



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA MECÁNICA

DISEÑO DE SCAFFOLDS AUXÉTICOS FABRICADOS MEDIANTE IMPRESIÓN 3D PARA ESTIMULACIÓN MECÁNICA DE CÉLULAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL MECÁNICA

CONSTANZA MAKARENA FUENTEALBA SIERRA

PROFESOR GUÍA:

HUMBERTO PALZA CORDERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

VIVIANA MERUANE NARANJO

JUAN PABLO ACEVEDO COX

SANTIAGO DE CHILE

2021

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE:** Ingeniera Civil Mecánica
POR: Constanza Makarena Fuentealba Sierra
FECHA: Agosto 2021
PROFESOR GUÍA: Humberto Palza Cordero

DISEÑO DE SCAFFOLDS AUXÉTICOS FABRICADOS MEDIANTE IMPRESIÓN 3D PARA ESTIMULACIÓN MECÁNICA DE CÉLULAS

Estudios recientes han logrado demostrar que los andamios auxéticos son capaces de mantener el crecimiento celular y preservar la capacidad de expansión de espacios entre las interfaces de capa, por lo que son potencialmente aceptables para la formación de tejido. También sugieren que los andamios auxéticos con coeficiente de Poisson ajustable podrían influir en la diferenciación de las células madre.

El objetivo general de esta memoria para optar al Título de Ingeniera Civil Mecánica fue fabricar andamios auxéticos mediante impresión 3D, y estudiar el efecto de su coeficiente de Poisson sobre el crecimiento de células madre mesenquimales cultivadas en su superficie.

Se seleccionaron tres estructuras auxéticas correspondientes a panal reentrante, semi-rígida cuadrada y Kagome triangular, además de una estructura de panal hexagonal normal como punto de comparación. Estas fueron diseñadas en el software CAD Fusion 360, para luego ser impresas en la impresora FormLab 2, utilizando el software PreForm.

La estructura de panal reentrante fue impresa a escala de centímetros en resina estándar, flexible, elástica y dental SG. Se descartó resina flexible y estándar.

Se realizó impresión a escala de centímetros y milímetros de las estructuras panal reentrante, semi-rígida cuadrada y Kagome triangular, en resina elástica y dental SG. Se descartó resina elástica y estructura semi-rígida cuadrada.

Se realizaron ensayos de tracción en estructura de panal reentrante y Kagome triangular, a escala milimétrica, impresas con resina dental SG, sin post curado. Se grabó cada ensayo y se obtuvo los coeficientes de Poisson en base a las deformaciones obtenidas de cuatro puntos de la estructura.

Se realizaron cultivos celulares sobre láminas lisas de resina dental SG sin curar, y scaffolds con estructura Kagome triangular.

Se realizó un cultivo celular sobre piezas lisas y con estructura Kagome, impresas en resina dental sin curar. En la pieza lisa, su opacidad no permitió observar resultados. En la estructura Kagome, previamente esterilizada, se realizaron diversos análisis para determinar la proliferación celular sobre estas. Las piezas sin tratamiento previo para facilitar la adhesión y eliminar cualquier posible residuo de resina, no permiten el cultivo celular pues la resina sin curar sigue siendo dañina para la célula y por ende evita su proliferación. Se descarta la resina dental, sin curar y sin tratamientos, para fabricar scaffolds.

*Vive el presente, recuerda el pasado y no temas el futuro,
porque no existe, ni existirá jamás. Sólo existe el ahora.*

– Christopher Paolini

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer al profesor Humberto Palza por asignarme un tema de mi interés, a pesar de no ser de mi departamento. Además de por su apoyo en la finalización del proyecto a pesar de todas las dificultades que se presentaron en el camino.

Al profesor Juan Pablo Acevedo por abrirme las puertas del laboratorio de c4c, además de dirigir el experimento celular.

A Carmen Hidalgo por enseñarme cultivo celular y encargarse de la realización de cada uno de los experimentos. Además de darme el tiempo de enseñarme a realizarlos.

A mis amigos de la universidad, en particular a Makarena y Constanza, quienes transformaron mi experiencia universitaria de tolerable a maravillosa, y porque, sin el constante apoyo de la Macka creo que jamás habría logrado llegar al final de este camino.

A mis amigas de toda la vida, Constanza, Tamara y Fernanda. Gracias por siempre estar ahí para mí.

A Gabriel, quien tuvo que soportar mis peores crisis, pero siempre fue capaz de levantarme. Gracias por siempre estar conmigo y recordarme que soy capaz, aunque a veces me cueste verlo.

Finalmente, pero los más importantes, a mi mamá, Cecilia y a mi papá, Isidro. Porque por su constante preocupación, apoyo y exigencia es que logré superar las etapas más difíciles y llegar a donde estoy hoy. No sería nada sin ellos.

Tabla de contenido

1.	Introducción	1
1.1.	Antecedentes generales.....	1
1.1.1.	Impresión 3D	1
1.1.2.	Scaffolds	4
1.1.3.	Materiales Auxéticos	6
1.2.	Motivación	7
2.	Objetivos	8
2.1.	Objetivo general:.....	8
2.2.	Objetivos específicos:.....	8
3.	Alcances.....	8
4.	Antecedentes específicos.....	8
4.1.	Estereolitografía.....	8
4.2.	Metamateriales auxéticos	9
4.2.1.	Estructuras reentrantes:	10
4.2.2.	Estructuras Quirales:	12
4.2.3.	Estructuras semi-rígidas rotatorias:	12
4.3.	Estimulación mecánica de células.....	13
4.4.	Aplicaciones en medicina de los materiales auxéticos	16
4.4.1.	Biomateriales auxéticos	16
4.4.2.	Parque cardíaco:	17
4.4.3.	Stent arterial o para vasos sanguíneos:	19
4.4.4.	Vendaje inteligente	20
4.4.5.	Scaffolds auxéticos y estudios de proliferación y diferenciación celular	21
5.	Metodología	30
5.1.	Diseño e impresión de scaffolds	30
5.1.1.	Fusion 360	30
5.1.2.	Software PreForm	32
5.1.3.	FormLab Form 2 y Resinas	34
5.2.	Coficiente de Poisson de las estructuras.....	37
5.3.	Proliferación celular	38
5.3.1.	Esterilización:	38
5.3.2.	Adhesión:.....	38

5.3.3. Cultivo:	40
6. Resultados y discusiones	40
6.1. Elección de las estructuras e impresión	40
6.1.1 Impresiones preliminares a escala de centímetros.....	46
6.1.2 Impresiones a escala de milímetros.....	49
6.2. Medición del Coeficiente de Poisson	51
6.3. Proliferación Celular	58
6.3.1. Esterilización:	58
6.3.2. Adhesión:.....	59
7. Conclusiones.....	61
Bibliografía	62
Anexos.....	65
Anexo A	65
Anexo B	65

Índice de Figuras

Figura 1.1: Representación esquemática de una configuración FDM típica ^[1]	1
Figura 1.2: Representación esquemática de una configuración 3DP típica ^[1]	2
Figura 1.3: Representación esquemática de una configuración SLA típica ^[1]	2
Figura 1.4: Representación esquemática de una configuración SLS típica ^[1]	3
Figura 1.5: Representación esquemática de una configuración de trazado 3D típica ^[1]	3
Figura 1.6: Comportamiento al aplicar una carga de tensión y compresión en: (a) material no auxético (b) material auxético ^[5]	6
Figura 4.1: Esquema impresora SLA ^[10]	9
Figura 4.2: Ilustración del comportamiento auxético en una estructura de panal reentrante. Donde θ es el ángulo reentrante, h/l es el coeficiente de largo de la costilla y w es el espesor de las costillas ^[5]	10
Figura 4.3: (a) Celda unitaria de RH donde, h y l son los largos de las paredes horizontales e inclinadas, θ es el ángulo entre la pared horizontal y la inclinada, y t es el grosor de la pared de la celda; (b) Celda unitaria de ARH donde t^* es el grosor de la pared de la celda aumentada; (c) Celda unitaria de DAH donde l_1 y l_2 son los largos de las dos paredes inclinadas, ϕ_1 y ϕ_2 son los ángulos entre las dos paredes inclinadas y t es el grosor de las paredes inclinadas; (f) Celda unitaria de ADAH donde t^* es el grosor de la pared de la celda aumentada ^[13]	11
Figura 4.4: Ilustración del comportamiento auxético en una unidad hexaquiral ^[5]	12
Figura 4.5: Celda unitaria del modelo de cuadrados rotatorios ^[5]	12

Figura 4.6: Ilustración esquemática de la "naturaleza mecánica" de los mecanismos de mecanotransducción celular. Notar que las flechas dobles indican tensiones intracelulares sobre el citoesqueleto. En la imagen MF: Fuerzas mecánicas; FR: Receptores de fuerza como integrinas y proteínas G; M: Proteína extracelular; R: Receptor de factores solubles ^[12]	14
Figura 4.7: Representación esquemática de los actores clave de la mecanosensibilidad que participan en la interacción célula-MEC en el sitio de adhesión focal (FA), donde ACTN: actinina; FAK: quinasa de adhesión focal; IT: integrinas; PAX: paxilina; TLN: talina; VASP: fosfoproteína estimulada por vasodilatadores; VCL: vinculina; ZYX: zyxina. Los cambios extracelulares en rigidez, tensión u otros estímulos mecánicos son percibidos por grupos de integrinas cuyos cambios morfológicos o de distribución reclutan FAK. La barra de talina, la vinculina, la paxilina y la proteína adaptadora p130 ^{Cas} se acoplan entre sí y transfieren las señales mecánicas de las integrinas al componente actina del citoesqueleto. Cerca del centro de la adhesión focal, el complejo VASP, la zyxina y actininas regulan directamente el ensamblaje y la dinámica de la actina ^[11]	15
Figura 4.8: El núcleo de una célula madre embrionaria en el estado de transición (T-ESC) se expande cuando se tracciona ^[19]	17
Figura 4.9: A)Esquema de las dimensiones de un corbatín; B) Ilustración esquemática del alineamiento de un parche cardíaco auxético (Auxetic Cardiac Patch: AuxCP) en el corazón ^[21]	18
Figura 4.10: Dilatador que emplea una vaina terminal auxética ^[22]	19
Figura 4.11: Izquierda: Fotografía que muestra una muestra completa del Stent coronario auxético; Derecha: vista en primer plano de una celda unitaria del Stent ^[23]	20
Figura 4.12: Principio de funcionamiento de un vendaje inteligente ^[24]	21
Figura 4.13: Fabricación y caracterización de andamios de poliuretano auxético. Arriba: esquemas del proceso de conversión auxética por pandeo parcial de las costillas de la celda usando compresión isotrópica (triaxial); Abajo: Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) del andamio regular (izquierda) y el andamio auxético (derecha). Barra de escala:500[μm] ^[14]	21
Figura 4.14: Imágenes fotográficas de las muestras auxéticas y sus controles, donde PCL: Muestra de nanofibra fina electrohilada de Policaprolactona con espesor 40 μm ; PCLA: Muestra auxética de nanofibra fina electrohilada de Policaprolactona con espesor 40 μm ; PCLT: Muestra de nanofibra gruesa electrohilada de Policaprolactona con espesor 180 μm y PCLTA: Muestra auxética de nanofibra gruesa electrohilada de Policaprolactona con espesor 180 μm ^[15]	22
Figura 4.15: Esquema del andamio 3D ^[4]	23
Figura 4.16: Imagen SEM de andamios híbridos de una sola capa. En el lado izquierdo zona NPR y en el lado derecho zona PPR ^[16]	23
Figura 4.17: Gráfico del coeficiente de Poisson de las regiones PPR y NPR en un scaffold de una sola capa en función del desplazamiento ^[16]	24
Figura 4.18: Imágenes de microscopía de fluorescencia de células madre mesenquimales humanas en la región (A, D) de proporción de Poisson positiva (PPR) y en la región de proporción de Poisson negativa (NPR) (B, C, E). (C) Células que crecen en huecos de	

andamios y a lo largo de puntales de andamios en la región NPR. (D) Células que crecen a lo largo de los puntales del andamio (recuadro: SEM de los puntales del andamio) en la región de PPR. (E) Células sembradas en la región NPR (recuadro: SEM de puntales de andamio). Las barras de escala representan (A, B) 250 μm y (C, D, E) 125 μm . Verde: filamentos de actina; azul: núcleos; rosa: puntales de andamio ^[16]	25
Figura 4.19: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de scaffolds bruto (a la izquierda) y scaffolds auxéticos (a la derecha) ^[26]	25
Figura 4.20: Diseño geométrico de las celdas unitarias. A la derecha la estructura de costilla intacta, con comportamiento PPR, y a la derecha la estructura de costilla cortada con comportamiento NPR. Las paredes de las celdas unitarias (denominadas nervaduras) tienen aproximadamente 40 micrómetros de ancho y 100 micrómetros de profundidad ^[29]	27
Figura 4.21: Imágenes ópticas ensayo de tracción de parches tubulares PPR izquierda y NPR derecha ^[29]	27
Figura 4.22: Imágenes microscópicas de filamentos de actina teñidos más núcleos en las construcciones al día siete. A la izquierda la estructura NPR y a la derecha PPR ^[29]	28
Figura 4.23: Cultivo en andamios auxéticos de tamaño de poro pequeño. Vista general de los tres andamios donde se pueden observar grandes deformidades debido a las fuerzas mecánicas aplicadas por los fibroblastos ^[30]	29
Figura 4.24: Cultivo en scaffold auxético de poro 40 [μm]. A la izquierda vistas generales inclinadas del andamio. Las células pudieron penetrar dentro de los poros de la estructura, que constaba de dos capas y fue capaz de resistir las fuerzas. A la derecha imagen ampliada de varias celdas unitarias en la superficie del scaffold. La geometría hexagonal reentrante puede doblarse hacia adentro debido a las fuerzas mecánicas aplicadas por las células (en amarillo) ^[30]	30
Figura 5.1: Dibujo realizado en Fusion 360.....	31
Figura 5.2: Extrusión de una figura.....	32
Figura 5.3: Guardar diseño en STL.....	32
Figura 5.4: Configuración inicial del software PreForm.....	33
Figura 5.5: Selección de una base en PreForm.....	33
Figura 5.6: Estructura con soportes generados automáticamente por el software.....	34
Figura 5.7: Imagen de una impresión en Form 2 ^[10]	35
Figura 5.8: Escala de grises de la resina estándar ^[10]	35
Figura 5.9: Objeto fabricado con resina flexible ^[10]	35
Figura 5.10: Impresión realizada en resina dental ^[10]	36
Figura 5.11: Objeto fabricado con resina elástica ^[10]	36
Figura 5.12: Puños de tracción estáticos de uso general con acción lateral del tornillo ^[9]	37
Figura 5.13: Estructura triangular. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 12%; Derecha: Deformación de 24%.....	38
Figura 5.14: Izquierda: Ejemplo del llenado de una placa Neubauer; Derecha: Conteo en un cuadrante de la placa Neubauer63 ^[17]	39
Figura 5.15: Placa 24 well ^[18]	40
Figura 5.16: Placa p100 ^[18]	40
Figura 6.1: Estructura de panal reentrante.....	41

Figura 6.2: Detalles de la geometría de la estructura con $h \approx 0,9$ [mm]; $l \approx 1,2$ [mm]; $\theta = 28,1^\circ$; $w = 0,08$ [mm]. Donde h/l es el coeficiente de largo de la costilla, θ es el ángulo reentrante y w es el espesor de las costillas.....	41
Figura 6.3: Estructura semi-rígida cuadrada.....	42
Figura 6.4: Detalles de la geometría de la estructura con cuadrados de lado $0,8$ [mm] y ángulo de 30°	42
Figura 6.5: Estructura Kagome triangular.....	42
Figura 6.6: Detalles de la geometría de la estructura con triángulos de lado $1,6$ [mm], ondas de radio $0,36$ [mm] y espesor de las costillas de $0,08$ [mm].	43
Figura 6.7: Estructura no auxética hexagonal	43
Figura 6.8: Diseño de la estructura celda por celda.....	44
Figura 6.9: Extrusión de la estructura.....	44
Figura 6.10: Diseño de estructura mediante patrón rectangular. En azul se destaca la estructura inicial de dos celdas utilizadas para generar las demás.	45
Figura 6.11: Estructura con soportes en PreForm. En azul la estructura del scaffold y en amarillo los soportes necesarios para imprimirla.	46
Figura 6.12: Impresiones con resina estándar (a) estructura impresa directamente en la base de impresión (b) prueba de impresión con bordes de la menor resolución posible.....	47
Figura 6.13: Estructuras impresas con orientación (a) horizontal apoyando sólo las esquinas en la plataforma y con un soporte interno en el medio (b) vertical apoyada directamente en la plataforma y sin soportes.	47
Figura 6.14: Estructura impresa en resina flexible.....	47
Figura 6.15: Estructuras impresas en resina elástica (a) Kagome triangular (b) Semi-rígida cuadrada (c) Panal reentrante.	48
Figura 6.16: Estructuras impresas en resina dental sin curar (a) Semi-rígida cuadrada (b) Kagome triangular.....	48
Figura 6.17: Estructuras impresas en resina dental curada (a) Semi-rígida cuadrada (b) Kagome triangular.....	48
Figura 6.18: Impresiones a escala milimétrica en resina elástica.....	49
Figura 6.19: Impresiones a escala milimétrica en resina dental.....	49
Figura 6.20: Pruebas de cantidad de soportes.(a) mínima cantidad de soportes que la impresora admite (b) colocando soportes en cada una de las uniones (c) cantidad intermedia de soportes.	50
Figura 6.21: Impresión en resina dental en la que se observa separación de capas.	50
Figura 6.22: Estructura con soportes para ensayo de tracción.	51
Figura 6.23: Estructura panal reentrante. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 16% ; Derecha: Deformación de 30%	52
Figura 6.24: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la estructura panal reentrante.	52
Figura 6.25: Estructura panal reentrante. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 18% ; Derecha: Deformación de 36%	53
Figura 6.26: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la estructura panal reentrante.	53

Figura 6.27: Estado inicial de la primera y segunda estructura ensayada.	54
Figura 6.28: Estructura Kagome triangular. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 16%; Derecha: Deformación de 32%.	54
Figura 6.29: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la primera estructura Kagome triangular.	55
Figura 6.30: Estructura Kagome triangular. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 15%; Derecha: Deformación de 31%.	55
Figura 6.31: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la segunda estructura Kagome triangular.	56
Figura 6.32: Estructura Kagome triangular. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 12%; Derecha: Deformación de 24%.	56
Figura 6.33: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la segunda estructura Kagome triangular.	56
Figura 6.34: Gráfico resumen de deformación v/s coeficiente de Poisson para las estructuras estudiadas.	57
Figura 6.35: Estado inicial de las estructuras ensayadas.	58
Figura 6.36: Estructura Kagome sumergida en etanol por 1 [min](a la izquierda) v/s [overnight] (a la derecha).	59
Figura 6.37: Diseño de las piezas lisas utilizadas en estudio de adherencia celular. El cuadrado es de lados de 12 [mm] y el espesor es de 0,5 [mm].	59
Figura 6.38: Diseño de las estructuras Kagome triangular utilizadas en estudio de adherencia celular. Su tamaño es de aproximadamente 14x16 [mm] y su espesor es de 0,5 [mm].	60
Figura 6.39: Células con tinción Hoechst en control sin estructura (a la izquierda) v/s pocillo con estructura (a la derecha).	60
Figura 6.40: A la izquierda células en pocillo de control (sin estructura) v/s a la derecha pocillo con estructura en el cual se observan células muertas a su alrededor.	61
Figura A.1: Diagrama de estructura de panal reentrante.	65

Índice de Tablas

Tabla 1.1: Resumen de las técnicas establecidas de prototipado rápido ^[1]	4
Tabla 5.1: Resumen de propiedades mecánicas de las resinas. Elaboración propia con información disponible en las guías técnicas ^[10]	36
Tabla 6.1: Resumen de resultados del Coeficiente de Poisson en los ensayos de tracción..	57
Tabla B.1: Funciones de la Matriz Extracelular en tejidos nativos y de scaffolds en tejidos de ingeniería ^[3]	65

1. Introducción

1.1. Antecedentes generales

1.1.1. Impresión 3D

La impresión 3D, también conocida como manufactura aditiva, prototipado rápido o fabricación sólida de forma libre, es un “proceso de unir materiales para hacer objetos 3D a partir de un modelo de datos, usualmente capa por capa”, el cual fue descrito por primera vez en 1986 por Charles Hull. Esta tecnología crea objetos añadiendo el material para reducir el desperdicio, mientras se alcanza una satisfactoria precisión geométrica.

Comienza con un modelo de computadora mallado en 3D, que puede ser creado por datos de imagen adquirida o estructuras diseñadas en software asistido por computadora (Computer-Aided Design: CAD). Comúnmente se crea un archivo STL (Surface Tessellation Language o lenguaje de teselación de superficie), el cual posteriormente se convierte en un archivo de construcción de capas 2D y se envía a la máquina de impresión 3D^[1].

Las técnicas establecidas de prototipado rápido se resumen en la Tabla 1.1 y corresponden a:

1. Modelado por deposición fundida (FDM: Fused Deposition Modeling):

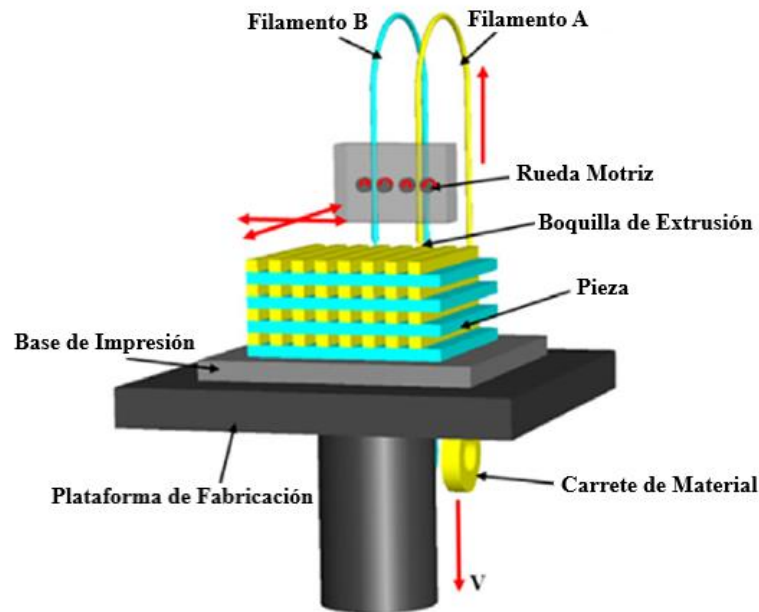


Figura 1.1: Representación esquemática de una configuración FDM típica^[1].

Las impresoras FDM funcionan por extrusión controlada de filamentos de un material polimérico termoplástico, como se observa en la Figura 1.1. El filamento se funde a un estado semilíquido en la boquilla y es extruido capa por capa sobre la plataforma de construcción, donde las capas se unen por fundición y luego solidifican a partes finales.

2. Cama de polvo y cabezal de inyección de tinta de impresión 3D (3DP: 3D Printing):

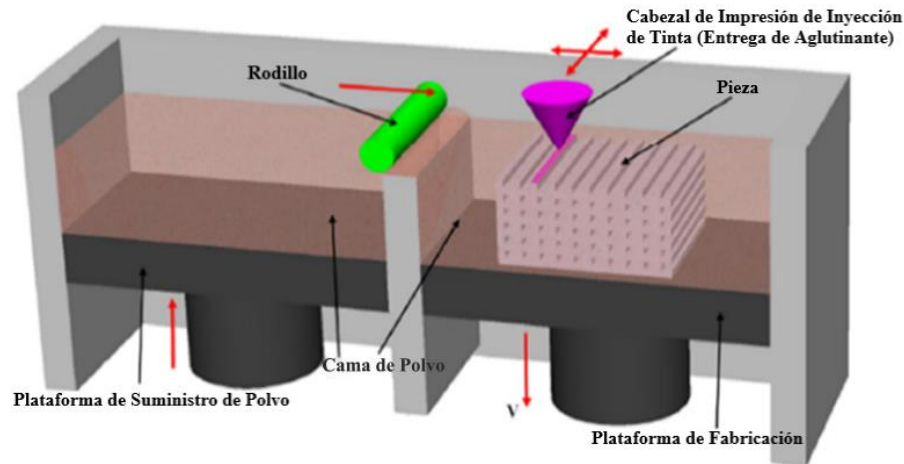


Figura 1.2: Representación esquemática de una configuración 3DP típica^[1].

Se basa en el procesamiento de polvo (puede ser de cualquier material polimérico que se pueda suministrar en este formato), que inicialmente se esparce en la plataforma de construcción y luego se une selectivamente en una capa con patrón determinado, depositando un aglutinante líquido a través del cabezal de impresión de inyección de tinta, que puede moverse en dirección x-y como se observa en la Figura 1.2. Una vez que se logra el patrón 2D deseado, la plataforma desciende y se esparce la siguiente capa de polvo. Este proceso se repite hasta terminar la estructura y finalmente se debe eliminar el polvo no adherido para obtener los productos finales.

3. Estereolitografía (SLA: Stereolithography):

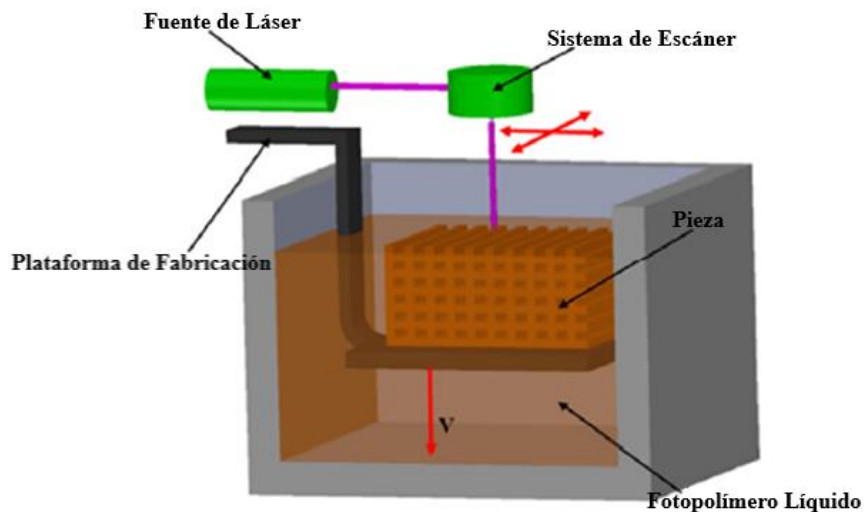


Figura 1.3: Representación esquemática de una configuración SLA típica^[1].

Utiliza fotopolímeros que pueden ser curados por láser UV. Un láser UV es controlado apuntando un camino deseado en el depósito de resina fotocurable, la cual se polimerizará en una capa con diseño 2D, como se observa en la Figura 1.3. Después de que cada capa es curada, la plataforma baja y otra capa de resina sin curar está lista para ser modelada.

4. Sinterización por láser selectiva (SLS: Selective Laser Sintering):

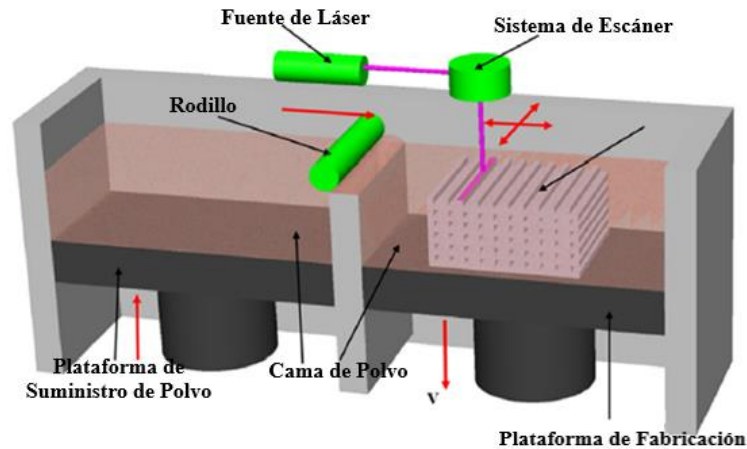


Figura 1.4: Representación esquemática de una configuración SLS típica^[1].

Similar a la técnica 3DP pero, en lugar de utilizar un aglutinante líquido, utiliza un rayo láser con un camino controlado que sinteriza los polvos calentándolos. Bajo el láser de alta potencia, polvos vecinos se funden juntos a través de difusión molecular y luego comienza el procesamiento de la siguiente capa, como se observa en la Figura 1.4. Se debe remover el polvo no adherido para obtener los productos finales.

5. Trazado 3D / Escritura directa 3D:

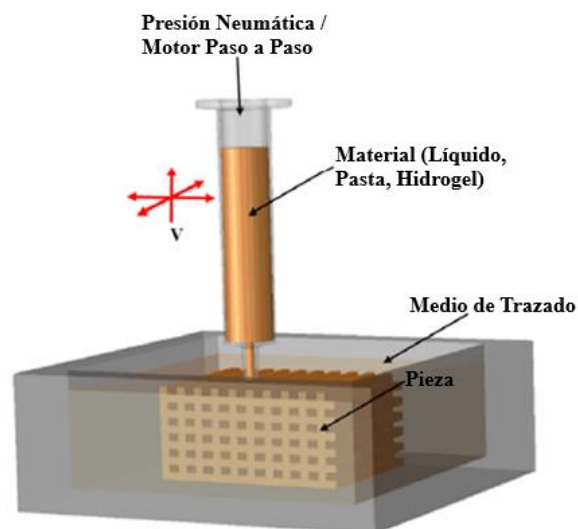


Figura 1.5: Representación esquemática de una configuración de trazado 3D típica^[1].

Se basa en la extrusión de un material viscoso a través de una jeringa presurizada para crear formas 3D de materiales. La cabeza de la jeringa puede moverse en tres dimensiones, mientras que la plataforma donde los materiales se unen capa por capa se mantiene estacionaria, como se observa en la Figura 1.5. Se pueden realizar acciones de curado dispersando dos componentes reactivos utilizando boquillas de mezcla o inducido por calor o luz UV. En ciertos casos, los materiales pueden pasar a un medio para finalizar la reacción de curado.

En la Tabla 1.1 se encuentra un resumen de las técnicas anteriormente mencionadas.

Tabla 1.1: Resumen de las técnicas establecidas de prototipado rápido^[1].

Técnica	Estado inicial del material	Material polimérico típico	Principio de trabajo	Ventajas	Desventajas
FDM	Filamento	Termoplásticos como PC, ABS, PLA, y nylon	Extrusión y deposición	Bajo costo, buena resistencia, múltiples materiales	Anisotropía, Obstrucción de la boquilla
SLA	Fotopolímero líquido	Resina fotocurable (resina epoxi o a base de acrilato)	Escaneo láser y curado inducido por UV	Alta resolución de impresión	Materiales limitados, citotoxicidad, alto costo
SLS	Polvo	PCL y polvo de poliamida	Escaneo láser y sinterización inducida por calor	Buena resistencia, fácil remoción del polvo de soporte	Alto costo, superficie polvosa
3DP	Polvo	Cualquier material que se pueda suministrar como polvo, necesita aglutinante	Impresión de aglutinante con goteo a demanda	Bajo costo, múltiples materiales, fácil remoción del polvo de soporte	Obstrucción del chorro o contaminación del aglutinante
Trazado 3D	Líquido o pasta	PCL, PLA, hidrogel	Extrusión presurizada de jeringuilla, y curación asistida por calor o UV	Alta resolución de impresión, capacidad para materiales blandos	Baja resistencia mecánica, lenta

1.1.2. Scaffolds

Los recientes avances en el campo de la manufactura aditiva han permitido la fabricación de estructuras con arquitecturas arbitrariamente complejas a diferentes escalas. La velocidad y facilidad de fabricación han convertido a la impresión 3D en una de las principales herramientas para la ingeniería de tejidos, en particular para la fabricación de scaffolds.

De acuerdo con la norma ASTM F2150-13 un scaffold o andamio es un soporte, vehículo o matriz para facilitar la migración, adhesión o transporte de células o moléculas bioactivas que es usada para reemplazar, reparar o regenerar tejidos. Los andamios son estructuras tridimensionales y porosas que sirven como soporte temporal para el crecimiento vascular y celular, mientras se da la regeneración tisular esperada^[2].

Casi todas las células en los tejidos humanos son dependientes de su anclaje en una matriz sólida llamada Matriz Extracelular (ECM: Extracellular Matrix). Las funciones de esta matriz se pueden clasificar en 5 categorías^[3]:

1. Proveer un soporte estructural y ambiente físico para que las células residentes en el tejido puedan adherirse, crecer, migrar y responder a señales.
2. Otorgar al tejido sus propiedades mecánicas, como la rigidez y elasticidad, que están asociadas a las funciones del tejido.
3. Proveer activamente señales bioactivas a las células para regulación de sus actividades.
4. Actuar como reserva de factores de crecimiento y potenciar su bioactividad.
5. Proveer un entorno físico degradable para permitir neovascularización y remodelamiento en respuesta a los desafíos del desarrollo, fisiológicos y patológicos, durante los procesos dinámicos de tejidos llamados morfogénesis, homeostasis y cicatrización de heridas respectivamente.

Intuitivamente el mejor scaffold para un tejido diseñado debería ser la ECM del tejido objetivo en su estado nativo. Sin embargo, las múltiples funciones, la compleja composición y la naturaleza dinámica de la misma vuelve difícil imitarla exactamente. Por lo tanto, el concepto contemporáneo de los scaffolds en la ingeniería de tejidos es imitar las funciones de la ECM nativa, al menos de forma parcial. De esta manera, las características que debe tener el scaffold son:

1. Arquitectura: Los scaffolds deben proveer un volumen vacío para la vascularización, formación del nuevo tejido y remodelamiento, a fin de facilitar la integración del tejido huésped en la implantación. Los biomateriales deberían ser procesados para dar una estructura suficientemente porosa para un transporte eficiente de nutrientes y metabolitos, sin comprometer significativamente la estabilidad mecánica del scaffold. En el año 2014, Yamamoto y sus colaboradores establecieron que el tamaño óptimo de un poro debe oscilar entre 100-500 [µm] para que sea posible la migración celular^[2].
Los biomateriales también deben ser degradables tras la implementación a una velocidad equivalente a la de la producción de una nueva matriz por el tejido en desarrollo.
2. Compatibilidad: Los scaffolds deben proporcionar soporte para que células externamente aplicadas se adhieran, crezcan y diferencien tanto durante un cultivo in vitro como en implantación in vivo. Los biomateriales usados para fabricar los scaffolds necesitan ser compatibles con los componentes celulares de los tejidos diseñados y las células endógenas en el tejido del huésped.
3. Bioactividad: Los scaffolds pueden interactuar con los componentes celulares de los tejidos diseñados activamente para facilitar y regular sus actividades. Los biomateriales pueden incluir señales biológicas como ligandos de adhesivo celular para amplificar adherencia o señales físicas como topografía para influenciar la morfología celular y alineamiento. El scaffold también puede servir como vehículo de transporte o reservorio para señales estimulantes del crecimiento endógenas como los factores de crecimiento para acelerar la regeneración.

4. **Propiedades mecánicas:** Los scaffolds proporcionan estabilidad mecánica y de forma al defecto en el tejido. Las propiedades mecánicas intrínsecas de los biomateriales usados para scaffolds o sus propiedades post-procesamiento deben coincidir con las del tejido huésped^[3].

En el Anexo B se encuentra una tabla comparativa entre las funciones de la ECM en un tejido nativo y de un scaffold en un tejido de ingeniería.

1.1.3. Materiales Auxéticos

Una rama de investigación de la ingeniería de tejidos se ha enfocado en estudiar los efectos que pueden tener los scaffolds con estructura auxética en la generación de tejidos y sus funciones.

Las estructuras auxéticas y materiales auxéticos son aquellos que tienen un coeficiente de Poisson negativo y exhiben un comportamiento contraintuitivo cuando se les aplica fuerza: el área transversal aumenta con el estiramiento axial. Esto en contraste con el comportamiento de deformación más intuitivo de los materiales con coeficiente de Poisson positivo, que se contraen lateralmente mientras el material se estira como se observa en la Figura 1.6^[4].

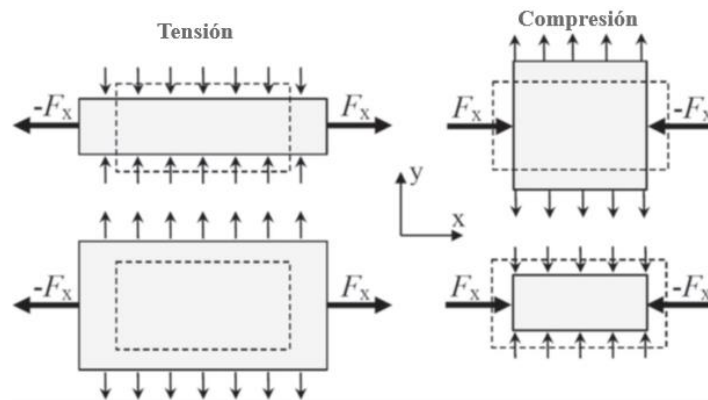


Figura 1.6: Comportamiento al aplicar una carga de tensión y compresión en: (a) material no auxético (b) material auxético^[5]^[5].

El coeficiente de Poisson, denotado ν y nombrado por Simeón Denis Poisson, corresponde a la propiedad de un material de expandirse (o contraerse) en dirección perpendicular a la dirección de compresión (tensión), y es empleado para caracterizar un material. Se define como menos el coeficiente entre la contracción lateral (deformación transversal: ϵ_t) y el estiramiento axial (deformación longitudinal: ϵ_l) en la dirección de carga elástica, como muestra la ecuación (1.1) ^[5]. Termodinámicamente puede probarse que el coeficiente de Poisson para los materiales elásticos isotrópicos está delimitado entre -1 y +0,5^[6]. Mientras que el coeficiente de Poisson para los materiales elásticos anisotrópicos puede no tener límites^[25].

$$\nu = \frac{-\epsilon_t}{\epsilon_l} \quad (1.1)$$

De acuerdo con Greaves (2011), “El coeficiente de Poisson describe la resistencia de un material de distorsionarse bajo carga mecánica, en lugar de alterar su volumen”^[6]. Un material auxético exhibe inusualmente grandes transformaciones volumétricas, conservando la forma de su microestructura^[7].

Las primeras muestras de un material con coeficiente de Poisson negativo o NPR (Negative Poisson Ratio) datan de 1870, pero el primer material diseñado intencionalmente fue en 1987 por Lakes, quien reportó una estructura de espuma reentrante que exhibe NPR^[6].

En 1991, los materiales con coeficiente de Poisson negativo fueron acuñados como “auxéticos” o “materiales auxéticos” por Evans, para simplificar la descripción de un material con NPR^[5]. El término “auxéticos” se deriva de la palabra “auxetikos” y se refiere a “lo que tiende a aumentar”^[6].

El comportamiento auxético es provisto por el arreglo particular de la microestructura geométrica y por la específica deformación mecánica ocurriendo en los elementos que componen la microestructura del material. La microestructura geométrica más simple en los materiales auxéticos es la celda de panal hexagonal reentrante, también conocida como mariposa o corbatín. Otras microestructuras geométricas en materiales auxéticos son aquellas hechas de nodos y ligamentos rotatorios (exhibiendo lo que se conoce como simetría quiral), rectángulos y triángulos rotatorios (estructuras rígidas rotatorias) o unidades interconectadas con transmisión cinética provista por fuerzas de corte^[7]^[7].

La mayoría de las investigaciones se han realizado en estructuras reentrantes, especialmente el panal hexagonal reentrante^[4]^[5]^[6]^[7]^[13]^[14]. A pesar de que las estructuras quirales y rígidas-rotatorias han sido extensamente modeladas, datos experimentales aún no han sido extensamente reportados. La mayoría de los reportes se basa en estudios paramétricos hechos usando derivaciones analíticas o modelamiento de elementos finitos (FEM: Finite Element Modeling) ^[5]^[6]^[7]^[15]^[16].

1.2. Motivación

Los andamios auxéticos tienen diversas aplicaciones en medicina, entre las que destacan parches cardíacos, stents y vendajes inteligentes^[19]^[19]^[21]^[22]^[23]^[24]. Estudios recientes han logrado demostrar que los andamios auxéticos son capaces de mantener el crecimiento celular y preservar la capacidad de expansión de espacios entre las interfaces de capa, por lo que son potencialmente aceptables para la formación de tejido. También sugieren que los andamios auxéticos con coeficiente de Poisson, módulo elástico y microestructura ajustables podrían modular el microambiente biofísico 3D e influir en la diferenciación de las células madre^[4]^[14]^[15]^[16].

Por esta razón, la motivación de este trabajo es la creación de una estructura auxética fabricada en resina mediante impresión 3D SLA, para la realización de pruebas celulares que muestren si sería posible utilizarlas en el ámbito de la medicina.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

- Fabricar andamios auxéticos mediante impresión 3D, y estudiar el efecto de su coeficiente de Poisson sobre el crecimiento de células madre mesenquimales en su superficie.

2.2. Objetivos específicos:

- Estudiar scaffolds auxéticos poliméricos para fabricación mediante impresión 3D, seleccionar las tres estructuras con el mejor desempeño e imprimirlas en distintas resinas y con diferentes parámetros de impresión, con el fin de optimizar los resultados.
- Cuantificar el valor del coeficiente de Poisson de las estructuras auxéticas impresas.
- Estudiar el efecto del diseño del andamio sobre la proliferación de las células madre mesenquimales cultivadas en su superficie.

3. Alcances

Se espera poder observar la respuesta de las células utilizando como su soporte scaffolds auxéticos del mismo material, pero diferentes estructuras y, por ende, distinto coeficiente de Poisson. Los scaffolds serán impresos en resina mediante impresión 3D y se intentará reducir cada vez más su tamaño para posteriores estudios de proliferación celular. Se estudiarán tres estructuras auxéticas reportadas, además de una estructura no auxética para comparación.

El cultivo será realizado en colaboración por especialistas para comprobar la viabilidad de los scaffolds y, finalmente, analizar el efecto de la estructura sobre la proliferación celular en cada uno de ellos. No se realizarán ensayos sometiendo las estructuras a estímulos mecánicos externos, se espera que las células sean capaces de reaccionar a las propiedades mecánicas de la estructura del material.

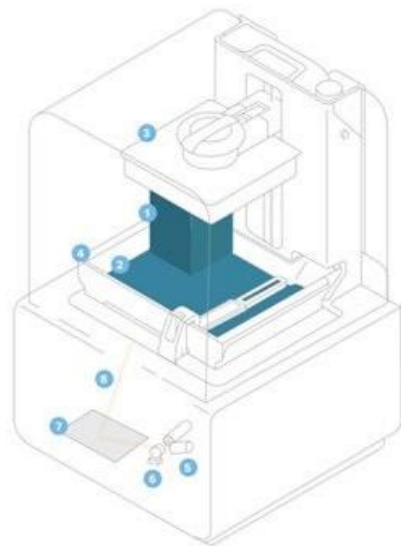
4. Antecedentes específicos

4.1. Estereolitografía

La impresión 3D de estereolitografía (SLA) utiliza un láser para curar resina de fotopolímero líquido en partes sólidas. En la Figura 4.1 se puede ver un esquema de una impresora SLA.

Con el proceso común, SLA invertido, una plataforma de construcción se baja en un tanque de resina, dejando solo una capa delgada de líquido entre la plataforma y el fondo del tanque. Los galvanómetros dirigen el láser a través de una ventana transparente en el fondo del tanque de resina, dibujando una sección transversal del modelo 3D y endureciendo selectivamente el material. La impresión está construida en capas consecutivas, cada una de menos de cien

micras de espesor. Las estructuras de soporte mantienen los voladizos anclados a la plataforma cuando es necesario. Cuando se completa una capa, la plataforma se eleva alejándose levemente del fondo del tanque, dejando que la resina fresca fluya debajo, y la plataforma se baja una vez más. Este proceso se repite hasta que se completa la impresión. La estereolitografía es ideal para la creación rápida de prototipos funcionales, modelado de conceptos, producción a corto plazo, aplicaciones dentales, creación de prototipos de joyas y fundición^[10].



Estereolitografía invertida (SLA)

- 1 Impresión
- 2 Resina
- 3 Plataforma de impresión
- 4 Tanque de resina
- 5 Láser UV
- 6 Galvanómetros
- 7 Espejo escaneador X-Y
- 8 Rayo del láser

Figura 4.1: Esquema impresora SLA^[10].

4.2. Metamateriales auxéticos

El término “metamateriales” fue inicialmente usado dentro del contexto de óptica y electromagnetismo. Recientemente, el concepto ha sido extendido a una clase de materiales cuyas propiedades efectivas son generadas, no solo por el comportamiento a granel de los materiales que lo componen, sino también por su estructura interna^[5]. Las propiedades a escala macro de los metamateriales se originan de su topología a escala pequeña (es decir, nano/micro arquitectura), por lo tanto, esta topología puede ser diseñada para obtener propiedades mecánicas o físicas específicas^[6]. Esto genera que posean propiedades superiores o inusuales en aspectos como el módulo elástico, densidad, absorción de energía y acústica, rendimiento fónico, rendimiento de transporte de calor, materiales inteligentes y coeficiente de Poisson negativo (NPR). En particular las ventajas de los metamateriales auxéticos los convierten en potenciales candidatos para aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a prótesis, textiles auxéticos, sensores inteligentes, resistencia a la indentación y fatiga, filtros inteligentes, sistemas magnéticos auxéticos, tamiz molecular, cojines de asiento, amortiguadores de vibraciones superiores y aislantes acústicos^[5].

La existencia de materiales auxéticos naturales se mantiene controversial desde la perspectiva de la mecánica tradicional, pero algunos investigadores han reportado comportamiento auxético en huesos esponjosos, piel de vaca, tendones, ciertos minerales y algunas zeolitas^[6].

Los recientes avances en manufactura aditiva (AM: Additive Manufacturing) han habilitado la fabricación de estructuras con complejas nano/micro arquitecturas. La habilidad de diseñar un material con una estructura que exhiba un deseado set de propiedades mecánicas, incluyendo un coeficiente de Poisson negativo, han llevado al desarrollo de metamateriales mecánicos auxéticos^[6].

Estos materiales pueden ser clasificados por su geometría o mecanismo de deformación. Tres bien establecidas estructuras básicas pueden ser identificadas, lo que ayuda en la explicación de estos mecanismos: estructuras reentrantes, estructuras quirales y estructuras rígidas rotatorias^[5].

4.2.1. Estructuras reentrantes:

Reentrante se refiere a algo “dirigido hacia el interior” o que tiene un ángulo negativo. Una típica estructura reentrante es conocida como panel hexagonal reentrante (Figura 4.2) y fue propuesta por primera vez en 1982 por Gibson.

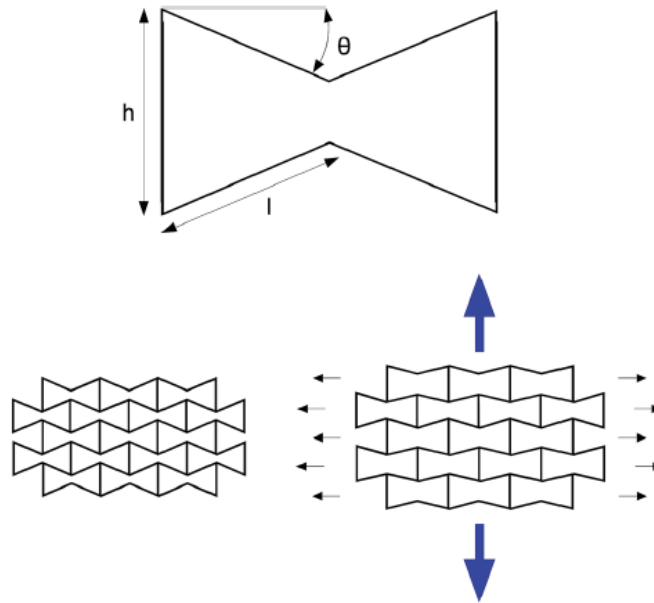


Figura 4.2: Ilustración del comportamiento auxético en una estructura de panel reentrante. Donde θ es el ángulo reentrante, h/l es el coeficiente de largo de la costilla y w es el espesor de las costillas^[5].

Un panel usualmente se refiere al arreglo regular de celdas hexagonales prismáticas de la abeja. Sin embargo, un panel auxético se refiere a cualquier conjunto de celdas reentrantes idénticas que anidan juntas para llenar un plano o espacio 3D y exhiben un coeficiente de Poisson negativo. Las celdas hexagonales regulares tienen isotropía en el plano, pero las celdas hexagonales reentrantes son altamente anisotrópicas.

La deformación de estructuras reentrantes es dominada por el realineamiento de las costillas de la celda (bisagras), aunque la deflexión y deformación axial (estiramiento) de las costillas de la celda también están dentro de los mecanismos responsables de su comportamiento auxético.

En 2003, Yang encontró que el grado de auxeticidad es dependiente del ángulo reentrante y del coeficiente de largo de la costilla de la celda (h/l). Un mínimo relativo de $-0,99382$ fue alcanzado con el ángulo de $14,47^\circ$ y coeficiente de $0,5$. Se mostró que la auxeticidad de esta estructura aumenta con el aumento del coeficiente de largo o de costilla, hasta que comienza a disminuir pasado el valor óptimo de $0,5$. Al igual que ocurre con el aumento del ángulo reentrante^[5].

Li y colaboradores usan dos estructuras auxéticas clásicas, y proponen dos nuevas estructuras para combinar el comportamiento auxético y el alto rendimiento mecánico. En particular buscan obtener un módulo de Young y límite elástico significativamente mejorados, sin sacrificar su coeficiente de Poisson negativo en la dirección perpendicular correspondiente. Las estructuras analizadas corresponden al clásico panel reentrante (RH: Re-entrant Honeycomb) y panel de doble flecha (DAH: Double Arrowed Honeycomb), las nuevas estructuras se denominan panel reentrante aumentado (ARH: Augmented Re-entrant Honeycomb) y panel de doble flecha aumentado (ADAH: Augmented Double Arrowed Honeycomb). Estas cuatro estructuras se pueden observar en la Figura 4.3^[13].

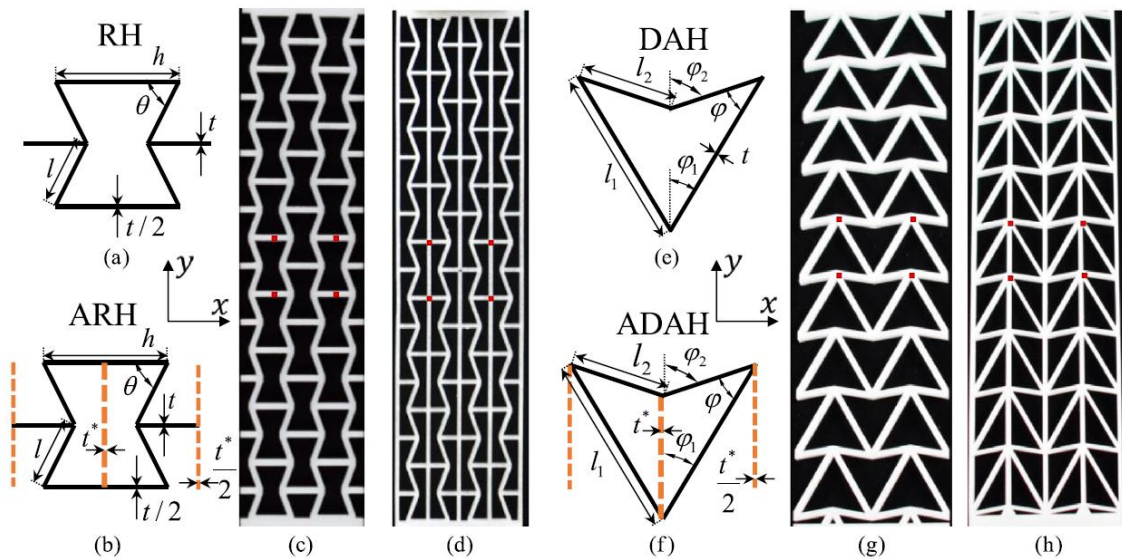


Figura 4.3: (a) Celda unitaria de RH donde, h y l son los largos de las paredes horizontales e inclinadas, θ es el ángulo entre la pared horizontal y la inclinada, y t es el grosor de la pared de la celda; (b) Celda unitaria de ARH donde t^* es el grosor de la pared de la celda aumentada; (e) Celda unitaria de DAH donde l_1 y l_2 son los largos de las dos paredes inclinadas, ϕ_1 y ϕ_2 son los ángulos entre las dos paredes inclinadas y t es el grosor de las paredes inclinadas; (f) Celda unitaria de ADAH donde t^* es el grosor de la pared de la celda aumentada^[13].

Obtienen que las nuevas estructuras auxéticas poseen un coeficiente de Poisson más pequeño que las originales. El Poisson experimental de la estructura ARH con $h = 11[mm]$, $l = 8[mm]$, $t = 1,5[mm]$ y $\theta = 60^\circ$ es aproximadamente $-1,6$, mientras que el de RH es $-1,4$. En el caso de la estructura ADAH su coeficiente de Poisson es aproximadamente -1 , mientras que el de DAH es $-0,9$. El módulo de Young y la resistencia de los ARHs y ADAHs son destacablemente aumentados, comparados con RHs y DAHs^[13].

4.2.2. Estructuras Quirales:

Una típica unidad quirale, como la de la Figura 4.4, comprende un cilindro central encapsulado en ligamentos unidos tangencialmente, y no es superponible en su imagen especular. La unidad básica descrita puede ser construida de forma quirale o anti-quirale.

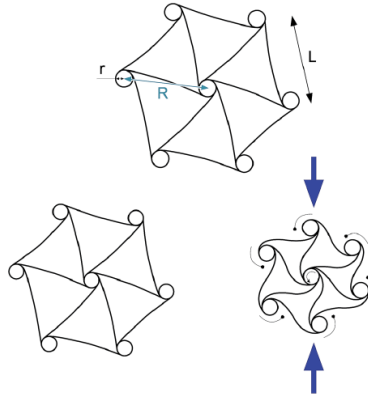


Figura 4.4: Ilustración del comportamiento auxético en una unidad hexaquiral^[5].

Los cilindros rotan bajo carga mecánica, causando que los ligamentos se flexionen. Esto resulta en el plegado y desplegado de los ligamentos bajo las cargas de tensión o compresión, respectivamente.

A diferencia de las celdas reentrantes, el coeficiente de Poisson de las celdas quirales no depende de ningún ángulo estructural. Su habilidad de “enrollarse” en sí mismos bajo compresión, les permite mantener su coeficiente de Poisson sobre un rango significativo de deformación (25%). Estas celdas han demostrado isotropía mecánica en el plano, con coeficientes de Poisson cercanos a -1 ^[5].

4.2.3. Estructuras semi-rígidas rotatorias:

Una estructura rotatoria ideal contiene cuadrados rígidos conectados por simples bisagras, como se observa en la Figura 4.5. Cuando se carga, los cuadrados rotarán en los vértices, ya sea expandiéndose o contrayéndose, dependiendo del tipo de carga. El concepto ha sido ampliamente implementado usando cuadrados, rectángulos, triángulos, rombos y paralelogramos.

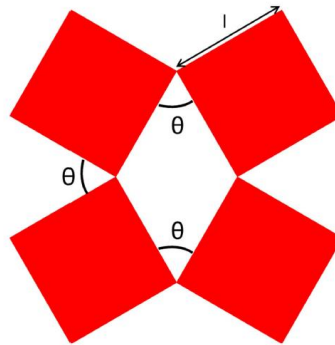


Figura 4.5: Celda unitaria del modelo de cuadrados rotatorios^[5].

A pesar de haber sido observados en materiales cristalinos inorgánicos, en el año 2000, Grima fue el primero en explorar el potencial auxético de los cuadrados rígidos rotatorios. Usando el principio de conservación de la energía para modelar este comportamiento, mostrando que este sistema idealizado siempre mantendrá su coeficiente de aspecto y por lo tanto exhibe un coeficiente de Poisson constante de -1.

El efecto auxético es usualmente sobreestimado, ya que la mayoría de los modelos tiende a idealizar la situación y asumir que los cuadrados no se deforman. Por tanto, fallan al predecir la dependencia del coeficiente de Poisson de la dirección de carga. En 2007, Grima simuló el comportamiento de cristales de zeolita bajo carga axial y de corte, y propuso un nuevo modelo de cuadrado semi-rígido, lo que permite a los cuadrados deformarse y convertirse en rectángulos. La introducción de un grado extra de libertad provee una mejor representación del coeficiente de Poisson de las estructuras de cuadrados rotatorios, pero se necesitan nuevas mejoras pues la auxeticidad sigue siendo sobreestimada^[5].

4.3. Estimulación mecánica de células

Las células responden a estímulos mecánicos mediante un proceso denominado mecanotransducción. Estos estímulos son percibidos a través de diversas moléculas mecanosensibles, y son convertidos en señales químicas dentro de la célula.

Las moléculas mecanosensibles son principalmente proteínas que muestran un cambio de estado en respuesta a la estimulación mecánica. Estas incluyen integrinas, canales iónicos activados por estiramiento, receptores acoplados a proteínas G y receptores de factor de crecimiento, que activan diferentes vías de mecanotransducción^[11].

Un esquema de este proceso se puede observar en la Figura 4.6, donde las fuerzas mecánicas (MF: Mechanical Forces) pueden inducir la mecanotransducción alterando directamente la conformación de una configuración proteína-integrina de la matriz extracelular y transmitiendo las fuerzas al citoesqueleto y núcleo, esto eventualmente afectando la transcripción y traducción. También las fuerzas mecánicas pueden desenrollar el dominio de una proteína extracelular (M) y exponer un sitio crítico que puede servir como ligando activador para un receptor de superficie celular, resultando en una serie de eventos de señalización. Además, cuando fuerzas mecánicas son aplicadas a Receptores de Fuerza (FR: Force Receptors), como las integrinas y proteínas G, estas inician la transducción de señales, resultando en transcripción, seguida de traducción. Como resultado, factores solubles son secretados en la ECM, los cuales actúan en el receptor (R) y luego inician una cascada de eventos de señalización^[12].

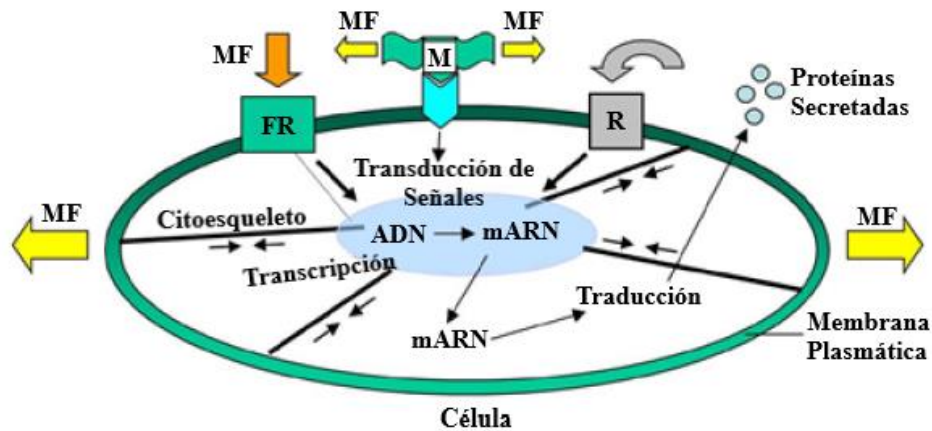


Figura 4.6: Ilustración esquemática de la "naturaleza mecánica" de los mecanismos de mecanotransducción celular. Notar que las flechas dobles indican tensiones intracelulares sobre el citoesqueleto. En la imagen MF: Fuerzas mecánicas; FR: Receptores de fuerza como integrinas y proteínas G; M: Proteína extracelular; R: Receptor de factores solubles^[12].

La respuesta mecánica celular a través del eje ECM-integrina-citoesqueleto-núcleo comienza con las adhesiones focales (FA: Focal Adhesions), donde se concentra principalmente la interacción celda-matriz. Las FA son complejos discretos de multiproteínas debajo de la membrana, que desarrollan típicamente las células en contacto con una superficie rígida. Las FA perciben y transfieren las señales mecánicas que surgen del medio extracelular al citoesqueleto celular. Para ello se construyen como estructuras complejas, como se observa en la Figura 4.7, que se pueden dividir en una capa transmembrana y en una capa intracelular. La capa intracelular de FA está compuesta por proteínas de andamiaje, acoplamiento y señalización, que colectivamente sirven como interfaz entre los componentes transmembrana que contactan directamente la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina. Estas proteínas son:

- Quinasa de adhesión focal (FAK: Focal Adhesion Kinase): Es una de las primeras moléculas reclutadas para desarrollar adherencias focales en respuesta a estímulos mecánicos externos. Su activación por autofosforilación se considera el desencadenante de la mecanotransducción intracelular.
- Talina: Proteína que se comporta como amortiguador de fuerza mediante rondas estocásticas de despliegue/replegamiento. El efecto más reconocido de la fuerza de carga en la talina consiste en su despliegue para exponer sitios de unión hidrófobos crípticos para hospedar la cabeza de la vinculina. Este proceso se llama mecanosensibilidad talina-vinculina.
- Vinculina: Uno de los componentes principales de las FA, su reclutamiento en el sitio requiere la activación de talina por fuerzas mecánicas. La presencia de vinculina en los FA se correlaciona directamente con la fuerza aplicada en el mismo.
- Paxilina: Principalmente localizada en la capa intracelular de las FA. Estabiliza la interacción FA-citoesqueleto.

- Zyxina y p130^{Cas}: La zyxina se libera de las FA cuando las células crecen en un sustrato blando o cuando la carga mecánica se reduce. Un interactador directo de la zyxina es la proteína adaptadora p130^{Cas}, recientemente propuesta como un nuevo mecanosensor. Esta proteína interactúa con la vinculina y FAK en el sitio FA. Se ha propuesto que la interacción p130^{Cas}-vinculina congela la vinculina en la conformación abierta, promoviendo así la unión con la talina y la estabilidad de FA.

Además de responder a los cambios en la composición bioquímica y mecánica de la ECM, las células también ajustan su propio estado mecánico al alterar la arquitectura del citoesqueleto, modular la elasticidad celular o generar una respuesta contráctil asociada a las fuerzas aplicadas. La interacción entre el estado mecánico externo o interno de las células se define por la homeostasis tensional, un estado de estrés de equilibrio basal en el que las células mantienen niveles definidos de tensión con su entorno, a pesar de las perturbaciones mecánicas.

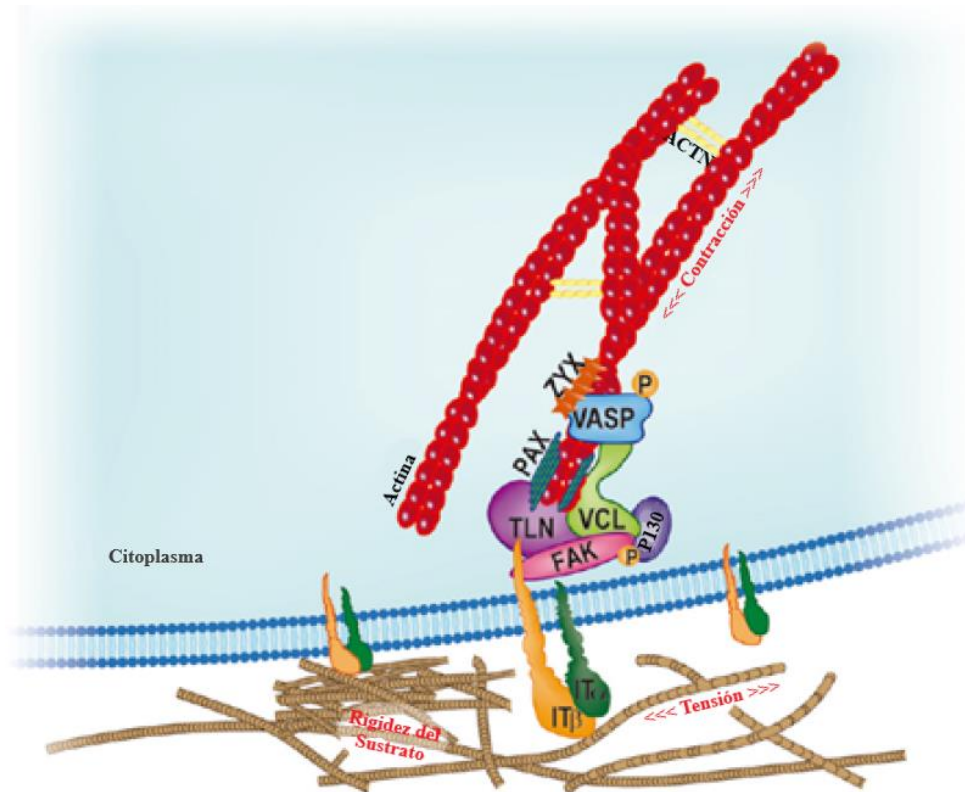


Figura 4.7: Representación esquemática de los actores clave de la mecanosensibilidad que participan en la interacción célula-MEC en el sitio de adhesión focal (FA), donde ACTN: actinina; FAK: quinasa de adhesión focal; IT: integrinas; PAX: paxilina; TLN: talina; VASP: fosfoproteína estimulada por vasodilatadores; VCL: vinculina; ZYX: zyxina. Los cambios extracelulares en rigidez, tensión u otros estímulos mecánicos son percibidos por grupos de integrinas cuyos cambios morfológicos o de distribución reclutan FAK. La barra de talina, la vinculina, la paxilina y la proteína adaptadora p130^{Cas} se acoplan entre sí y transfieren las señales mecánicas de las integrinas al componente actina del citoesqueleto. Cerca del centro de la adhesión focal, el complejo VASP, la zyxina y actininas regulan directamente el ensamblaje y la dinámica de la actina^[11].

La información mecánica que surge de las modificaciones de la ECM, percibida por las AF y propagada a nivel del citoesqueleto, impacta en las proteínas que residen en la membrana o en el citoplasma e induce su modificación estructural y su posterior traslado al núcleo celular^[11].

La interpretación de las señales mecánicas por parte de la célula se completa mediante la activación de un programa genético dado, que induce a la célula a adaptarse a las nuevas condiciones. Dependiendo del tipo de célula y las condiciones de carga, la aplicación de fuerzas mecánicas a las células afecta un espectro de funciones celulares, incluida la proliferación celular, diferenciación, expresión génica y síntesis de proteínas de componentes de la ECM, y producción de citocinas y factores de crecimiento. Las fuerzas de tracción y compresión con la misma magnitud inducen respuestas mecanobiológicas celulares diferentes^[11].

En los organismos vivos, las células residen en núcleos físicamente confinados donde las células circundantes y la ECM presentan señales mecánicas dinámicas y heterogéneas. La topografía es percibida por las células como una característica específica del tejido, por lo tanto, los materiales de ingeniería capaces de imitar el entorno fisiológico se consideran una herramienta poderosa para controlar el comportamiento celular. Las células también pueden distinguir entre las características de micro y nano escala^[11].

4.4. Aplicaciones en medicina de los materiales auxéticos

4.4.1. Biomateriales auxéticos

La relevancia de los materiales auxéticos en medicina se basa en que algunos tejidos o biopolímeros naturales podrían mostrar NPR bajo ciertas condiciones de carga. A pesar de que es muy difícil obtener propiedades elásticas precisas de biomateriales auxéticos que ocurren naturalmente, algunos ejemplos han sido reportados.

Los tendones, banda de tejido conectivo fibroso que conecta el músculo con el hueso, son capaces de soportar grandes cargas de tracción, una característica atribuida a sus subestructuras helicoidales poliméricas. Estas funcionan de manera similar a los resortes en espiral, y se cree que las interacciones acopladas entre ellos son responsables de su efecto auxético. Una estructura de tendón artificial podría enfatizar un diseño auxético "reentrante" que imita las subestructuras helicoidales alineadas del tendón natural^[19].

Williams observó que huesos esponjosos de la epífisis tibial proximal exhibe NPR^[19]. Veronda examinó la caracterización mecánica de la piel de gato y encontró que es auxética bajo deformación finita^[19]. Lees conduce experimentos en piel de ubre de vaca en deformación uniaxial y biaxial y encontró que puede presentar NPR a bajos esfuerzos^[19]. Todos los efectos auxéticos mencionados, se cree resultan de estructuras fibrilares a nivel microestructural.

Aparte del comportamiento auxético encontrado en los biomateriales macroscópicos naturales mencionados anteriormente, el comportamiento auxético también se encontró en la escala microscópica de las células.

Baughman reportó que las membranas encontradas en el citoesqueleto de células rojas demuestran NPR^[19]. Wang reportó que el núcleo de células madre embrionarias extraídas de ratón fueron encontradas auxéticas durante el transicionamiento hacia la deformación, como se ve en la Figura 4.8.

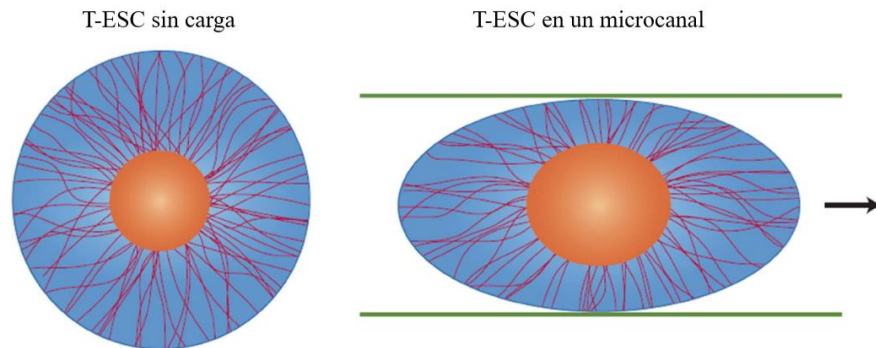


Figura 4.8: El núcleo de una célula madre embrionaria en el estado de transición (T-ESC) se expande cuando se tracciona^[19].

La auxeticidad puede ser un elemento significativo en la mecanotransducción, a través de la regulación de la transformación molecular en la diferenciación de núcleos por fuerzas externas^[19].

4.4.2. Parche cardíaco:

Las enfermedades cardiovasculares (cardiovascular diseases: CVDs) son la causa líder de muerte y discapacidad en el mundo. Los biomateriales y terapias regenerativas representan interesantes posibles soluciones. El infarto al miocardio (Myocardial Infarct: MI) es uno de los mayores contribuidores a las CVDs. Este es causado por la oclusión de una o más arterias coronarias, resultando en que el tejido del miocardio se vuelva isquémico y reduciendo la habilidad del corazón de bombear sangre alrededor del cuerpo. Una solución para regenerar el tejido infartado son los parches cardíacos, que buscan fortalecer el tejido, suplementar células o factores de crecimiento para vitalizar el tejido y hacer de puente para la estimulación mecánica y/o eléctrica con el fin de mantener y mejorar la función cardíaca.

Es ampliamente aceptado que las propiedades mecánicas de los biomateriales usados para tratar MI son extremadamente importantes. Típicamente, se cree que las propiedades mecánicas de un parche cardíaco deben coincidir con las del tejido del corazón nativo. Sin embargo, el módulo de Young del corazón humano varía entre 0,02 a 0,5 [MPa] dependiendo si el corazón está en sístole o diástole, con el tejido infartado siendo aún más rígido.

Otra importante propiedad mecánica que usualmente no se toma en cuenta es el coeficiente de Poisson. Los materiales auxéticos poseen mejores propiedades únicas como resistencia al corte, resistencia a la indentación y curvatura sinclástica, todas las cuales son propiedades

interesantes en un parche cardiaco. Una forma de incorporar estas propiedades en parches cardiacos es mediante micro patronaje auxético.

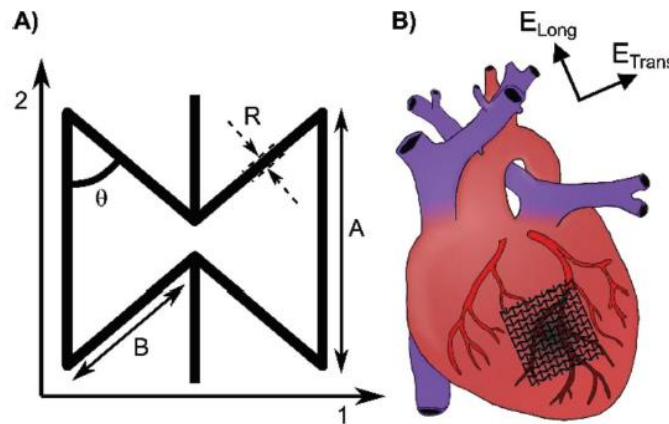


Figura 4.9: A) Esquema de las dimensiones de un corbatín; B) Ilustración esquemática del alineamiento de un parche cardiaco auxético (Auxetic Cardiac Patch: AuxCP) en el corazón^[21].

El diseño usado aquí es conocido como mecanismo de deformación de panel reentrante o “corbata”, como se observa en la Figura 4.9. Una característica particularmente interesante de esta geometría es que es anisotrópica, es decir, es más rígida en una dirección que en la otra, lo que es similar al tejido nativo del corazón. Se ha reportado que el corazón es más rígido en dirección circunferencial (transversa) que en la longitudinal.

Se diseñó un parche cardiaco auxético (Auxetic Cardiac Patch: AuxCP) tal que la dirección más rígida estuviese alineada con la dirección más rígida circunferencial (transverso) del corazón; mientras la menos rígida dirección longitudinal del corazón. Cuando este patrón de corbata es estirado en una dirección, las costillas diagonales se flexionan y abren causando expansión en la otra dirección, resultando en un coeficiente de Poisson negativo. Este coeficiente de Poisson es negativo entre 5%-15% de tensión (según las dimensiones originales de las corbatas). La fabricación de la geometría de corbata fue lograda a través de microabrasión con láser UV^[21].

Los parches fueron adjuntados al tejido con una técnica de fotoadhesión. Las deformaciones longitudinales, las deformaciones transversales y el coeficiente de las dos deformaciones se midieron a partir de videos del microscopio digital del tejido mientras era elongado con un parche auxético o sin patrón, y se normalizó al tejido antes de colocar el parche. Al analizar tensiones a través de todo el tejido no hubo diferencias significativas entre las tensiones transversales y longitudinales para el parche cardiaco auxético y sin patrón, comparado al tejido sin parche, sugiriendo que los parches no interfieren con la mecánica global del tejido.

Sin embargo, mediciones de tensión a través del área del parche demostraron significativas disminuciones en ambas tensiones longitudinal y transversal para el sin patrón comparado con ambas el tejido sin parche y con parche auxético. Más aun, los parches sin patrón tienen un coeficiente normalizado de tensión de $-0,7 \pm 0,6$ (transversal/longitudinal), demostrando una dramática disminución de sus propiedades mecánicas.

Se observó una mayor adaptabilidad de los parches auxéticos al movimiento del tejido nativo en comparación con los parches sin patrón. Los parches auxéticos disminuyeron significativamente las tensiones en el área del parche en comparación con el tejido sin parche. Sin embargo, aunque las tensiones se redujeron con los parches auxéticos, mantuvieron una proporción normalizada similar de tensiones con el tejido sin parche, lo que sugiere que los parches auxéticos se estiran y se ajustan a los movimientos del tejido nativo al tiempo que proporcionan soporte mecánico^[21].

Esto demuestra que un parche cardíaco conductor mejorado mediante el uso de un diseño auxético, que puede ajustarse para adaptarse a las demandas mecánicas del corazón, es un parche cardíaco prometedor^[21].

4.4.3. Stent arterial o para vasos sanguíneos:

Se ha descrito un stent, malla extensible que se utiliza para abrir arteria, venas u otros conductos del cuerpo que han sido previamente tapadas u obstruidas, para abrir la cavidad de una arteria o un vaso similar para su uso en angioplastia coronaria y procedimientos relacionados. La arteria se abre mediante la expansión lateral de una vaina o varilla hueca de politetrafluoroetileno auxiliar flexible (PTFE) bajo tensión, como se observa en la Figura 4.10^[22].

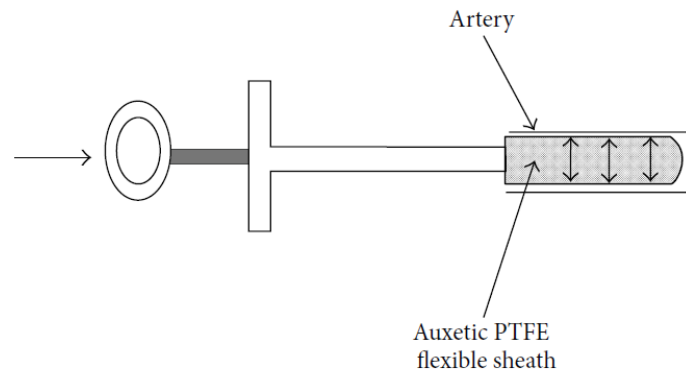


Figura 4.10: Dilatador que emplea una vaina terminal auxética^[22].

El desarrollo de implantes biomédicos con geometría auxética no solo mejora las propiedades físicas y mecánicas del dispositivo, sino que también minimiza el daño de la adhesión tisular cuando se despliega en el sitio del tejido lesionado. En los modelos basados en geometría, el comportamiento auxético es independiente de la escala al igual que en los materiales auxéticos, por lo que, con los mecanismos de deformación, las características auxéticas se pueden maniobrar junto con la misma combinación geométrica en cualquier etapa. De manera similar, la deformación en las características geométricas del dispositivo se debe al efecto de la NPR cuando se somete a cargas uniaxiales. La geometría del material que muestra un comportamiento auxético se puede lograr en niveles macro, micro y nano escala. Se ha presentado la fabricación de un nuevo stent coronario basado en una nueva geometría auxética que evita la constricción localizada del flujo sanguíneo en la arteria coronaria del corazón. El nuevo diseño de stent coronario complementa las propiedades anisotrópicas del

sistema vascular del cuerpo. Ésta es una característica estructural novedosa que faltaba en los stents coronarios comercializados anteriormente. El stent fabricado puede observarse en la Figura 4.11.

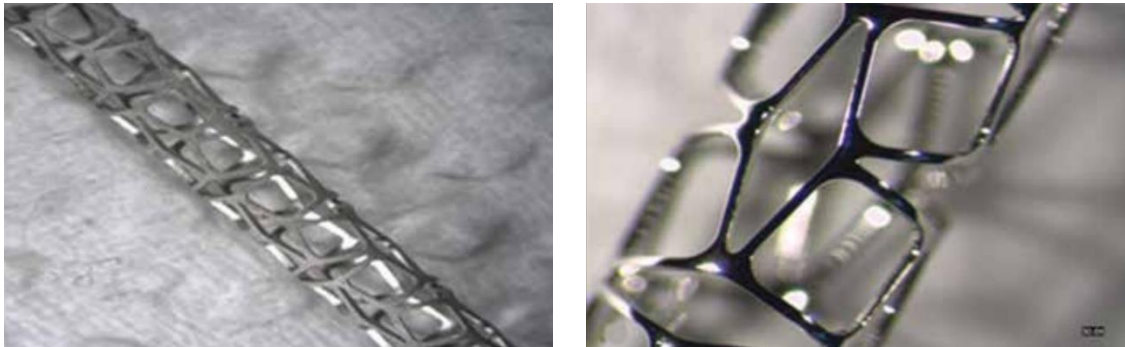


Figura 4.11: Izquierda: Fotografía que muestra una muestra completa del Stent coronario auxético; Derecha: vista en primer plano de una celda unitaria del Stent^[23].

Se propone que el nuevo stent auxético expansible con balón tendrá una buena adherencia o anclaje mecánico en la pared arterial en virtud de que tiene propiedades mecánicas adecuadas. Las propiedades anisotrópicas del stent se basan en su diseño auxético, que lo convierte en un complemento perfecto para las propiedades estructurales anisotrópicas de los vasos coronarios. El tamaño del stent auxético aumenta tanto en dirección radial como longitudinal cuando se expande radialmente a través del catéter de globo, y el stent no presenta acortamiento. Se cree que la propiedad auxética del diseño del stent mantendrá efectivamente la permeabilidad luminal de la arteria coronaria y evitará cualquier problema de migración del stent. La expansión del stent coronario auxético en ambas direcciones mejorará el anclaje mecánico con las paredes de las arterias. Los stents actualmente disponibles en el mercado tienen un desajuste entre la estructura del stent y la pared arterial debido a sus propiedades isotrópicas, razón por la cual estos stents no ofrecen un anclaje favorable con las paredes arteriales^[23].

4.4.4. Vendaje inteligente

Las telas auxéticas también se pueden usar para vendajes médicos inteligentes para mantener el medicamento curativo en contacto. Como se muestra en la Figura 4.12, cuando el material auxético se usa para vendar una herida inflamada, se expande bajo tensión para liberar el medicamento y, una vez que la herida ha cicatrizado y la hinchazón se aclara, el vendaje se encoge deteniendo la liberación del medicamento^[24].

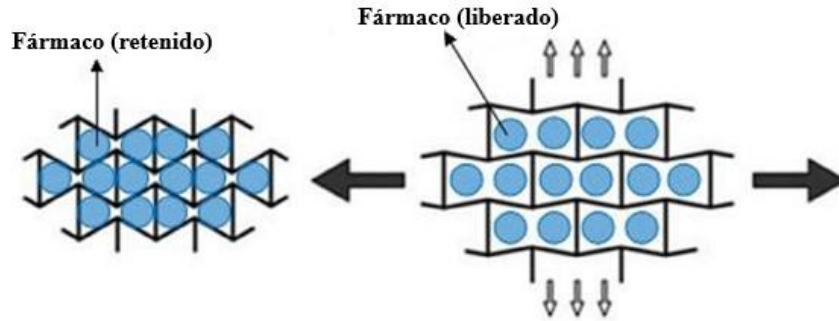


Figura 4.12: Principio de funcionamiento de un vendaje inteligente^[24].

4.4.5. Scaffolds auxéticos y estudios de proliferación y diferenciación celular

En los últimos años han aparecido una serie de trabajos mostrando el uso de estructuras auxéticas para el cultivo celular. Yan, a través de la fabricación de scaffolds auxéticos de poliuretano con varios módulos elásticos, coeficiente de Poisson y microestructuras, estimó la diferenciación neural de células madre pluripotentes. Concluyendo que la microestructura y el coeficiente de Poisson de scaffolds auxéticos puede potenciar la diferenciación neural^[19].

Yan y colaboradores fabrican scaffolds auxéticos de poliuretano con diferentes coeficientes de Poisson, entre 0 y $-0,45$, diferentes módulos de Young, entre 10 y 100 [kPa] y diferentes microestructuras. Evalúan sus efectos en la diferenciación neural de células madre embrionarias de ratón (ESC) y células madre pluripotentes inducidas de humano (hiPSC). Comparan con scaffolds no auxéticos con un coeficiente de Poisson de $\nu = 0,3$ ^[14].

Los scaffolds son fabricados por conversión auxética de espumas de poliuretano como se observa en la Figura 4.13, mediante compresión triaxial a temperatura superior que la característica de transición del sistema^[14].

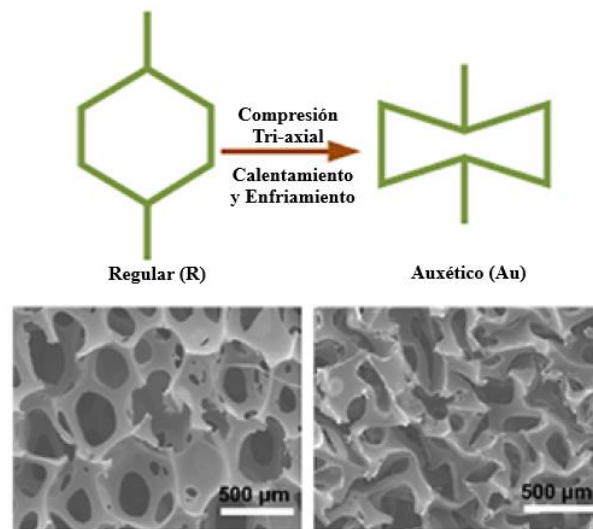


Figura 4.13: Fabricación y caracterización de andamios de poliuretano auxético. Arriba: esquemas del proceso de conversión auxética por pandeo parcial de las costillas de la celda usando compresión isotrópica (triaxial); Abajo: Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) del andamio regular (izquierda) y el andamio auxético (derecha). Barra de escala: 500[μm]^[14].

Evaluaron los andamios auxéticos para la expansión y diferenciación neuronal de las ESC de ratón y las hiPSC. Se observó una distribución de tamaño agregado diferente entre los andamios regular y auxético, lo que puede contribuir a diferentes comportamientos celulares. Cuando se indujo la diferenciación neural, las células en los andamios auxéticos exhibieron una mayor expresión de marcadores neuronales en comparación con los andamios antes de la conversión auxética. La microestructura y la proporción de Poisson de andamios auxéticos probablemente contribuyan a la diferenciación neuronal mejorada^[14].

Por otro parte, Bhullara y colaboradores informan de la preparación y caracterización de membranas de nanofibras auxéticas de PCL (Policaprolactona) adecuadas para diversas aplicaciones biomédicas, en particular, ingeniería de tejidos. Fabrican cuatro muestras que se pueden observar en la Figura 4.14^[15].

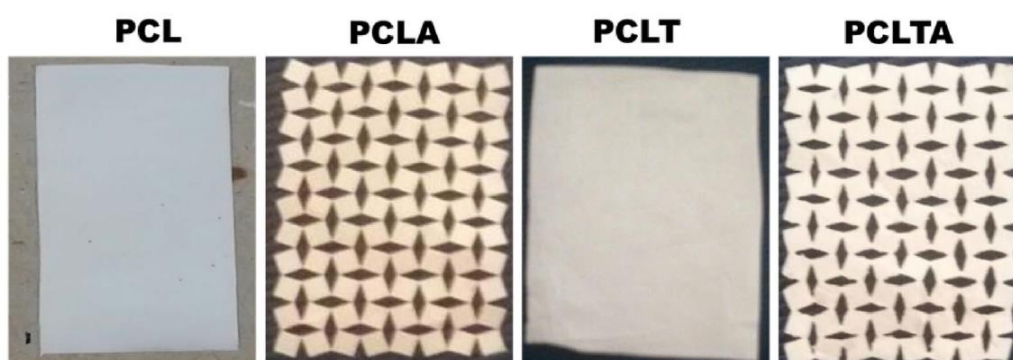


Figura 4.14: Imágenes fotográficas de las muestras auxéticas y sus controles, donde PCL: Muestra de nanofibra fina electrohilada de Policaprolactona con espesor 40 [μm]; PCLA: Muestra auxética de nanofibra fina electrohilada de Policaprolactona con espesor 40 [μm]; PCLT: Muestra de nanofibra gruesa electrohilada de Policaprolactona con espesor 180 [μm] y PCLTA: Muestra auxética de nanofibra gruesa electrohilada de Policaprolactona con espesor 180 [μm]^[15].

Este estudio demostró que las membranas de nanofibras de PCL auxéticas con diferentes espesores se pueden fabricar mediante electrohilado y micromaquinado láser. Las muestras utilizadas corresponden a PCL (Muestra de nanofibra fina electrohilada de Policaprolactona), PCLA (Muestra auxética de nanofibra fina electrohilada de Policaprolactona), PCLT (Muestra de nanofibra gruesa electrohilada de Policaprolactona) y PCLTA (Muestra auxética de nanofibra gruesa electrohilada de Policaprolactona). La muestra de PCLA mostró un aumento de casi diez veces en su capacidad de alargamiento en comparación con la muestra de control, lo que confirma la naturaleza más flexible de la nanofibra auxética sobre nanofibras no auxéticas. Se encontró que la capacidad de elongación total de la muestra de PCLA era mejor que la muestra de PCLTA. Sin embargo, la capacidad de alargamiento total para la muestra de PCLTA se redujo significativamente (casi seis veces) en comparación con las muestras de PCLT, lo que destaca que la auxeticidad redujo la capacidad de deformación de las muestras de PCLTA debido a su mayor espesor de membrana^[15].

Warner y colaboradores, desarrollan un andamio impreso en 3D con coeficiente de Poisson negativo, destinado a usos futuros en aplicaciones de diferenciación celular mediada por

estiramiento como la regeneración de músculo y tendón. Un esquema de este andamio se puede observar en la Figura 4.15.



Figura 4.15: Esquema del andamio 3D^[4].

Los resultados del cultivo celular indican que los scaffolds auxéticos de PAUA/IBOA (poliuretano fotopolimerizable) recubiertos con fibronectina y polimerizados son capaces de soportar el crecimiento celular agregado. Ensayos de evaluación de la viabilidad celular demuestran la capacidad de adhesión celular, los mioblastos murinos son incluso capaces de abarcar espacios vacíos en una malla de una sola capa de hasta 250 μm en 3 semanas^[4].

Las imágenes de superficie de una malla multicapa sembrada con mioblastos y teñida para F-actina y núcleos, muestran que las células parecen envolverse transversalmente a la dirección axial a lo largo de puntales individuales, formando una alfombra superficial de células. Este comportamiento se ha observado previamente con células sometidas a estiramiento, sin embargo, una imagen más profunda del andamio multicapa muestra que las células con tinción de núcleo parecen extenderse a lo largo de las paredes internas de las células unitarias y son normales a la superficie plana. Por lo tanto, logran demostrar que los andamios auxéticos son capaces de mantener el crecimiento celular y preservar la capacidad de expansión de espacios entre las interfaces de capa, por lo que son potencialmente aceptables para la formación de tejido^[4].

Soman y colaboradores diseñan y fabrican un andamio con coeficiente de Poisson positivo y negativo simultáneamente, el cual se puede observar en la Figura 4.16^[16].

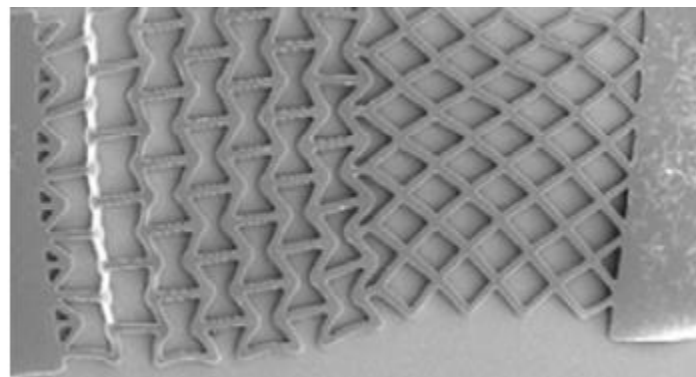


Figura 4.16: Imagen SEM de andamios híbridos de una sola capa. En el lado izquierdo zona NPR y en el lado derecho zona PPR^[16].

Los datos de coeficiente de Poisson en función de la deformación para los andamios híbrido se pueden observar en la Figura 4.17, coinciden bien con los modelos analíticos informados en la literatura. Los datos experimentales para un scaffold híbrido de una capa entregan para el área PPR un coeficiente de Poisson entre 0,7 y 1,2, mientras que para el área NPR entregan valores entre $-1,1$ y $-0,5$.

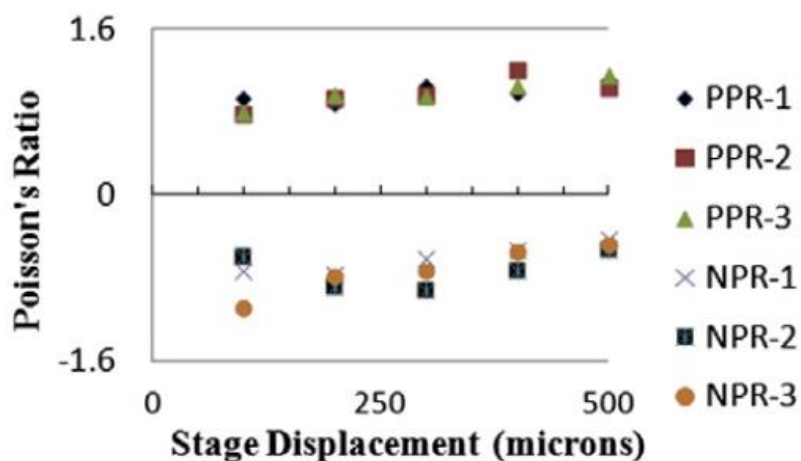


Figura 4.17: Gráfico del coeficiente de Poisson de las regiones PPR y NPR en un scaffold de una sola capa en función del desplazamiento^[16].

Se encontró que las células madre mesenquimales humanas (hMSC) derivadas de la médula ósea se unen fácilmente a las regiones PPR y NPR de los armazones híbridos (Figura 4.18). En ambas regiones, las células adheridas a los puntales del andamio mostraron la formación de fibras de tensión gruesas. Sin embargo, en la región PPR, se encontró que las hMSC crecían principalmente a lo largo del filamento del andamio (Figura 4.18 A y D), mientras que las hMSC en la región NPR crecieron no solo a lo largo de los puntales del andamio, sino también dentro de sus huecos (Figura 4.18 B, C y E). Como se observa en la Figura 4.18 C, las hMSC que crecían en los huecos del andamio se moldearon a la forma de los huecos. Esto es probablemente el resultado de las diferentes topologías presentadas por las regiones PPR / NPR, aunque el área vacía para ambas arquitecturas es relativamente similar y muy grande en comparación con el tamaño de las celdas. El hecho de que las hMSC fueran capaces de unirse y proliferar a través del andamio sugiere aplicaciones potenciales de esta arquitectura híbrida como parches de biomaterial para la regeneración de tejidos^[16].

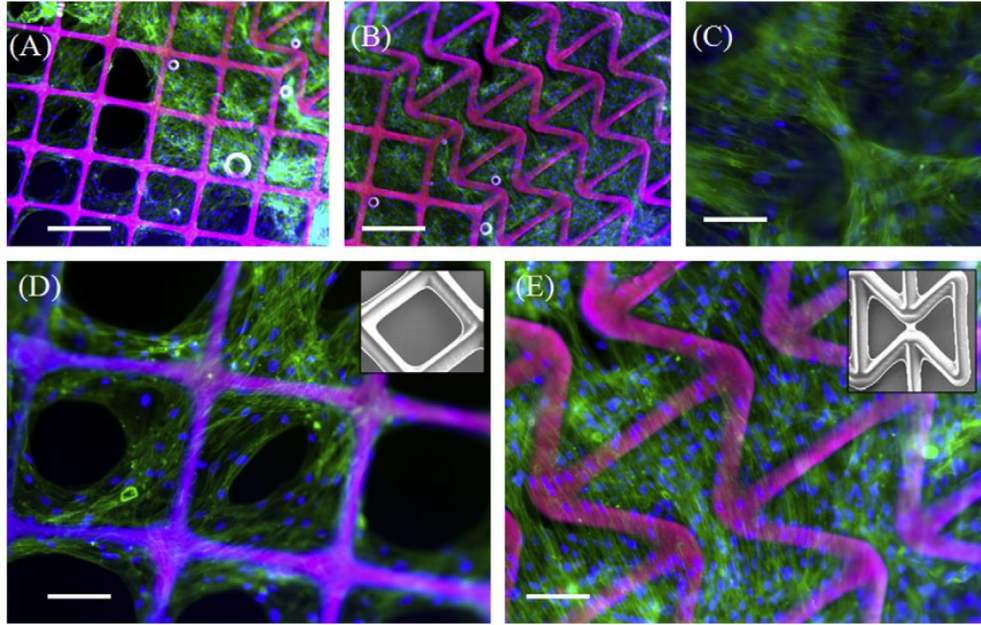


Figura 4.18: Imágenes de microscopía de fluorescencia de células madre mesenquimales humanas en la región (A, D) de proporción de Poisson positiva (PPR) y en la región de proporción de Poisson negativa (NPR) (B, C, E). (C) Células que crecen en huecos de andamios y a lo largo de puntales de andamios en la región NPR. (D) Células que crecen a lo largo de los puntales del andamio (recuadro: SEM de los puntales del andamio) en la región de PPR. (E) Células sembradas en la región NPR (recuadro: SEM de puntales de andamio). Las barras de escala representan (A, B) 250 [μm] y (C, D, E) 125 [μm].

Verde: filamentos de actina; azul: núcleos; rosa: puntales de andamio^[16].

Song y colaboradores, evaluaron el uso de andamios auxéticos para la diferenciación neuronal (linaje ectodermo). Los resultados indican que los andamios auxéticos con la estructura de poros adecuada y la relación de Poisson negativa mejoran la diferenciación neuronal^[26].

Evalúan la diferenciación vascular (un linaje mesodermo) de las células madre embrionarias de ratón (ESC) y las PSC inducidas por humanos (hiPSC) en andamios auxéticos 3-D en comparación con los andamios antes de la conversión auxética. Ambas estructuras se observan en la Figura 4.19^[26]. Este estudio investigó el posible papel de la proteína YAP (Yes-Associated Protein o Proteína Asociada a Sí) en el comportamiento celular de las células madre pluripotentes durante la diferenciación vascular en andamios auxéticos.

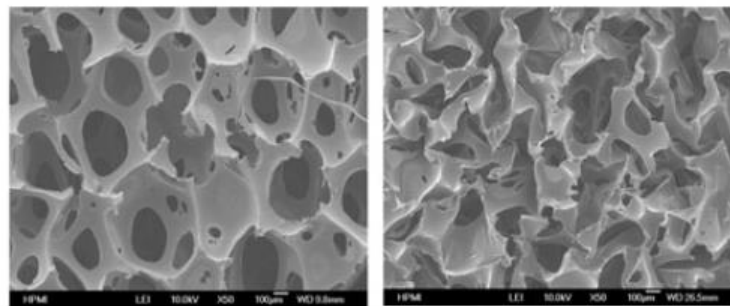


Figura 4.19: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de scaffolds bruto (a la izquierda) y scaffolds auxéticos (a la derecha)^[26].

Se observó una mayor retención citoplasmática en las células ES - D3 de los scaffolds auxéticos en comparación con las de los andamios regulares, lo que sugiere que los andamios auxéticos pueden afectar la organización celular y la contracción para acelerar la diferenciación vascular^[26].

El análisis cuantitativo de la localización de YAP mostró que YAP nuclear fue dominante para el grupo de control, y el porcentaje de células que expresan YAP citoplasmático fue significativamente mayor para el grupo auxético que para el grupo regular^[26].

Los resultados mostraron que los andamios auxéticos promueven la expresión de marcadores de diferenciación vascular y la secreción de proteínas ECM. La expresión de YAP citoplasmática de células de armazones auxéticos puede contribuir a la diferenciación vascular mejorada^[26].

Kim y colaboradores investigan un andamio auxético y su efectividad en la entrega de estrés isotrópico (estático/dinámico) a las células. El objetivo del estudio fue lograr una proliferación efectiva de células óseas bajo diversas condiciones de estímulo compresivo (estático/dinámico) a través de un scaffold auxético^[28].

El andamio de PLGA poroso convexo se transformó con éxito en un andamio poroso reentrante con estructuras especiales y coeficiente de Poisson negativo. Su estudio anterior reveló que esta estructura podría entregar una carga compresiva de forma isotrópica a las células en el andamio y tuvo un efecto sobre la proliferación celular.

Los resultados de este estudio indican que tanto la estimulación compresiva estática como la estimulación compresiva dinámica son eficaces para aumentar la tasa de proliferación celular. En los grupos de estimulación tanto estática como dinámica, la eficiencia de la administración de estimulación a las células disminuyó con un aumento en el período de cultivo. La estimulación compresiva dinámica fue más eficaz que la estimulación estática en la proliferación de células MG-63^[28].

Choi y colaboradores, realizan un estudio para fabricar HA (Hidroxiapatita)/PLGA (Poli Ácido D, L-láctico-co-glicólico) auxético e investigar los efectos de la proliferación de células óseas después de varios estímulos compresivos dinámicos. Se espera específicamente que las células en un scaffold HA/PLGA con coeficiente de Poisson negativo (NPR) reciban estímulos de compresión desde todas las direcciones, a pesar de que un estímulo solo se aplica en una dirección. La hidroxiapatita (HA) es un material inorgánico conocido que es similar al tejido óseo natural en términos de sus componentes inorgánicos, composición química y características cristalográficas. Estas ventajas de HA en el andamio de PLGA mejoran la biocompatibilidad y las propiedades mecánicas de un andamio para el crecimiento de células osteogénicas. En consecuencia, se esperaría que los andamios 3-D con una relación de Poisson negativa tuvieran un efecto positivo sobre la proliferación de células óseas^[27].

Se encuentra que el andamio compuesto HA / PLGA puede mantener su forma durante la estimulación compresiva continua. En caso de estimulación sin compresión, la adición de HA condujo a un aumento del 20% en la proliferación de células de tipo osteoblastos en

relación con PLGA a los 5 días de cultivo. También confirmaron que el scaffold compuesto NPR de HA / PLGA mostró una proliferación celular 2 veces mayor que el scaffold de PLGA después de la estimulación dinámica. Por lo tanto, la estimulación de compresión dinámica adecuada (ciclos de 5 min) facilitaría la regeneración ósea al proporcionar una compresión isotrópica efectiva en el andamio NPR. En general, estos hallazgos indican que los andamios compuestos de NPR utilizados en este estudio ayudarían a la regeneración ósea al proporcionar una mejor osteo-compatibilidad y una compresión isotrópica efectiva para estimular la proliferación de células óseas^[27].

Lee y colaboradores, desarrollan un sustituto de vasos sanguíneos de pequeño diámetro altamente compatible al otorgar un coeficiente de Poisson negativo (NPR) a un material biocompatible^[29].

Diseñan una construcción tubular con NPR ensamblando un patrón con una costilla cortada, como se observa a la derecha de la Figura 4.20.

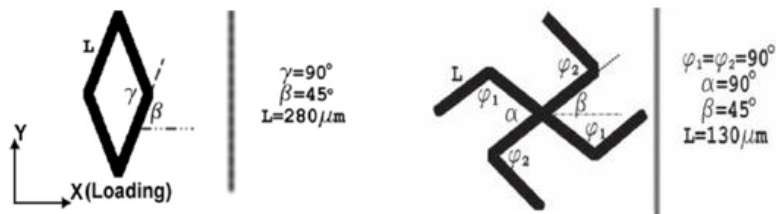


Figura 4.20: Diseño geométrico de las celdas unitarias. A la derecha la estructura de costilla intacta, con comportamiento PPR, y a la derecha la estructura de costilla cortada con comportamiento NPR. Las paredes de las celdas unitarias (denominadas nervaduras) tienen aproximadamente 40 micrómetros de ancho y 100 micrómetros de profundidad^[29].

Utilizan un sistema de impresión 3D basado en un dispositivo de micro espejo digital (DMD) para fabricar una estructura a partir de un hidrogel basado en PEGDA (diacrilato de poli etilenglicol). Para fabricar una muestra grande, utilizan un enfoque de paso e impresión para ampliar el proceso. Al unir los patrones adyacentes, construyen un parche grande con el rasgo NPR, luego enrollan el parche para formar un injerto tubular^[29]. Los parches PPR (con coeficiente de Poisson positivo) y NPR se pueden observar en la Figura 4.21.

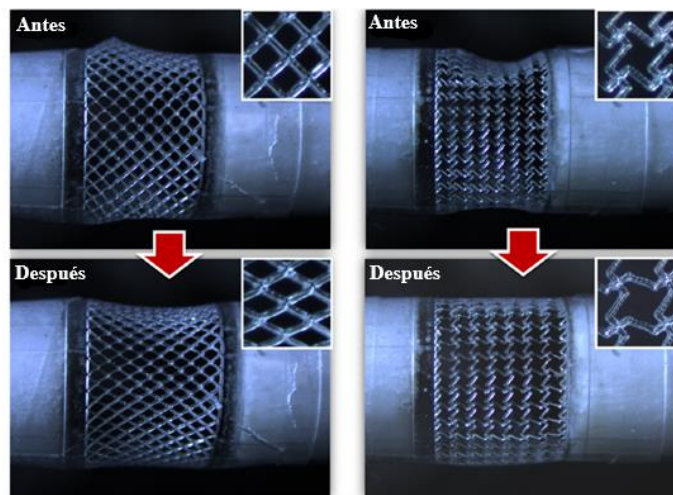


Figura 4.21: Imágenes ópticas ensayo de tracción de parches tubulares PPR izquierda y NPR derecha^[29].

Se realizaron ensayos de adhesión y proliferación de hTSMCs (células estromales mesenquimales de cornete humano) en las estructuras tubulares PPR y NPR desarrolladas. Ambas estructuras fueron recubiertas con colágeno para promover adhesión celular^[29].

Las células sembradas se unieron a los puntales de la estructura y se formaron fibras de actina en ambas construcciones siete días después del cultivo. Sin embargo, en la construcción PPR las células crecieron a lo largo de los puntales en un área parcial, mientras que en la construcción NPR proliferaron en toda el área de las construcciones con una alta interconexión, así como a lo largo de los puntales de la construcción. La tinción nuclear también mostro abundancia de la célula en la construcción NPR^[29]. Esto se observa en la Figura 4.22.

Además, los resultados de la proliferación celular durante once días basados en la medición de densidad óptica mostraron superioridad de la estructura NPR. Aunque la tasa de proliferación celular inicial del día uno fue similar entre sí, la estructura NPR mostró una densidad de hTSMCs más alta que la construcción PPR en los otros días^[29].

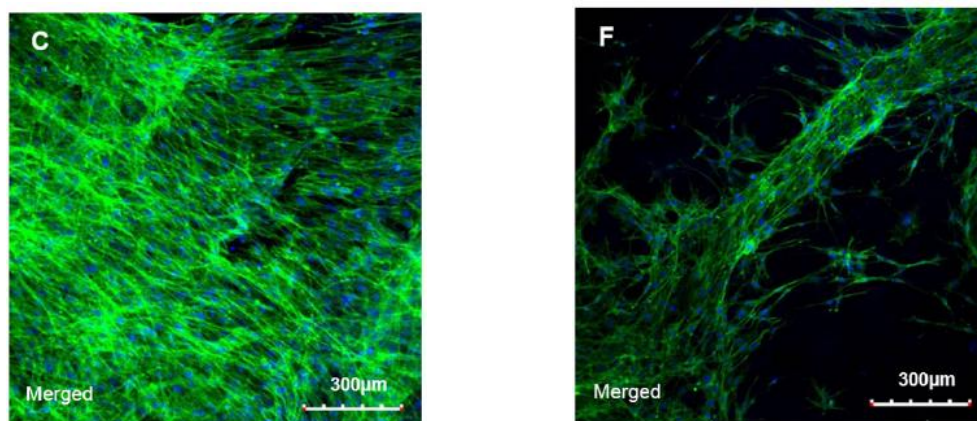


Figura 4.22: Imágenes microscópicas de filamentos de actina teñidos más núcleos en las construcciones al día siete. A la izquierda la estructura NPR y a la derecha PPR^[29].

A pesar de que las arquitecturas de celda unitaria tienen un tamaño de poro relativamente similar, el espaciado entre los puntales es más pequeño en la celda unitaria NPR que en la celda unitaria PPR, por lo que el llenado de los poros fue más fácil en la construcción NPR. Por lo tanto, la densidad celular fue mucho mayor en la construcción NPR que en la construcción PPR, los que se observa en la Figura 4.22. Estos resultados demuestran que la geometría y la disposición de los poros pueden afectar el comportamiento de la unión celular^[29].

Los resultados del experimento confirmaron que la adhesión celular era mayor en las estructuras con comportamiento NPR que en PPR^[29].

Flamourakis y colaboradores demuestran la aplicación de andamios auxéticos hechos con MPL (litografía multifotónica o escritura láser directa) para el crecimiento celular en cultivo 3D. La estructura auxética seleccionada corresponde a la estructura hexagonal reentrante.

Para la fabricación de la estructura utilizan un material híbrido orgánico-inorgánico, SZ2080, conocido por mejorar la proliferación celular^[30].

Caracterizan sus propiedades mecánicas y muestran que, a pesar de que el material en sí es rígido, los andamios fabricados son flexibles y exhiben comportamiento auxético. Finalmente, utilizan dos tipos diferentes de andamios en cultivos de células de fibroblastos con el objetivo de estudiar la respuesta de las células a los mismos y viceversa. Estos dos tipos de andamios auxéticos difieren en el tamaño de sus poros. El primero de ellos presenta un tamaño de poro más pequeño (8,6 [μm] de altura) para ser utilizado como sustrato celular, sin posibilidad de penetración celular, mientras que el segundo tiene un tamaño de poro mayor (40[μm] de altura) para estudiar el potencial de penetración de los fibroblastos^[30].

La estructura con un tamaño de poro pequeño es demasiado pequeña para permitir la penetración celular, sin embargo, es útil para investigar la capacidad de los fibroblastos para adherirse y proliferar en el armazón y para adaptarlo y deformarlo. Todas las células pudieron adherirse tanto a la superficie como a los lados del andamio y tirar de toda la estructura. En la Figura 4.23 se observan deformaciones importantes de muchas celdas unitarias del andamio, así como pandeo alrededor y sobre el andamio. No se observó daño celular^[30].

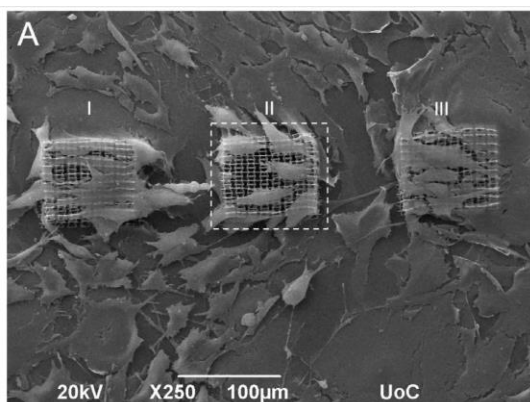


Figura 4.23: Cultivo en andamios auxéticos de tamaño de poro pequeño. Vista general de los tres andamios donde se pueden observar grandes deformidades debido a las fuerzas mecánicas aplicadas por los fibroblastos^[30].

Para permitir la penetración y la proliferación celular dentro del andamio, se construyó un scaffold con un tamaño de poro grande de 40 μm, comparable al tamaño de una sola célula (los fibroblastos de ratón tienen un diámetro de 40-50 [μm]). Después de 4 días de cultivo, las imágenes SEM mostraron que podían entrar en los poros del andamio y proliferar con éxito, como se observa en la Figura 4.24, izquierda. La estructura parece estar completamente ocupada por las células y deformada, como se observa en la Figura 4.24, derecha^[30].

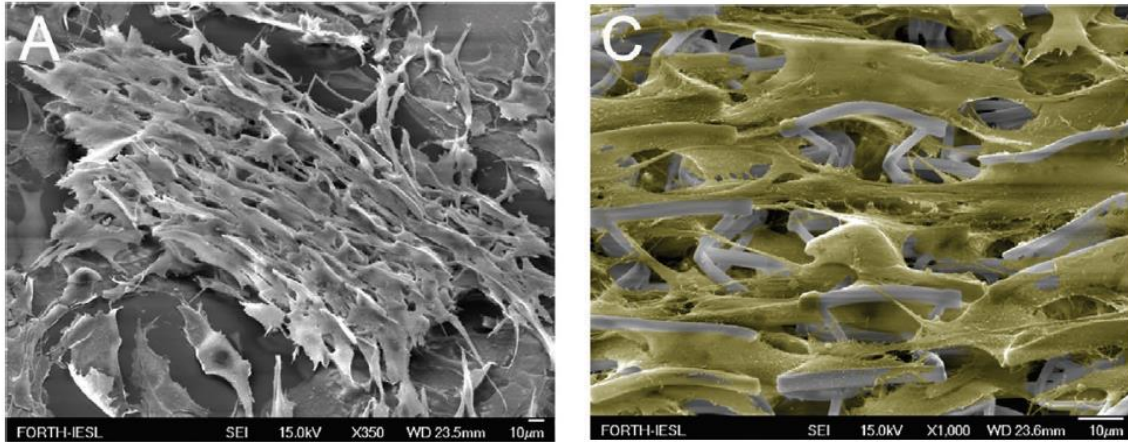


Figura 4.24: Cultivo en scaffold auxético de poro 40 [µm]. A la izquierda vistas generales inclinadas del andamio. Las células pudieron penetrar dentro de los poros de la estructura, que constaba de dos capas y fue capaz de resistir las fuerzas. A la derecha imagen ampliada de varias celdas unitarias en la superficie del scaffold. La geometría hexagonal reentrante puede doblarse hacia adentro debido a las fuerzas mecánicas aplicadas por las células (en amarillo)^[30].

Logran demostrar que las estructuras auxéticas 3D construidas a través de MPL se pueden utilizar como andamios para cultivos celulares. Además, demuestran que los fibroblastos de ratón pueden penetrar y proliferar fácilmente en estos andamios, adaptando la forma de este para satisfacer sus necesidades, aumentando su proliferación y adquiriendo la direccionalidad deseable^[30].

5. Metodología

La metodología general de este trabajo consiste en diseñar e imprimir los scaffolds seleccionados, para luego realizar un ensayo de tracción a cada uno y obtener su coeficiente de Poisson. Una vez conocida esta variable, se realiza un cultivo celular sobre cada uno de los scaffolds con el fin de estudiar el efecto de una estructura auxética sobre la proliferación celular.

5.1. Diseño e impresión de scaffolds

Se seleccionan las estructuras a estudiar luego de una exhaustiva investigación. Una vez seleccionadas, se procede a realizar sus diseños en un software CAD para poder realizar la impresión 3D. El software utilizado es Fusion 360, debido a su simplicidad y a la existencia de herramientas para convertir inmediatamente una estructura diseñada en este software a un archivo de impresión STL. Este archivo se abre en el software PreForm para proceder a imprimir la pieza en la impresora Form 2.

5.1.1. Fusion 360

Fusion 360 es un software creado por Autodesk, y que integra CAD (Computer Aided Design o Diseño Asistido por Computadora), CAM (Computer Aided Manufacturing o Manufactura Asistida por Computadora), CAE (Computer Aided Engineering o Ingeniería Asistida por

Computadora) y PCB (Printed Circuit Board o Placa de Circuito Impresa). Está pensado para unificar y facilitar los procesos de diseño, ingeniería, electrónica y manufactura en una única plataforma^[8].

En este software se realiza el diseño de los scaffolds y luego se guarda en un archivo de impresión STL.

El proceso de diseño se realiza de la siguiente manera:

El primer paso es crear un sketch y seleccionar el plano en que se realizará el diseño. Para efectos de este trabajo no es relevante el plano utilizado. En la ventana del programa Fusion 360 se debe seleccionar los siguientes comandos:

SOLID → CREATE → Create Sketch → Seleccionar un plano de trabajo

Una vez seleccionado el plano, se procede a la realización del dibujo utilizando las herramientas de Create, con la forma y medidas deseadas, como se ve en la Figura 5.1. Se seleccionan los comandos:

SOLID → CREATE → Line → Realización del dibujo de la estructura → FINISH SKETCH

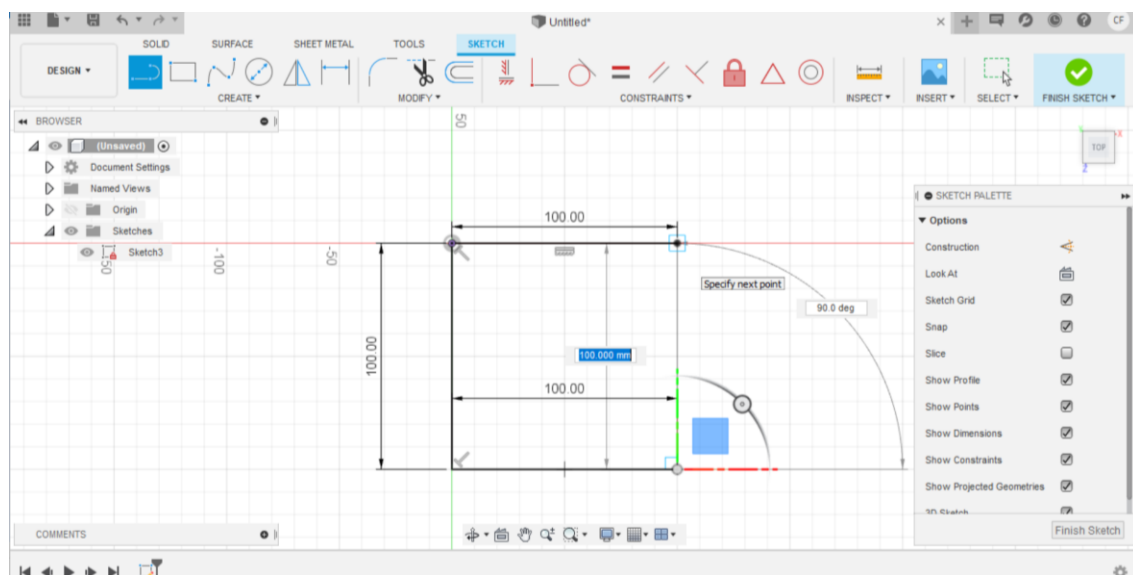


Figura 5.1: Dibujo realizado en Fusion 360.

Para formar la estructura en 3D se utiliza la herramienta de extrusión. Luego se asigna el espesor deseado como se observa en la Figura 5.2. Para esto se seleccionan los comandos:

SOLID → CREATE → Extrude → Ingresar espesor deseado → OK

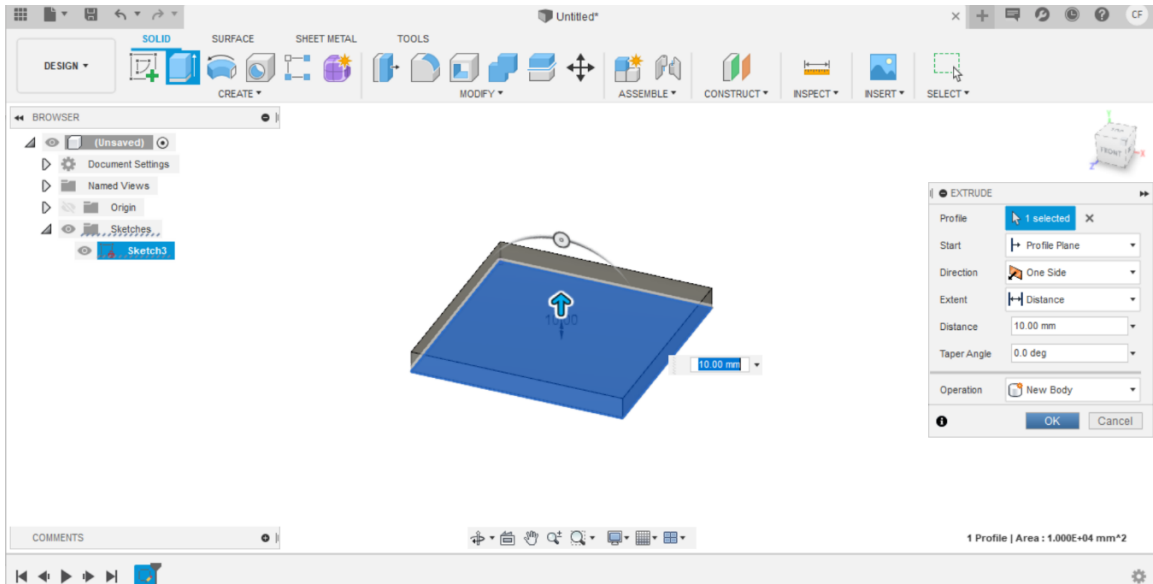


Figura 5.2: Extrusión de una figura.

Con la pieza terminada, para generar el archivo de impresión que será utilizado en el software de la impresora (Figura 5.3), se debe utilizar los siguientes comandos:

TOOLS → MAKE → 3D Print → Desmarcar opción “Send to 3D Print Utility” → OK → Guardar como STL

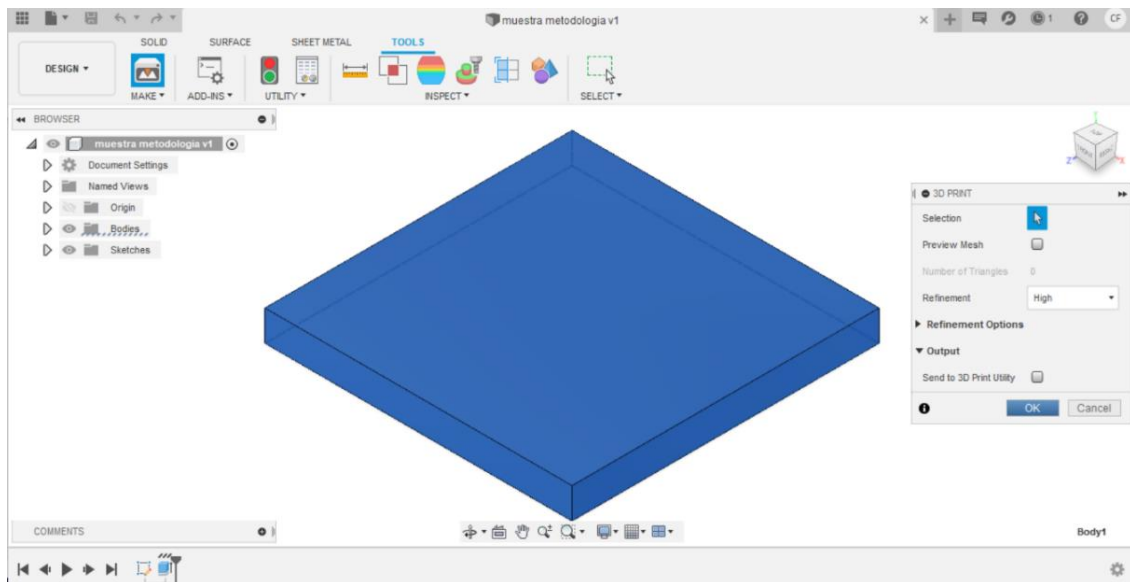


Figura 5.3: Guardar diseño en STL.

5.1.2. Software PreForm

Una vez finalizado el diseño que se desea imprimir y que se ha creado el archivo STL del mismo, se abre el software de la impresora llamado PreForm. Aquí se debe seleccionar la impresora a utilizar, la resina y la resolución. En este caso se selecciona la impresora Form 2, resina Dental SG y resolución de 50 [micrones], como muestra la Figura 5.4.

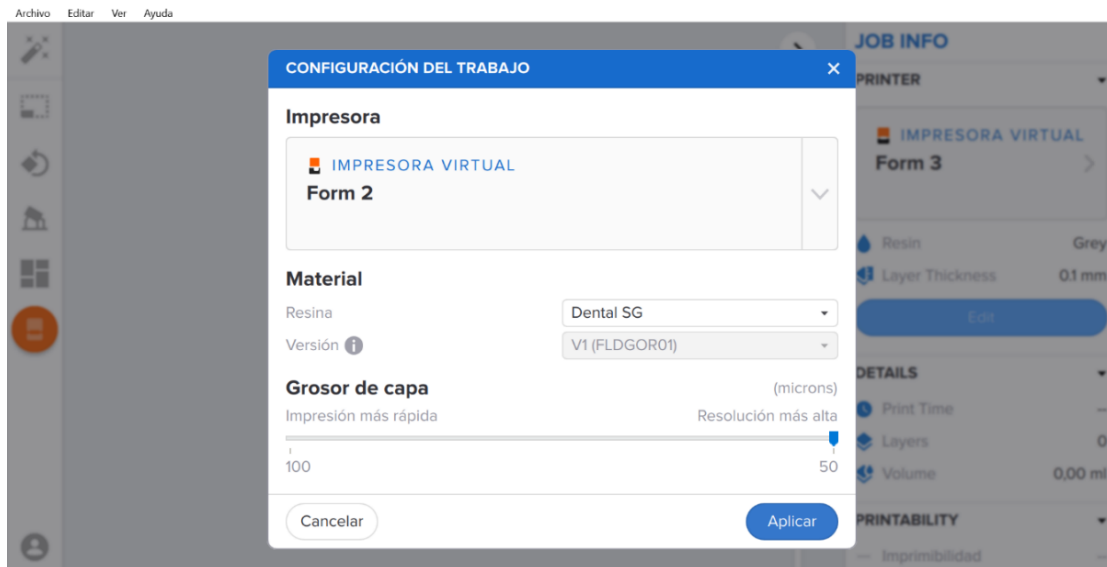


Figura 5.4: Configuración inicial del software PreForm.

Luego, se abre el archivo STL que se desea imprimir. Se posiciona la pieza de manera horizontal como se observa en la Figura 5.5, siguiendo los siguientes comandos:

Orientación → Seleccionar Base... → Seleccionar una base que oriente la estructura de manera horizontal



Figura 5.5: Selección de una base en PreForm.

Para agregar soportes a la figura se puede utilizar la opción automática o manual. Los soportes son estructuras pequeñas, generalmente de menor densidad que la estructura, y que poseen un punto de contacto con la misma. Se utilizan para mantener fija la pieza durante la impresión, además de permitir la creación estructuras como voladizos (estructuras sobresalientes respecto a la pared que las sostiene).

En la Figura 5.6 se observa una estructura con soportes automáticos. Para esto se deben utilizar los siguientes comandos:

Soportes → Generar automáticamente la selección

También se pueden agregar manualmente utilizando la opción de editar:

Soportes → Editar...

En ambos casos los ajustes deben ser:

- Densidad: 0,50
- Tamaño del punto de contacto: 0,10 [mm]
- Tipo de base: Minibases

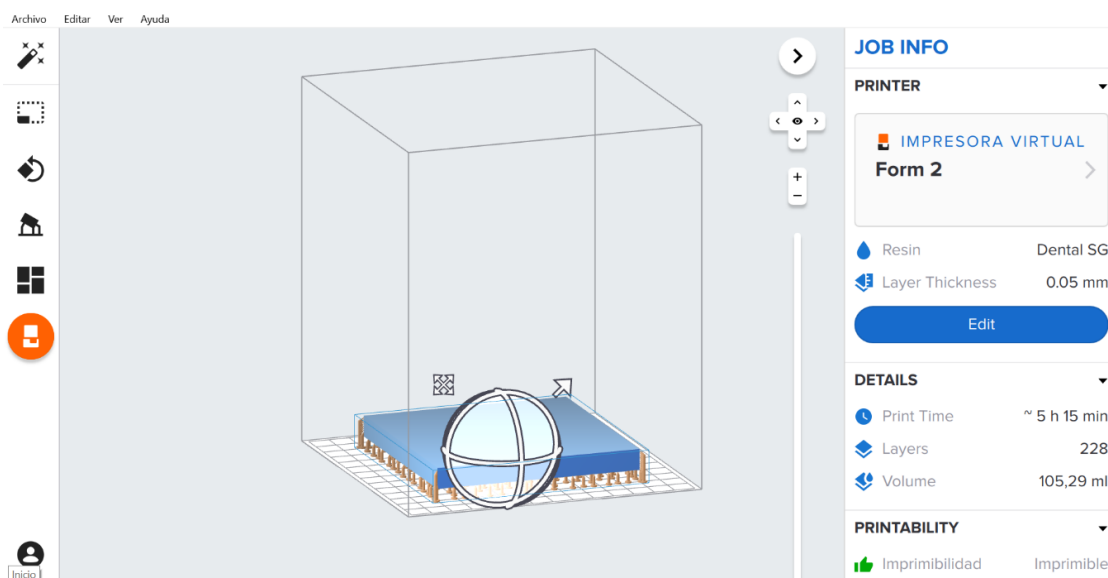


Figura 5.6: Estructura con soportes generados automáticamente por el software.

Una vez finalizado el proceso, el archivo se envía a la impresora, ya sea mediante WiFi o a través de conexión USB, y se procede a iniciar la impresión.

5.1.3. FormLab Form 2 y Resinas

La impresora utilizada en este trabajo es la Form 2 de la marca FormLab, que posee un láser de 140 micrones, siendo esta su máxima resolución de impresión. En la Figura 5.7 se puede observar el proceso de impresión en esta impresora.

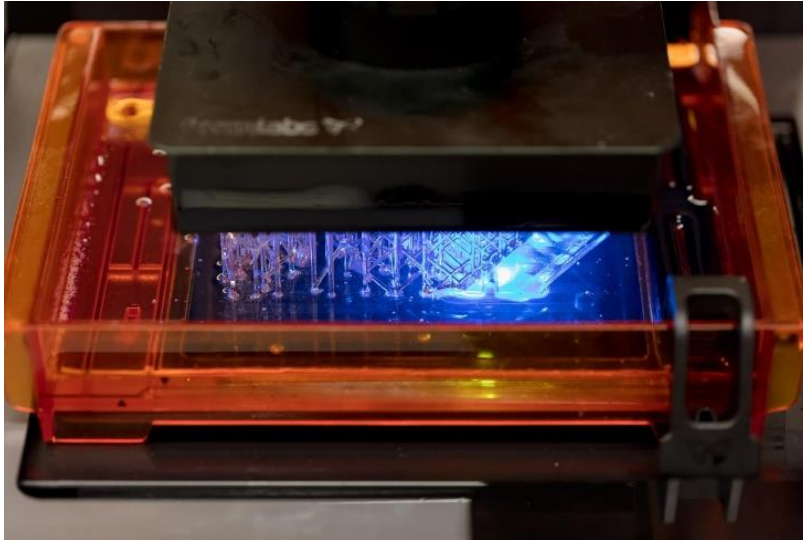


Figura 5.7: Imagen de una impresión en Form 2^[10].

Las resinas disponibles para la Form 2 en este proyecto son:

- **Estándar**: Material de alta resolución para prototipados rápidos. En particular, se tiene la resina clear y black, que difieren sólo en el color. Los demás colores se pueden observar en la Figura 5.8.



Figura 5.8: Escala de grises de la resina estándar^[10].

- **Flexible**: Adecuada para partes flexibles más rígidas, como la botella de la Figura 5.9.



Figura 5.9: Objeto fabricado con resina flexible^[10].

- Dental SG: Produce piezas fuertes, precisas y biocompatibles. Después de ser curado, este material puede ser esterilizado. Generalmente se utiliza para imprimir guías dentales como las de la Figura 5.10.



Figura 5.10: Impresión realizada en resina dental^[10].

- Elástica: La resina más suave, adecuada para prototipos de piezas normalmente producidas con silicona. En la Figura 5.11 se puede ver un ejemplo de objeto fabricado con esta resina.



Figura 5.11: Objeto fabricado con resina elástica^[10].

En la Tabla 5.1 se encuentra un resumen de las propiedades mecánicas de cada una de las resinas mencionadas.

Tabla 5.1: Resumen de propiedades mecánicas de las resinas. Elaboración propia con información disponible en las guías técnicas^[10].

Resina	Tensión Máxima [MPa]	Módulo de Young [GPa]	Elongación a la Fractura
Estándar Sin Curar	38	1,6	12%
Estándar Curada	65	2,8	6,2%
Flexible Sin Curar	3,3 – 3,4	-	75 – 85%
Flexible Curada	7,7 – 8,5	-	12,3%
Dental SG Curada	73	2,9	12,3%
Elástica Sin Curar	1,61	-	100%
Elástica Curada	3,23	-	160%

5.2. Coeficiente de Poisson de las estructuras

Para obtener el coeficiente de Poisson de las estructuras diseñadas es necesario realizar un ensayo de tracción. El módulo de Poisson se obtiene con la ecuación (1.1).

El ensayo es realizado en una máquina de ensayos universal marca Instron, serie EMIC modelo 23-5D. Esta posee un módulo de carga de 5 [kN] y puños de tracción para sostener las piezas de ensayo, los cuales se pueden observar en la Figura 5.12.

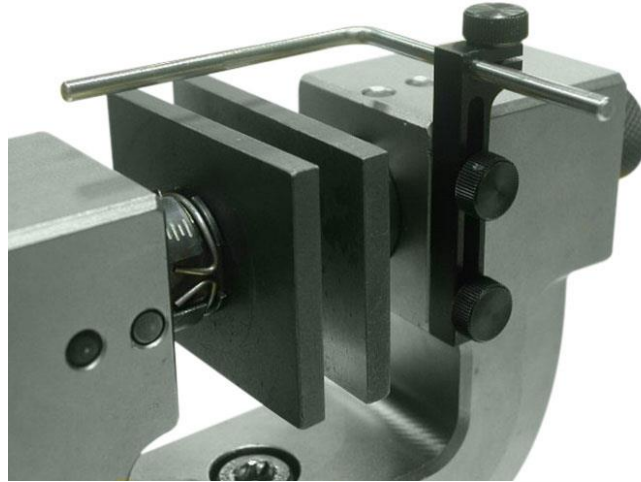


Figura 5.12: Puños de tracción estáticos de uso general con acción lateral del tornillo^[9].

Dado que las estructuras tienen un tamaño promedio de 6 [cm], para poder obtener las deformaciones, se utiliza una cámara fotográfica con un lente macro para grabar el experimento.

Para realizar el ensayo los pasos a seguir son:

1. Fijar los extremos de la pieza a las tenazas de la máquina.
2. Comenzar la grabación con la cámara.
3. Comenzar el ensayo de tracción a la menor velocidad posible (0,5 [mm/min]), si se realiza a mayor velocidad, la pieza se rompe antes de observar su deformación.
4. Una vez que la pieza se rompa, detener el experimento y la grabación.
5. Quitar los restos de la pieza.
6. Analizar el video en cámara lenta, para poder observar la deformación de la estructura.
7. Repetir para las otras estructuras.

El análisis del video se realiza agregando puntos referenciales y estudiando el desplazamiento de estos, como se observa en la Figura 5.13. En base a estos puntos se obtiene la deformación transversal de la estructura, a medida que se tracciona longitudinalmente. La relación entre estas dos deformaciones entrega el coeficiente de Poisson experimental de cada una. Con

esta información se genera un gráfico del coeficiente de Poisson experimental de la estructura, según la deformación.

En el caso de la imagen, la deformación transversal (e_t) a una deformación del 24% es de $386 - 358 = 28$ [píxeles], mientras que la longitudinal (e_l) es de $401 - 322 = 79$ [píxeles]. Utilizando la ecuación (1.1) obtenemos el coeficiente de Poisson (ν):

$$\nu = -\frac{e_t}{e_l} = -\frac{28}{79} = -0,35$$

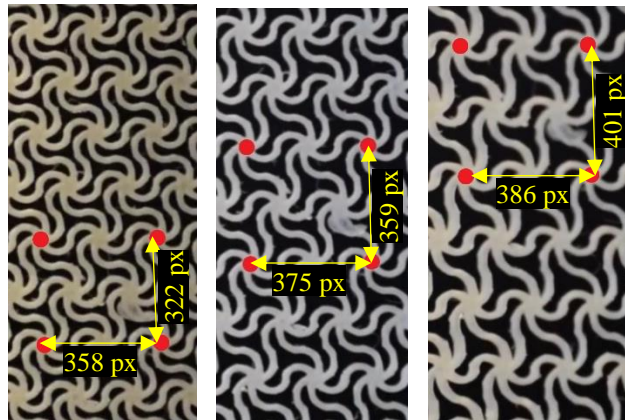


Figura 5.13: Estructura triangular. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 12%; Derecha: Deformación de 24%.

5.3. Proliferación celular

Para estudiar la proliferación celular se realizan cultivos sobre cada uno de los scaffolds. Para asegurar el crecimiento celular y poder estudiar el efecto de las estructuras, es necesario realizar de antemano estudios de esterilización y adhesión al material, para luego proceder al cultivo en su superficie. Esto se realizó en el laboratorio de c4c (cells for cells) de la Universidad de los Andes, a cargo del profesor Juan Pablo Acevedo.

5.3.1. Esterilización:

La esterilización se realiza con etanol y antibiótico de la siguiente manera:

Se sumergen las estructuras en 10 [mL] de etanol al 70% por 2 horas, luego se lavan con 10 [mL] de PBS, repitiendo el lavado.

Dentro de campana, se colocan las piezas en una placa con antibiótico al 2% y se dejan toda la noche.

El resto del cultivo debe realizarse dentro de campana, con el fin de evitar contaminación de los scaffolds.

5.3.2. Adhesión:

Se realizan pruebas de adhesión para comprobar si las células pueden adherirse directamente a los scaffolds. Estas pruebas se realizan en piezas lisas (láminas impresas sin estructura),

cultivando células mesenquimales humanas de cordón umbilical en su superficie con el fin de observar si existe adhesión. Se realizan en un pocillo 24 well, el cual necesita 5700 células por pocillo, en 500 [μL] de medio.

Una vez finalizado el tiempo de cada experimento (4 horas, 6 horas y fin de semana) se realiza un conteo de células, post revisión bajo el microscopio para asegurar que no haya contaminación. El proceso de conteo se debe realizar bajo campana de la siguiente manera:

- Lavado con 7 [mL] de PBS, repetir 3 veces.
- Añadir 6 [mL] de Tripsina para disociar las células adheridas al pocillo. Incubar a 37°C por 5 min.
- Agregar 9 [mL] de medio para bloquear la reacción de la Tripsina. Centrifugar por 5 [min] a 300 [g].
- Desechar el líquido y añadir 1 [mL] de medio.
- Preparar mezcla con 50 [μL] de la suspensión, junto a 50 [μL] de azul de tripano (colorante que permite diferenciar células vivas y muertas).
- En una placa Neubauer, depositar 10 [μL] de mezcla y realizar conteo por cuadrante como se observa en la Figura 5.14.

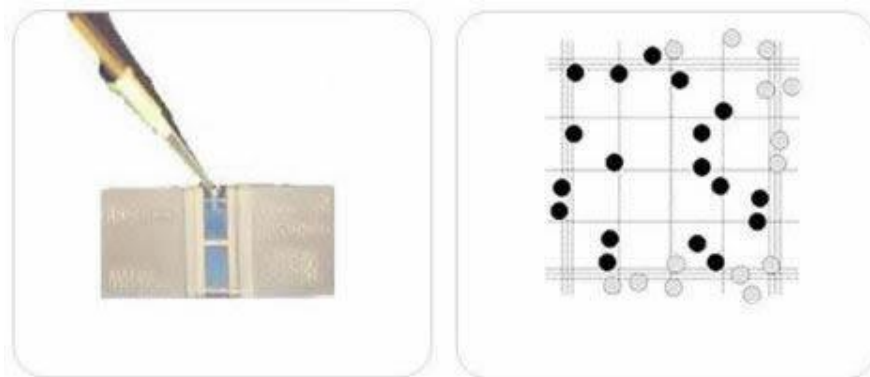


Figura 5.14: Izquierda: Ejemplo del llenado de una placa Neubauer; Derecha: Conteo en un cuadrante de la placa Neubauer^{63[17]}.

La concentración se obtiene utilizando la ecuación (4.12):

$$\text{Concentración} \left[\frac{\text{número de células}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Células contadas}}{\text{Número de cuadrantes}} \cdot \text{Factor dilución} \cdot \text{Factor Neubauer} \cdot \text{Volúmen} \quad (4.1)$$

Donde el factor de dilución de la mezcla corresponde a $\left(\frac{50 [\mu\text{L}]}{50 [\mu\text{L}] + 50 [\mu\text{L}]} \right)^{-1} = 2$, el factor Neubauer es 10^4 y el volumen es 1 [mL].

5.3.3. Cultivo:

Para el cultivo se utilizan células mesenquimales humanas de cordón umbilical. Estas células son cultivadas directamente sobre los scaffolds, cada uno en un espacio de $1,9 [cm^2]$ de una placa 24 well como la de la Figura 5.15 luego de crecer en una placa p100 o p150 como la de la Figura 5.16, con áreas de $100 [cm^2]$ y $150 [cm^2]$ respectivamente.



Figura 5.15: Placa 24 well^[18].



Figura 5.16: Placa p100^[18].

6. Resultados y discusiones

6.1. Elección de las estructuras e impresión

Para elegir las estructuras a utilizar se realiza una exhaustiva investigación. De esta se obtiene que la estructura más estudiada como un scaffold auxético corresponde a un panel reentrante o “corbata”, por lo que se selecciona como primera estructura^{[4][5][6][7][13][14][30]}.

El ángulo utilizado fue de $28,1^\circ$ para lograr un equilibrio entre el coeficiente de Poisson de la estructura y asegurar que el hueco de cada celda sea cercano a $200 [\mu m]$, requisito para

poder realizar un cultivo en el cual las células puedan crecer sobre la estructura. El diseño de esta se puede ver en la Figura 6.1, en la Figura 6.2 se aprecian los detalles de las dimensiones.

El coeficiente de Poisson teórico de esta estructura, con el ángulo mencionado, corresponde a -1,44. Valor obtenido utilizando la ecuación (1.1).

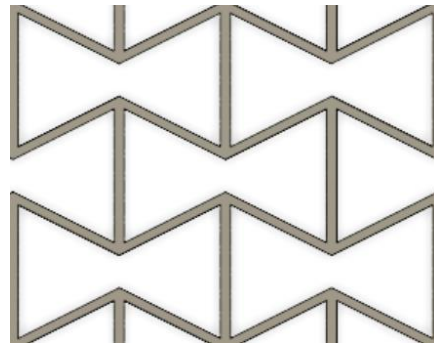


Figura 6.1: Estructura de panal reentrante.

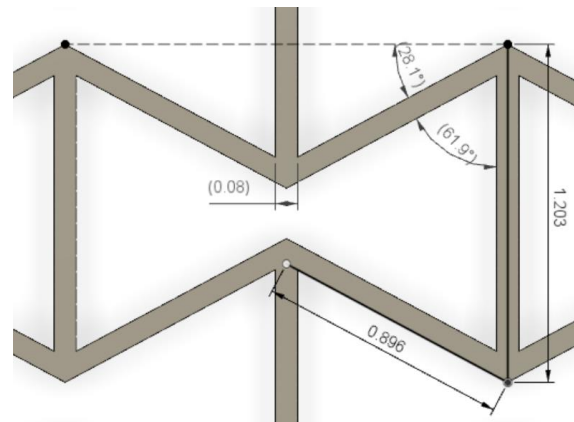


Figura 6.2: Detalles de la geometría de la estructura con $h \approx 0,9$ [mm]; $l \approx 1,2$ [mm]; $\theta = 28,1^\circ$; $w = 0,08$ [mm]. Donde h/l es el coeficiente de largo de la costilla, θ es el ángulo reentrante y w es el espesor de las costillas.

Las otras dos estructuras auxéticas también se seleccionan de las ya estudiadas, aunque en mucho menor medida. La primera corresponde a una estructura semi-rígida cuadrada, debido a que su área de contacto con la célula es mucho mayor^{[5][6][15]}. Además, el coeficiente de Poisson teórico de esta estructura es de -1, es decir, su deformación transversal es igual a la longitudinal. El diseño de la estructura se puede ver en la Figura 6.3.

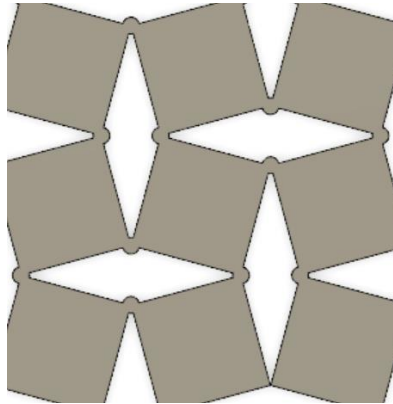


Figura 6.3: Estructura semi-rígida cuadrada.

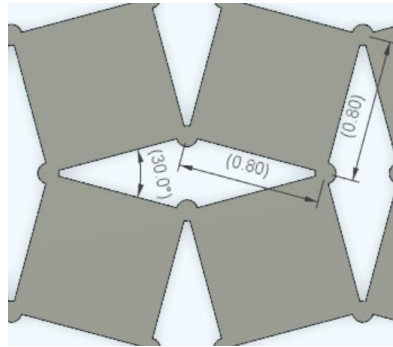


Figura 6.4: Detalles de la geometría de la estructura con cuadrados de lado 0,8 [mm] y ángulo de 30°.

La última estructura seleccionada es la menos estudiada de las tres y corresponde a un patrón triangular ondulante también conocida como “Kagome triangular”^{[5][6][7]}. Esta estructura fue seleccionada debido a que los espacios entre cada borde son mucho más pequeños que en la estructura de panal, lo que podría dar un mejor soporte a las células, que tienden a crecer a lo largo de los bordes del scaffold^[29]. Su coeficiente de Poisson es el menos negativo de los tres, siendo su valor teórico de -0,4. El diseño de la estructura se puede ver en la Figura 6.5.

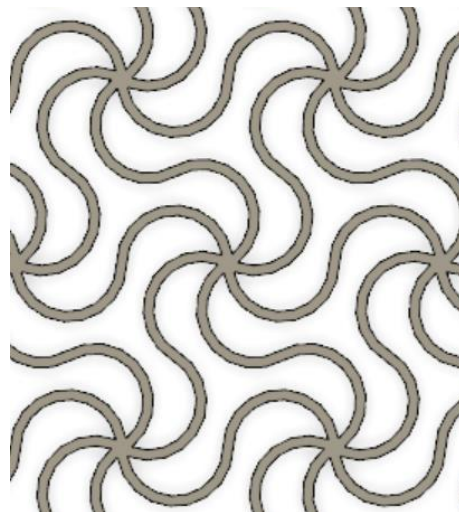


Figura 6.5: Estructura Kagome triangular.

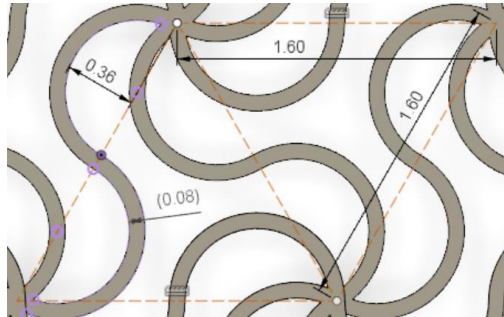


Figura 6.6: Detalles de la geometría de la estructura con triángulos de lado 1,6 [mm], ondas de radio 0,36 [mm] y espesor de las costillas de 0,08 [mm].

Para tener una verdadera apreciación del efecto de la auxeticidad de una estructura sobre la proliferación celular, es necesario contar con una estructura no auxética de control.

En este caso la estructura seleccionada fue la hexagonal o de “panal” de la Figura 6.7. Esto debido a que es la forma no auxética de la estructura de panal reentrante, por lo que puede ser un buen punto de comparación.

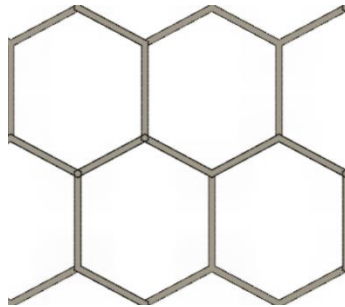


Figura 6.7: Estructura no auxética hexagonal

La primera estructura diseñada en el programa fue la de panal reentrante. Debido a la necesidad de realizar pruebas para comprender el funcionamiento de la impresora, además de sus parámetros, el primer diseño impreso corresponde solo a una celda de la estructura. El diseño de las celdas en el programa Fusion 360 se realiza generando el dibujo en un sketch como el de la Figura 6.8 de la siguiente manera:

SOLID → CREATE → Create Sketch → Seleccionar un plano de trabajo → Line → Realización del dibujo de la estructura → FINISH SKETCH

Luego, para aumentar el tamaño de la estructura, se añaden celdas una por una hasta obtener 5 hacia el lado y 10 hacia abajo. Una vez listo el diseño, se procede a extruirlo con un espesor de 5 [mm] como se observa en la Figura 6.9. Este proceso se realiza como sigue:

SOLID → CREATE → Extrude

Hasta este punto no existen mayores problemas con el diseño. Este fue impreso en resina estándar y resina flexible.

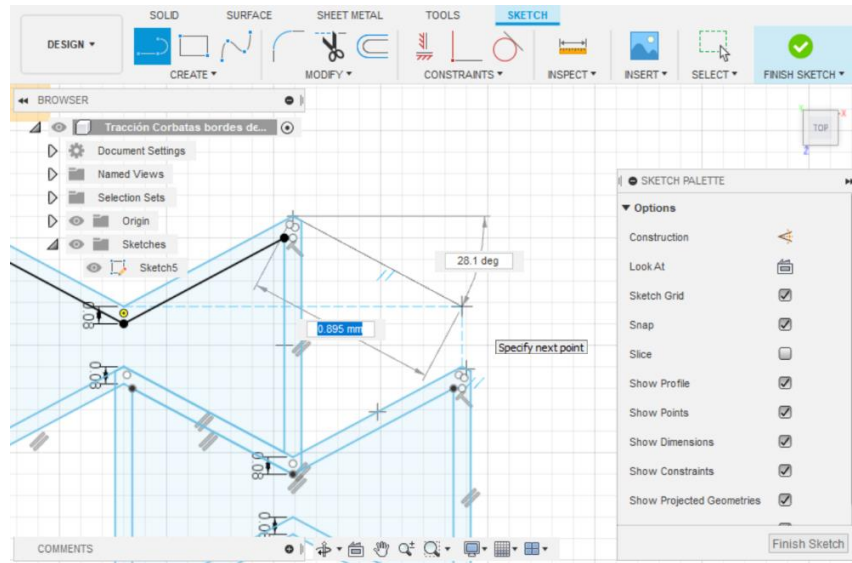


Figura 6.8: Diseño de la estructura celda por celda

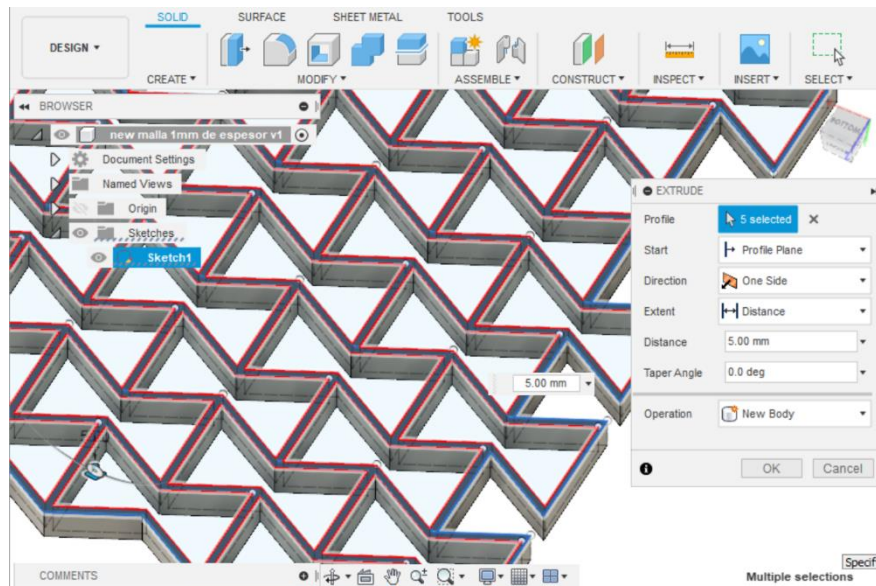


Figura 6.9: Extrusión de la estructura.

Luego, la estructura debe ser miniaturizada para alcanzar el tamaño necesario para trabajar con células. Esto implica que la cantidad de celdas necesaria para generar la estructura es mucho mayor, y agregar una por una deja de ser una opción. Esto debido a que el diseño se vuelve demasiado complejo para el procesamiento del programa y, por ende, toma más de 10 minutos en modificar cada línea del dibujo.

Para solucionar el problema de sobre-procesamiento, se utiliza la herramienta “rectangular pattern”, que permite crear la estructura completa en base a una estructura inicial de 2 celdas. Para esto se crea un sketch con dos celdas base, al cual se le realiza un extrude de 0,5 [mm] de espesor. Una vez creado este cuerpo, se procede a utilizar la herramienta de la siguiente forma:

CREATE → Pattern → Rectangular Pattern → Pattern Type: Bodies → Objects: Seleccionar la estructura de 2 celdas → Directions: Seleccionar cualquier borde paralelo al eje → Distance Type: Spacing → Quantity & Distance: Dependen de la estructura → OK

En este caso se necesita 19 repeticiones, de la estructura de dos celdas que se observa destacada en azul en la Figura 6.10, hacia el lado con una separación de 1,58 [mm], mientras que hacia abajo se necesitan 43 repeticiones con una separación de 1,403 [mm]. Esto para obtener una estructura total de aproximadamente 30 [mm] x 60 [mm].

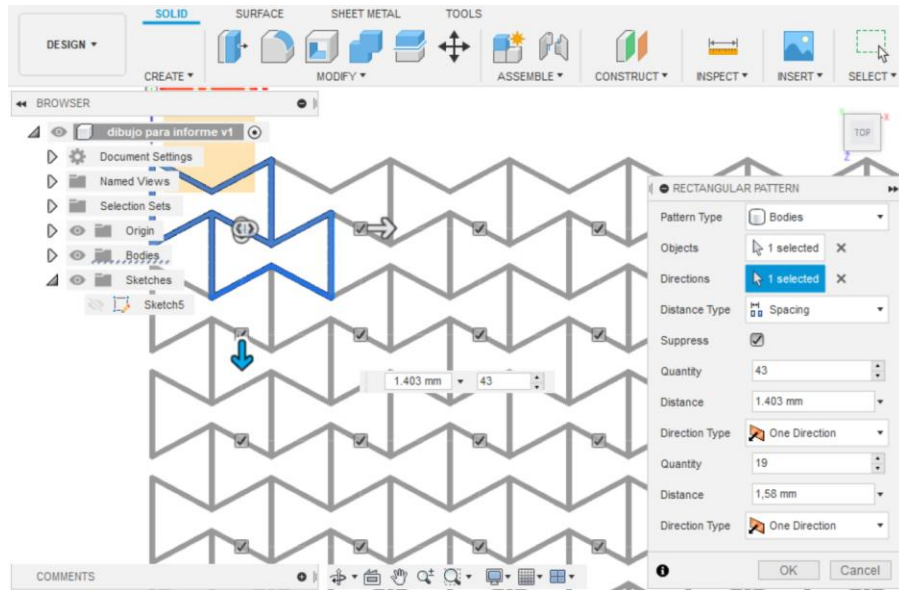


Figura 6.10: Diseño de estructura mediante patrón rectangular. En azul se destaca la estructura inicial de dos celdas utilizadas para generar las demás.

Con el diseño terminado, para imprimir las piezas, es necesario convertir el archivo al formato del programa PreForm, software de impresión de las impresoras FormLab. Para esto:

TOOLS → MAKE → 3D Print → Desmarcar opción “Send to 3D Print Utility” → OK → Guardar como .stl

Finalmente, para imprimir la estructura se debe abrir el programa PreForm. Se debe seleccionar la resina con la cual se planea imprimir, además del tamaño de cada una de las capas que la conformará. Este puede variar entre 100 y 25 micrones, según la resina. Dado que se desea imprimir estructuras muy pequeñas, se utiliza el menor tamaño de capa disponible para cada una. Luego, se abre el archivo a utilizar y se orienta de la mejor manera posible:

Orientación → Seleccionar base... → Posicionarla horizontalmente → Comenzar una impresión

De esta manera, la estructura se imprime directamente sobre la base de impresión. Esto le da un buen soporte, pero se vuelve muy difícil retirarla de la plataforma, sobre todo cuando el tamaño es reducido y la pieza se vuelve más delicada.

Para resolver este problema, es necesario agregar soportes a las estructuras. La generación automática del programa no entrega buenos resultados en este caso, por lo que deben añadirse manualmente. Dado que los bordes a imprimir son de ordenes milimétricos, estos deben tener el menor punto de contacto posible, el que varía según el tipo de resina. Además, se usa una densidad de 0,5 con el fin de ahorrar resina y ya que no es necesario un soporte más denso. En la Figura 6.11 se puede observar una estructura con soportes en el software PreForm.

Soportes → Editar... → Densidad: 0,5 → Tamaño del punto de contacto: Menor posible → Desactivar casillas “Soportes internos” y “Etiqueta en la base” → Tipo de base: Minibases

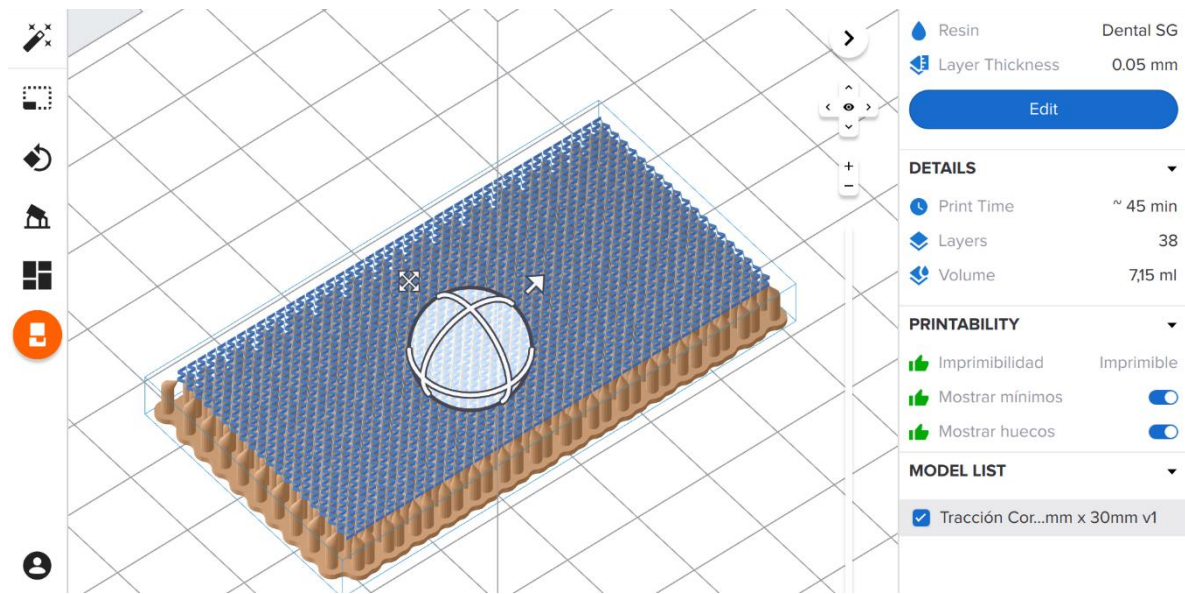


Figura 6.11: Estructura con soportes en PreForm. En azul la estructura del scaffold y en amarillo los soportes necesarios para imprimirla.

Una vez dominados los parámetros de impresión, se realizan impresiones de prueba, comenzando con la resina estándar. Estas fueron realizadas a escala de centímetros y con la estructura de panel reentrante. Para luego realizar impresiones a escala milimétrica y con las estructuras restantes.

6.1.1 Impresiones preliminares a escala de centímetros

En la Figura 6.12 (a) se puede ver una impresión realizada directamente sobre la plataforma de impresión. Esta se rompe al retirarla de la base debido a su fragilidad, por lo que es necesario agregar soportes a la impresión, con el fin de poder retirar con mayor facilidad la pieza finalizada.

En la Figura 6.12 (b) se puede observar una impresión cuyos bordes fueron diseñados para tener la menor resolución posible, es decir, los bordes más finos que se pueden alcanzar con esta impresora. En esta se aprecia que la resolución no es tan exacta, debido a que se generan bordes dobles en lugar de un borde delgado.

Ambas impresiones fueron realizadas con resina estándar, en posición horizontal sin soportes y con resolución de capa de 25 [μm].

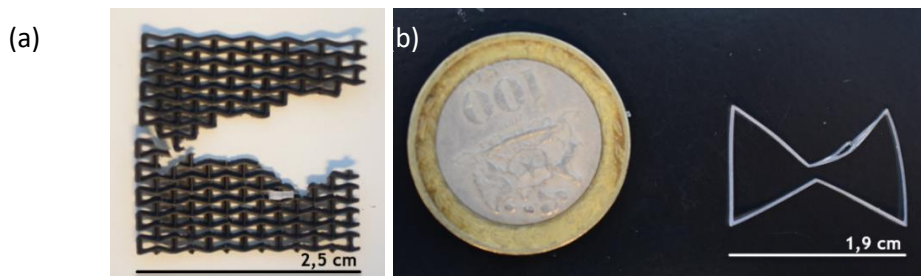


Figura 6.12: Impresiones con resina estándar (a) estructura impresa directamente en la base de impresión (b) prueba de impresión con bordes de la menor resolución posible.

Las siguientes impresiones se realizaron con resina flexible, en posición horizontal sin soportes, y con una resolución de capa de 50 [μm]. También se utiliza esta resina para hacer una prueba de orientación de impresión. En la Figura 6.13 se puede ver cómo la resina tiende a acumularse en la base, por lo que, para tener una estructura homogénea, es necesario que su orientación sea horizontal.

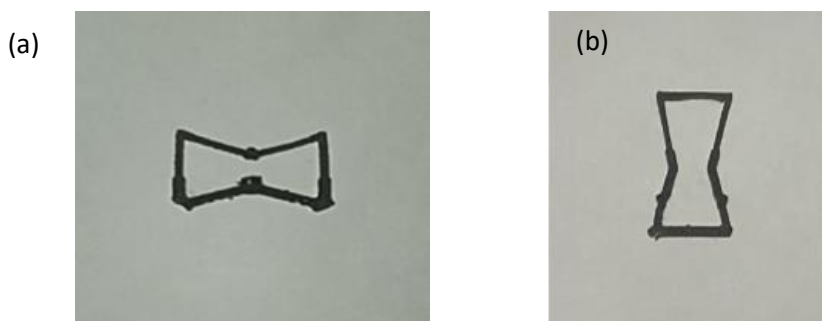


Figura 6.13: Estructuras impresas con orientación (a) horizontal apoyando sólo las esquinas en la plataforma y con un soporte interno en el medio (b) vertical apoyada directamente en la plataforma y sin soportes.

En el caso de la impresión con resina flexible es bastante sencillo retirarla de la base de impresión, a pesar de no tener soportes. Sin embargo, se genera una primera capa sólida, sin las perforaciones esperadas como se puede ver en la Figura 6.14. Dado que es necesario miniaturizar las estructuras, esta resina es inmediatamente descartada, ya que no alcanza la resolución necesaria.

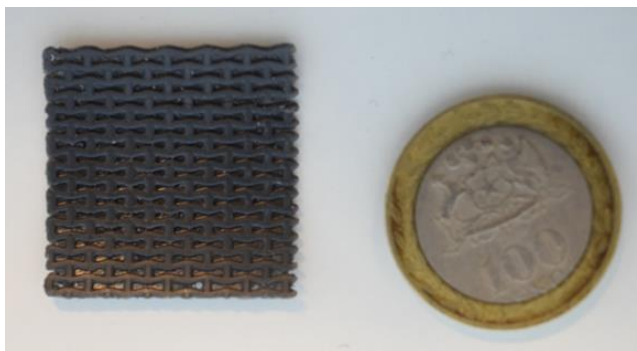


Figura 6.14: Estructura impresa en resina flexible.

La siguiente resina utilizada corresponde a la elástica. Esta funciona bastante bien en escala de centímetros, incluso sin soportes, debido a que no es frágil. En esta resina se imprimieron las 3 estructuras auxéticas en estudio, con un borde para ensayos de tracción/compresión, las que se pueden observar en la Figura 6.15. Estas fueron impresas horizontalmente, con soportes aleatoriamente dispuestos y una resolución de capa de 50 [μm].

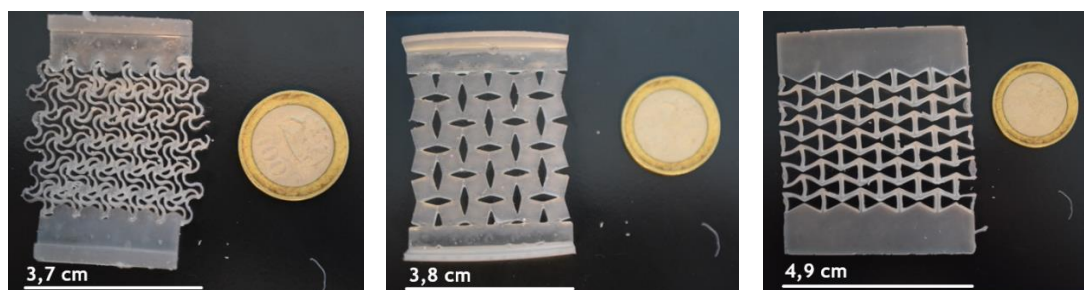


Figura 6.15: Estructuras impresas en resina elástica (a) Kagome triangular (b) Semi-rígida cuadrada (c) Panal reentrante.

Al realizar ensayos de compresión la estructura se pandeaba en exceso, por lo que se decide hacer sólo ensayos de tracción y, por ende, se eliminaron los bordes para compresión.

La última resina utilizada corresponde a la dental SG, impresa en posición horizontal, con soportes aleatoriamente dispuestos y una resolución de capa de 50 [μm]. Esta tiene buenos resultados a escala de centímetros como se ve en la Figura 6.16, a pesar de ser bastante frágil.



Figura 6.16: Estructuras impresas en resina dental sin curar (a) Semi-rígida cuadrada (b) Kagome triangular.

La resina dental tiene menor toxicidad que las demás, sobre todo después de ser curada. Sin embargo, una vez que se cura se vuelve excesivamente frágil y no sirve para la aplicación deseada. En la Figura 6.17 se puede observar que una vez la resina es curada, no se puede manipular.



Figura 6.17: Estructuras impresas en resina dental curada (a) Semi-rígida cuadrada (b) Kagome triangular.

Dado que la resina dental alcanza la resolución necesaria, y su rigidez es similar a la de la resina estándar, esta última se descarta y se decide utilizar la dental, sin curar, debido a su esperable mayor biocompatibilidad.

Para poder realizar un cultivo celular en los scaffolds, es necesario que la celda unitaria de cada estructura tenga un tamaño de aproximadamente 200 $[\mu m]$. Por lo que es necesario que la resina tenga una alta resolución de impresión. Las pruebas a escala milimétrica se realizan solo con resina elástica y resina dental SG sin curar.

6.1.2 Impresiones a escala de milímetros

La resolución de la resina elástica es insuficiente para este proyecto, al miniaturizar la estructura desaparecen las celdas unitarias. Esta resina necesita una separación de mínimo 0,8 [mm] para no pegarse. En la Figura 6.18 se observa como quedan las estructuras con resina elástica y el tamaño deseado. Esta impresión fue realizada en posición horizontal, con soportes aleatoriamente dispuestos y una resolución de capa de 50 $[\mu m]$.

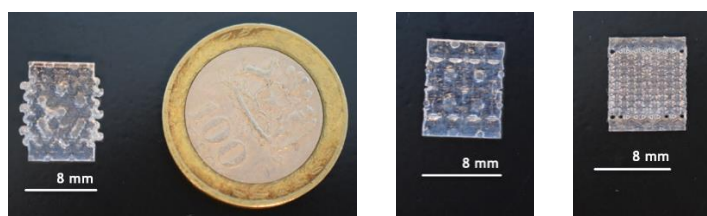


Figura 6.18: Impresiones a escala milimétrica en resina elástica.

La resolución de la resina dental si es suficiente, pero su fragilidad, incluso sin curar, obliga a descartar la estructura semi-rígida, pues sus puntos de unión son demasiado pequeños para mantener a toda la estructura. Por esta razón, se sigue trabajando solo con las estructuras triangular y de panal reentrante. En la Figura 6.19 se puede observar cada una de las estructuras auxéticas impresas a escala milimétrica, en orientación horizontal, con soportes aleatoriamente dispuestos y una resolución de capa de 50 $[\mu m]$.

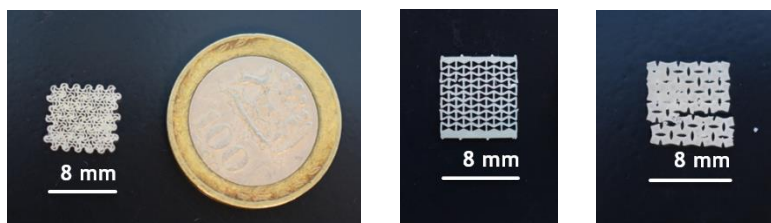


Figura 6.19: Impresiones a escala milimétrica en resina dental.

A partir de este punto solo se utiliza la resina dental sin curar, pues es la que mejor cumple con los requerimientos.

Para obtener el coeficiente de Poisson real de las estructuras impresas, es necesario analizar su deformación al realizar un ensayo de tracción. Para esto es necesario imprimir piezas de mayor dimensión, pero cuya celda unitaria siga siendo de 200 micras. La dificultad en este punto está en lograr retirar las estructuras de la base sin romperlas, por lo que los soportes se vuelven de gran relevancia.

Dado que las estructuras son extremadamente delicadas, los soportes deben tener un punto de contacto del menor tamaño posible. En la resina dental, esto corresponde a soportes con un punto de contacto de 0,1 [mm].

La Figura 6.20 corresponden a distintas cantidades y ubicación de los soportes en una misma estructura. Los puntos amarillos corresponden a los soportes.

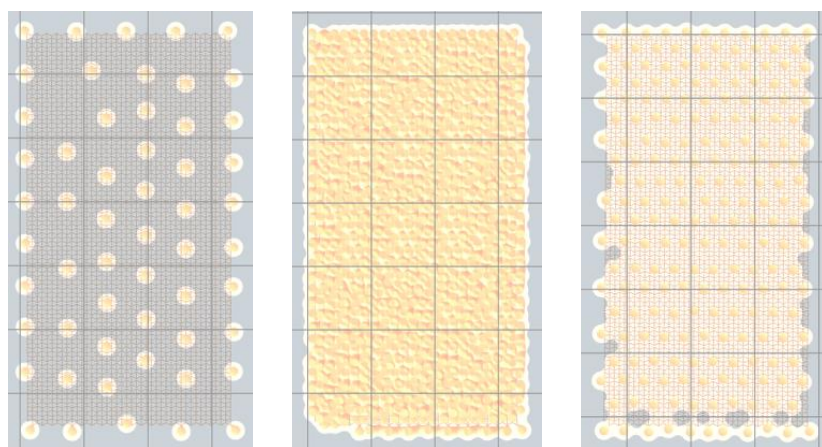


Figura 6.20: Pruebas de cantidad de soportes.(a) mínima cantidad de soportes que la impresora admite (b) colocando soportes en cada una de las uniones (c) cantidad intermedia de soportes.

Se realizaron pruebas con la mínima cantidad de soportes que la impresora admite, colocando soportes en cada una de las uniones y una cantidad intermedia entre estas dos.

En el primer caso la pieza se suelta de la base y no se termina la impresión, en el segundo caso la pieza se funde en algunos lugares con los soportes y resulta imposible retirarla sin romperla completamente. Mientras que el último caso permite completar la impresión de la pieza y retirarla de los soportes con un daño menor, sin embargo, quedan en la impresión algunas capas separadas como se ve en la Figura 6.21, por lo que es necesario agregar soportes en estos puntos.



Figura 6.21: Impresión en resina dental en la que se observa separación de capas.

Cabe destacar que la duración de la impresión para una pieza de celdas a escala milimétrica y con un tamaño total de 30 [mm] x 60 [mm], es de aproximadamente 1 hora y 30 [min]. Esto sin contar el tiempo necesario para retirar cada una de las estructuras de sus respectivos soportes. Este experimento toma demasiado tiempo, sobre todo en comparación a la

velocidad de impresión de la máquina DOPsL diseñada por Warner et al. en su experimento “3D-printed biomaterials with regional auxetic properties”, con la cual una pieza demora al rededor de 3 minutos en ser impresa^[4].

6.2. Medición del Coeficiente de Poisson

Para realizar los ensayos de tracción y poder medir el coeficiente de Poisson, se prueban distintas fórmulas. Las primeras pruebas se realizan con estructuras de 8 [mm], pero son tan pequeñas que las tenazas no logran sujetarlas.

Para resolver el problema de las tenazas, se imprime la misma estructura, pero con soportes en los bordes, como se observa en la Figura 6.22, para sujetarlas con mayor facilidad, sin embargo, al realizar el ensayo, la estructura se quiebra al instante en la unión entre los bordes y las celdas.

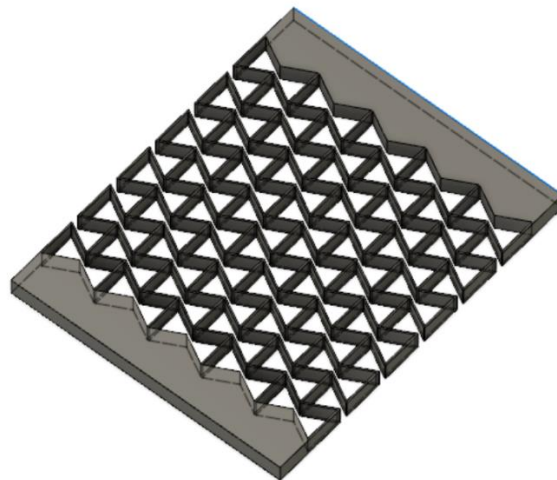


Figura 6.22: Estructura con soportes para ensayo de tracción.

Con el fin de lograr realizar el ensayo, la siguiente prueba se realiza con una estructura de aproximadamente 9 [cm] de ancho y 9 [cm] de largo, manteniendo el tamaño de la celda unitaria.

Para el ensayo de tracción de la estructura de panal reentrante, la estructura tiene un largo menor a 9 [cm] debido a que no fue posible retirarla completa de la base de impresión.

El ensayo es grabado y luego se analizan 4 puntos de la imagen, como se ve en la Figura 6.23, para observar la deformación y, con esto, obtener el coeficiente de Poisson en función de la deformación del scaffold. Se realizan dos repeticiones con dos scaffolds diferentes, pero con la misma estructura (dos réplicas de la estructura panal reentrante).

Se obtiene el gráfico de la Figura 6.24, que muestra que el coeficiente de Poisson de esta estructura es negativo, como se esperaba de su diseño, y que depende de la deformación de su costilla reentrante, la cual produce un efecto de resorte.

En este gráfico se puede observar que el coeficiente de Poisson más negativo obtenido fue de $-0,57$ a una deformación de 6% . El valor promedio corresponde a $-0,37$. Mientras que el valor promedio a una deformación menor a 20% es de $-0,45$.

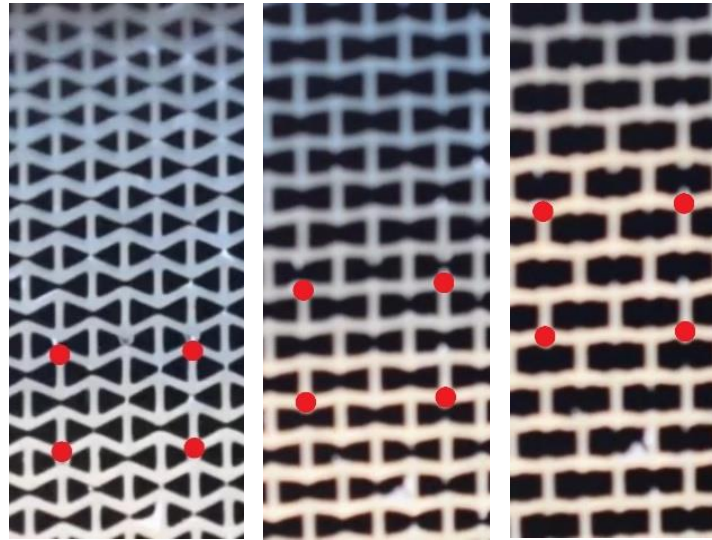


Figura 6.23: Estructura panal reentrante. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 16% ; Derecha: Deformación de 30% .

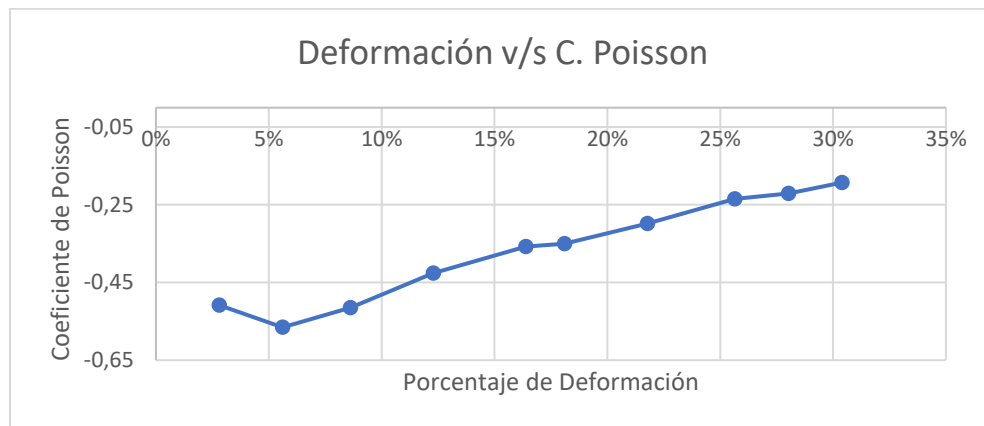


Figura 6.24: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la estructura panal reentrante.

Repitiendo el ensayo con una segunda estructura de panal reentrante, con una deformación máxima alcanzada de 36% observable en la Figura 6.25, se obtiene el gráfico de la Figura 6.26. Nuevamente se observa un aumento del coeficiente de Poisson a medida que aumenta la deformación. El valor más negativo obtenido corresponde a $-0,73$ a una deformación de 2% . El valor promedio corresponde a $-0,38$. Mientras que el valor promedio a una deformación menor a 20% es de $-0,56$.

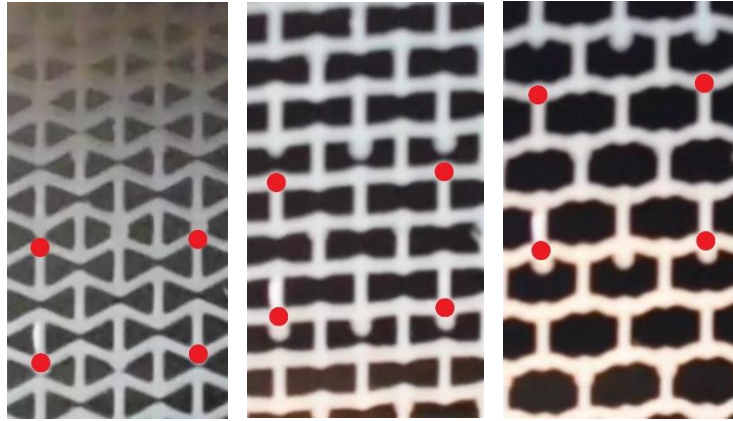


Figura 6.25: Estructura panal reentrante. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 18%; Derecha: Deformación de 36%.

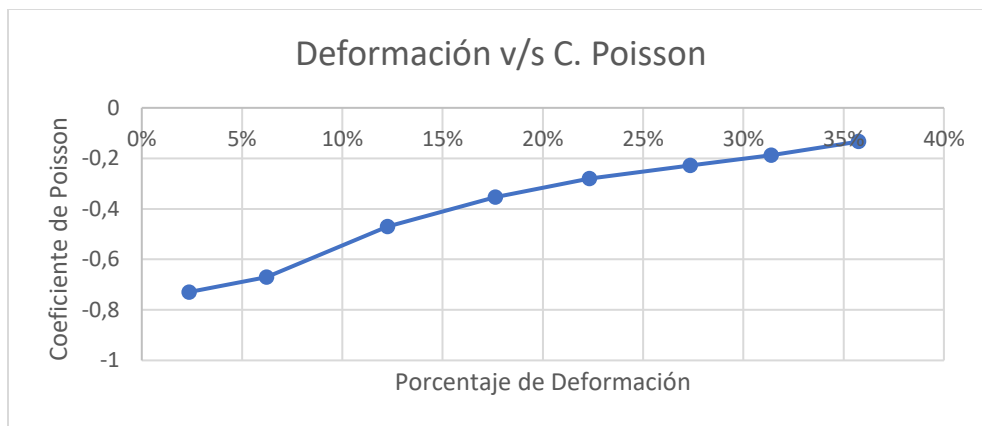


Figura 6.26: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la estructura panal reentrante.

Dado que la auxeticidad de esta estructura se obtiene de la acomodación de las costillas, llega a un punto en que se pierde esta propiedad. En general se comienza a perder la auxeticidad al rededor del 20% de deformación^[30], lo que se observa en los gráficos de las Figura 6.24 y Figura 6.26, donde el coeficiente de Poisson se acerca a cero a medida que aumenta la deformación. Esto no sólo ocurre porque la estructura deja de ser reentrante, sino también porque existe deformación plástica, la cual se vuelve prominente a mayores deformaciones.

El valor menor para el segundo ensayo se puede explicar por falta de tensión inicial al comenzar el experimento y también por daños en la estructura ensayada, pues la primera estructura tenía una fractura, que se observa en la Figura 6.27, lo que pudo impedir que la deformación ocurriera de forma ideal.

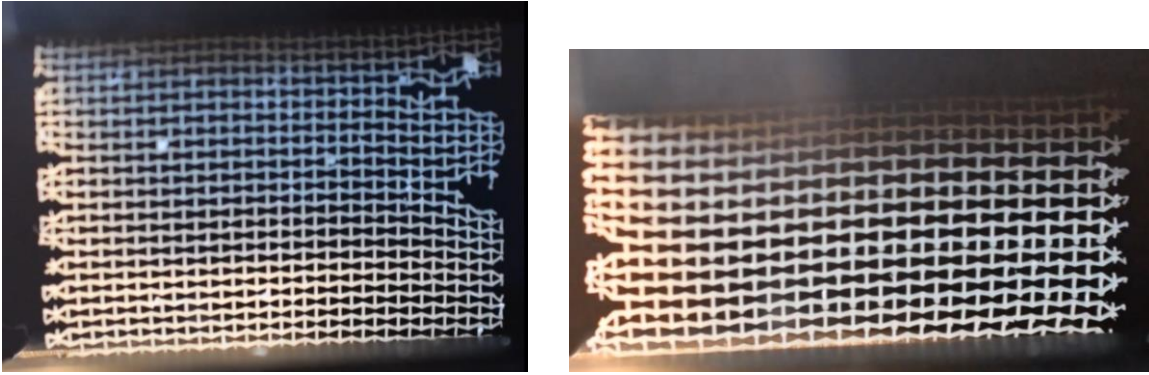


Figura 6.27: Estado inicial de la primera y segunda estructura ensayada.

Para los ensayos de la estructura Kagome triangular, nuevamente se seleccionan 4 puntos y se analiza su desplazamiento como se observa en la Figura 6.28. En este caso se realizan tres repeticiones con tres scaffolds diferentes, pero con la misma estructura (tres réplicas de la estructura Kagome triangular).

Se realiza el gráfico de la Figura 6.29, que muestra que, en efecto, el coeficiente de Poisson de esta estructura es negativo gracias a su diseño. En el caso de las estructuras Kagome, el efecto auxético se produce cuando los ligamentos se desenrollan (o enrollan), esto permite que se mantenga la propiedad a deformaciones un poco más altas, superando el 25%.

En el gráfico se puede observar que el valor más negativo obtenido corresponde a $-0,85$ a una deformación de 3%. El valor promedio corresponde a $-0,39$. Mientras que el valor promedio para deformaciones menores a 25% es de $-0,43$.

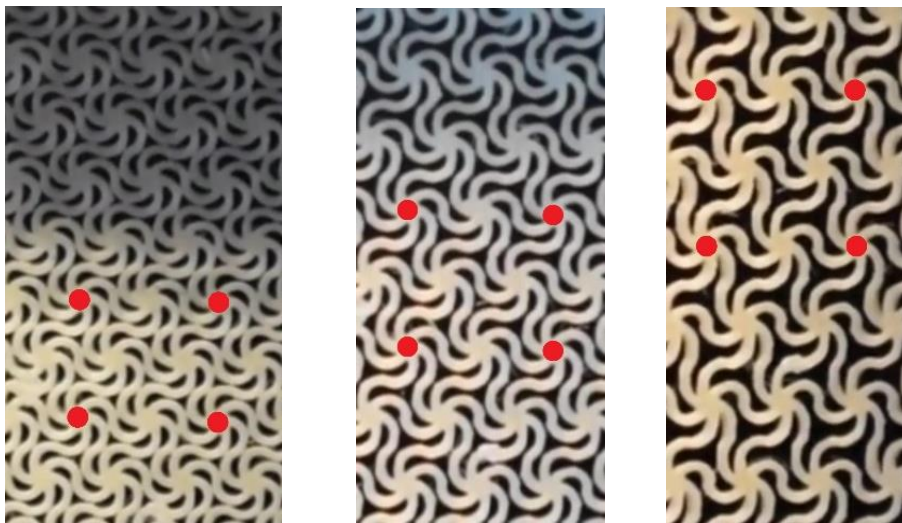


Figura 6.28: Estructura Kagome triangular. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 16%; Derecha: Deformación de 32%.

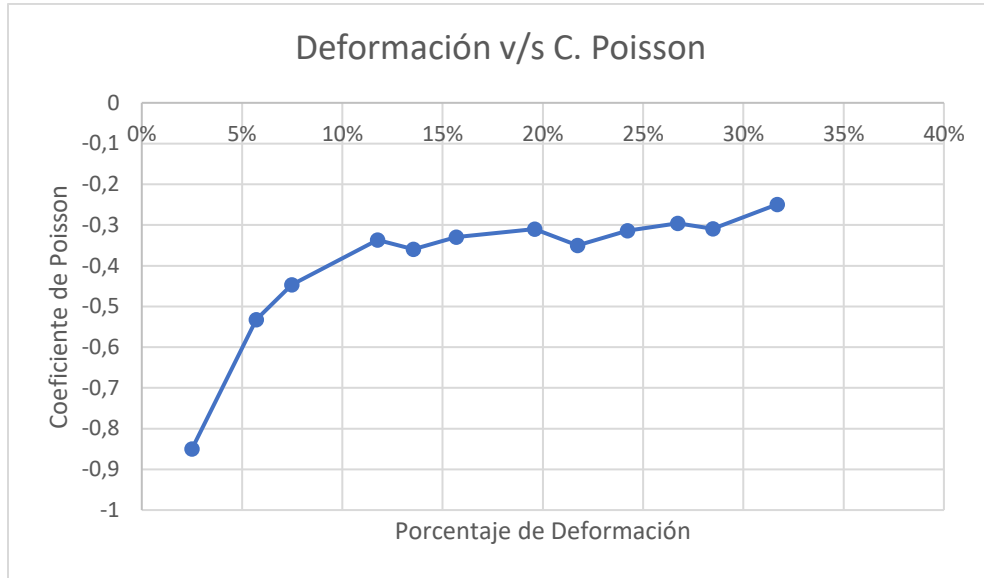


Figura 6.29: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la primera estructura Kagome triangular.

Repitiendo el ensayo con una segunda estructura Kagome triangular, alcanzando una deformación de 31%, como se observa en la Figura 6.30. Se obtiene el gráfico de la Figura 6.31, en el cual se puede observar que el valor más negativo corresponde a -1,45 a una deformación de 2%. El valor promedio corresponde a -0,66. Mientras que el valor promedio para deformaciones hasta 25% es de -0,71.

El valor obtenido para una deformación de 2% está demasiado alejado de los demás, lo que hace pensar que es posiblemente debido a que la estructura no estaba bien tensada antes de comenzar el ensayo, lo que implicaría que el mínimo valor corresponda a -0,53. Logrando que el valor promedio sea -0,6 y el promedio menor a 25% sea de -0,64.

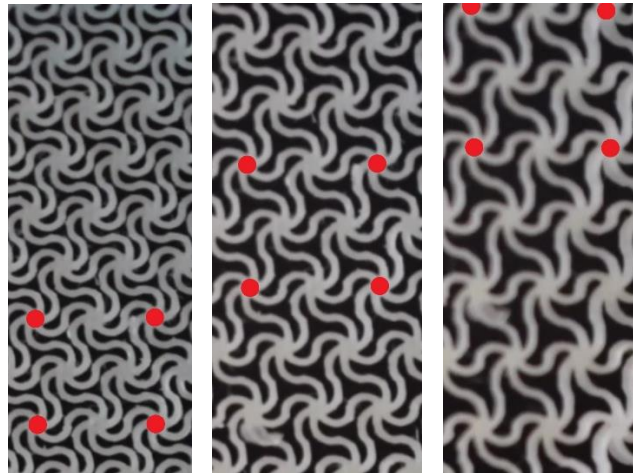


Figura 6.30: Estructura Kagome triangular. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 15%; Derecha: Deformación de 31%.

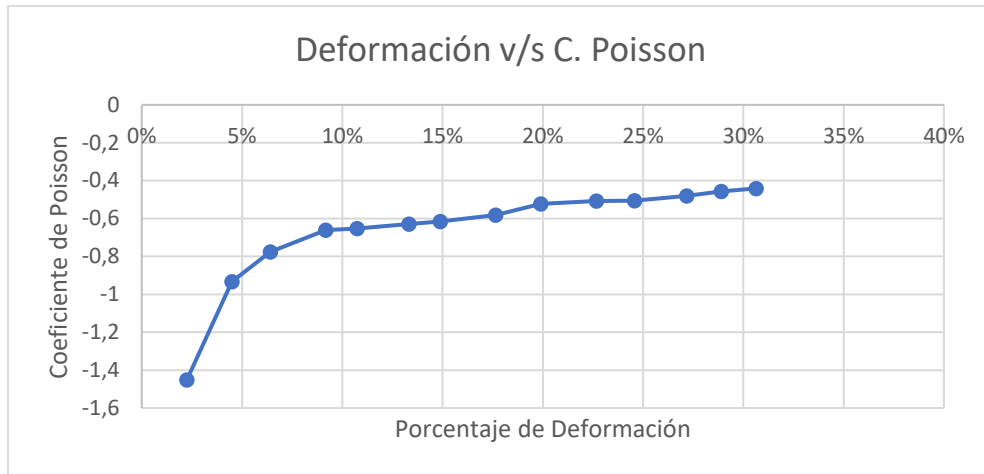


Figura 6.31: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la segunda estructura Kagome triangular.

Repitiendo el ensayo con la tercera estructura Kagome triangular, se alcanza una deformación máxima de 24% observable en la Figura 6.32. Se obtiene el gráfico de la Figura 6.33, donde se observa un valor mínimo de -0,47 a una deformación de 8%. El valor promedio corresponde a -0,41.

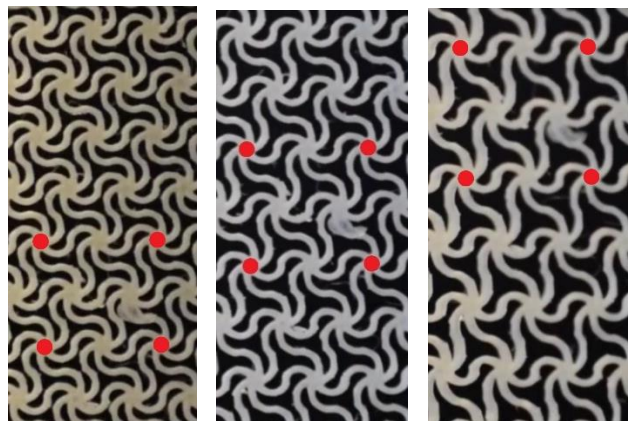


Figura 6.32: Estructura Kagome triangular. Izquierda: En reposo; Medio: Deformación de 12%; Derecha: Deformación de 24%.

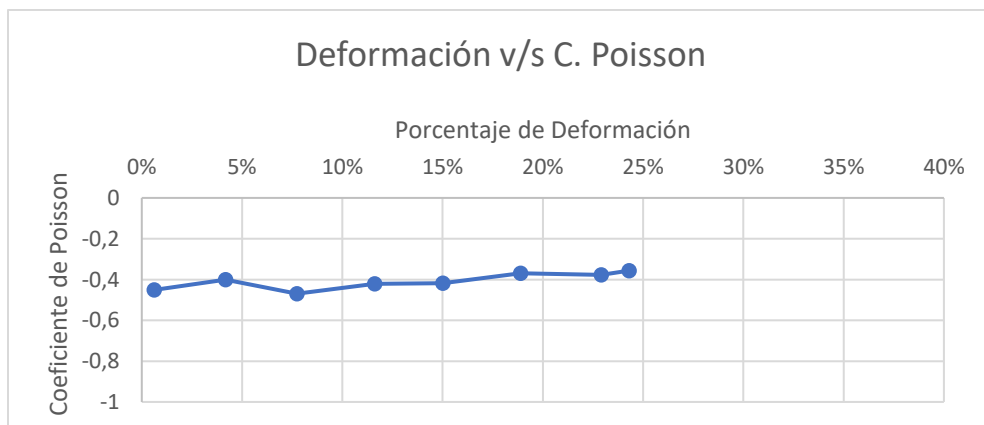


Figura 6.33: Gráfico de deformación v/s coeficiente de Poisson para la tercera estructura Kagome triangular.

En la Figura 6.34 se entrega un gráfico resumen con todos los coeficientes de Poisson teóricos obtenidos para las estructuras.

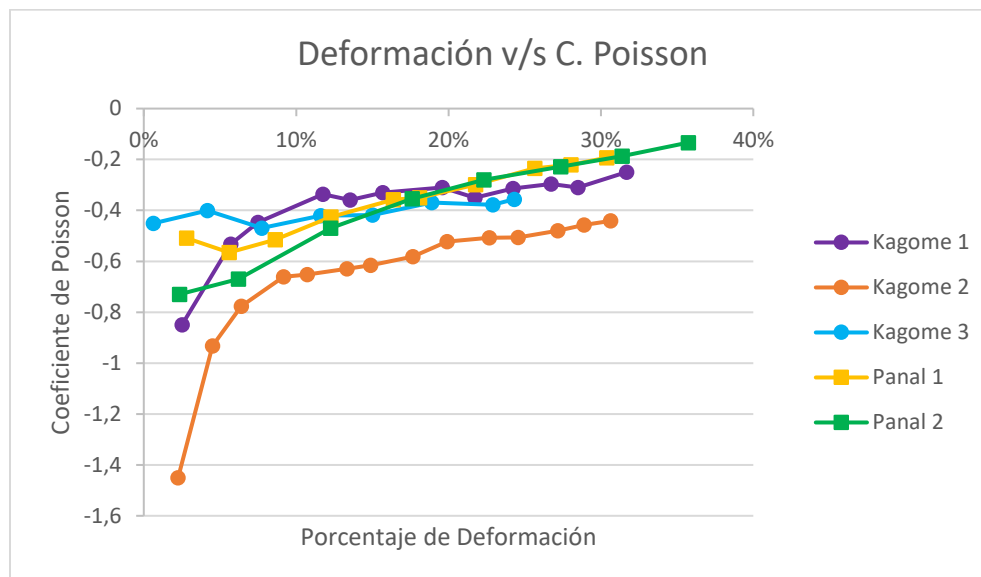


Figura 6.34: Gráfico resumen de deformación v/s coeficiente de Poisson para las estructuras estudiadas.

En este gráfico es fácil observar que, como era de esperarse, el coeficiente de Poisson se acerca a cero a mayores deformaciones. Esto ocurre pues, una vez superado el rango de deformación auxético, la propiedad estructural que otorga esa propiedad (ángulo reentrante en el caso del panal y ligamentos enrollados en caso de Kagome) se pierde, por lo que la deformación plástica comienza a dominar el estiramiento.

En la Tabla 6.1 se resumen los coeficientes de Poisson experimentales promedio obtenidos para cada una de las estructuras estudiadas.

Tabla 6.1: Resumen de resultados del Coeficiente de Poisson en los ensayos de tracción.

Estructura	Mínimo	Promedio	Promedio Rango Auxético
Kagome 1	-0.85	-0.39	-0.43
Kagome 2	-0.53	-0.6	-0.64
Kagome 3	-0.47	-0.41	-0.41
Panal Reentrante 1	-0.57	-0.37	-0.45
Panal Reentrante 2	-0.73	-0.38	-0.56

Las grandes variaciones entre los ensayos de las estructuras Kagome se deben probablemente a errores en las mediciones. En la Figura 6.35 se observa el estado inicial de los ensayos. La estructura del primer ensayo tiene diversas fracturas que, al igual que el ensayo del panal reentrante, evitan que la estructura se desenrolle como debe y por ende limitan su auxeticidad.

El segundo ensayo posee menor cantidad de fracturas, y las celdas logran desenrollarse de mejor manera, demostrando un mayor comportamiento auxético que los demás. Es probable que la pieza no haya estado correctamente tensada al comienzo del ensayo.

El tercer ensayo fue realizado a una velocidad mayor que los demás, y es posible observar deformación plástica desde el inicio. Disminuyendo el efecto auxético de la estructura.

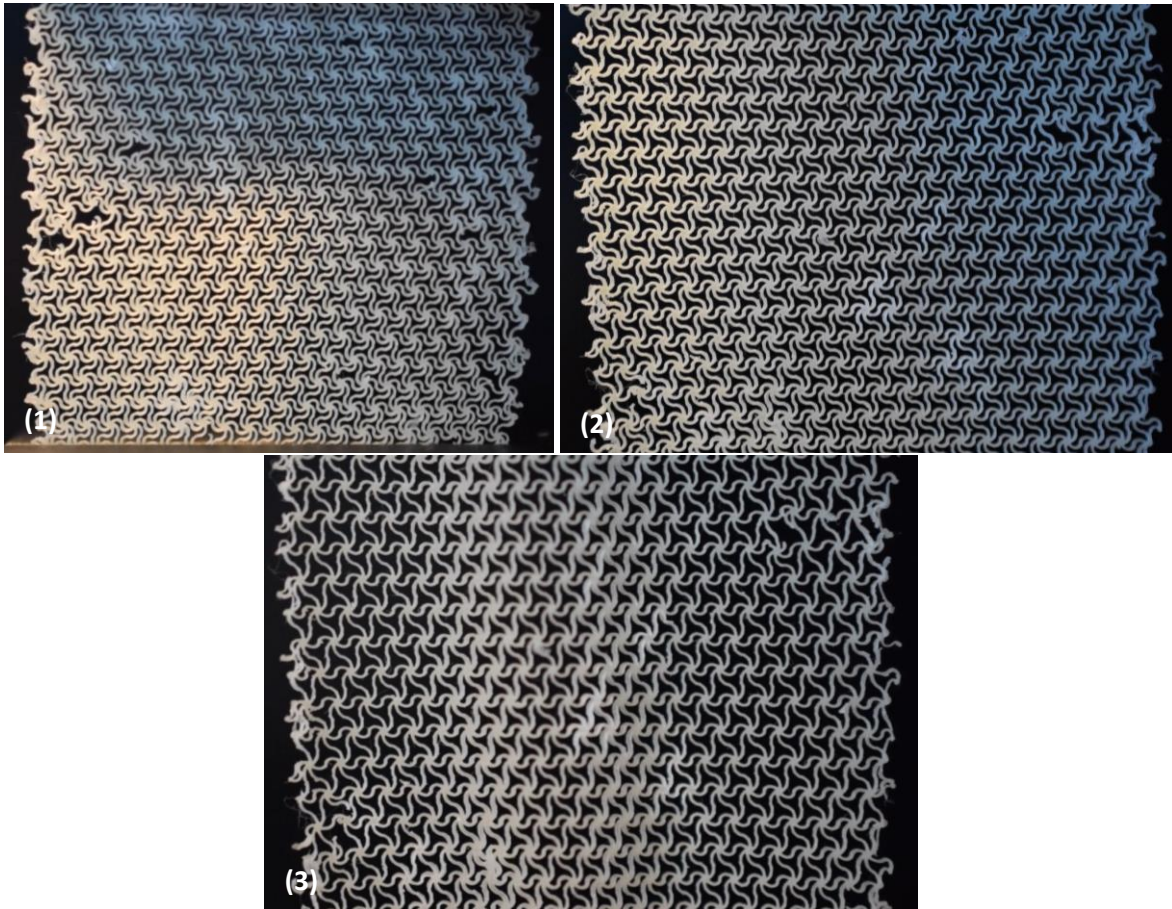


Figura 6.35: Estado inicial de las estructuras ensayadas.

Los valores del coeficiente de Poisson obtenidos para las estructuras Kagome se acercan a los esperados según los experimentos previos y el valor teórico. Sin embargo, los valores del coeficiente de Poisson de ambas estructuras de panal reentrante son bastante menos negativos del valor teórico esperado de $-1,4$. Esto se puede explicar por las fracturas en la estructura que disminuyen el comportamiento auxético, además de la deformación plástica que ocurre al elongar la estructura, precisamente porque la deformación auxética no se produce de manera homogénea.

6.3. Proliferación Celular

6.3.1. Esterilización:

Para asegurar la resistencia de las estructuras al etanol que sería utilizado en su esterilización, se comienzan las pruebas sumergiendo 5 réplicas de la estructura Kagome triangular en 10 [mL] de etanol al 70% cada una. Estas se dejan por 1 [min], 30 [min], 2 [horas], 6 [horas] y [overnight], respectivamente. Una vez cumplido el tiempo correspondiente, se desecha el etanol y la estructura se lava con 10 [mL] de PBS. Se repite el lavado.

Todas las estructuras resisten el etanol, sin embargo, a partir de los 30 [min] las estructuras comienzan a absorberlo, generando que la estructura se desenrolle levemente como se puede observar en la Figura 6.36.

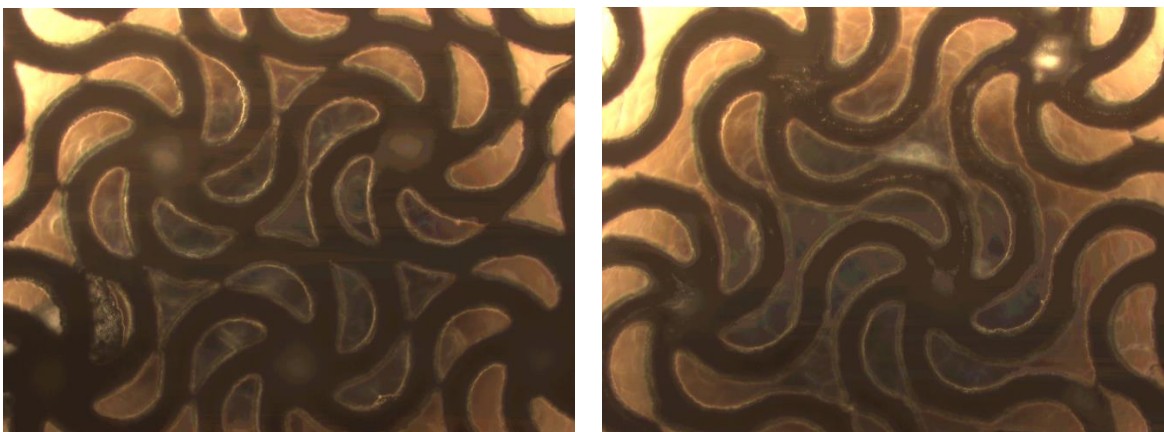


Figura 6.36: Estructura Kagome sumergida en etanol por 1 [min](a la izquierda) v/s [overnight] (a la derecha).

6.3.2. Adhesión:

Para estudiar si el material tiene adhesión celular o es necesario realizar un tratamiento, se imprimen piezas lisas de 12x12 [mm], cuyo diseño se observa en la Figura 6.37, Estas fueron esterilizadas con etanol al 70%, y luego se realizó un cultivo de células mesenquimales humanas de cordón umbilical en su superficie, utilizando una placa 24 well.

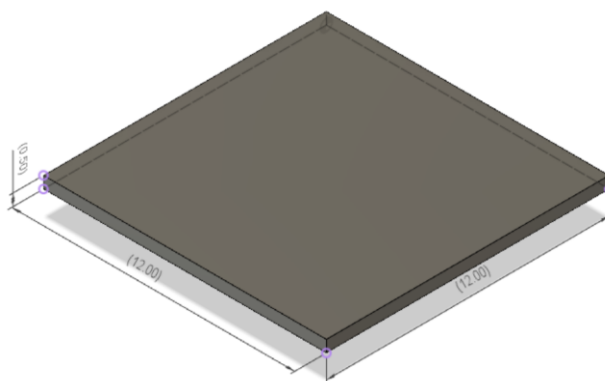


Figura 6.37: Diseño de las piezas lisas utilizadas en estudio de adherencia celular. El cuadrado es de lados de 12 [mm] y el espesor es de 0,5 [mm].

Se realizan 3 repeticiones de cada experimento correspondientes a: control (solo las células), cultivo por 4 horas, cultivo por 6 horas y un cultivo por dos días, sobre piezas lisas. No fue posible observar adhesión en estas piezas, por lo que el experimento se repitió con la estructura Kagome triangular, de aproximadamente 14x16 [mm], como se observa en la Figura 6.38, donde se espera que la porosidad de la estructura favorezca la adhesión, y la posterior visualización de las células. No se intenta repetir el experimento con la pieza lisa debido a que el objetivo es comprobar la factibilidad del cultivo en las diversas estructuras.

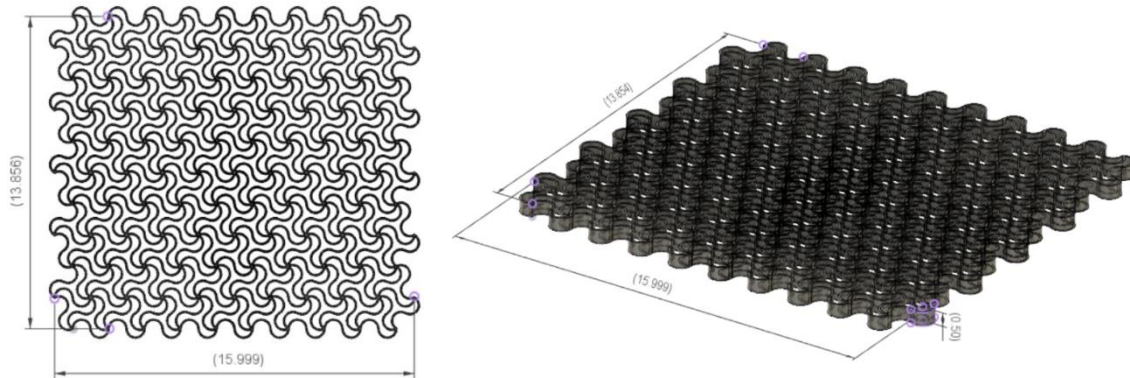


Figura 6.38: Diseño de las estructuras Kagome triangular utilizadas en estudio de adherencia celular. Su tamaño es de aproximadamente 14x16 [mm] y su espesor es de 0,5 [mm].

Dada la opacidad del material, en el experimento con la estructura Kagome se agrega también un método de tinción con colorante Hoechst para poder observar las células, sin embargo, la pieza absorbe el colorante o reacciona con el mismo, y no se logra diferenciar de las células. Esto se muestra en la Figura 6.39.

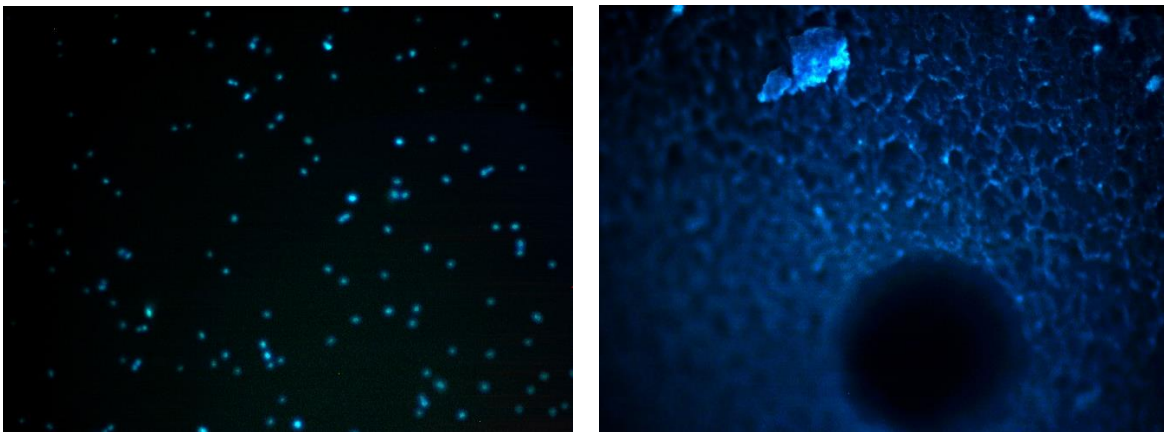


Figura 6.39: Células con tinción Hoechst en control sin estructura (a la izquierda) v/s pocillo con estructura (a la derecha).

Luego de 2 días, se puede observar que las células que se encontraban en los pocillos con la lámina de resina con estructura Kagome han muerto, como se puede observar en la Figura 6.40. En la figura de la izquierda se observa como las células vivas, en el pocillo de control, se han adherido a la base de este y han adoptado una forma alargada. Mientras que en la figura de la derecha es posible decir que las células han muerto pues poseen una forma circular, y se encuentran flotando en lugar de adherirse al pocillo. Este resultado demuestra que es necesario realizar un tratamiento previo para la adhesión de las células a los scaffolds.

Algunos tratamientos posibles consisten en recubrimiento con gelatina^[14] o revestimiento de fibronectina junto a antibióticos^{[4][16]}.

Se repite el experimento del cultivo sobre una estructura Kagome, pero esta vez la estructura se somete a un recubrimiento de gelatina y plasma, previo a la realización del cultivo. No fue posible obtener los resultados de este experimento, debido a una falla en el microscopio.

También se intentó realizar un ensayo celular live and dead, pero tampoco fue posible obtener los resultados de este debido a la falta de disponibilidad de los equipos necesarios.

Otra causa posible de la muerte celular es que las células fueran afectadas por resina residual liberada de la estructura al no estar curadas. Dado que curar la estructura no es una opción para esta resina debido a la excesiva fragilidad que se generaría, se debe buscar otra manera de eliminar la resina residual de la estructura, antes de realizar el cultivo. Una opción es sumergir la estructura en cloroformo, previo a realizar la esterilización de esta.

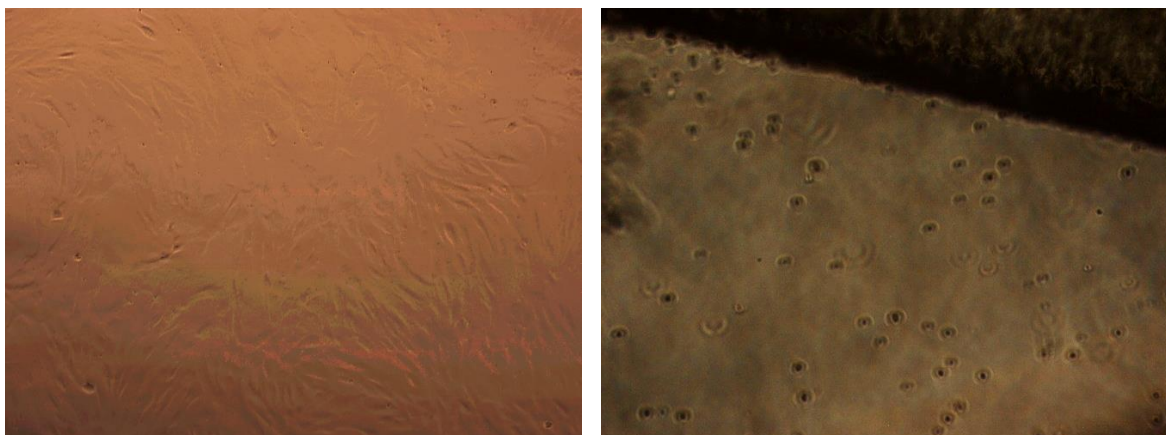


Figura 6.40: A la izquierda células en pocillo de control (sin estructura) v/s a la derecha pocillo con estructura en el cual se observan células muertas a su alrededor.

7. Conclusiones

Se lograron diseñar e imprimir scaffolds auxéticos, a escala de centímetros, con tres estructuras diferentes: panal reentrante, Kagome triangular y semi-rígida cuadrada, utilizando las resinas estándar, flexible, dental SG y elástica.

Se realizaron pruebas de impresión a escala submilimétrica donde solo las resinas estándar y dental SG tienen la resolución necesaria para imprimir en la escala deseada. Se concluye que la resina que más se adapta al proyecto corresponde a la resina dental SG sin curar pues, además de ser capaz de alcanzar la resolución necesaria, es una resina biocompatible una vez curada.

Se debió descartar la estructura semi-rígida cuadrada debido a que la rigidez de la resina dental, junto a los pequeños puntos de contacto que sostienen la estructura, provocaron que no fuera factible su fabricación a escala milimétrica.

A escala submilimétrica y con resina dental, se realizaron impresiones de diverso tamaño de capas, además de diversas pruebas de cantidad y ubicación de soportes, obteniendo los mejores resultados cuando las capas de impresión son de 50 micras y aplicando la mayor cantidad posible de soportes, cuidando que estos no se fusionen entre sí (esto se observa al generar los soportes en el programa PreForm).

La estructura más auxética corresponde a Kagome triangular, alcanzando un coeficiente de Poisson promedio de $-0,64$, mientras que la estructura de panal reentrante alcanza un

coeficiente de Poisson promedio de -0,56. Sin embargo, la estructura Kagome presenta una mayor dispersión en sus valores, la cual es probablemente provocada por errores en el comienzo del experimento (fracturas en las piezas o falta de tensión inicial).

No fue posible estudiar la estructura hexagonal no auxética, pues su fragilidad a la escala necesaria impidió que se lograra retirar sus soportes sin destruir la estructura.

Se realizó un cultivo celular sobre piezas lisas y con estructura Kagome, impresas en resina dental sin curar. Las pruebas en la pieza lisa se realizaron para comprobar la capacidad de adhesión de las células al material, pero su opacidad no permitió observar resultados por que las siguientes pruebas se realizaron con estructura Kagome, previamente esterilizadas, y luego se realizaron diversos análisis para determinar la proliferación celular sobre estas. Las piezas sin tratamiento previo para facilitar la adhesión y eliminar cualquier posible residuo de resina, no permiten el cultivo celular pues la resina sin curar sigue siendo dañina para la célula y por ende evita su proliferación. Se descarta la resina dental, sin curar y sin tratamientos, para fabricar scaffolds.

Basado en resultados de otros experimentos, sería interesante repetir el cultivo posterior a un tratamiento con cloroformo para eliminar cualquier residuo de resina. Realizando también un pretratamiento de adhesión con gelatina y plasma.

Bibliografía

- [1] X. Wang, M. Jiang, Z. Zhou, J. Gou y D. Hui, «3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective,» *Composites Part B: Engineering*, vol. 110, n° 1359-8368, pp. 442-458, 2017.
- [2] C. Llanos Galvis, «Fabricación y Caracterización de Andamios Tridimensionales de Quitosano-Óxido de Grafeno-Plastificante Mediante el Método Liofilización,» 2015.
- [3] B. P. Chan y K. W. Leong, «Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations,» *European Spine Journal*, vol. 17, n° 4, pp. 467-479, 2008.
- [4] J. Warner, A. Gillies, H. Hwang, H. Zhang, R. Lieber y C. Shaochen, «3D-printed biomaterials with regional auxetic properties,» *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 76, p. 145–152, 2017.
- [5] X. Ren, R. Das, P. Tran, T. D. Ngo y Y. M. Xie, «Auxetic metamaterials and structures: a review,» *Smart Materials and Structures*, vol. 27, n° 2, 2018.
- [6] H. M. Kolken y A. A. Zadpoor, «Auxetic Mechanical Metamaterials,» *RSC Advances*, vol. 7, pp. 5111-5129, 2017.
- [7] F. Scarpa, «Auxetic materials for bioprostheses [In the Spotlight],» *Signal Processing Magazine, IEEE*, vol. 25, pp. 128 - 126, 2008.

- [8] «Fusion 360» Autodesk, 2020. [En línea]. Available: <https://www.autodesk.com/products/fusion-360/overview>.
- [9] «Instron» 2019. [En línea]. Available: <https://www.instron.com.br/>.
- [10] Formlabs, «3D Printing Guide: Types of 3D Printers, Materials, and Applications,» 2020. [En línea]. Available: <https://formlabs.com/3d-printers/>.
- [11] F. Martino, A. R. Perestrelo, V. Vinarský, S. Pagliari y G. Forte, «Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function,» *Frontiers in Physiology*, vol. 9, p. 824, 2018.
- [12] J. Wang y B. Li, «Mechanics rules cell biology,» *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*, nº 16, pp. 2-16, 2010.
- [13] X. Li, Q. Wang, Z. Yang y Z. Lu, «Novel auxetic structures with enhanced mechanical properties,» *Extreme Mechanics Letters*, vol. 27, nº 2352-4316, pp. 59-65, 2019.
- [14] Y. Yuanwei, L. Yan, S. Liqing, Z. Changchun y L. Yan, «Pluripotent stem cell expansion and neural differentiation in 3-D scaffolds of tunable Poisson's ratio,» *Acta Biomaterialia*, vol. 49, p. 192–203, 2017.
- [15] S. K. Bhullara, D. Ranac, H. Lekesiza, A. C. Bedeloglud, J. Kob, Y. Chob, Z. Aytace, T. Uyare, M. Junb y M. Ramalingam, «Design and fabrication of auxetic PCL nanofiber membranes for biomedical applications,» *Materials Science & Engineering C*, vol. 81, p. 334–340, 2017.
- [16] P. Soman, J. W. Lee, A. Phadke, S. Varghese y S. Chen, «Spatial tuning of negative Poisson's ratio in a multi-layer scaffold,» *Acta Biomaterialia*, vol. 8, pp. 2587-2594, 2012.
- [17] «Technical Data Sheet Neubauer Haemocytometry» Electron Microscopy Sciences, 2020. [En línea]. Available: <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/68052-14.aspx>.
- [18] «Fisher Scientific», 2020. [En línea]. Available: <https://www.fishersci.es/>
- [19] J. Warner, A. Gillies, H. Hwang, H. Zhang, R. Lieber y C. Shaochen, «3D-printed biomaterials with regional auxetic properties,» *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 76, p. 145–152, 2017.
- [20] Abdelaal y S. Darwish, «Analysis, Fabrication and a Biomedical Application of Auxetic Cellular Structures,» *International Journal of Engineering and Innovative Technology (IJEIT)*, vol. 2, nº 3, 2012.
- [21] M. Kapnisi, C. Mansfield, C. Marijon, A. G. Guex, F. Perbellini, I. Bardi, J. L. Humphrey, D. Mawad, D. C. Koutsogeorgis, D. J. Stuckey, C. M. Terracciano, S. E. Harding y M. M. Stevens, «Auxetic Cardiac Patches with Tunable Mechanical and

- Conductive Properties toward Treating Myocardial Infarction,» *Advanced Functional Materials*, vol. 28, n° 21, 2018.
- [22] M. Mir, M. N. Ali, J. Sami, U. Ansari y L. Nicolais, «Review of Mechanics and Applications of Auxetic Structures,» *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2014, pp. 1-17, 2014.
- [23] F. Amin, M. N. Ali, U. Ansari, M. Mir, M. A. Minhas y W. Shahid, «Auxetic coronary stent endoprosthesis: fabrication and structural analysis,» *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, vol. 13, n° 2, pp. 127-135, 2015.
- [24] P. Ma, Y. Chang, A. Boakye y G. Jiang, «Review on the knitted structures with auxetic effect,» *The Journal of The Textile Institute*, vol. 108, n° 6, pp. 947-961, 2017.
- [25] T. C. T. Ting y T. Chen, «Poisson's ratio for anisotropic elastic materials can have no bounds,» *Quarterly Journal of Mechanics and Applied Mathematics*, vol. 58, n° 1, pp. 73 - 82, 2005.
- [26] L. Song, M. F. Ahmed, Y. Li, Y. Li y C. Zeng, «Vascular differentiation from pluripotent stem cells in 3-D auxetic scaffolds,» *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 12, n° 7, pp. 1679-1689, 2018.
- [27] H. J. Choi, J. J. Lee, J. B. Lee, H.-J. Sung, J.-W. Shin, J. W. Shin, Y. Wu y J. K. Kim, «MG-63 cells proliferation following various types of mechanical stimulation on cells by auxetic hybrid scaffolds,» *Biomaterials Research*, vol. 20, n° 32, 2016.
- [28] M. J. Kim, H. J. Choi, J. Cho, J. B. Lee, H.-J. Sung y J. K. Kim, «MG-63 Cell Proliferation with Static or Dynamic Compressive Stimulation on an Auxetic PLGA Scaffold,» *International Journal of Polymer Science*, vol. 2017, 2017.
- [29] J. W. Lee, P. Soman, J. H. Park, S. Chen y D.-W. Cho, «A Tubular Biomaterial Construct Exhibiting a Negative Poisson's Ratio,» *PLoS ONE*, vol. 11, n° 5, 2016.
- [30] G. Flamourakis, I. Spanos, Z. Vangelatos, P. Manganas, L. Papadimitriou, C. Grigoropoulos, A. Ranella y M. Farsari, «Laser-made 3D Auxetic Metamaterial Scaffolds for Tissue Engineering Applications,» *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 305, n° 7, 2020.
- [31] D. Prall y R. S. Lakes, «Properties of a chiral honeycomb with a Poisson's ratio of -1,» *International Journal of Mechanical Sciences*, vol. 39, n° 3, pp. 305-307, 309-314, 1997.

Anexos

Anexo A

Coefficiente de Poisson teórico de la estructura panal reentrante

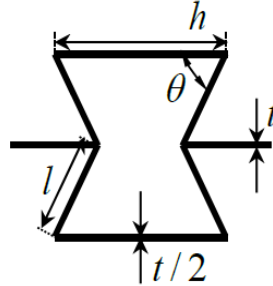


Figura A.1: Diagrama de estructura de panal reentrante.

$$\nu = - \frac{\sin^2 \theta}{\left(\frac{h}{l} - \cos \theta\right) \cos \theta} \quad (\text{A.1})$$

Donde:

$$h = 1.203 [\mu\text{m}]$$

$$l = 895 [\mu\text{m}]$$

$$\theta = 61,9^\circ$$

Anexo B

Tabla B.1: Funciones de la Matriz Extracelular en tejidos nativos y de scaffolds en tejidos de ingeniería^[3].

Funciones de la MEC en tejido nativo		Funciones análogas de scaffolds en tejidos de ingeniería	Características arquitectónicas, biológicas y mecánicas de los scaffolds
1.	Proporciona soporte estructural para que las células residan.	Proporciona soporte estructural para que las células aplicadas se adhieran, crezcan, migren y se diferencien in vitro e in vivo.	Biomateriales con sitios de unión para células. Estructura porosa con interconectividad para la migración celular y la difusión de nutrientes. Resistencia temporal a la biodegradación tras la implantación.
2.	Contribuye a las propiedades mecánicas de los tejidos.	Proporciona la forma y la estabilidad mecánica al defecto del tejido y da rigidez a los tejidos diseñados.	Biomateriales con suficientes propiedades mecánicas llenan el espacio vacío del defecto y simulan el del tejido nativo.
3.	Proporciona señales bioactivas para que las células respondan a su microambiente.	Interactúa con las células de forma activa para facilitar actividades como la proliferación y diferenciación.	Señales biológicas tales como sitios de unión celular. Señales físicas como la topografía de la superficie.

4.	Actúa como reservorio de factores de crecimiento y potencia sus acciones.	Sirve como vehículo de reparto y depósito de factores estimulantes del crecimiento aplicados de forma exógena.	Microestructuras y otros factores de la matriz que retienen agentes bioactivos en el andamio.
5.	Proporciona un entorno físico flexible para permitir la remodelación en respuesta a los procesos dinámicos de los tejidos, como la cicatrización de heridas.	Proporciona un volumen vacío para la vascularización y la formación de nuevos tejidos durante la remodelación.	Microestructuras porosas para permitir la difusión de nutrientes y metabolitos. Diseño matricial con mecanismos y tasas de degradación controlables. Biomateriales y sus productos degradados con compatibilidad tisular aceptable.