembrado de 20.000 hGMSC se observó un aumento en la cantidad de células adheridas en comparación al grupo de 10.000 hGMSC, presentándose aglomeraciones de células a través de la superficie del biomaterial, dificultando la visualización de cada célula de manera individual a tiempos cortos (Figura 14 B). Tras 7 días del sembrado de 10.000 y 20.000 células sobre PCL/10BG, se observó un aumento en la cantidad de células identificadas en ambos grupos de manera similar, lo cual indica proliferación celular, sumado a notorios cambios morfológicos en los cuales las células se observaron alargadas y con ausencia de aglomeraciones, en comparación a tiempos anteriores (Figura 14 C, D). Al día 14 del sembrado de 10.000 y 20.000 hGMSC sobre PCL/10BG, se observó un aumento en la en la cantidad de células en comparación al día 1 y 7, y mayor confluencia (Figura 14 E, F). Para ambos casos, la distribución y morfología celular es similar.

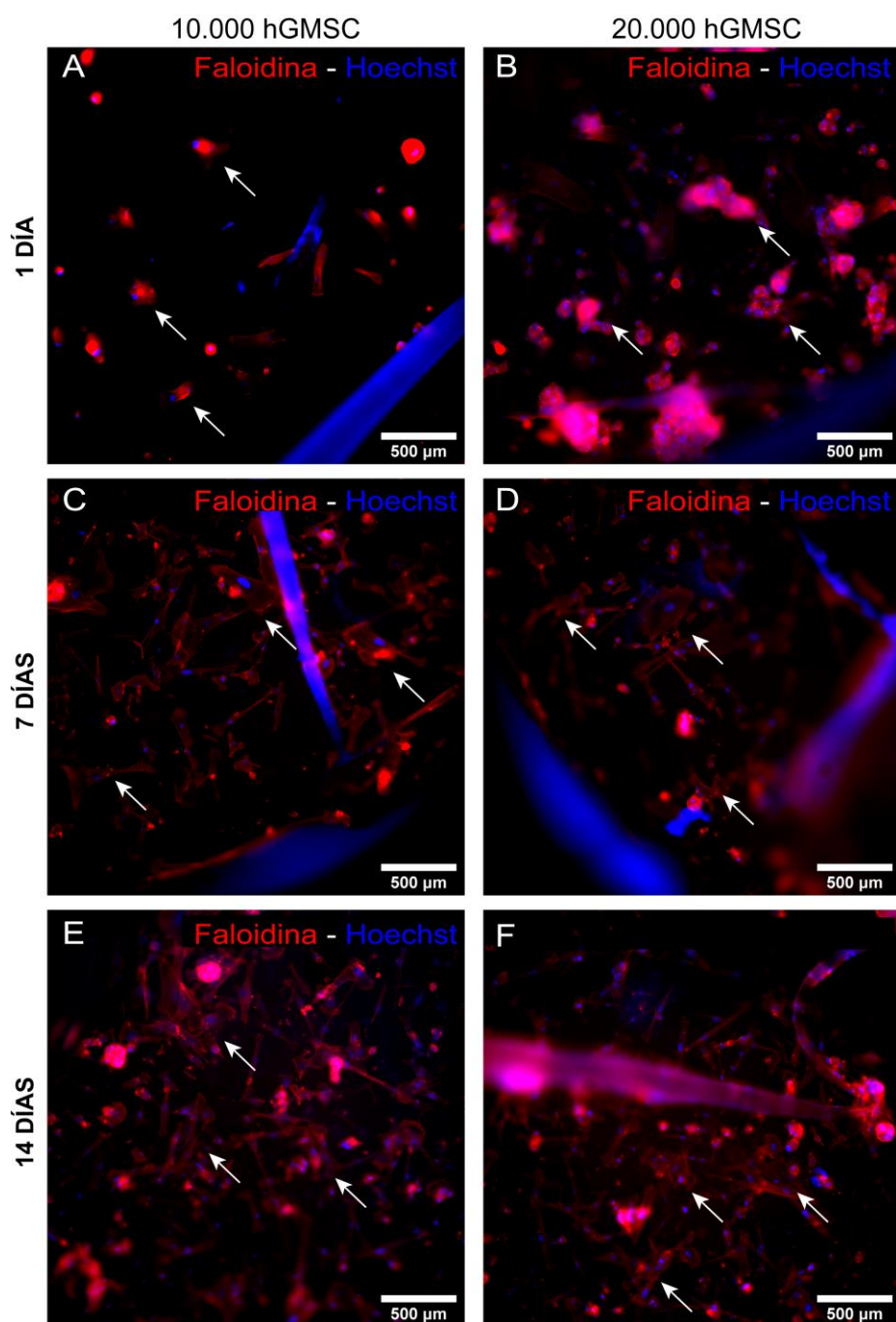


Figura 14. Análisis de la densidad celular de hGMSC sembradas en PCL/10BG a distintos tiempos.

En rojo, marcador de F-Actina con Faloidina y en azul, marcador nuclear Hoechst. (A y B) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía de epifluorescencia de 10.000 y 20.000 hGMSC sembradas en PCL/10BG respectivamente, tras 1 día del sembrado. (A) Se presenta una baja confluencia celular (10% aproximadamente), mostrando células aisladas, indicadas por flechas blancas. (B) Zonas de alta confluencia presentada por aglomeraciones celulares indicadas por flechas blancas, presentando un 20% de confluencia

en el campo en general. (C y D) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía de epifluorescencia de 10.000 y 20.000 hGMSC sembradas en PCL/10BG respectivamente, tras 7 días del sembrado. Ambas presentan una distribución y confluencia similar de un 40% aproximadamente, sin presentar aglomeraciones celulares. Las flechas blancas indican citoesqueleto y núcleos de células marcadas con Faloidina y Hoechst respectivamente. (E y F) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía de epifluorescencia de 10.000 y 20.000 hGMSC sembradas en PCL/10BG respectivamente, tras 14 días del sembrado. Se presenta una distribución y confluencia similar entre ambos grupos, de aproximadamente un 60%, con presencia de aglomeraciones celulares. Las flechas blancas indican citoesqueleto y núcleos de células marcadas con Faloidina y Hoechst respectivamente.

Dadas estas observaciones, los resultados indican que se pueden visualizar posibles cambios en la proliferación, distribución y morfología celular a través del tiempo para las densidades de 10.000 y 20.000 células, lo cual posibilitaría sembrar hGMSC sobre biomateriales en estas densidades para los próximos experimentos para analizar biocompatibilidad. Sin embargo, para analizar y describir la morfología celular de hGMSC, es importante poder identificar los límites de las células y analizarlas por separado a tiempos cortos, por lo que para ese experimento específico se volvería relevante utilizar una densidad celular de 10.000 hGMSC.

5. Viabilidad celular de MSC durante la interacción *in vitro* con biomateriales compuestos de PCL-BG.

A partir de la caracterización química y elemental de los biomateriales, se puede realizar el análisis de biocompatibilidad de las condiciones de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, lo cual permitirá identificar la influencia de las distintas composiciones de los biomateriales sobre las respuestas celulares. De esta manera, luego de desarrollar una metodología para asegurar la adhesión celular y definir la densidad celular a sembrar sobre los biomateriales, se evaluó la viabilidad celular de hGMSC sembradas en biomateriales con distintas concentraciones de BG, para analizar si el material es tóxico o compatible con las células.

Para llevar a cabo este análisis, se realizó un ensayo MTS, el cual se utiliza como un indicador de viabilidad celular, ya que evalúa la actividad metabólica de las células, indicando que estas están

vivas y funcionales. Las condiciones experimentales analizadas fueron PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, y se midió la eficiencia de adhesión celular y los cambios en la actividad celular de hGMSC a distintos tiempos.

Los resultados indican que la eficiencia de adhesión celular tras 24 horas del sembrado es igual o menor al 50% en todos los grupos experimentales en comparación al grupo control de células sembradas en placa, presentando diferencias significativas. Además, se muestra una baja viabilidad celular en el grupo PCL/20BG, con un valor medio de 1,58% y una desviación estándar de 3.86 (Figura 15 A, C).

En cuanto a los cambios en la actividad celular con respecto al tiempo, no se presentaron diferencias significativas en el grupo de PCL entre los 3 y 7 días tras el sembrado de hGMSC, sin embargo, a 14 días, la viabilidad celular aumentó significativamente. Por otro lado, el grupo PCL/ACE presentó un aumento significativo en la viabilidad celular entre los tiempos 3, 7 y 14 días. Con respecto al grupo PCL/10BG, si bien aumentó la viabilidad celular con respecto al tiempo, no se presentaron diferencias significativas. Finalmente, con el grupo PCL/20BG, se presentó un ligero aumento en la viabilidad celular tras 7 días del sembrado de hGMSC (Figura 15 B, D).

En cuanto a la actividad celular entre grupos experimentales, los principales resultados que presentan diferencias significativas a los días 3 y 7 tras el sembrado, se encuentran entre los grupos de PCL/10BG y PCL20BG, en donde la viabilidad del grupo PCL/20BG es baja en comparación a los demás grupos. Adicionalmente, al día 14, el grupo PCL/20BG mantiene una baja viabilidad en comparación a los grupos PCL, PCL/ACE y PCL/10BG, presentando diferencias significativas entre todos estos. Así mismo, no se presentan diferencias significativas en la viabilidad celular entre los grupos PCL y PCL/10BG al día 14.

Con respecto a los grupos control de PCL y PCL/ACE, a tiempos cortos como 3 y 7 días del sembrado no se presentan diferencias significativas en la viabilidad celular, por lo que para experimentos de tiempos cortos se puede considerar solo el grupo de PCL como grupo con 0% de BG.

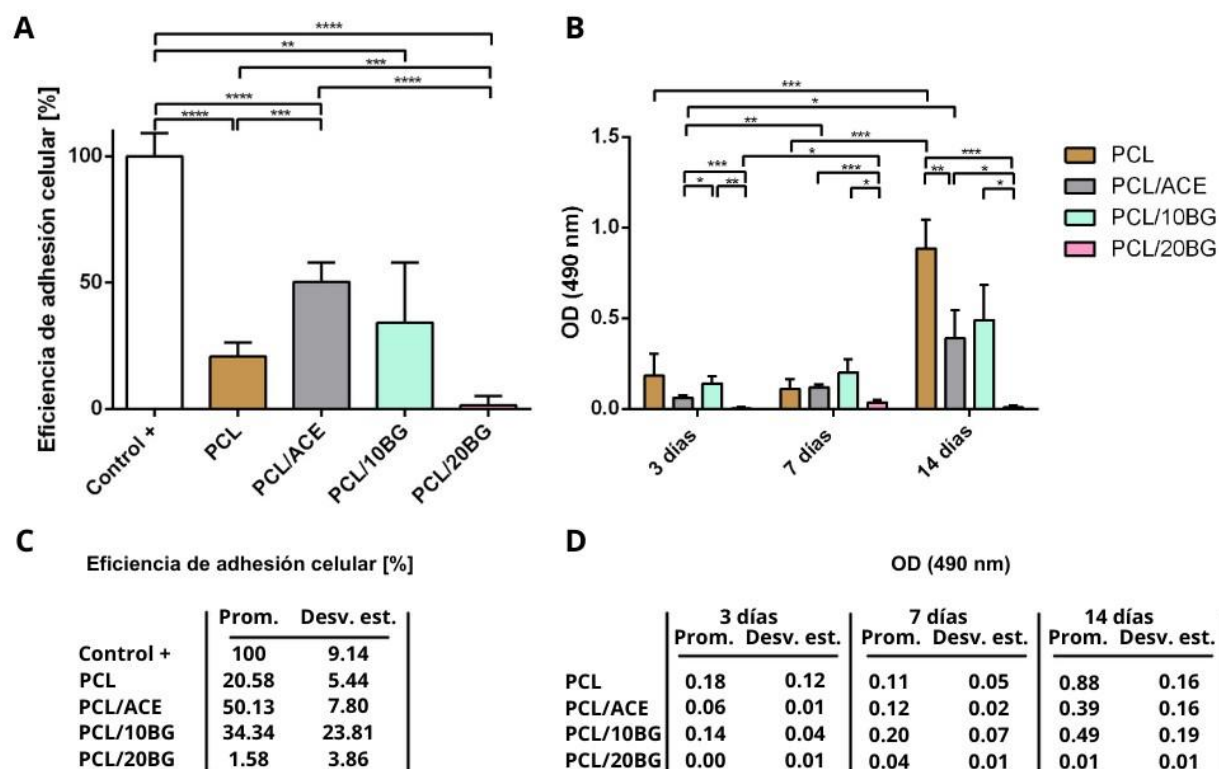


Figura 15. Análisis de la actividad metabólica de hGMSC sembradas sobre PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG a distintos tiempos.

(A) Experimento de viabilidad celular para evaluar la eficiencia de adhesión entre las condiciones PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG. (B) Viabilidad celular para evaluar los cambios en la actividad celular entre las mismas condiciones después de 3, 7 y 14 días del sembrado. En (A-B) Las barras representan la media con la desviación estándar para todos los casos. Los corchetes representan la significancia estadística en una prueba de Games Howell después de un Anova de Welch (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$). Las tablas (C) y (D) representan la media (Prom) y desviación estándar (Desv. est.) para los valores presentados en (A) y (B).

A partir de los resultados de viabilidad celular obtenidos, se realizó un marcaje nuclear y de los filamentos de actina con Hoechst y Faloidina respectivamente para los PCL y PCL/10BG, con el objetivo de visualizar la confluencia y distribución celular sobre los biomateriales. Para este marcaje, se descartó la condición PCL/ACE, debido a que se considerará solo el grupo PCL como control. Adicionalmente, se descartó la condición de PCL/20BG debido a su baja viabilidad celular en todos los tiempos.

El marcaje se realizó para observar los cambios en un tiempo intermedio y final del ensayo de viabilidad con MTS, por lo que se escogieron 7 y 14 días.

Tanto la distribución celular como la confluencia tras 7 días del sembrado se observaron similares en los grupos de PCL y PCL/10BG, notándose zonas en las cuales se encontraron aglomeraciones de células (Figura 16 A, A', B, B'). Adicionalmente, se detectó una disposición celular desorganizada lo largo de todo el biomaterial para ambas condiciones. A los 7 días, las hGMSC sembradas en PCL y PCL/10BG muestran una morfología alargada sobre los biomateriales, lo cual indica una correcta adhesión celular para ambas condiciones. Ahora bien, las zonas de aglomeración celular reflejan una distribución no aleatoria de clones, lo cual sugiere un patrón de expansión clonal localizado (Figura 16 A' y B'). Así mismo, estas zonas presentan una mayor intensidad de fluorescencia debido a la alta cantidad de células en zonas específicas.

Con respecto a la confluencia y distribución celular a los 14 días, se observó un aumento de confluencia en ambas condiciones en comparación a los 7 días del sembrado. Sin embargo, el grupo de PCL/10BG presenta una mayor confluencia en comparación al grupo de PCL, asociándose aproximadamente a un 95% y 80% del biomaterial respectivamente (Figura 16 C, C', D, D'). Luego, la distribución y disposición celular en ambos casos es similar, en donde se observó que, al aumentar la confluencia, las células adoptaron una organización más estructurada, en términos de la orientación. Al igual que a los 7 días, tras 14 días del sembrado, las hGMSC sembradas en PCL y PCL/10BG muestran una morfología alargada sobre los biomateriales. Ahora bien, no es posible identificar distribución en clones por zonas, debido a la alta confluencia que presentan las células, por lo que se presenta una interacción célula-célula en todo el biomaterial.

En conjunto, estos experimentos mostraron una eficiencia de adhesión celular menor a un 50% en todas las condiciones experimentales. En particular, el grupo PCL/20BG presentó una viabilidad significativamente baja en todos los tiempos evaluados. Ahora bien, las células sembradas en los grupos PCL, PCL/ACE y PCL/10BG mostraron un aumento en la viabilidad celular a los 14 días, lo cual, al complementarse con el análisis de confluencia evaluado mediante marcadores celulares, demostró proliferación celular entre días 7 y 14. A partir de esto, otros estudios como análisis de citotoxicidad y proliferación celular, pueden ayudar a comprender mejor la interacción célula-biomaterial, y así, obtener resultados más precisos.

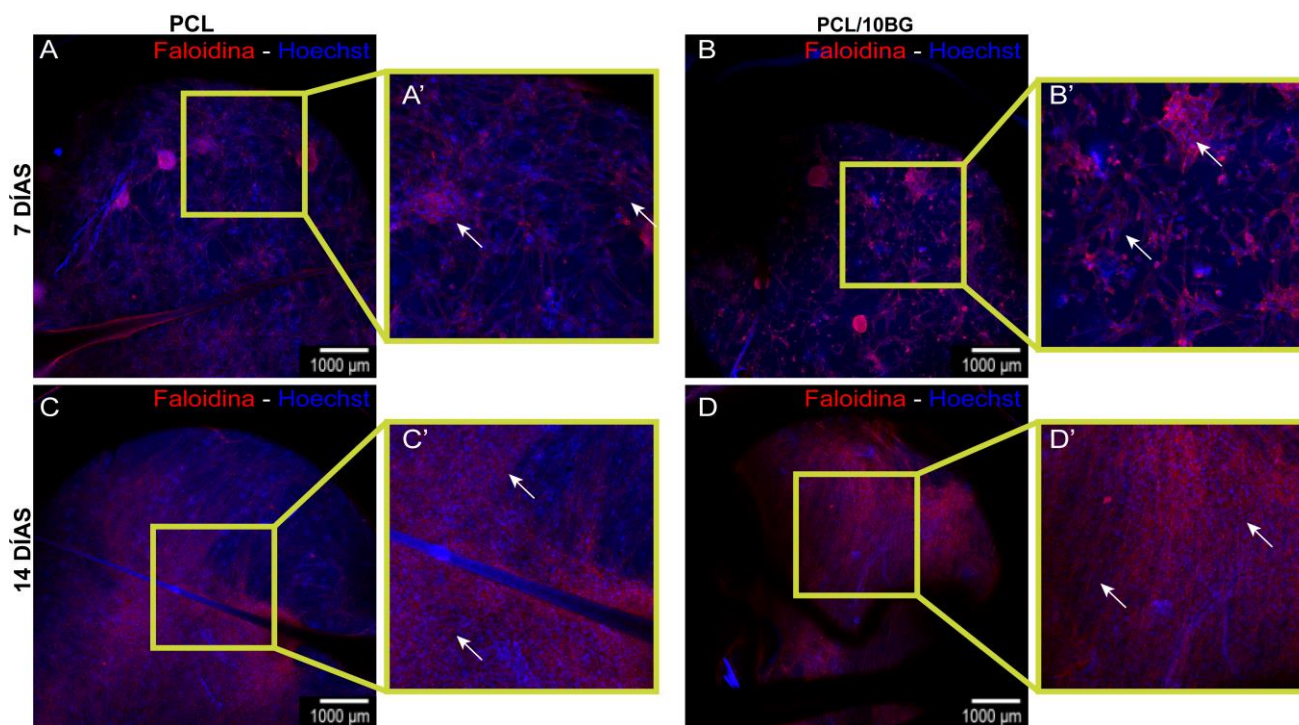


Figura 16. Distribución y confluencia de hGMSC sembradas en PCL y PCL/10BG tras 7 y 14 días tras el sembrado.

En rojo, marcador de F-Actina con faloidina y en azul, marcador nuclear Hoechst. (A y B) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal de hGMSC sembradas en PCL y PCL/10BG respectivamente, tras 7 días del sembrado. En ambas condiciones se observan aglomeraciones de células por distintas zonas de los biomateriales, con una confluencia similar. (C y D) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal de hGMSC sembradas en PCL y PCL/10BG respectivamente, tras 14 días del sembrado. En el grupo de PCL (C), se presenta una confluencia de aproximadamente un 80%, mientras que en el grupo de PCL/10BG se presenta una confluencia de aproximadamente un 95%.

6. Evaluación de citotoxicidad de biomateriales compuestos de PCL y BG

Para complementar el ensayo de viabilidad celular medido por actividad metabólica, se realizaron análisis de citotoxicidad para evaluar la viabilidad y muerte celular de hGMSC sembradas en biomateriales con distintas concentraciones de BG. Para este ensayo se realizó un marcaje de fluorescencia con Calceína AM, Homodímero de Etidio – 1 y Hoechst, para identificar el citoplasma de células vivas de color verde, núcleos de células muertas de color rojo y núcleos totales de color azul respectivamente. Este ensayo se realizó en las condiciones PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG a distintos tiempos, y se cuantificó el porcentaje de viabilidad y muerte celular.

6.1. Validación de marcadores

Antes de realizar el ensayo de citotoxicidad sobre los biomateriales, se validaron los marcadores para evaluar la especificidad estos. Así, se realizó un triple marcaje en grupos de hGMSC vivas y muertas sembradas en placa. Se marcaron los núcleos totales de ambos grupos con Hoechst, los núcleos de células muertas con Homodímero de Etidio – 1 (EthD-1), y citoplasma de células vivas con Calceína.

De este modo, en el grupo de células vivas se observó el citoplasma de las células de color verde y núcleos de color azul, seguido de una ausencia de núcleos de color rojo (Figura 17 A, B, C, D). Por otro lado, en el grupo de células muertas, se observaron los núcleos de color rojo y azul, sin presentar el citoplasma de las células de color verde.(Figura 17 E, F G, H).

En conjunto, estos resultados demuestran la especificidad de los marcadores, debido a (i) la localización de la Calceína en el citoplasma de células vivas, evidenciando la actividad esterasa al hidrolizar la Calceína-AM, por lo que se transforma en un reactivo fluorescente y se ausenta en el citoplasma del grupo de células muertas; (ii) la localización del EthD-1 en los núcleos del grupo de células muertas, presentando una colocalización en los núcleos marcados con Hoechst, ya validado previamente. Así mismo, no hay marcaje de núcleos en el grupo de células vivas.

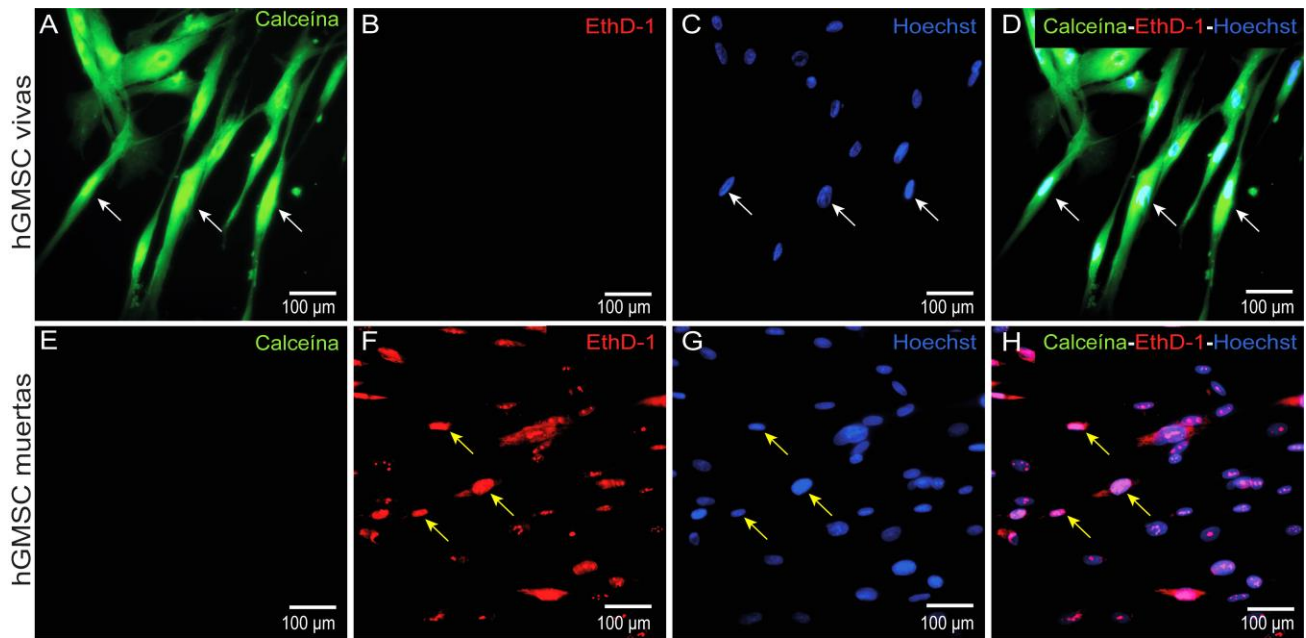


Figura 17. Análisis de la localización del marcaje de Calceína AM, Homodímero de Etidio – 1 y Hoechst para células vivas y muertas sembradas en placa.

(A, B, C, D) Imágenes representativas de microscopía de epi fluorescencia de células vivas, marcadas con Calceína AM , Homodímero de Etidio – 1 y Hoescht. (A) En verde, se observa el citoplasma de las células vivas marcado con Calceína. Las flechas blancas, indican el citoplasma marcado de tres células vivas diferentes. (B) Células vivas marcadas con Homodímero de Etidio – 1. (C) En azul, marcaje nuclear con Hoechst, donde se marca el núcleo completo. Las flechas blancas, indican los núcleos marcados de las mismas células indicadas en (A). (D) Sobreposición (A, B, C). Las flechas blancas, indican las células indicadas en (A y C). (E, F, G y H) Imágenes representativas de microscopía de epi fluorescencia de células muertas, marcadas con Calceína AM , Homodímero de Etidio - 1 y Hoescht. (E) Células muertas marcadas con Calceína AM. (F) En rojo, marcaje nuclear con Homodímero de Etidio – 1 donde se marcan los núcleos de células muertas. Las flechas amarillas, indican tres núcleos marcados de células distintas. (G) En azul, marcaje nuclear con Hoechst, donde se marca el núcleo completo. Las flechas amarillas, indican los núcleos marcados de las mismas células indicadas en (F). (H) Sobreposición (E, F, G).

6.2.Evaluación de autofluorescencia en biomateriales para determinar la efectividad de marcaje molecular.

Con el fin de analizar posibles señales que no provengan de las células al momento de realizar los marcajes, se hicieron controles negativos de todas las condiciones experimentales (PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG), sin células, con los marcadores Calceína AM, EthD-1 y Hoechst. Estos controles demostraron ausencia de autofluorescencia o marcaje inespecífico en muestras de PCL y PCL/ACE en el mismo rango de emisión/absorción de los marcadores Calceína AM y EthD-1 (Figura 18 A, B, D, E), mientras que mostraron la presencia de fluorescencia en el mismo rango de emisión/absorción que el marcador Hoechst, mostrando, por lo tanto, una autofluorescencia o marcaje inespecífico en ambas condiciones (Figura 18 C, F). Por otro lado, los grupos PCL/10BG y PCL/20BG, demostraron fluorescencia en el mismo rango de emisión/absorción que los marcadores Calceína AM, EthD-1 y Hoechst, mostrando, por lo tanto, una autofluorescencia o marcaje inespecífico en ambas condiciones (Figura 18 G, H, I, J, K, L).

En conjunto, estos resultados indican que todas las condiciones experimentales presentan autofluorescencia o marcaje inespecífico en el rango de emisión/absorción del marcador Hoechst, mientras que solo las condiciones experimentales con BG presentan autofluorescencia o marcaje inespecífico en el rango de emisión/absorción de los marcadores Calceína AM y EthD-1. A partir de esto, es importante tener presente en el análisis y cuantificación de citotoxicidad, que la autofluorescencia puede influir en la interpretación de resultados si es que no se considera, por lo que estos deben ser analizados con precaución, complementándose el análisis de especificidad de los marcadores.

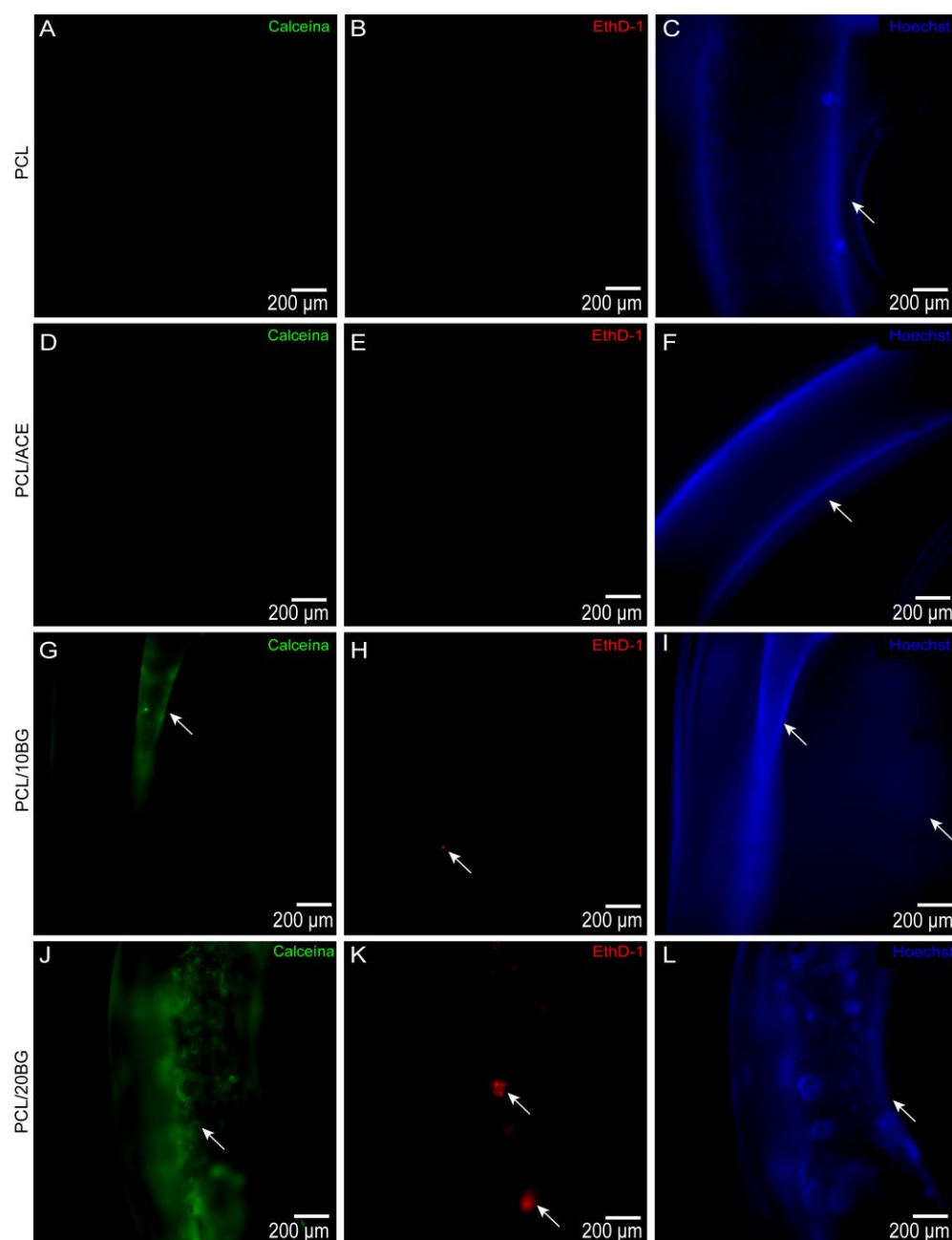


Figura 18. Análisis de la autofluorescencia de biomateriales compuestos de PCL y BG al realizar marcaje con Calceína AM, EthD-1 y Hoechst.

En verde Calceína AM, en rojo EthD-1 y en azul Hoechst. (A, B, C) Biomaterial de PCL sin células, marcado con Calceína AM, EthD-1 y Hoechst respectivamente. En (C), la flecha blanca indica la autofluorescencia de color azul en el borde del biomaterial, en el mismo rango de emisión/absorción del marcador Hoechst. (D, E, F) Biomaterial de PCL/ACE sin células, marcado con Calceína AM, EthD-1 y Hoechst respectivamente. En (F), la flecha blanca indica la autofluorescencia de color azul en el borde del biomaterial, en el mismo rango de emisión/absorción del marcador Hoechst. (G, H, I) Biomaterial de PCL/10BG sin células, marcado con Calceína AM, EthD-1 y Hoechst respectivamente. En (G), la flecha

blanca indica la autofluorescencia de color verde, un filamento del biomaterial, en el mismo rango de emisión/absorción de la Calceína AM. En (H), la flecha blanca indica la autofluorescencia de color rojo en un punto en el borde del biomaterial, en el mismo rango de emisión/absorción del EthD-1. En (I), la flecha blanca indica la autofluorescencia de color azul en el borde del biomaterial, en el mismo rango de emisión/absorción del marcador Hoechst. (J, K, L) Biomaterial de PCL/20BG sin células, marcado con Calceína AM, EthD-1 y Hoechst respectivamente. En (J), la flecha blanca indica la autofluorescencia de color verde en el borde del biomaterial, en el mismo rango de emisión/absorción de la Calceína AM. En (K), la flecha blanca indica la autofluorescencia de color rojo en puntos ubicados al borde del biomaterial, en el mismo rango de emisión/absorción del EthD-1. En (L), la flecha blanca indica la autofluorescencia de color azul en el borde del biomaterial, en el mismo rango de emisión/absorción del marcador Hoechst.

6.3. Viabilidad y muerte celular de hGMSC sembradas sobre biomateriales compuestos de PCL y BG.

A partir del análisis de especificidad de los marcadores para evaluar viabilidad y muerte celular, y la autofluorescencia de los biomateriales, se realizó el ensayo de citotoxicidad de los biomateriales de PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG a dos tiempos.

Las imágenes representativas de fluorescencia asociadas a los resultados del ensayo de citotoxicidad se presentan en la Figura 18 A – J, en donde se marcó el citoplasma de células vivas, núcleos de células muertas y núcleos totales para las condiciones mencionadas anteriormente.

Tras 1 día del sembrado de hGMSC, se observó una alta viabilidad celular en el grupo Control +, donde las células fueron sembradas en placa, acercándose a un 100% de viabilidad celular, debido a los escasos núcleos rojos de células muertas que fueron detectados (Figura 19 A). Luego, la viabilidad y muerte celular fue similar entre los grupos PCL y PCL/ACE (Figura 19 B,C), sin embargo, se percibió una mayor cantidad de núcleos rojos en comparación al grupo control, presentando, por lo tanto, una menor viabilidad celular. Luego, al agregar BG al biomaterial, se observó un aumento de muerte celular para el grupo de PCL/10BG y PCL/20BG (Figura 19 D, E), evidenciándose visualmente una mayor cantidad de núcleos rojos marcados en comparación a los grupos controles de biomaterial y control en placa. Sin embargo, el grupo de PCL/10BG presentó una mayor viabilidad celular en comparación al grupo PCL/20BG, visualizándose un aumento del marcaje citoplasmático de color verde y disminución de núcleos rojos en el grupo de PCL/10BG.

Tras 5 días del sembrado de hGMSC, las percepciones cualitativas tras el marcaje de células vivas y muertas fueron similares a las observadas para el día 1 para los grupos Control +, PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, pudiendo visualizarse en la Figura 19 F, G, H, I, J respectivamente.

Los resultados de la cuantificación del porcentaje de viabilidad y muerte celular, tras la cuantificación de núcleos totales y núcleos de células muertas, se presentan en la Figura 19 K, L respectivamente.

Tras 1 día del sembrado de hGMSC, la viabilidad celular fue igual o mayor al 75% en todos los grupos, a excepción de las células sembradas sobre PCL/20BG, presentando un porcentaje de viabilidad menor al 40%, presentando diferencias significativas entre los grupos Control +, PCL y PCL/ACE. Se presentó una alta y similar viabilidad celular entre los grupos PCL y PCL/ACE, con un valor cercano a un 90%, sin presentar diferencias significativas entre estos grupos, ni con el Control +. Ahora bien, el grupo PCL/10BG presentó una viabilidad ligeramente menor a los grupos PCL y PCL/ACE, encontrándose diferencias significativas solo con el grupo PCL/ACE. Con respecto al grupo PCL/20BG,

Tras 5 días del sembrado de hGMSC, la viabilidad celular no presentó diferencias significativas con respecto al tiempo en las condiciones experimentales, manteniendo resultados similares a los obtenidos al día 1, a excepción del grupo control, donde la viabilidad aumentó hasta acercarse al 100%. La viabilidad celular se mantuvo sobre un 60% para las condiciones de PCL, PCL/ACE y PCL/10BG, mientras que el grupo PCL/20BG mantuvo una viabilidad menor al 40%, presentando diferencias significativas con todos los grupos, a excepción de la condición PCL/10BG. Adicionalmente, se presenciaron diferencias significativas entre el grupo Control + y todos los grupos experimentales.

Con respecto a la muerte celular tras 1 día del sembrado de hGMSC, asociado también a los resultados de viabilidad celular, en todos los grupos se presentó un porcentaje menor al 25%, a excepción del grupo de PCL/20BG. De esta manera, los grupos de PCL y PCL/ACE presentaron un porcentaje de muerte celular cercano a un 10%, mientras que el grupo PCL/10BG mantuvo un porcentaje cercano al 25%. Sin embargo, al tiempo mencionado, las diferencias significativas se encuentran principalmente con el grupo PCL/20BG.

Tras 5 días del sembrado, los resultados asociados a la muerte celular se mantuvieron similares a los del día 1, presenciándose un aumento en la cuantificación de células muertas en el grupo PCL,

alcanzando un valor mayor a un 20%, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto al tiempo. Con respecto a la condición PCL/20BG, la muerte celular se mantuvo en un 60%, con un resultado significativamente alto en comparación a otros grupos experimentales, a excepción de la condición PCL/10BG. Por otro lado, la muerte celular cercana al 0% del grupo Control +, es significativamente más baja con respecto a las condiciones experimentales.

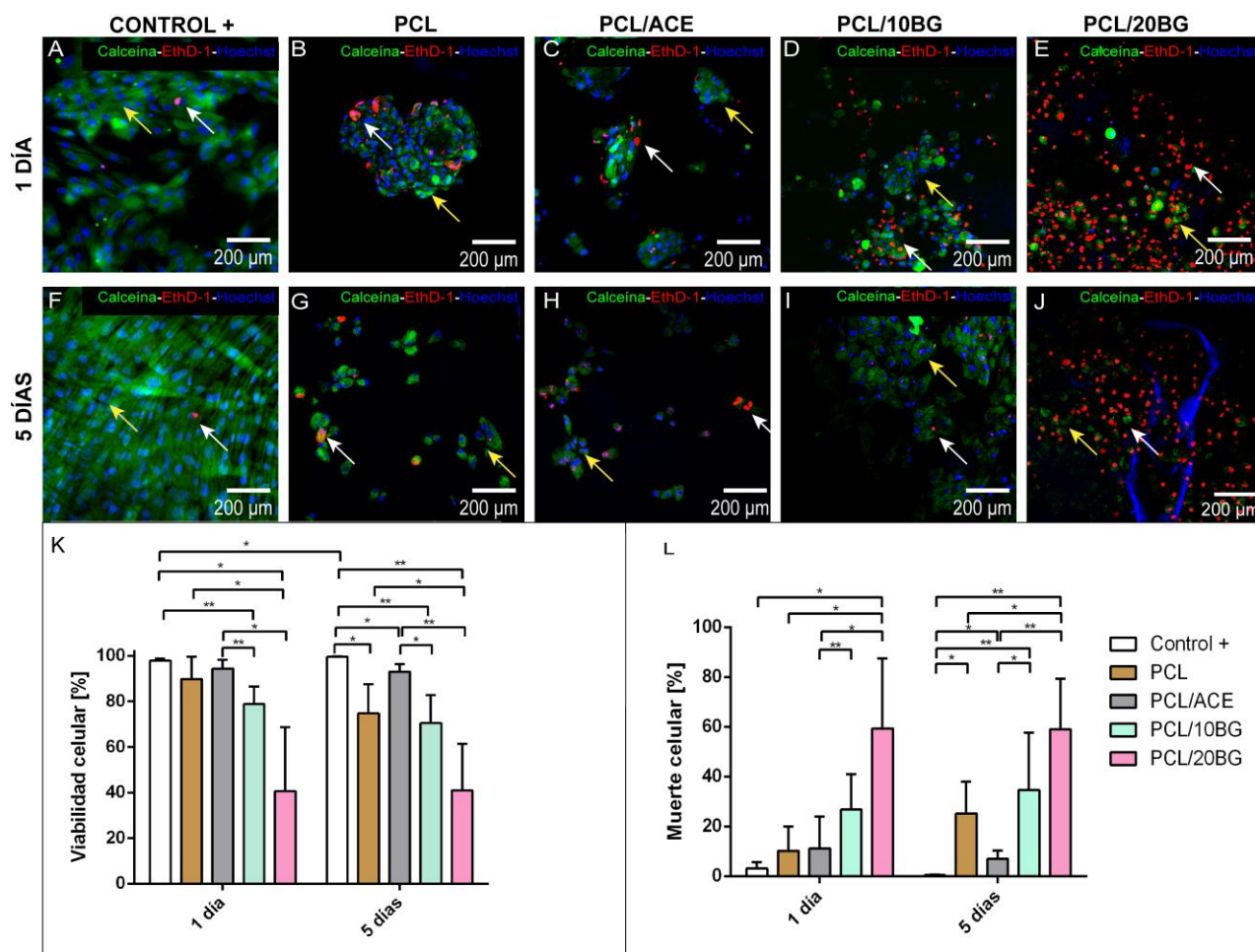


Figura 19. hGMSC presentan mayor muerte celular en biomateriales con alto porcentaje de BG.

Figuras A, B, C, D y E: Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal después de 1 día del sembrado de hGMSC, en placa (Control +), PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG respectivamente. En verde, citoplasma de células vivas marcado con Calceína. En rojo, núcleo de células muertas marcado con Homodímero de Etidio – 1. En azul, núcleo de células vivas y muertas marcados con Hoechst. Las flechas blancas indican núcleos de células muertas, mientras que las flechas amarillas indican citoplasma de células vivas. Figuras F, G, H, I y J: Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal después de 5 días del sembrado de hGMSC, en placa (Control +), PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG respectivamente. En verde, citoplasma de células vivas marcado con Calceína.

En rojo, núcleo de células muertas marcado con Homodímero de Etidio – 1. En azul, núcleo de células vivas y muertas marcados con Hoechst. Las flechas blancas indican núcleos de células muertas, mientras que las flechas amarillas indican citoplasma de células vivas. (K) Resultados de cuantificación de viabilidad celular para las condiciones Control +, PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG tras 1 y 5 días del sembrado de hGMSC. (L) Resultados de cuantificación de muerte celular para las mismas condiciones que (K), tras 1 y 5 días del sembrado de hGMSC. En (K, L) las barras representan la media con la desviación estándar para todos los casos. Los corchetes representan la significancia estadística en una prueba de Games Howell después de un Anova de Welch (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$).

En conjunto, estos resultados muestran que no se presentan cambios en la viabilidad y muerte celular a través del tiempo en cada grupo. Ahora bien, el grupo de PCL/20BG demostró presentar un nivel de toxicidad para las células, dada la alta muerte celular presentada en la cuantificación e imágenes representativas. Así mismo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad o muerte celular entre los grupos PCL y PCL/ACE, por lo que en experimentos futuros, se utilizará solo el grupo PCL como grupo control de biomaterial. A partir de esto, es posible continuar con la evaluación de proliferación celular para complementar el estudio de biocompatibilidad.

7. Análisis de proliferación celular de hGMSC sobre biomateriales compuestos de PCL y BG.

Para analizar y cuantificar la proliferación de las células adheridas al biomaterial de PCL y PCL/10BG en distintos tiempos de cultivo, se utilizaron imágenes de microscopía de fluorescencia, para las cuales se identificaron los núcleos totales marcados con Hoechst, y los núcleos de hGMSC en proceso de proliferación, con expresión de la proteína Ki67.

7.1 Validación de marcadores.

En este estudio, el marcaje realizado permitió identificar las células que se encuentran en proceso de proliferación. De esta manera, se determinó la especificidad del marcador de la proteína nuclear Ki67, como se indica en la Figura 20. Los núcleos totales se identificaron mediante el marcaje

nuclear con Hoechst descrito previamente (Figura 20 A). Luego, la expresión de la proteína Ki67 se identificó mediante un marcaje con el anticuerpo Ki67, en donde es posible identificar las células en proliferación mediante puntos dentro del núcleo, los cuales corresponden a la proteína marcada (Figura 20 B). Estos puntos de Ki67, indican que las células se encontraban en alguna de las fases G1, S, G2 o M, es decir, en proceso de proliferación celular. Finalmente, la especificidad de ambos marcadores se confirmó mediante la colocalización de estos (Figura 20 C).

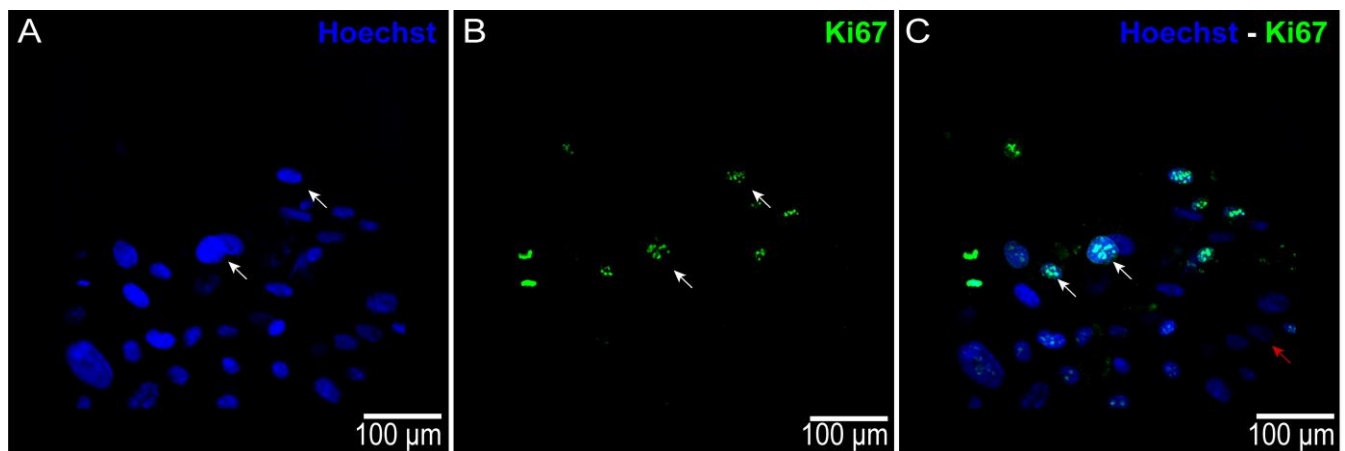


Figura 20. Análisis de la localización del marcaje de proteína nuclear, Ki67 en hGMSC, para evaluar proliferación celular.

Imágenes representativas de microscopía de epi fluorescencia. (A) En azul, marcaje nuclear con Hoechst, donde se marca el núcleo completo. (B) En verde, marcaje nuclear de la proteína Ki67, marcándose zonas específicas del núcleo. (C) Muestra la sobreposición del marcaje nuclear con Hoechst y de la proteína Ki67, pudiendo identificar las células que están en proceso de proliferación celular y las que se encuentran en reposo. Las flechas blancas indican el marcaje de núcleos marcados con Hoechst, con expresión de la proteína Ki67 de células que se encuentran en proceso de proliferación. La flecha roja, indica una célula que se encuentra en reposo, sin indicios de expresión de la proteína Ki67.

7.2. Evaluación de autofluorescencia en biomateriales para determinar la efectividad de marcaje molecular.

Con el fin de analizar posibles señales que no provengan de las células al momento de realizar los marcajes, se hicieron controles de autofluorescencia en las condiciones PCL y PCL/10BG bajo 3 condiciones: (i) sin células, con marcadores Faloidina, Hoechst y segundo anticuerpo Ki67 (sin primer anticuerpo), (ii) sin células, con marcadores Faloidina, Hoechst y primer-segundo anticuerpo Ki67, y (iii) con células, con marcadores Faloidina, Hoechst y segundo anticuerpo Ki67 (sin primer anticuerpo). Se demostró la ausencia de autofluorescencia o marcaje inespecífico en PCL y PCL/10BG en el rango de emisión/absorción de Faloidina, marcándose solo el citoesqueleto de las células en las condiciones de control con células (Figura 21). Para las mismas condiciones, se detectó una señal en el rango de emisión/absorción de Ki67, en las condiciones sin células, para PCL/10BG sin primer anticuerpo de Ki67, y PCL con primer y segundo anticuerpo de Ki67 (Figura 21 F, I). Sin embargo, no se detectó una tendencia, por lo que se observa como un marcaje inespecífico, el cual debe considerarse al momento de realizar las cuantificaciones, siendo cuidadoso de que el marcaje de Ki67 cumpla con la especificidad demostrada anteriormente. Ahora bien, como se ha demostrado anteriormente, en todas las condiciones se muestra una señal de autofluorescencia en el mismo rango de emisión/absorción que el marcador Hoechst.

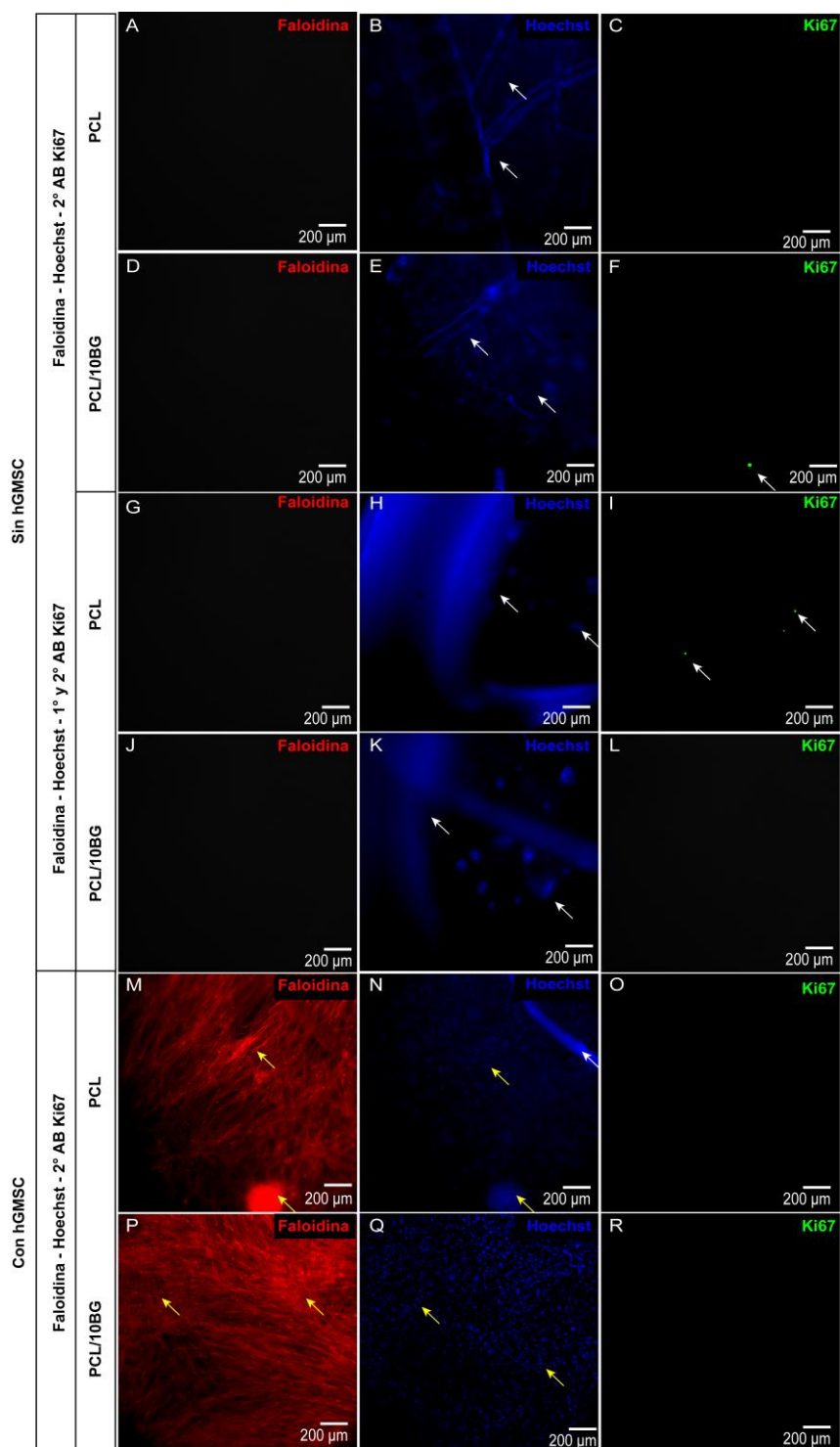


Figura 21. Análisis de la autofluorescencia y marcaje inespecífico de biomateriales compuestos de PCL y BG al realizar marcaje con Faloidina, Hoechst y prime/segundo anticuerpo Ki67.

(A, B, C) Biomaterial de PCL sin células, marcado con Faloidina, Hoechst y segundo anticuerpo de Ki67 (sin el primer anticuerpo). En (B), las flechas blancas indican autofluorescencia de color azul. (D, E, F) Biomaterial de PCL/10BG sin células, marcado con Faloidina, Hoechst y segundo anticuerpo de Ki67 (sin

el primer anticuerpo). En (E), las flechas blancas indican autofluorescencia de color azul. En (F), la flecha blanca indica autofluorescencia o marcaje inespecífico de color verde. (G, H, I) Biomaterial de PCL sin células, marcado con Faloidina, Hoechst y primer-segundo anticuerpo de Ki67. En (H), las flechas blancas indican autofluorescencia de color azul. En (I), las flechas blancas indican autofluorescencia o marcaje inespecífico de color verde. (J, K, L) Biomaterial de PCL/10BG sin células, marcado con Faloidina, Hoechst y primer-segundo anticuerpo de Ki67. En (K), las flechas blancas indican autofluorescencia de color azul. (M, N, O) Biomaterial de PCL con células, marcado con Faloidina, Hoechst y segundo anticuerpo de Ki67 (sin primer anticuerpo). En (M), las flechas amarillas indican filamentos de actina de hGMSC unidos a la Faloidina. En (N) la flecha amarilla indica núcleos de hGMSC marcados con Hoechst y la flecha blanca indica autofluorescencia de color azul. (P, Q, R) Biomaterial de PCL/10BG con células, marcado con Faloidina, Hoechst y segundo anticuerpo de Ki67 (sin primer anticuerpo). En (P), las flechas amarillas indican filamentos de actina de hGMSC unidos a la Faloidina. En (Q) las flechas amarillas indican núcleos de hGMSC marcados con Hoechst.

7.3. Proliferación celular de hGMSC sembradas en biomateriales de PCL y PCL/10BG

Los resultados de la cuantificación del porcentaje de hGMSC sembradas sobre PCL y PCL/10BG, en proceso de proliferación, presentados en la Figura 22 indican que la tras 7 días del sembrado, un 4,4% y 7,8% de las células sembradas en PCL y PCL/10BG respectivamente, expresaban la proteína Ki67, indicando que se encontraban en proceso de proliferación celular. Si bien, se presenta mayor proliferación celular en las células sembradas en la condición PCL/10BG, no se presentan diferencias significativas entre condiciones a este tiempo. Luego, tras 14 días del sembrado se presentó un aumento en la cantidad de células cuantificadas que expresaban la proteína Ki67, presentando un 12% y 9% de células en proceso de proliferación celular para PCL y PCL/10BG respectivamente. Sin embargo, no se presentan diferencias significativas entre los grupos PCL y PCL/10BG tras 14 días del sembrado. Con respecto a la variable del tiempo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de 7 y 14 días en el grupo de PCL o PCL/10BG.

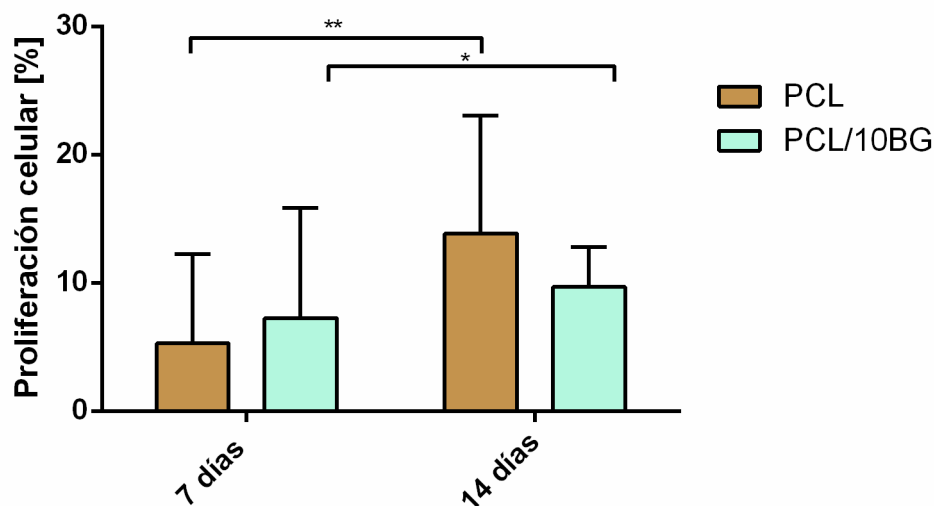


Figura 22. La proliferación celular aumenta entre los días 7 y 14 tras el sembrado de hGMSC en biomateriales de PCL y PCL/10BG.

Cuantificación del porcentaje de hGMSC que expresan la proteína Ki67 para evaluar cambios en la proliferación celular después de 7 y 14 días del sembrado sobre PCL y PCL/10BG. Las barras representan la media con la desviación estándar para todos los casos. Los corchetes representan la significancia estadística en una prueba de Dunn después de una prueba de Kurskal-Wallis (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$).

Las imágenes de fluorescencia representativas del marcaje de filamentos de actina, núcleos y proteína Ki67 se presentan en la Figura 23 para los tiempos de 7 y 14 tras el sembrado, para las condiciones de PCL y PCL/10BG. De esta manera, se observó tanto la confluencia con los filamentos de actina y núcleos, como las células en proceso de proliferación mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo Ki67.

En este contexto, tras 7 días del sembrado, las células se presentaron con una distribución irregular, tanto para el grupo PCL y PCL/10BG, mostrándose mediante la tinción nuclear Hoechst y actina (Figura 23 A-B, F-G). En ambas condiciones, se mostró la presencia de la proteína Ki67 en los núcleos celulares (Figura 23 C, H). La colocación de la tinción nuclear Hoechst y Ki67 se observó a un mayor aumento, identificándose la distribución de Ki67 en las zonas cercanas al límite del núcleo, tanto para las condiciones de PCL y PCL/10BG, pudiendo hacer referencia a la etapa del proceso de división celular en la que se encuentran las células (Figura 23 E, J).

Luego, tras 14 días del sembrado, las células presentaron una distribución uniforme en el biomaterial de PCL y PCL/10BG, observándose mediante la tinción nuclear Hoechst y actina. Adicionalmente, se observó un aumento en la confluencia en ambos materiales en comparación a los 7 días del sembrado (Figura 23 K-L, P-Q). Se observó la presencia de Ki67 para las condiciones PCL y PCL/10BG (Figura 23 M, R), con un aumento en la intensidad de fluorescencia en comparación al tiempo 1. La colocalización de la tinción nuclear Hoechst y Ki67 se observó a un mayor aumento, identificándose la distribución de Ki67 como puntos en el centro del núcleo (Figura 23 O, T), a diferencia de la localización a los 7 días del sembrado, mostrando una etapa de división celular distinta que a los 7 días.

Tras la cuantificación y análisis cualitativo de proliferación celular, los resultados en conjunto de esta sección muestran un aumento en la proliferación entre los días 7 y 14, tanto para las hGMSC sembradas en PCL como para las que fueron sembradas en PCL/10BG, sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significantes entre los grupos de distintos biomateriales. Así mismo, se observó un aumento en la confluencia entre los días 7 y 14 para ambos grupos de biomateriales, desde un 60% aproximadamente a un 100%. Con respecto a la autofluorescencia o marcaje inespecífico, se cuantificaron e identificaron los núcleos de las células en proceso de proliferación, a partir de la colocalización de los marcadores Hoechst y Ki67, pues, a pesar de que el marcaje nuclear con Hoechst se marque en el núcleo completo y la proteína Ki67 se exprese en zonas dentro de este, ambos se localizan en el núcleo celular.

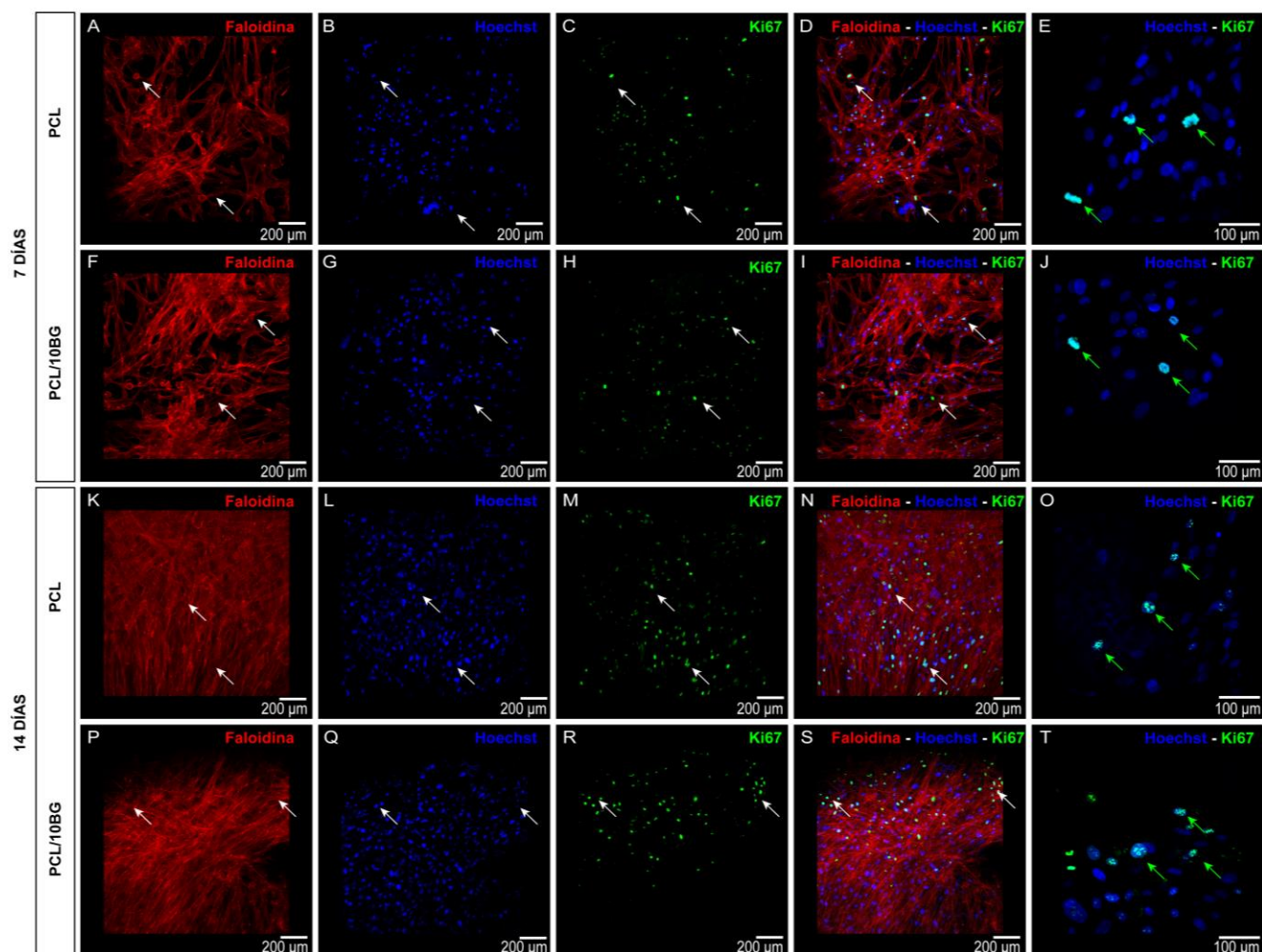


Figura 23. hGMSC presentan una mayor proliferación luego de 14 días del sembrado en PCL y PCL/10BG.

(A, B, C, D y E) y (F, G, H, I y J) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal después de 7 días del sembrado de hGMSC, sobre PCL y PCL/10BG respectivamente. (A y F) En rojo, marcador de F-actina con Faloidina. Las flechas blancas indican los filamentos de actina de hGMSC. (B y G) En azul, marcador nuclear Hoechst. Las flechas blancas indican núcleos de hGMSC. (C y H) En verde, marcador de proliferación Ki67. Las flechas blancas indican la expresión de la proteína Ki67, en núcleos de células que están en proceso de proliferación celular. (D e I) es la sobreposición de los canales (A, B y C) y (F, G y H) respectivamente. Las flechas indican células que se encuentran en proceso de proliferación, donde se identifican los filamentos de actina, núcleo y expresión de proteína Ki67. (E y J) Sobreposición del marcador nuclear Hoechst y de proliferación Ki67 en un aumento 60X de hGMSC sobre PCL y PCL/10BG respectivamente. Las flechas verdes indican los núcleos celulares que expresan la proteína Ki67, de células que se encuentran en proceso de proliferación celular. (K, L, M, N y O) y (P, Q, R, S y T) Imágenes

representativas de fluorescencia en microscopía confocal después de 14 días del sembrado de hGMSC, sobre CL y PCL/10BG respectivamente. (K y P) En rojo, marcador de F-actina con Faloidina. Las flechas blancas indican los filamentos de actina de hGMSC. (L y Q) En azul, marcador nuclear Hoechst. Las flechas blancas indican núcleos de hGMSC. (M y R) En verde, marcador de proliferación Ki67. Las flechas blancas indican la expresión de la proteína Ki67, en núcleos de células que están en proceso de proliferación celular. (N y S) es la sobreposición de los canales (K, L y M) Y (P, Q y R) respectivamente. Las flechas indican células que se encuentran en proceso de proliferación, donde se identifican los filamentos de actina, núcleo y expresión de proteína Ki67. (O y T) Sobreposición del marcador nuclear Hoechst y de proliferación Ki67 en un aumento 60X de hGMSC sobre PCL y PCL/10BG respectivamente. Las flechas verdes indican los núcleos celulares que expresan la proteína Ki67, de células que se encuentran en proceso de proliferación celular.

8. Análisis de morfología de hGMSC en el proceso de adhesión celular sobre biomateriales compuestos de PCL y PCL/10BG

Además de evaluar la viabilidad/citotoxicidad y proliferación celular, resulta fundamental profundizar en el proceso de adhesión celular, dado que este es uno de los primeros eventos tras la interacción célula material, pudiendo explicar y complementar los estudios previos.

Para analizar el proceso de adhesión celular, se cuantificó la morfología de las células adheridas al biomaterial de PCL y PCL/10BG en distintos tiempos de cultivo, a partir de la expresión de actina. Así, al unirse la Faloidina con los filamentos de actina, se marcó el citoesqueleto de las hGMSC y se utilizaron imágenes de microscopía de fluorescencia. Para esto, las imágenes se procesaron con software ImageJ para aislar células individuales.

Los descriptores evaluados en los 3 tiempos para medir la forma de las hGMSC, fueron redondez, AR, circularidad y solidez. De esta manera, la redondez y AR miden si las hGMSC presentan una forma circular o elíptica, mientras que circularidad y solidez cuantifican la formación de protrusiones del citoesqueleto de las hGMSC. Los resultados de la cuantificación de los descriptores de circularidad, AR, redondez y solidez se observan en la Figura 24 A, B, C, D respectivamente.

Para las condiciones experimentales (PCL y PCL/10BG), tras 1 y 5 horas del sembrado, los niveles de redondez y de AR cercanos a 1 indican que las células adheridas a los biomateriales mantienen una morfología mayormente redondeada. Luego, tras 24 horas del sembrado, se presenta

mayor variabilidad en la redondez, incluyendo valores más bajos, mientras que AR presenta valores más altos, indicando que se presentan células con morfología tanto circular como alargada. De esta manera, los resultados en estos descriptores fueron similares en los grupos de PCL y PCL/10BG, sin presentar diferencias significativas entre grupos. Los valores de cuantificación de las condiciones Control +, indican la presencia de hGMSC con morfología circular tras 1 hora del sembrado, observándose cómo a los tiempos 5 y 24 horas se observa una morfología mayormente alargada, presentando diferencias significativas entre los tiempos 1 y 24 horas, y con los grupos de PCL y PCL/10BG a los tiempos 5 y 24 horas.

Con respecto a los descriptores de circularidad y solidez, valores altos indican que las células no emiten protrusiones detectables, donde en valores cercanos a 0.5, se comienzan a observar estas. De esta manera, para los grupos de PCL y PCL/10BG, se observa un comportamiento similar sin presentar diferencias significativas entre grupos a través del tiempo. Sin embargo, se observó mayor variabilidad con respecto al tiempo en la circularidad, donde los valores se distribuyen de tal manera que indica que hay células tanto con protrusiones altamente detectables, como con protrusiones difíciles de detectar en los tiempos definidos. Luego, en relación con el grupo control, para comparar con los grupos experimentales, se observa una disminución significativa de los valores de circularidad y solidez con respecto al tiempo, indicando la formación distintiva de protrusiones, presentando así mismo en los tiempos de 5 y 24 horas, diferencias significativas con los grupos experimentales de PLC y PCL/10BG.

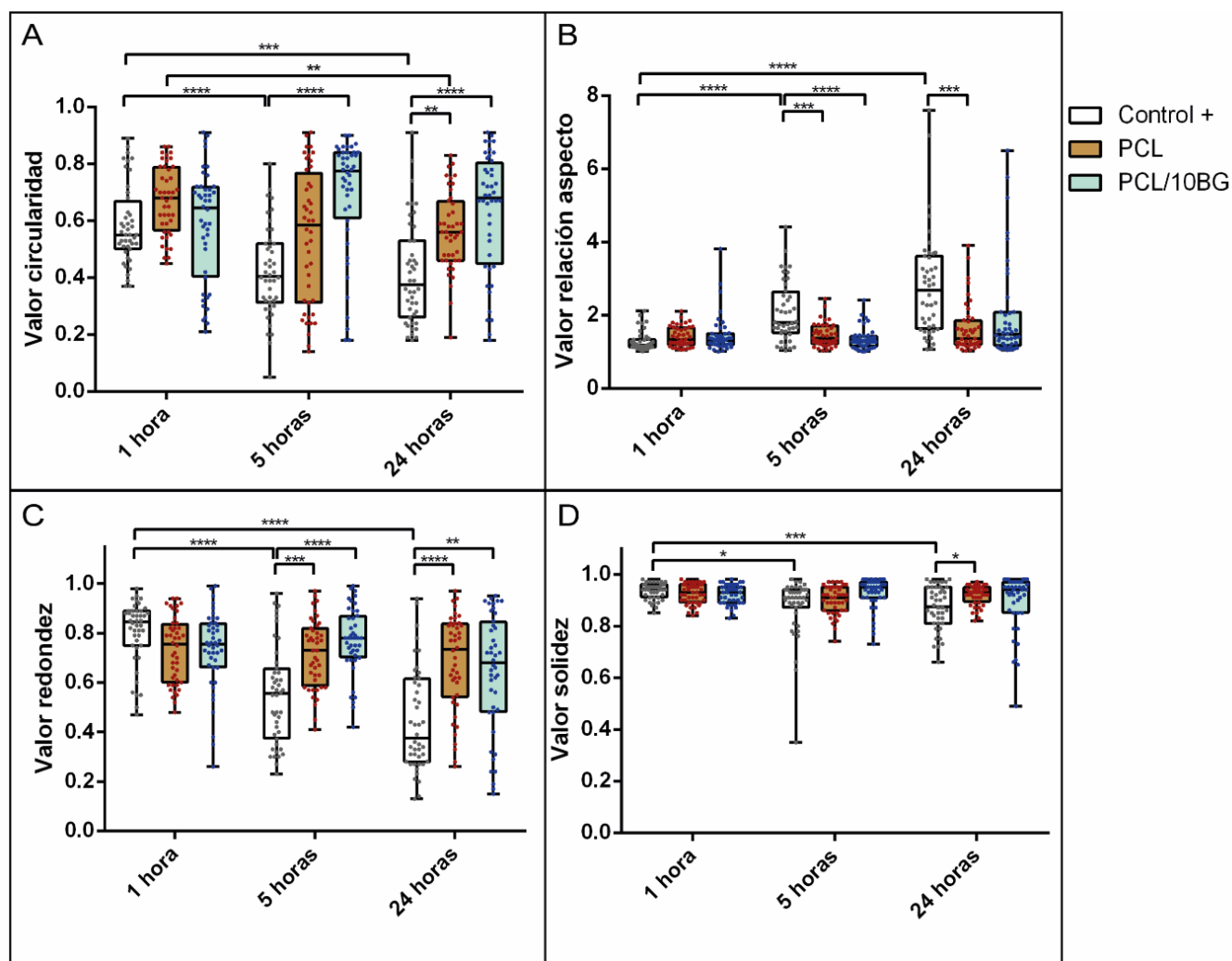


Figura 24. Descriptores de morfología de hGMSCs adheridas a biomateriales de PCL y PCL/10BG a distintos tiempos de cultivo.

Boxplot de los descriptores de morfología de hGMSCs que describen la distribución de los valores obtenidos para (A) Circularidad, (B) Relación de aspecto (AR), (C) Redondez y (D) Solidez. Los círculos grises, rojos y azules indican cada valor individual en para los grupos Control +, PCL y PCL/10BG respectivamente (n=40). En (A,B, C, D) los corchetes representan la significancia estadística en una prueba de Games Howell después de un Anova de Welch (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$).

Las imágenes de fluorescencia representativas del marcaje de filamentos de actina con Faloidina se presentan en la Figura 25 para los tiempos de 1, 5 y 24 horas tras el sembrado, para las condiciones de PCL y PCL/10BG.

Las hGMSC en cultivo celular suelen presentar una morfología fibroblastoide, la cual se caracteriza por tener un eje mayor bien definido, el cual se alinea con los filamentos de actina del citoesqueleto. Estos filamentos son estructuras que se acumulan debajo de la membrana plasmática, formando una red que proporciona un soporte estructural y define la forma de las células. Así, forman estructuras largas y paralelas que atraviesan el citoplasma de la célula desde un extremo a otro, reflejando de esta manera una orientación elongada de la célula. Ahora bien, en células recién adheridas, los filamentos suelen organizarse en la zona periférica de las células, formando una estructura circular.

A partir de esto, tras 1 hora de sembrar hGMSC en placa (grupo control), se observó una morfología más circular, donde los filamentos de actina se acumularon en la periferia (Figura 25 A). Tras 5 horas del sembrado, se observaron indicios de una reorganización de los filamentos de actina, en donde se comenzaron a orientar de manera paralela al eje mayor, pudiendo identificarse de manera alineada a un eje, pero al mismo tiempo, presentando en algunas células una organización intermedia entre la zona periférica y alineadas (Figura 25 D). Tras 24 horas del sembrado, es posible identificar los filamentos de actina que se encuentran alineados y paralelos al eje mayor, entregándole a las células un soporte que le permite adoptar una morfología alargada (Figura 25 G). Con respecto al grupo de PCL y PCL/10BG, a las 24 horas la organización de la actina refleja una morfología celular redondeada, con filamentos localizados en la periferia, configurando una estructura cortical que delimita un contorno circular (Figura 25 B, C). Tras 5 horas del sembrado de hGMSC sobre PCL y PCL/10BG, se observan cambios iniciales en la distribución de los filamentos de actina, evidenciándose en la formación de protrusiones o acumulación de actina en un extremo de la célula, lo cual se visualiza con una mayor intensidad del marcaje con Faloidina. Esto puede indicar un comienzo en la organización de los filamentos de actina (Figura 25 E, F). Tras 24 horas del sembrado de hGMSC sobre PCL y PCL/10BG, se observa una organización de los filamentos de actina en algunas células, donde, si bien no se identifican los filamentos y su dirección, se puede deducir debido a la orientación y morfología celular, cómo estos comienzan a organizarse en una dirección, dando un soporte a la forma de las células. Ahora bien, aún se presentan células donde la

actina no se ha alineado, manteniendo una organización periférica y por lo tanto, entrega un soporte que mantiene una morfología circular (Figura 25 H, I)

Con respecto a la formación de protrusiones y morfología celular que se describen en la cuantificación morfológica, tras 1 hora del sembrado, se observan las hGMSC de los grupos control, PCL y PCL/10BG con morfología más circular, en donde en el grupo control se están comenzando a formar pequeñas protrusiones (Figura 25 A). Para los grupos PCL y PCL/10BG, no se observan protrusiones (Figura 25 B, C). Tras 5 y 24 horas del sembrado, se observa que los filamentos de actina de las células del control, comienza a estirarse, con una morfología más alargada (Figura 24 D, G), mientras que en los grupos de PCL y PCL/10BG, a las 5 horas las células siguen con una morfología circular con protrusiones visibles (Figura 25 E, F), presentándose luego a las 24 horas, con los filamentos distribuidos de manera más variable, por lo que se observan tanto células circulares con protrusiones como células con morfología alargada (Figura 25 H, I).

En conjunto, estos resultados muestran cómo se modifica la morfología celular en el proceso de adhesión celular tanto en placa, como en biomateriales. Así, se observó la distribución de los filamentos de actina que conforman el citoesqueleto, y cómo estos se van organizando durante el proceso de adhesión celular, teniendo una influencia sobre la morfología y la orientación de las células dado que entregan el soporte a la forma celular.

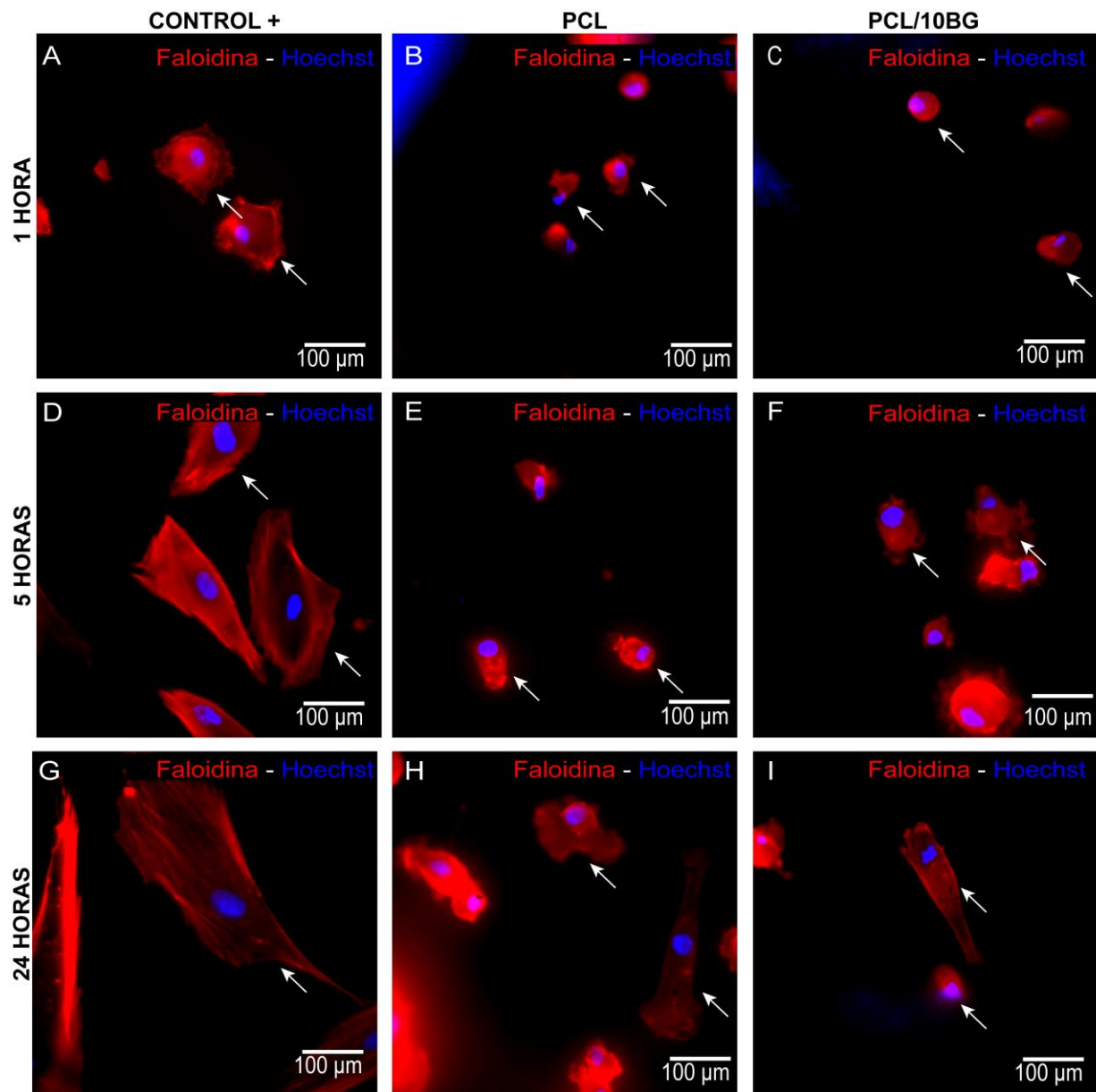


Figura 25. Cambios morfológicos y distribución de filamentos de actina de hGMSC en el proceso de adhesión celular, tras ser sembradas en PCL y PCL/10BG.

En rojo, marcador de F-Actina con faloidina y en azul, marcador nuclear Hoechst. (A, B y C) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal de hGMSC sembradas en placa (Control +), PCL y PCL/10BG respectivamente, tras 1 hora del sembrado. (A) Las células sembradas en el grupo control presentan una morfología circular con protrusiones detectables. Las flechas blancas indican una distribución de los filamentos de atina en la periferia. (B, C) Las células sembradas en PCL y PCL/10BG no presentan protrusiones, manteniendo una morfología circular. Las flechas blancas indican las células con filamentos de actina en la periferia, formando un soporte celular que entrega una forma circular. (D,

E y F) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal sembradas en placa (Control +), PCL y PCL/10BG respectivamente, tras 5 horas del sembrado. (D) Células sembradas en el grupo control presentan una morfología alargada. Las flechas blancas indican el inicio de la organización de los filamentos de actina de manera paralela al eje mayor, que comienza a dar una forma alargada a las células. (E, F) Las células sembradas en los grupos PCL y PCL/20BG permanecen con una morfología circular y presentan protrusiones. Las flechas indican la distribución de los filamentos de actina aún en la periferia, dando un soporte celular que entrega una morfología circular. (G, H e I) Imágenes representativas de fluorescencia en microscopía confocal de hGMSC sembradas en placa (Control +), PCL y PCL/10BG respectivamente, tras 24 horas del sembrado. (G) Las células sembradas en el grupo control presentan morfología mayormente alargada. La flecha blanca indica la organización de los filamentos de actina paralela al eje mayor, donde es posible identificar los filamentos de manera unidireccional. (H, I) Las células sembradas en PCL y PCL/10BG presentan variabilidad, con una morfología tanto circular como alargada. Las flechas blancas indican tanto células con los filamentos de actina organizados de manera paralela como en la periferia.

DISCUSIÓN

Los compuestos de PCL y BG tienen un alto potencial en para aplicaciones biomédicas. Sin embargo, se necesitan más estudios para optimizar su composición, estructura y propiedades para aplicaciones específicas y de esta manera, crear un biomaterial donde que permita mejorar su biocompatibilidad, con una alta resistencia mecánica (Dash et al., 2023). En este contexto, comprender la relación entre las propiedades del material y sus características microestructurales, tales como la cristalografía, morfología y composición química, es fundamental, ya que estos factores influyen en la biocompatibilidad al momento de interactuar con células (Sampath Kumar, 2013).

Caracterización química, morfológica y elemental de biomateriales de PCL y BG

En este estudio, se desarrolló un material compuesto de PCL y BG en concentraciones de 0, 10 y 20%, utilizando PCL comercial y BG sintetizado en base a (Sugumaran et al., 2022). El material se evaluó desde una perspectiva química, mediante análisis EDX y XRD, para analizar la composición de los biomateriales y verificar que las condiciones PLC/10BG y PCL/20BG incorporaran realmente partículas de BG, y cómo esta adición modificaba sus propiedades cristalinas y luego, su biocompatibilidad.

Los resultados obtenidos a partir del EDX, permitieron identificar los elementos presentes en los cuatro grupos de biomateriales (PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG), los cuales eran los componentes esperados de acuerdo con la literatura según cada grupo. En particular, en los biomateriales de PCL/10BG y PCL/20BG, se detectaron elementos como silicio (Si), calcio (Ca), sodio (Na) y fósforo (P), siendo consistente con la síntesis y caracterización de (Sugumaran et al., 2022) en la composición del BG sintetizado, mostrando además elementos que componen PCL - C, O. A partir de esto, la composición del BG caracterizado y presente en los biomateriales de PCL/10BG y PCL/20BG sería beneficiosa para la regeneración ósea, pues hace posible el desarrollo de enlaces con el hueso a partir de la formación de una capa de hidroxiapatita en la superficie, liberando iones de Si, Ca, P y Na, promoviendo la formación de tejido óseo al implantarse en el cuerpo vivo.

Ahora bien, en cuanto a la morfología y distribución del BG sobre el polímero de PCL, las imágenes SEM en los grupos de PCL/10BG y PCL/20BG presentaron zonas de aglomeraciones de BG en la superficie. Esto podría indicar que, si bien, las condiciones de PCL/10BG y PCL/20BG tienen un porcentaje en peso del 10 y 20% de BG, la distribución no es homogénea sobre toda la muestra por lo que, al analizar localmente distintas zonas del biomaterial, podrían encontrarse áreas con mayor contenido de BG que otras. De esta manera, se podría esperar que la interacción célula-biomaterial sea diferente en distintas zonas del biomaterial o bien, las aglomeraciones de BG pueda generar efectos adversos o toxicidad en las células debido a un alto porcentaje de este biocerámico en zonas del biomaterial, pues, de acuerdo a los resultados presentados en (Soto, 2017), donde se determinó que a mayores concentración de BG, la proliferación celular era menor.

Con respecto a la cristalinidad de los biomateriales compuestos, los resultados obtenidos a partir del estudio de cristalinidad mediante XRD, muestran un patrón característico que concuerda con los picos de los espectros reportados en (Vallejos Baier et al., 2021) para PCL y BG, presentando una estructura cristalina. Por lo tanto, al comparar ambos espectros es posible detectar los picos de las fases correspondientes al PCL y BG. Así, se verificó que la incorporación de partículas de BG modificó las propiedades cristalinas del PCL, lo cual es de suma importancia debido a que la cristalinidad puede controlar la degradabilidad y por lo tanto, bioactividad del BG debido a un mayor control en la liberación de iones, proporcionando nuevas terapias para aplicaciones médicas avanzadas (Montazerian et al., 2024).

Tratamiento de biomateriales para mejorar adhesión celular

Se llevó a cabo un tratamiento superficial en biomateriales de PCL/10BG, en el cual se utilizó acetona como solvente para tratar su superficie, en el cual los biomateriales se agitaron en 50 mL de acetona por 2 horas en un agitador magnético. El desarrollo de esta metodología fue en base a la escasa adhesión celular de hGMSC sobre biomateriales de PCL y PCL/10BG en estudios preliminares, en donde las células se adhirieron principalmente en zonas de mayor rugosidad o desnivel del biomaterial, como en excesos de filamentos o en el borde del biomaterial. De esta manera, el tratamiento superficial de acetona buscó aumentar la rugosidad del biomaterial mediante una metodología de bajo costo, de tal manera que se logró favorecer la adhesión celular de hGMSC sobre biomateriales compuestos de PCL y BG en toda la superficie.

En este contexto, se han desarrollado otras estrategias similares para aumentar el rendimiento biológico de polímeros de PCL mediante el uso de manufactura aditiva y tratamientos superficiales para agregar rugosidad en la superficie del biomaterial. En base a esto, en (W. Wang et al., 2020) se imprimieron andamios de PCL, los cuales se sumergieron en acetona pura a temperatura ambiente por 7 días, para formar estructuras porosas en la superficie de los filamentos. Adicionalmente, se agregó un grupo al cual se sometió al mismo tratamiento, agregándole luego un injerto de dopamina, generando una reacción química con el PCL. Los resultados de viabilidad celular en los tres grupos mostraron que en todos los casos se presenta una muerte celular menor al 15% a las 24 horas del sembrado. Sin embargo, se observaron menos células vivas adheridas en estructuras de PCL sin tratar, lo cual podría atribuirse a propiedades superficiales, resultando en una adhesión y propagación celular más débil en comparación a los grupos tratados con acetona y dopamina. Por otro lado, en cuanto a los días 1 y 3 tras el sembrado, todos los grupos presentaron un rendimiento biológico relativamente similar en términos de proliferación celular, notándose cambios al día 7, en donde las estructuras con tratamiento superficial de acetona e injerto de dopamina exhibieron una proliferación celular estadísticamente mayor que los andamios de PCL sin tratar. Así, estos resultados sugirieron que la presencia de una textura superficial porosa en andamios de PCL tratados con acetona, influye positivamente en la biocompatibilidad, aumentando la adhesión y proliferación celular, mostrando congruencia con los resultados obtenidos tras el tratamiento de acetona en los biomateriales de PCL/10BG trabajados.

Por otro lado, en (Kumar et al., 2012) se realizó un tratamiento superficial en los andamios con acetona y diclorometano. Tras el tratamiento, se tomaron imágenes SEM para observar la morfología superficial de los andamios con y sin tratamiento, en la cual se observa un aumento de rugosidad en andamios de PCL sumergidos en acetona. Tras ensayos biológicos, se demostró que la superficie rugosa de PCL tratado, favorecieron a la proliferación celular y, por lo tanto, validando un enfoque para la fabricación de andamios para optimizar la actividad de células madre.

En base a la literatura y resultados obtenidos, se validó la metodología utilizada para aumentar la rugosidad de los biomateriales compuestos de PCL y BG, presentándose un enfoque de bajo costo. Ahora bien, planteándose para un trabajo futuro, sería relevante estudiar profundamente los cambios de rugosidad mediante SEM o perfilómetro de contacto, para optimizar el protocolo.

Viabilidad y proliferación de hGMSC en biomateriales compuestos de PCL y BG

En este estudio, los biomateriales compuestos de PCL-BG en concentraciones de 0, 10 y 20% de BG (en peso) fueron sometidos a ensayos biológicos para evaluar la biocompatibilidad mediante distintas técnicas para tener un análisis más completo y comprender la interacción célula-biomaterial.

Se realizó un ensayo MTS como indicador de viabilidad celular, para evaluar la actividad metabólica a partir de la actividad mitocondrial de las hGMSC adheridas a los biomateriales a distintos tiempos. Con la absorbancia obtenida a las 24 horas del sembrado para las distintas condiciones, se calculó la eficiencia de adhesión celular, pues indicaría la actividad celular de hGMSC tras el proceso de adhesión celular. Se obtuvo una eficiencia de adhesión celular de 21%, 50%, 34% y 2% aproximadamente para PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG respectivamente. Es importante considerar que, en este contexto, los resultados de la absorbancia de los grupos PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG se normalizaron por el área del grupo de PCL, debido a que la superficie útil de cultivo celular era significativamente diferente entre los grupos, lo cual podría haber afectado en la cantidad de células adheridas por una menor disponibilidad de biomaterial para poder llevar a cabo este proceso. Sin embargo, uno de los inconvenientes al momento de realizar el experimento, fue desconocer el área que ocuparon las hGMSC sembradas en pocillos a las 24 horas del sembrado. Si bien, se conoce el área de la superficie útil en cada pocillo de una placa de 48 pocillos, no se conoce el área utilizada por las células al sembrar 20 uL de medio con hGMSC, por lo que la comparación de las células adheridas no es del todo exacta. De esta manera, para un futuro experimento o análisis, sería de importancia conocer el área en el que se sembraron las células para normalizar los resultados en caso de tener biomateriales con distinta superficie útil para cultivo celular. Adicionalmente, un factor importante a considerar es el material en el cual fueron sembradas las células para el grupo Control+. Si bien, es un material con características diferentes en comparación a los grupos de PCL y BG, la superficie de las placas de cultivo ayuda a fomentar una adhesión celular máxima, lo cual justifica la referencia de un 100% de adhesión celular como grupo control.

Siguiendo la misma metodología, en (Vallejos et al., 2021) se evaluó el porcentaje de eficiencia de adhesión celular de hGMSC sembradas sobre andamios porosos PCL con 0 y 20% de BG. Los resultados revelaron una adhesión celular similar, con valores cercanos al 40% del control, complementándose por la caracterización del PCL como un material hidrófobo, por lo que poseería

un bajo potencial de adhesión celular. Estos resultados difieren principalmente del resultado de adhesión celular en el grupo de PCL/20BG, evidenciado por una baja viabilidad celular obtenida. Estas diferencias se podrían explicar en base a los resultados obtenidos en la caracterización morfológica del biomaterial, en donde se observaron aglomeraciones de BG en la superficie del biomaterial de PCL/20BG, lo cual, como se mencionó en la sección anterior, podría generar un alto contenido de BG en zonas específicas del biomaterial, expresando un mayor porcentaje al 20% de BG en focos donde se presenta la interacción célula-biomaterial. Dado que se han realizado estudios de biocompatibilidad mediante microscopía de barrido (SEM) para evaluar adhesión y morfología de hGMSC sembradas en biocerámicos (Benjumeda Wijnhoven et al., 2020), sería conveniente seguir esta metodología para analizar la superficie en la cual las células están adheridas, y por lo tanto, verificar si es que se encuentran en zonas de aglomeraciones de BG. Al mismo tiempo, estudios de citotoxicidad mediante marcaje de células vivas y muertas podría entregar indicios de la viabilidad celular al momento de interactuar con biomateriales.

Otro aspecto relevante al evaluar la eficiencia de adhesión celular en biomateriales de PCL y BG, fueron las diferencias estadísticamente significativas que se obtuvieron entre los grupos PCL y PCL/ACE, lo cual podría indicar la influencia de los métodos de preparación del biomaterial en su desempeño biológico. Para estudios de biocompatibilidad en muestras de PCL con distintos métodos de preparación entre ellos, entre ellos, PCL puro y PCL con acetona, se evaluó la actividad metabólica tras 1, 3 y 7 días de cultivo, descartando posibles efectos de los métodos utilizados, dado que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ningún tiempo (Contreras et al., 2025). Si bien, estos resultados difieren de los presentados en esta investigación, es relevante mencionar que las muestras de ambas investigaciones presentan diferencias, pues, en el presente estudio, tanto los biomateriales de PCL como PCL/ACE se sometieron a un tratamiento superficial adicional de acetona, aumentando las variables para comparar con (Contreras et al., 2025). De esta manera, se sugiere para trabajo a futuro, realizar un análisis que evalúe efectos en las propiedades químicas de muestras preparadas con distintos métodos, antes y después del tratamiento superficial de acetona.

Con respecto a los cambios en la actividad metabólica celular en relación con el tiempo, en el grupo PCL se observó un aumento tras 14 días del sembrado de hGMSC, mientras que en el grupo PCL/ACE se presentó un aumento en los 3, 7 y 14 días. En el grupo de PCL/10BG, se presentó un aumento en la viabilidad celular al día 14 evaluado a partir del metabolismo celular, sin embargo,

no se presentaron diferencias significativas con respecto a los días 3 y 7. Finalmente, a pesar de que el grupo PCL/20BG evidenció un leve aumento tras 7 días del sembrado, la actividad metabólica fue significativamente menor en comparación a otros grupos experimentales. El ensayo MTS se basa en la conversión de una sal de tetrazolio en un producto de formazán soluble, mediante la actividad mitocondrial de las células, indicando que hay actividad celular y por lo tanto, las células están vivas. De esta manera, al hablar de la teoría, la cantidad de producto de formazán que se obtiene es proporcional al número de células viables (Malich et al., 1997), por lo que al haber una mayor cantidad de producto, se esperaría a tener una mayor cantidad de células vivas. De esta manera, de acuerdo con este supuesto, los resultados obtenidos indicarían que un aumento en la actividad metabólica a los 14 días en el grupo PCL, PCL/ACE y PCL/10BG, podría relacionarse a un aumento en la cantidad de células vivas, lo cual significaría una mejora en la viabilidad celular al aumentar los días tras el sembrado en los biomateriales de estas condiciones. Por otro lado, de acuerdo con la teoría, bajos niveles de formazán, asociados a una baja actividad metabólica, indicarían una baja viabilidad celular la cual puede asociarse tanto a un proceso de adhesión ineficiente como también podría asociarse a efectos tóxicos del biomaterial con 20% de BG, el cual podría provocar muerte celular.

En un estudio se analizaron los cambios en la actividad metabólica celular sobre PCL y PCL con 20% de BG, identificándose como proliferación celular (Vallejos et al., 2021). Se demostró que a los 7 días la señal en la condición de BG al 20% aumentó, aunque a los 14 días esta señal disminuye en comparación con el control, lo cual se evidencia también en el presente estudio, mientras que los grupos de PCL, PCL/ACE y PCL/10BG mostraron un aumento a los 14 días. Con respecto a la baja actividad metabólica en el grupo PCL/20BG, y al mismo tiempo la disminución de actividad al día 14 en el grupo con 20% de BG con respecto al control, en (Vallejos et al., 2021) fundamenta que sobre concentraciones de 20% de BG, las propiedades biológicas pueden disminuir en biomateriales cerámicos.

En otros estudios, se analizó la adhesión y proliferación celular de osteoblastos sobre biomateriales de PCL, quitosano y concentraciones de 0, 1, 3 y 5% de BG (en peso) (Haddadi et al., 2023). Se demostró que, tras 1 día del sembrado, se presentaron diferencias significativas en la viabilidad celular entre los grupos PCL y PCL-BG3%, y PCL-BG3% y PCL-BG5%, con una viabilidad mayor en el grupo PCL-BG3%, seguida de PCL-BG5%, PCL-BG1%, y PCL. Luego, tras 3 días de cultivo, el grupo de PCL-BG3% presentó una diferencia de viabilidad celular con otros

grupos que se hizo más considerable, donde se concluyó que presentó un número de células estadísticamente significativa mayor en comparación a otros grupos. Esto demuestra que la adición de BG en muestras de PCL y quitosano benefició a la adhesión celular, presentando un valor óptimo de 3% de BG, evidenciando la importancia de la optimización de la concentración de los biomateriales para su desempeño biológico. Los resultados obtenidos en el presente estudio, junto con los hallazgos reportados en (Haddadi et al., 2023), evidencian una tendencia consistente con respecto al efecto de la concentración de BG sobre la viabilidad celular en el tiempo, pues, estos resultados en conjunto sugieren que aun que la presencia de BG puede mejorar las propiedades biológicas de un biomaterial, elevadas concentraciones podrían inducir efectos adversos. Así, definir una concentración adecuada de BG en biomaterial compuesto se convierte en un factor crítico para maximizar la funcionalidad del biomaterial para su futura aplicación.

Con respecto a los experimentos que evalúan la actividad metabólica como MTS o MTT, en la literatura estos se han utilizado como indicadores de proliferación celular (Haddadi et al., 2023) (Vallejos et al., 2021), debido a que, como se ha mencionado anteriormente, teóricamente estos ensayos relacionan el aumento de producto de formazán producido por la actividad metabólica celular, con una mayor cantidad de células viables (Malich et al., 1997), por lo que, al aumentar el producto en relación al tiempo, teóricamente indicaría un aumento en la cantidad de células viables. Sin embargo, es importante mencionar existen distintos factores que pueden afectar al metabolismo celular, a pesar del número de células adheridas a un biomaterial. Por esto, para utilizar el concepto de proliferación celular al evaluar de cambios metabólicos, es importante complementarlo con otros estudios para validar la combinación de conceptos. Es por esto que, para complementar el estudio de viabilidad celular, se realizó un estudio de proliferación celular a partir de marcadores de la proteína Ki67, ya que su expresión está asociada a las etapas del ciclo celular, por lo que actúa como indicador de proliferación celular (Sun & Kaufman, 2018).

Los resultados del estudio de cuantificación y análisis cualitativo del proceso de proliferación de hGMSC sembradas sobre PCL y PCL/10BG, indicaron que tanto al día 7 del sembrado como al 14, había proliferación celular. Si bien, no se presentaron diferencias significativas entre los grupos de PCL y PCL/10BG en este ámbito, sí se presentó un aumento en la proliferación celular significativo entre los días 7 y 14, demostrándose por un aumento de la cantidad de núcleos marcados con expresión de la proteína Ki67, al mismo tiempo que un aumento en confluencia de ambos biomateriales, alcanzando aproximadamente un 100% de confluencia a los 14 días. De esta manera,

si es que se evidenció un aumento en la proliferación celular hasta alcanzar un 100% de confluencia en los biomateriales de PCL y PCL/10BG, al combinarse con el análisis de viabilidad celular a partir de la actividad metabólica, se puede decir que los cambios en el tiempo en esta variable sí reflejaron un aumento en la proliferación celular. Esto implica que tanto el PCL como PCL/10BG son capaces de promover la proliferación de hGMSC con respecto al tiempo, alcanzando un 100% de confluencia en la superficie de los biomateriales a los 14 días de cultivo. Si bien, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, el aumento en la expresión de la proteína Ki67 entre los días 7 y 14 indicaron un proceso de proliferación activo, indicando entonces, que los cambios en la viabilidad celular a partir de la actividad metabólica de hGMSC se puede considerar como un reflejo de la proliferación celular en este contexto.

Cabe mencionar que, si bien en la literatura se ha utilizado el marcaje de la proteína Ki67 para evaluar proliferación celular en biocerámicos (Benjumedá Wijnhoven et al., 2020), hasta el momento no se ha encontrado literatura que describa cuantitativa o cualitativamente la proliferación en biomateriales de PCL y BG mediante el marcaje de la proteína Ki67.

Retomando la baja viabilidad celular, reflejada en escasa adhesión y proliferación en el grupo de PCL/20BG, se realizó un estudio de citotoxicidad para evaluar las células muertas y viables en todas las condiciones experimentales, de tal manera que se puede comprender con mayor profundidad la interacción biomaterial-célula. Los resultados de este estudio revelaron que en el grupo PCL/20BG, se presentó una muerte celular de un 60% a las 24 horas y 5 días tras el sembrado, sin presentar cambios significativos con el tiempo. Esto podría demostrar que un material de PCL y concentraciones elevadas de BG, pueden ser tóxico para las células, lo cual puede generar muerte celular o potenciar fallas metabólicas. Así mismo, este estudio justifica la baja viabilidad celular en el análisis de actividad metabólica que describirían la adhesión y proliferación celular. Al mismo tiempo, si bien, la viabilidad celular en el grupo PCL/10BG es menor a la viabilidad en grupos de PCL puro, la actividad metabólica de las células no se vio afectada hasta el día 7. Sin embargo, al momento comparar los resultados de viabilidad celular entre el día 7 y 14, medida mediante actividad metabólica, un aumento en esta variable podría indicar también una disminución de citotoxicidad del biomaterial, tras la proliferación celular evidenciada a partir de los resultados del marcaje de la proteína Ki67. De esta manera, un aumento significativo en la proliferación celular de un biomaterial podría indicar la disminución de la citotoxicidad de este. En este contexto, en (Podgórski et al., 2022) se analizó la citotoxicidad de distintos polímeros, entre esos, PCL, tras 1, 3

y 7 días de cultivo. Al realizarse un recuento de células vivas y muertas, se reveló que, al aumentar la cantidad de células con respecto al tiempo, la proporción de células muertas con respecto a las células vivas disminuyeron en biomateriales de PCL. Así mismo, en (Anselmi et al., 2024) se realizó un análisis de viabilidad/citotoxicidad de células de la pulpa dental humanas sembradas sobre biomateriales de PCL, PCL + quitosano, PCL + hidroxiapatita, entre otros materiales. Así, al transcurrir los tiempos de cultivo desde 1, 7 a 14 días del sembrado, se observó un aumento en la viabilidad celular en todos los grupos experimentales, donde los grupos de PCL + quitosano y PCL + hidroxiapatita, aumentaron aún más la viabilidad celular en comparación al grupo de PCL. A partir de lo anterior, para futuros experimentos, sería conveniente analizar la citotoxicidad de los biomateriales a tiempos mayores, como, por ejemplo, 14 días, en los cuales se presencia una proliferación celular. Con esto, un análisis de proliferación celular se podría complementar con un estudio de citotoxicidad en tiempos donde existe una mayor confluencia celular sobre el biomaterial, ya que con esto se daría paso al estudio de diferenciación de hGMSC a células osteogénicas. Al mismo tiempo, se observó que la biocompatibilidad de un biomaterial compuesto de PCL se ve afectada al agregar distintas concentraciones de BG, donde una alta concentración de biovidrio generaría efectos tóxicos sobre las células, de acuerdo con los resultados obtenidos de ensayos de viabilidad y citotoxicidad. Así, al relacionar estos resultados con la hipótesis planteada, se podría decir que un 20% de biovidrio se aleja de la concentración óptima que permitiría una mejora en la biocompatibilidad, provocando efectos adversos. Por otro lado, la adición de un 10% de BG en un biomaterial de PCL, no se consideraría como una estrategia óptima para mejorar la viabilidad celular y, por lo tanto, disminuir la muerte celular a tiempos cortos, dado que la viabilidad celular se mantuvo menor al grupo de PCL hasta los 7 días. Sin embargo, a partir de la literatura y debido al aumento en la proliferación celular y en la viabilidad celular a los 14 días del sembrado, podría sugerir que, a tiempos prolongados, la adición de un 10% de BG podría beneficiar a la biocompatibilidad de un biomaterial de PCL. Así mismo, sería pertinente evaluar biomateriales con una concentración con un contenido intermedio de BG (por ejemplo, 5%), con el fin de determinar si se logra disminuir la muerte celular a tiempos cortos y mantener o mejorar la viabilidad celular a tiempos más largos.

Cambios morfológicos y organización de filamentos de actina

Dentro del ámbito de ingeniería de tejidos para la regeneración ósea, el proceso de adhesión celular al biomaterial es de suma importancia para mantener la viabilidad celular y promover una rápida proliferación y capacidad de diferenciación osteogénica (Przekora, 2019). En este proceso, los filamentos de actina intracelulares desempeñan un papel importante, ya que proporcionan soporte mecánico interno, funcionan como guía para el movimiento intracelular y generan fuerza para mantener la forma celular (J. Wang et al., 2016).

Una vez que las células se vuelven esféricas tras la tripsinización, se siembran en un biomaterial, se adhieren y se expanden con el tiempo (J. Wang et al., 2016). En este proceso, las células con una morfología circular, se extiende su membrana en la superficie del biomaterial adoptando una morfología alargada (Xi & Y. Chen, 2013).

Para determinar cómo cambia la morfología de las células durante el proceso de adhesión, se analizó el cambio morfológico del citoesqueleto y la organización de la actina. Adicionalmente, se realizó una cuantificación de descriptores de morfología, los cuales se utilizan principalmente para describir y caracterizar el tamaño y forma de las células, abarcando en este estudio cuatro descriptores: Circularidad, AR, Solidez y Redondez, que permiten realizar un análisis detallado las diferencias morfológicas entre grupos. Sin embargo, existen distintos estudios en los cuales se han estudiado los cambios morfológicos de MSC, en los cuales no se ha aplicado la cuantificación de descriptores de morfología, si no que se han utilizado imágenes SEM o de fluorescencia para analizar de manera cualitativa (Kotobuki et al., 2005a), (Guida et al., 2013), (R. Xu et al., 2018).

De acuerdo con los resultados cualitativos obtenidos en el presente estudio, las hGMSC se adhirieron tempranamente, tras 1 hora del sembrado, a lo largo de la superficie de los biomateriales de PCL y PCL/10BG. Como era de esperarse, la morfología inicial de las células se observó redondeada, seguido de presencia de protrusiones luego de 5 horas, hasta alcanzar una morfología alargada y aplanada (fibroblastoide) a las 24 horas de cultivo, ocupando una mayor área en la superficie de los biomateriales. A partir de esto, se sugirió que las hGMSC pueden adherirse, propagarse y proliferar biomateriales de PCL y PCL/10BG, mostrando un comportamiento similar al interactuar con otros biocerámicos utilizados para regeneración ósea. Sin embargo, al no notarse diferencias significativas entre los grupos de PCL y PCL/10BG, se puede decir que, en el proceso de adhesión celular a tiempos cortos, la adición de un 10% de BG a un biomaterial de PCL no entrega beneficios significativos. Esto se podría deber tanto a que en tiempos cortos no se logran

evidenciar los efectos del BG sobre la biocompatibilidad, o bien, la concentración definida no es óptima como para evidenciar cambios, por lo que sería relevante considerar para futuros experimentos, evaluar el proceso de adhesión incluyendo tiempos más largos, o realizar los ensayos de biocompatibilidad con una concentración de BG intermedia, como, por ejemplo, un 5%.

En un estudio previo, se evaluaron los cambios morfológicos de MSC sembradas sobre hidroxiapatita. Este estudio demostró que en una etapa temprana (1 hora después del sembrado de células), muchas células se adhirieron, mostrando una propagación celular evidenciada a partir de células redondas sobre la cerámica. Luego de 5 horas del sembrado, la adhesión y propagación fue más evidente, observándose una expansión de las células sobre el cerámico. Tras 1 día del sembrado, las MSC adoptaron una morfología característica del grupo celular, con una morfología alargada y aplanada, demostrando que las MSC pueden adherirse, propagarse y proliferar en cerámicas de hidroxiapatita (Kotobuki et al., 2005a). Estos hallazgos se presentaron de manera similar en el presente estudio, en el cual se observó el proceso de adhesión y cambios morfológicos de hGMSC sembradas sobre PCL y PCL/10BG. Las células adheridas en etapas tempranas mostraron una morfología redondeada, donde a tiempos más largos del sembrado se mostró una propagación de las células sobre los biomateriales, formando protrusiones. Sin embargo, a diferencia de las MSC sembradas sobre hidroxiapatita, al cumplir las 24 horas del sembrado sobre PCL y PCL/10BG, las hGMSC presentaron una morfología variable, en la cual algunas células aún poseían morfología circular y otras más alargadas, lo que podría evidenciar que el proceso de adhesión sobre PCL y PCL/10BG es más lento.

Con respecto a la organización de la actina, (J. Wang et al., 2016) resume los cambios morfológicos durante el proceso de adhesión, comparando la una línea celular de osteoblastos con fibroblastos. Inicialmente, muestra un núcleo rodeado uniformemente por una capa de actina, seguido por la formación de bandas periféricas densas tras 40 minutos del sembrado, las cuales se expanden. A partir de esto, se comienzan a formar los filamentos de actina, los cuales aumentan continuamente, llevando a un alargamiento de las células debido a la alineación de los filamentos a las 24 horas del sembrado en dirección del eje mayor de las células. Estos resultados se alinean a los obtenidos en el grupo del Control + de hGMSC sembradas en placa, demostrando la organización de filamentos de actina de acuerdo con lo reportado en la literatura. Ahora bien, en relación con los grupos experimentales de PCL y BG, estas observaciones se presentan de manera tardía, pues, tras 5 horas del sembrado, aún se observan algunas células con el núcleo rodeado de una capa de actina,

mientras que a las 24 horas se observan tanto la formación de bandas periféricas, como también se comienza a ver las células comienzan a expandirse y alargarse. Sin embargo, no se logra identificar los filamentos de actina con claridad, en comparación al grupo control. Con esto, se podría decir que las células sembradas en PCL y PCL/10BG, aún no logran formar en todas las células los filamentos de actina que permiten adoptar una morfología característica de las hGMSC, lo cual podría al mismo tiempo afectar a los estudios realizados previamente en relación con la viabilidad/citotoxicidad y proliferación celular. De esta manera, al relacionar los experimentos, se puede notar la importancia del proceso de adhesión para una correcta proliferación celular, pues, una adhesión celular tardía en los biomateriales compuestos de PCL y BG, podría explicar que el aumento de proliferación celular se comienza a reportar tras 7 y 14 días del sembrado, pues, en períodos anteriores, las hGMSC podrían haber estado aún en el proceso de adhesión celular y organización de filamentos de actina.

En el contexto de cuantificación de descriptores, tras 1 y 5 horas del sembrado, la cuantificación de redondez y AR sobre las hGMSC sembradas sobre PCL y PCL/10BG, indicaron que las células adheridas mantuvieron una morfología mayormente redondeada, presentando protrusiones recién detectables a las 5 horas en ambos grupos, de acuerdo con la cuantificación de circularidad y solidez. Luego, tras 24 horas del sembrado fue posible identificar a partir de los descriptores, una morfología variable, en la cual se presentaban células con una forma circular con protrusiones, al mismo tiempo que otras células presentaban una morfología alargada.

Al centrarse en la circularidad, se observó entre grupos que, el valor de la mediana bajó levemente con respecto al tiempo para el grupo control, PCL y PCL/10BG, como era de esperarse, tal como se reporta en (J. Wang et al., 2016). En este estudio, se analizaron los cambios morfológicos y de la organización de los filamentos de actina. La cuantificación de circularidad indicó que, en tiempos menores a 1 hora, las células presentan un valor que asciende a 1, revelando que, desde los 10 minutos hasta cumplir 60 minutos tras el sembrado, se caracterizan por no presentar protrusiones, acercándose a un círculo perfecto. Sin embargo, a partir de los 60 minutos hasta 24 horas tras el sembrado, la circularidad disminuye hasta alcanzar un valor de 0.8 aproximadamente, mientras que las hGMSC sembradas sobre PCL y PCL/10BG presentan un valor de 0,7 aproximadamente. Ambos resultados indican la formación de protrusiones. Ahora bien, comparando estos resultados con los valores de circularidad de células sembradas en placa (grupo control), aún son significativamente más altos. De esta manera, comparándose con la literatura, el proceso de adhesión celular y cambios morfológicos que este conlleva de hGMSC sobre PCL y PCL/10BG se mantuvo cuantitativamente

cercano a los valores esperados. Sin embargo, al no presentarse diferencias significativas entre los grupos PCL y PCL/10BG, no se considera el un 10% de BG como una concentración óptima para beneficiar los cambios morfológicos en los tiempos estudiados del proceso de adhesión celular que forman parte de la biocompatibilidad.

Al mismo tiempo, las imágenes de fluorescencia permitieron observar el aumento en el área de las células en el proceso de adhesión celular sobre PCL y PCL/10BG, lo que significa que en el proceso de expansión y adoptar una morfología estirada, el área de las células aumenta. Estos resultados son congruentes con los resultados expuestos en (J. Wang et al., 2016), donde se cuantificó el área de las células a partir de los 10 minutos tras el sembrado, hasta cumplir 24 horas.

Con respecto al parámetro AR, este compara el eje mayor con el eje menor de la célula, de tal manera que inicialmente, cuando las células poseen una morfología circular, el AR se acerca a 1, mientras que al adoptar la morfología características de hGMSC, las células se irán alargando y, por lo tanto, el AR aumentará con el tiempo. Este aumento fue detectado en el grupo control al aumentar el tiempo tras el sembrado. Sin embargo, en los grupos de células sembradas sobre PCL y PCL/10BG, la cuantificación de AR presentó resultados variados a las 24 horas, dada la variabilidad en la morfología celular, en donde se presentaron tanto células alargadas como circulares.

Con respecto a la cuantificación de redondez, en (Uynuk-Ool et al., 2017) se describe que un valor alto en redondez caracteriza una forma más redondeada. En relación con esta descripción, el grupo control de hGMSC sembradas en placa, indican que presentaron cambios en su morfología desde una más circular, mientras que a las 5 y 24 horas el valor de redondez disminuyó, demostrando cómo esta fue alargándose durante el proceso de adhesión. Con respecto a los grupos de PCL y PCL/10BG, si bien, los valores de redondez no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tiempo, se presentó una mayor variabilidad, en la cual se presentaron valores más bajos en comparación a tiempos anteriores. Así, se demostró mediante cuantificación, que a las 24 horas algunas células presentaban una morfología más alargada y otras aún circulares.

En este mismo contexto, en el mismo estudio, el parámetro de solidez se utiliza para evaluar los bordes celulares, asociadas a las formaciones de protrusiones. De esta manera, un valor cercano a 1 se asocia a un borde celular más liso, mientras que un valor cercano a 0.7 se asocia a un borde con protrusiones o menos liso (Uynuk-Ool et al., 2017). Al comparar los estándares presentados por la literatura con los resultados obtenidos en el presente estudio, se presentaron las diferencias se presentaron en el grupo control, demostrando resultados esperados de acuerdo con cómo cambia la

morfología celular de hGMSC en condiciones ideales. Sin embargo, al no presentarse diferencias significativas entre los grupos de PCL y PCL/10BG con respecto al tiempo, se asume que a pesar de que los bordes celulares presenten protrusiones de acuerdo con los resultados cualitativos y de circularidad, estos son poco detectables.

Con respecto a este análisis, se puede decir que, en etapas tempranas de la adhesión celular, no se presentan diferencias cualitativas y estadísticamente significativas entre hGMSC sembradas en PCL y PCL/10BG, por lo que, a tiempos cortos, la adición de BG sobre PCL no parece influir en el proceso de adhesión celular. Sin embargo, al compararse estos resultados con el grupo control, se observa una diferencia en el proceso de adhesión celular, tanto en los descriptores de morfología, como análisis cualitativo de morfología y organización de los filamentos de actina. En este proceso, la distribución y alineación de los filamentos se observó con un efecto retardado en grupos de PCL y PCL/10BG, en comparación al grupo control, así como también lo indican los descriptores de morfología. Esto indica que las hGMSC pueden adherirse, propagarse y proliferar biomateriales de PCL y PCL/10BG, pero su proceso de adhesión celular es más lento, pues, en estudios de confluencia y proliferación, los resultados cualitativos mostraron una morfología alargada a los 7 días, y un aumento en la proliferación a los 14 días tras el sembrado, lo cual no habría sido posible sin una adhesión celular efectiva. De esta manera, con relación al proceso de adhesión celular, la adición de un 10% de BG sobre biomateriales de PCL, no demostró tener efectos sobre este, lo cual, como se ha mencionado anteriormente, podría indicar que no se evidencian cambios a tiempos cortos por lo que el estudio en el proceso de adhesión se podría realizar agregando más tiempos después de las 24 horas del sembrado para visualizar cambios morfológicos hasta que un número de células importante alcance la morfología esperada, o bien, la concentración de BG no es la óptima para mejorar las distintas aristas que abarcan la biocompatibilidad.

Con lo anterior, es relevante comprender la relación entre las propiedades estructurales de los biomateriales y cómo estos influyen en la biocompatibilidad al momento de interactuar con células, pues, esta es esencial para el desarrollo de dispositivos médicos y/o biomateriales. Desde un punto de vista ingenieril, el estudio de biocompatibilidad de biomateriales se enfoca en cómo sus propiedades estructurales, fisicoquímicas y mecánicas afectan a su interacción con su entorno biológico, para contribuir al funcionamiento correcto de un implante o andamio. De esta manera, la relevancia de este concepto recae en la comprensión de la interacción entre las células y biomateriales, y cómo cada interacción puede complementarse, y dar paso a un nuevo proceso. Así

es como, en la Figura 26, se observa un modelo biológico que explica brevemente el proceso de interacción entre las células y biomateriales, desde el momento de sembrado de hGMSC sobre un biomaterial de PCL/10BG, hasta la proliferación celular, destacando las observaciones principales de cada proceso. Así es como, cada uno de los procesos evaluados se complementa entre sí, influyendo sobre los distintos aspectos de biocompatibilidad abarcados. Finalmente, tras el día 14 del sembrado de hGMSC sobre PCL/10BG, se presenta la posibilidad de evaluar el proceso de diferenciación celular, la cual no fue abarcada en este estudio, pero se plantea como trabajo a futuro para completar el análisis con el estudio en uno de los aspectos destacados del BG.

En este estudio se demostró que la incorporación de una concentración de 10% de BG en biomateriales de PCL, mantiene una biocompatibilidad comparable a la de PCL puro, mientras que una concentración de un 20% de BG generó efectos citotóxicos sobre hGMSC. A partir de esto, en términos de adhesión y viabilidad celular, no se observaron diferencias significativas entre grupos de PCL y PCL/10BG, sin embargo, se mostró un aumento en la proliferación celular en ambos grupos entre los 7 y 14 días tras el sembrado, confirmando que estos biomateriales permiten una correcta adhesión y proliferación celular. En conjunto, los resultados evidencian la relevancia de optimizar la concentración de BG en biomateriales compuestos para mantener o mejorar su biocompatibilidad. Por lo tanto, se presentan desafíos para un trabajo a futuro, para encontrar una concentración de BG que tenga efectos que beneficien las distintas aristas que abarca la biocompatibilidad, pues, ya se conoce que un 20% de BG genera efectos adversos, y que un 10% de BG en un biomaterial de PCL presenta una biocompatibilidad similar un biomaterial de PCL puro, por lo que podría evaluarse a futuro una concentración menor de BG, como un 5%. Así mismo, otro paso a seguir a partir de este trabajo sería evaluar el proceso de diferenciación de hGMSC a células osteogénicas, el cual permitiría evaluar la funcionalidad del biomaterial compuesto de PCL y BG para la regeneración de tejido óseo.

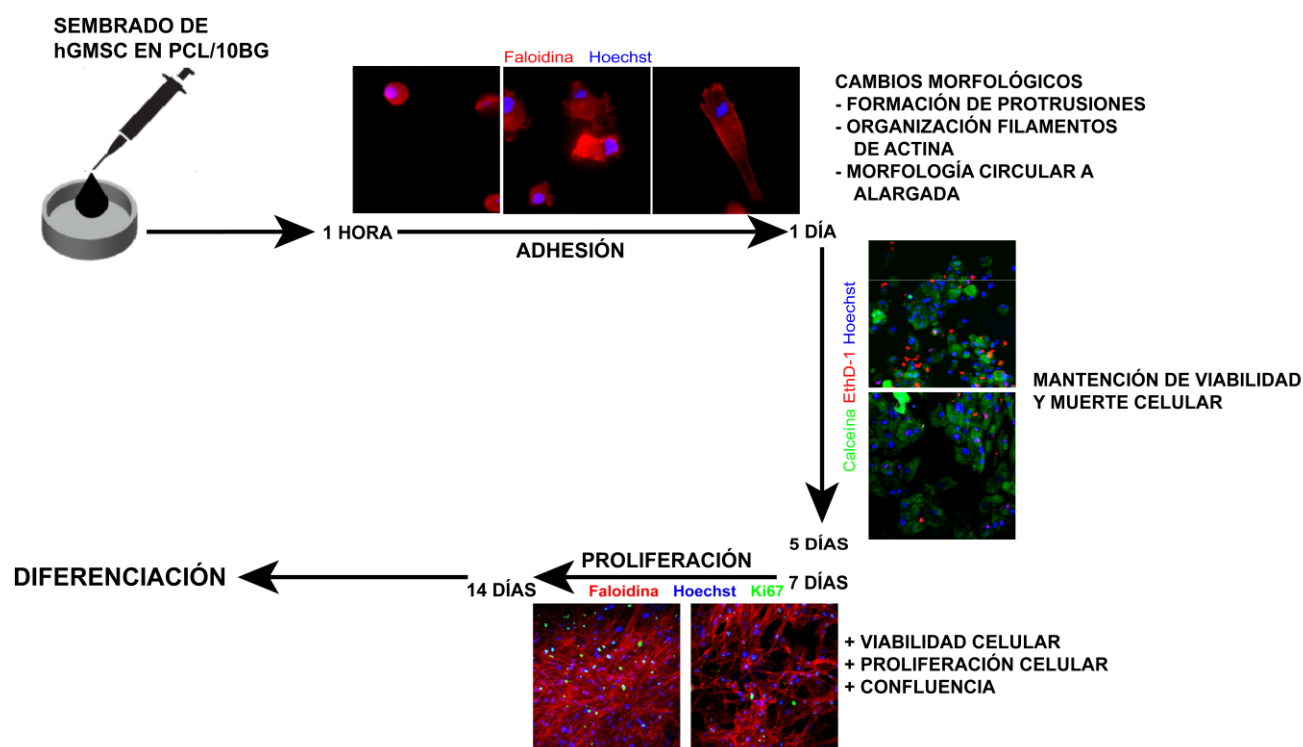


Figura 26. Modelo de interacción de hGMSC sembradas sobre biomateriales compuestos de PCL/10BG, para su aplicación en ingeniería de tejidos.

Tras el sembrado de hGMSC sobre biomateriales de PCL/10BG, comienza el proceso de adhesión celular, proceso de alta relevancia ya que abre paso al proceso de proliferación y diferenciación celular. Se observan los principales cambios morfológicos en las primeras 24 horas, tales como formación de protrusiones, organización de filamentos de actina o cambios morfológicos desde una forma circular a alargada. A partir de las 24 horas del sembrado, la realización de ensayos de citotoxicidad entrega información de la viabilidad celular sobre los biomateriales, revelando si es que el material es tóxico para las células, y determinar el futuro de este para sus aplicaciones en regeneración de tejidos. Entre los días 7 y 14 tras el sembrado de células, se presenta un aumento significativo en la proliferación celular, llegando a una confluencia de un 100% sobre el biomaterial y aumentando la viabilidad en comparación a tiempos tempranos, entregando la oportunidad de diferenciación celular.

CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

En este estudio, se evaluó el efecto de la adición de distintas concentraciones de biovidrio en la biocompatibilidad de un material compuesto de PCL, con una mirada amplia enfocada en la viabilidad/citotoxicidad, proliferación y adhesión celular de hGMSC. A partir de los resultados y análisis, se demostró que la incorporación de 10% de BG (en peso) en biomateriales de PCL, mantiene una biocompatibilidad similar a biomateriales poliméricos de PCL puro. Sin embargo, altas concentraciones de BG en los biomateriales compuestos, mostraron un efecto tóxico sobre las células.

Con respecto a la caracterización físico-química de los biomateriales, se lograron identificar los principales elementos que compusieron los biomateriales de PCL y BG, demostrando la presencia de los elementos característicos para cada uno de estos. Adicionalmente, se determinó la distribución de BG sobre los biomateriales, y las fases de cristalinidad características para los biomateriales que componen las condiciones PCL, PCL/ACE, PCL/10BG y PCL/20BG, pudiendo generar distintos efectos en la biocompatibilidad de estas.

En cuanto a la adhesión celular, a partir de un tratamiento con acetona sobre la superficie de los biomateriales, se logró desarrollar una metodología eficiente para favorecer la adhesión celular, cumpliendo con uno de los objetivos clave del estudio, pues, se destacó la relevancia del proceso de adhesión celular para una futura proliferación celular. De esta manera, se observó un aumento significativo en la adhesión celular tras 24 horas del sembrado de hGMSC sobre biomateriales de PCL/10BG con tratamiento superficial, en comparación a los biomateriales sin tratamiento.

En lo que respecta a la viabilidad celular y citotoxicidad del biomaterial, los resultados indicaron que una concentración de 20% de BG generó afectos adversos sobre hGMSC, posiblemente debido a una distribución heterogénea del biomaterial o a una sobrecarga de BG, lo que respalda la hipótesis de que existe un umbral de concentración óptimo. Adicionalmente, no se mostraron grandes diferencias en la viabilidad celular entre los grupos PCL y PCL/10BG, lo que sugiere que las mejoras en biocompatibilidad pueden presentarse en el proceso de diferenciación celular, o que la concentración de BG no fue óptima, de acuerdo con lo reportado en la literatura.

Se presentó un aumento significativo en la proliferación de hGMSC sembradas en PCL y PCL/10BG a los días 7 y 14, lo cual podría estar asociado a un proceso de adhesión más lento, sin embargo, se demostró que las células pueden adherirse, propagarse y proliferar en biomateriales de PCL y BG.

Sobre los cambios morfológicos en el proceso de adhesión celular tras la interacción entre hGMSC y biomateriales de PCL y PCL/10BG, se identificaron cambios morfológicos importantes relacionados con la organización del citoesqueleto, complementándose con cuantificaciones de descriptores de morfología. De esta manera, a pesar de que no se presentaron mayores diferencias entre los grupos experimentales, se observó el proceso de adhesión celular a través del tiempo, el cual se caracterizó por la formación de protrusiones y organización de filamentos de actina que permiten a las células adoptar una morfología alargada.

En conjunto, estos hallazgos enfatizan la importancia de optimizar la concentración de biovidrio en biomateriales compuestos de PCL y BG, para que no se generen efectos adversos en la biocompatibilidad de las células. Adicionalmente, se sugiere que los procesos celulares tales como la adhesión y proliferación celular están conectados entre sí, pues tras un proceso de adhesión lento en comparación a los controles, se observó un aumento en la proliferación recién entre los 7 y 14 días del sembrado.

Así mismo, se hace relevante estudiar la biocompatibilidad de biomateriales a partir de las distintas aristas que esta abarca. Se evidenció que los diferentes ensayos para analizar adhesión, viabilidad y proliferación celular se complementan entre sí, permitiendo obtener resultados más precisos y favorecer al entendimiento de la interacción célula-biomaterial, lo cual debe considerarse para el estudio de los biomateriales y sus aplicaciones clínicas a futuro.

Con respecto al trabajo futuro, para una siguiente etapa se propone evaluar el potencial de diferenciación celular osteogénica de los biomateriales compuestos de PCL y BG, pues, este se destaca y logra ser un material de interés que libera iones que intervienen en la activación de genes que controlan la osteogénesis, presentando una alta bioactividad. De esta manera, sería posible evaluar la funcionalidad del biomaterial para aplicaciones relacionadas a la regeneración ósea.

Adicionalmente, dada la relevancia de las características superficiales de los biomateriales sobre el proceso de adhesión celular, queda pendiente realizar estudios sobre la superficie de los biomateriales para evaluar con mayor precisión la rugosidad de estos. En este contexto, también se plantea explorar el impacto de modificaciones estructurales mayores del biomaterial, como, por ejemplo, la evaluación de biocompatibilidad en andamios porosos tridimensionales, de manera profunda mediante distintas técnicas que se complementen. Este enfoque permitiría replicar de manera más realista el entorno tisular y al mismo tiempo, agregar un factor adicional relevante para comprender la interacción célula-biomaterial, como lo es la porosidad.

Como proyección para estudios futuros que complementen la caracterización morfológica durante el proceso de adhesión celular, sería pertinente incorporar el análisis de otros marcadores del citoesqueleto como vimentina, la cual es una proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto. La inclusión de este marcador permitiría evaluar de manera más completa los cambios estructurales en las células, inducidos por la interacción célula-biomaterial. A partir de esto, se podrían implementar métodos de cuantificación automatizados para el análisis de imágenes, como por ejemplo *CellProfiler*, el cual permitiría obtener mediciones de la expresión y organización de las proteínas del citoesqueleto, mejorando la precisión y profundidad del análisis morfológico de las células.

Para finalizar, este estudio ayudó a entregar una mirada amplia de factores que no siempre se consideran al momento de evaluar la biocompatibilidad de biomateriales. De tal manera, se analizó mediante diferentes técnicas la interacción entre células y biomateriales compuestos de PCL y distintas concentraciones de BG, entregando herramientas completas que permitan entender de mejor manera los efectos del proceso de fabricación o definición de parámetros en la biocompatibilidad de un biomaterial. Así, se abren opciones para estudiar materiales compuestos en base a biopolímeros con partículas bioactivas, y analizar, por ejemplo, cómo afectan distintos procesos de fabricación o estructuras en las propiedades biológicas, mediante un análisis profundo que permita obtener conclusiones más acertadas.

REFERENCIAS

- Achermann, Y., Kerns, P., & Shirtliff, M. E. (2015). In vivo infection studies. In *Biomaterials and Medical Device - Associated Infections*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857097224.1.47>
- Adejuyigbe, B., Kallini, J., Chiou, D., & Kallini, J. R. (2023). Osteoporosis: Molecular Pathology, Diagnostics, and Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19). <https://doi.org/10.3390/ijms241914583>
- Alonzo, M., Primo, F. A., Kumar, S. A., Mudloff, J. A., Dominguez, E., Fregoso, G., Ortiz, N., Weiss, W. M., Joddar, B., Paso, E., Paso, E., Paso, E., Paso, E., Paso, E., & Paso, E. (2022). *HHS Public Access*. 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2020.100248>. Bone
- Altıparmak, S. C., Yardley, V. A., Shi, Z., & Lin, J. (2022). Extrusion-based additive manufacturing technologies: State of the art and future perspectives. *Journal of Manufacturing Processes*, 83(July), 607–636. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2022.09.032>
- Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 40(5), 363–408. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10>
- Anselmi, C., Mendes Soares, I. P., Mota, R. L. M., Leite, M. L., Ribeiro, R. A. de O., Fernandes, L. de O., Bottino, M. C., de Souza Costa, C. A., & Hebling, J. (2024). Functionalization of PCL-Based Fiber Scaffolds with Different Sources of Calcium and Phosphate and Odontogenic Potential on Human Dental Pulp Cells. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/jfb15040097>
- Benjumeda Wijnhoven, I., Vallejos, R., Santibanez, J. F., Millán, C., & Vivanco, J. F. (2020). Analysis of cell-biomaterial interaction through cellular bridge formation in the interface between hGMSCs and CaP bioceramics. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73428-y>
- Bhaskar, B., Sreenivasa Rao, P., Kasoju, N., Nagarjuna, V., & Baadhe, R. R. (2021). Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: From Basic Concepts to State of the Art Approaches. In *Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: From Basic Concepts to State of the Art Approaches*. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-0002-9>
- Boskey, A. L., & Coleman, R. (2010). Critical reviews in oral biology & medicine: Aging and bone. *Journal of Dental Research*, 89(12), 1333–1348. <https://doi.org/10.1177/0022034510377791>

- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Chen, J. Y., Penn, L. S., & Xi, J. (2018). Quartz crystal microbalance: Sensing cell-substrate adhesion and beyond. *Biosensors and Bioelectronics*, 99(June 2017), 593–602. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.032>
- Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Velletri, T., Zhang, X., Xu, C., Zhang, L., Yang, H., Hou, J., Wang, Y., & Shi, Y. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts? *Cell Death and Differentiation*, 23(7), 1128–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>
- Civinini, R., De Biase, P., Carulli, C., Matassi, F., Nistri, L., Capanna, R., & Innocenti, M. (2012). The use of an injectable calcium sulphate/calcium phosphate bioceramic in the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *International Orthopaedics*, 36(8), 1583–1588. <https://doi.org/10.1007/s00264-012-1525-6>
- Contreras, J., Pardo, M., Núñez, P., Millán, C., Siqueira, G., Palza, H., Vivanco, J. F., & Aiyangar, A. K. (2025). *Effect of Processing Parameters on the Printability and Mechano-Biological Properties of Polycaprolactone – Bioactive Glass Composites for 3D-Printed Scaffold Fabrication*. 1–22.
- Dash, P. A., Mohanty, S., & Nayak, S. K. (2023). A review on bioactive glass, its modifications and applications in healthcare sectors. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 614(May), 122404. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.122404>
- Dziadek, M., Dziadek, K., Checinska, K., Zagrajczuk, B., Golda-Cepa, M., Brzychczy-Wloch, M., Menaszek, E., Kopec, A., & Cholewa-Kowalska, K. (2021). PCL and PCL/bioactive glass biomaterials as carriers for biologically active polyphenolic compounds: Comprehensive physicochemical and biological evaluation. *Bioactive Materials*, 6(6), 1811–1826. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.11.025>
- El-Rashidy, A. A., Roether, J. A., Harhaus, L., Kneser, U., & Boccaccini, A. R. (2017). Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models. *Acta Biomaterialia*, 62, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.030>
- Eldeeb, A. E., Salah, S., & Elkasabgy, N. A. (2022). Biomaterials for Tissue Engineering Applications and Current Updates in the Field: A Comprehensive Review. *AAPS PharmSciTech*, 23(7). <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02419-1>

- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>
- Fang, I. J., & Trewyn, B. G. (2012). Application of mesoporous silica nanoparticles in intracellular delivery of molecules and proteins. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 508). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391860-4.00003-3>
- Feng, X. & Mcdonald, J. M. (2011). Disorders of Bone Remodeling. *Annu. Rev. Pathol. Mech.*, 6, 121–145. <https://doi.org/10.3109/9780203508954-27>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., & Song, G. (2019). Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080784>
- Girón, J., Kerstner, E., Medeiros, T., Oliveira, L., Machado, G. M., Malfatti, C. F., & Pranke, P. (2021). Biomaterials for bone regeneration: An orthopedic and dentistry overview. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(9), 1–15. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2021E11055>
- Guida, L., Oliva, A., Basile, M. A., Giordano, M., Nastri, L., & Annunziata, M. (2013). Human gingival fibroblast functions are stimulated by oxidized nano-structured titanium surfaces. *Journal of Dentistry*, 41(10), 900–907. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.07.009>
- Haddadi, M. H., Karamian, E., Bakhsheshi-Rad, H. R., & Kasiri-Asgarani, M. (2023). Investigation of the effect of Bioglass-58S content on structural and biological properties of PCL-chitosan-58S-bioactive glass composite coating for bone tissue engineering application. *Ceramics International*, 49(5), 8190–8195. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.10.343>
- Hench, L. L., Roki, N., & Fenn, M. B. (2014). Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration. *Journal of Molecular Structure*, 1073(C), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.066>
- Honzel, E., Joshi, A., Hernandez-morato, I., & Pitman, M. J. (2024). *A comparison of confocal and epifluorescence microscopy for quantification of RNAScope and immunohistochemistry fluorescent images*. 2023, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2023.110050.A>
- Invitrogen Molecular Probes. (2005). LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells.

- Product Information, Catalog Number: MP 03224, 1–7.*
<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>
- Javaheri, B., & Pitsillides, A. A. (2019). Aging and Mechanoadaptive Responsiveness of Bone. *Current Osteoporosis Reports*, 17(6), 560–569. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00553-7>
- Ji, S., & Guvendiren, M. (2017). Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5(APR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00023>
- Joseph Rey, J. R. H., Chen, Q., Maalihan, R. D., Ren, J., da Silva, Í. G. M., Dugos, N. P., Caldon, E. B., & Advincula, R. C. (2021). 3D printing of biomedically relevant polymer materials and biocompatibility. *MRS Communications*, 11(2), 197–212. <https://doi.org/10.1557/s43579-021-00038-8>
- Kotobuki, N., Ioku, K., Kawagoe, D., Fujimori, H., Goto, S., & Ohgushi, H. (2005a). Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*, 26(7), 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.03.020>
- Kotobuki, N., Ioku, K., Kawagoe, D., Fujimori, H., Goto, S., & Ohgushi, H. (2005b). Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*, 26(7), 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.03.020>
- Kumar, G., Waters, M. S., Farooque, T. M., Young, M. F., & Simon, C. G. (2012). Freeform fabricated scaffolds with roughened struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shape. *Biomaterials*, 33(16), 4022–4030. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.048>
- Lee, E. J., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2014). Biomaterials for tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(2), 323–337. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0859-6>
- Liu, H. (2015). Comparing Welch’s ANOVA, a Kruskal-Wallis test and traditional ANOVA in case of heterogeneity of variance ANOVA. *Theses and Dissertations*, 1–46. <https://scholarscompass.vcu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=5026&context=etd>
- Loy, A., Follett, L., & Hofmann, H. (2016). Variations of Q–Q Plots: The Power of Our Eyes! *American Statistician*, 70(2), 202–214. <https://doi.org/10.1080/00031305.2015.1077728>
- Malich, G., Markovic, B., & Winder, C. (1997). The sensitivity and specificity of the MTS

- tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124(3), 179–192. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(97\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(97)00151-0)
- Mateu-Sanz, M., Fuenteslópez, C. V., Uribe-Gomez, J., Haugen, H. J., Pandit, A., Ginebra, M. P., Hakimi, O., Krallinger, M., & Samara, A. (2024). Redefining biomaterial biocompatibility: challenges for artificial intelligence and text mining. *Trends in Biotechnology*, 42(4), 402–417. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.09.015>
- mckight2010. (n.d.).
- Millan, C., Vivanco, J. F., Benjumedá-Wijnhoven, I. M., Bjelica, S., & Santibanez, J. F. (2018). Mesenchymal stem cells and calcium phosphate bioceramics: Implications in periodontal bone regeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1107, 91–112. https://doi.org/10.1007/5584_2018_249
- Mirzaali, M. J., Moosabeiki, V., Rajaa, S. M., Zhou, J., & Zadpoor, A. A. (2022). Additive Manufacturing of Biomaterials—Design Principles and Their Implementation. *Materials*, 15(15). <https://doi.org/10.3390/ma15155457>
- Montazerian, M., Shearer, A., & Mauro, J. C. (2024). Perspectives on the impact of crystallization in bioactive glasses and glass-ceramics. *International Journal of Ceramic Engineering and Science*, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1002/ces2.10194>
- Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive Materials*, 4(October), 271–292. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>
- Ostadfar, A. (2016). Tissue Engineering of Cardiovascular System. *Biofluid Mechanics*, 323–339. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802408-9.00009-0>
- Ostertagová, E., Ostertag, O., & Kováč, J. (2014). Methodology and application of the Kruskal-Wallis test. *Applied Mechanics and Materials*, 611, 115–120. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.611.115>
- Parekh, M., Ramos, T., O’Sullivan, F., Meleady, P., Ferrari, S., Ponzin, D., & Ahmad, S. (2021). Human corneal endothelial cells from older donors can be cultured and passaged on cell-derived extracellular matrix. *Acta Ophthalmologica*, 99(4), e512–e522. <https://doi.org/10.1111/aos.14614>
- Perrotti, V., Piattelli, A., Quaranta, A., Gómez-Moreno, G., & Iezzi, G. (2016). Biocompatibility of dental biomaterials. In *Biocompatibility of Dental Biomaterials*. Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100884-3.00001-1>

- Podgórski, R., Wojasiński, M., & Ciach, T. (2022). Nanofibrous materials affect the reaction of cytotoxicity assays. *Scientific Reports*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13002-w>
- Portal-Núñez, S., Lozano, D., de la Fuente, M., & Esbrit, P. (2012). Fisiopatología del envejecimiento óseo. *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia*, 47(3), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2011.09.003>
- Przekora, A. (2019). The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 97(March 2018), 1036–1051. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.061>
- Quevedo, I., Ormenõ, J. C., Weissglas, B., & Opazo, C. (2020). Epidemiology and Direct Medical Cost of Osteoporotic Hip Fracture in Chile. *Journal of Osteoporosis*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5360467>
- Ralston, S. H. (2021). Bone structure and metabolism. *Medicine (United Kingdom)*, 49(9), 567–571. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.06.009>
- Ramasamy, S., Davoodi, P., Vijayavenkataraman, S., Teoh, J. H., Thamizhchelvan, A. M., Robinson, K. S., Wu, B., Fuh, J. Y. H., DiColandrea, T., Zhao, H., Lane, E. B., & Wang, C.-H. (2021). Optimized construction of a full thickness human skin equivalent using 3D bioprinting and a PCL/collagen dermal scaffold. *Bioprinting*, 21, e00123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00123>
- Riza, S. H., Masood, S. H., Rashid, R. A. R., & Chandra, S. (2020). Selective laser sintering in biomedical manufacturing. In *Metallic Biomaterials Processing and Medical Device Manufacturing*. LTD. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102965-7.00006-0>
- Rojas F., Rodríguez L., & Rodríguez J. (2022). Envejecimiento en Chile: Evolución, características de las personas mayores y desafíos demográficos para la población. *Instituto Nacional de Estadísticas.*, 1–95. https://www.ine.cl/docs/default-source/demografia-y-migracion/documentos-de-trabajo/documentos/envejecimiento-en-chile-evolucion-y-caracteristicas-de-las-personas-mayores.pdf?sfvrsn=b76bd496_4
- Roman, J., Margozzini, P., & Donoso, R. (2020). Caracterización y riesgo de fractura en población adulta chilena. Una nueva mirada a la ENS 2009-2010. *Acta Ortopédica Mexicana*, 34(6), 346–

353. <https://doi.org/10.35366/99130>

- Rosales-Ibáñez, R., Cubo-Mateo, N., Rodríguez-Navarrete, A., González-González, A. M., Villamar-Duque, T. E., Flores-Sánchez, L. O., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. (2021). Assessment of a PCL-3D printing-dental pulp stem cells triplet for bone engineering: An in vitro study. *Polymers*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/polym13071154>
- Sampath Kumar, T. S. (2013). Physical and Chemical Characterization of Biomaterials. In *Characterization of Biomaterials*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415800-9.00002-4>
- Soni, R., Vijay Kumar, N., Chameettachal, S., Pati, F., & Rath, S. N. (2019). Synthesis and optimization of PCL-bioactive glass composite scaffold for bone tissue engineering. *Materials Today: Proceedings*, 15, 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.05.008>
- Soto, N. (2017). ANALISIS DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE CELULAS ESTROMALES MESENQUIMALES DE TEJIDO GINGIVAL EN CULTIVOS CON BIOGLASS 45S5. *Escuela de Tecnología Medica UST*, 1–90.
- Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone Materials that enhance bone regeneration have a wealth of potential. *Bone*, 11(5), 18–25. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702108700865>
- Sugumaran, V., Krishnamoorthy, E., Kamalakkannan, A., Ramachandran, R. C., & Subramanian, B. (2022). Unscrambling the Influence of Sodium Cation on the Structure, Bioactivity, and Erythrocyte Compatibility of 45S5 Bioactive Glass. *ACS Applied Bio Materials*, 5(4), 1576–1590. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01322>
- Sun, X., & Kaufman, P. (2018). HHS Public Access Ki-67 : more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>.Ki-67
- Szwed-Georgiou, A., Płociński, P., Kupikowska-Stobba, B., Urbaniak, M. M., Rusek-Wala, P., Szustakiewicz, K., Piszko, P., Krupa, A., Biernat, M., Gazińska, M., Kasprzak, M., Nawrotek, K., Mira, N. P., & Rudnicka, K. (2023). Bioactive Materials for Bone Regeneration: Biomolecules and Delivery Systems. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 9(9), 5222–5254. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c00609>
- Tappa, K., & Jammalamadaka, U. (2018). Novel biomaterials used in medical 3D printing techniques. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/jfb9010017>
- Torres-Mansilla, A., Hincke, M., Voltes, A., López-Ruiz, E., Baldión, P. A., Marchal, J. A., Álvarez-

- Lloret, P., & Gómez-Morales, J. (2023). Eggshell Membrane as a Biomaterial for Bone Regeneration. *Polymers*, 15(6), 1–28. <https://doi.org/10.3390/polym15061342>
- Uynuk-Ool, T., Rothdiener, M., Walters, B., Hegemann, M., Palm, J., Nguyen, P., Seeger, T., Stöckle, U., Stegemann, J. P., Aicher, W. K., Kurz, B., Hart, M. L., Klein, G., & Rolauffs, B. (2017). The geometrical shape of mesenchymal stromal cells measured by quantitative shape descriptors is determined by the stiffness of the biomaterial and by cyclic tensile forces. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(12), 3508–3522. <https://doi.org/10.1002/term.2263>
- Vallejos Baier, R., Contreras Raggio, J. I., Toro Arancibia, C., Bustamante, M., Pérez, L., Burda, I., Aiyangar, A., & Vivanco, J. F. (2021). Structure-function assessment of 3D-printed porous scaffolds by a low-cost/open source fused filament fabrication printer. *Materials Science and Engineering: C*, 123, 111945. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2021.111945>
- Vallejos, R., Contreras Raggio, J. I., Giovanetti, C. M., Palza, H., Burda, I., Terrasi, G., Weisse, B., De Freitas, G. S., Nyström, G., Vivanco, J. F., & Aiyangar, A. K. (2021). Shape fidelity, mechanical and biological performance of 3D printed polycaprolactone-bioactive glass composite scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, November. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112540>
- Wang, J., Sugita, S., Nagayama, K., & Matsumoto, T. (2016). Dynamics of actin filaments of MC3T3-E1 cells during adhesion process to substrate. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 11(2). <https://doi.org/10.1299/jbse.15-00637>
- Wang, W., Lu, Z., Li, J., & Bártolo, P. (2020). Engineering the biological performance of hierarchical nanostructured poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering. *CIRP Annals*, 69(1), 217–220. <https://doi.org/10.1016/j.cirp.2020.04.044>
- Welch, B. L. (1951). On the Comparison of Several Mean Values: An Alternative Approach. *Biometrika*, 38(3/4), 330. <https://doi.org/10.2307/2332579>
- Williams, D. F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30(30), 5897–5909. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>
- Xi, J., & Y. Chen, J. (2013). Quartz Crystal Microbalance in Cell Biology Studies. *Journal of Biochips & Tissue Chips*, s5, 1–9. <https://doi.org/10.4172/2153-0777.s5-001>
- Xu, C., Liu, Z., Chen, X., Gao, Y., Wang, W., Zhuang, X., Zhang, H., & Dong, X. (2024). Bone tissue engineering scaffold materials: Fundamentals, advances, and challenges. *Chinese*

Chemical Letters, 35(2), 109197. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2023.109197>

Xu, R., Hu, X., Yu, X., Wan, S., Wu, F., Ouyang, J., & Deng, F. (2018). Micro-/nano-topography of selective laser melting titanium enhances adhesion and proliferation and regulates adhesion-related gene expressions of human gingival fibroblasts and human gingival epithelial cells.

International Journal of Nanomedicine, 13, 5045–5057. <https://doi.org/10.2147/IJN.S166661>

Zadpoor, A. A., & Malda, J. (2017). Additive Manufacturing of Biomaterials, Tissues, and Organs.

Annals of Biomedical Engineering, 45(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1719-y>