

Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA/Hidroxiapatita

Biocompatibility of Nanofibrous Scaffolds with Different Concentrations of PLA/Hydroxyapatite

Alfonso Ali Altamirano Valencia MSc¹; Nancy Vargas Becerril PhD²;
 Febe Carolina Vázquez Vázquez MSc³; Tatiana Vargas Koudriavtsev MSc⁴;
 Juan José Montesinos Montesinos PhD⁵; Erika Alfaro Mayorga MSc⁶; Marco Antonio Álvarez Pérez PhD⁷

1. Residente de Postgrado de Prostodoncia, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
2. Posdoctorante del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, DEPeI-FO, UNAM CDMX, México.
3. Maestra en Ciencias, Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, DEPeI-FO, UNAM CDMX, México.
4. Docente Facultad de Odontología. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
5. Jefe del Laboratorio de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, CDMX, México.
6. Docente Facultad de Odontología. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
7. Profesor e Investigador, Jefe del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, DEPeI, Ciudad Universitaria s/n, UNAM, CDMX, México.

Autores para correspondencia: Dra. Erika Alfaro Mayorga - dra.erika.alfaro.m@gmail.com
 Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez - marcoalv@unam.mx

Recibido: 20-VII-2016

Aceptado: 16-VIII-2016

Publicado Online First: 22-VIII-2016

DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.25987>

RESUMEN

En la ingeniería de tejidos para lograr la regeneración tisular, existe un interés especial en el desarrollo de nuevos biomateriales funcionales capaces de estimular una respuesta biológica necesaria para restablecer las funciones de un tejido dañado. Las estrategias recientes tratan de imitar la matriz extracelular de los tejidos del cuerpo humano mediante el uso de la nanotecnología. Por ello; el propósito de esta investigación fue sintetizar y evaluar la respuesta de la biocompatibilidad de un andamio nanofibrilar compuesto con diferentes concentraciones de PLA dopados con hidroxiapatita. Los andamios de PLA fueron sintetizados utilizando la técnica de hilado por propulsión de gas (AJS) a partir de soluciones poliméricas de 6, 7, y 10% de PLA (p/v) en cloroformo/etanol en una relación 3:1 (v/v), y para la síntesis de los andamios composites a las soluciones poliméricas se les adicionó 0,1 g de hidroxiapatita. La biocompatibilidad de los andamios de PLA y composites de PLA/HA fueron evaluados por medio de analizar la respuesta de adhesión celular, de viabilidad celular y de la interacción célula-material utilizando a las células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSc). Los resultados indican que la respuesta de biocompatibilidad por parte de la células BM-MSc fue incrementada en los andamios nanofibrilares composites de PLA/HA cuando se comparan con los andamios fibrilares de PLA mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En conclusión la técnica de AJS permite obtener membranas nanofibrilares que podrían tener una aplicación directa en el campo de la ingeniería de tejidos mineralizados en la clínica odontológica debido a su biocompatibilidad y fácil diseño del andamio.

PALABRAS CLAVE

Ácido poliláctico; Hidroxiapatita; Ingeniería de tejido óseo; Andamios nanofibrilares.

ABSTRACT

In tissue engineering field to achieve tissue regeneration, there is particular interest in the manufacturing of new functional biomaterials capable of stimulating the biological response needed to restore the functions of damaged tissue. Recently, several strategies in attempt to mimic the extracellular matrix of the tissues of the human body by synthesized new biomaterials are focusing using nanotechnology. Thus, the purpose of this investigation was to synthesize and evaluate the response of the biocompatibility of nanofibrillar scaffold with different concentrations of PLA doped with hydroxyapatite. Scaffolds of PLA were synthesized using the air jet spinning (AJS) technology from different concentrations of 6, 7, and 10% of PLA polymeric solutions (w/v) in chloroform/ethanol in a 3:1 ratio (v/v), and for the synthesis of the composite scaffolds to the polymeric solutions were added 0.1g of hydroxyapatite. The biocompatibility of PLA nanofibers scaffolds and PLA/HA nanofiber composite were assessed by analyzing the response of cell adhesion, cell viability and cell-material interaction using mesenchymal stem cells derived from bone marrow (BM-MS). The results indicate that the cell response related to biocompatibility by the BM-MS cells was increased in the PLA/HA nanofiber composites when compared to PLA nanofiber scaffolds showing statistically significant differences ($p < 0.05$). In conclusion, AJS technique allows synthesizing nanofibers spun mats that could have a direct application in the field of bone guide tissue engineering in the dental clinic because of its biocompatibility and easy scaffold design.

KEYWORDS

Polilactic acid; Hydroxyapatite; Bone tissue engineering; Nanofibers scaffolds.

INTRODUCCIÓN

Los biomateriales en general y las biocerámicas en particular, son un campo novedoso de investigación y desarrollo en las aplicaciones médicas para la obtención de materiales útiles en la regeneración ósea (1, 2). En la actualidad, para realizar una sustitución ósea predomina la utilización de tejido donante, tanto de aloinjertos, autoinjertos como xenoinjertos. Los tejidos donantes, frente a su buena biocompatibilidad, tienen una serie de desventajas como el costo, disponibilidad reducida, riesgo de transmisión de enfermedades, y activación del complejo mayor de histocompatibilidad, entre otros. Debido a estas desventajas se han desarrollado materiales

sintéticos, que se utilizan en la medicina regenerativa y se pueden clasificar en dos grandes grupos: bioinertes y bioactivos. Los bioinertes tienen una influencia nula o muy pequeña en los tejidos vivos que los rodean y sus principales representantes son la alúmina o el circonio. Los bioactivos pueden enlazarse a los tejidos óseos vivos promoviendo la actividad celular y los más utilizados son la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico (3-5).

El hueso es un tejido vivo complejo compuesto por dos fases. La fase inorgánica compuesta por cristales de hidroxiapatita en conjunción con la fase orgánica que es una matriz colágena de tipo fibrilar. Este tejido tiene una estructura de nanocomposite biocerámico (6). Actualmente;

muchos grupos de investigación dirigen su estudio hacia la síntesis de biomateriales compuestos que imiten la estructura de la matriz extracelular del hueso y la evaluación de su aplicación potencial en la ingeniería de tejido óseo (7).

Las biocerámicas están compuestas por matrices cerámicas bioactivas que pueden ser de naturaleza química muy variada, como los fosfatos de calcio, la hidroxiapatita (HA) y el β -fosfato de calcio (4).

Los composite biocerámicos son la mezcla de dos o más elementos que actúan de manera sinérgica en el medio, como los vidrios bioactivos muy representativos de las cerámicas amorfas (4), las vitrocerámicas bioactivas (8,9), los cementos de sales de calcio (10-12) y todo tipo de combinaciones de materiales bifásicos como, por ejemplo, hidroxiapatita-biovidrio (13,14) e hidroxiapatita- β -fosfato de calcio (15) y cerámicas híbridas bioactivas (16).

Respecto a las biocerámicas de fosfatos de calcio, la creciente demanda de biomateriales con propiedades específicas concebidos para la aplicación deseada, ha conducido al desarrollo de nuevas rutas de síntesis de composites con aplicaciones en la medicina regenerativa de tejidos mineralizados como el hueso.

La HA es una cerámica biocompatible que puede ser de origen natural o sintética; siendo la cerámica más ampliamente utilizada en el campo de los biomateriales e ingeniería de tejido óseo. Es uno de los minerales encontrado en mayor cantidad en la matriz ósea y posee una alta biocompatibilidad con las células humanas. Provee de sitios activos para la biomineralización y adhesión celular, posee propiedades de osteoconducción, osteointegración y osteoinducción. Por otra parte su fragilidad y baja resistencia a la compresión limitan su uso clínico a injertos carentes de cargas o como material de relleno. Otra de sus características es

la baja cinética de biodegradación, registrándose en estudios hasta 9 meses sin reabsorción post implantación (17).

Una estrategia novedosa en la ingeniería de tejidos mineralizados es el desarrollo de membranas fibrilares a base de polímeros biodegradables (18). Con la técnica de hilado por presión de gas (por sus siglas en inglés air jet spinning, AJS) se pueden producir andamios de polímeros de fibras que poseen diámetros que van desde las sub-micras a los nanómetros. Rangos en los que es posible encontrar características únicas, entre las que se encuentran: un área superficial muy grande en relación al volumen, flexibilidad en la superficie, alta porosidad, poros interconectados y un rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocidas del mismo material (17). Las investigaciones en el desarrollo de nuevos materiales de aplicación ósea están en la búsqueda de cómo reforzar los andamios poliméricos con otros materiales biocompatibles para mejorar las propiedades tanto física, química, biológica y mecánicas llevando a la síntesis y formación de composite (19, 20).

Desde el punto de vista médico, el uso de polímeros biodegradables con suficiente resistencia mecánica y funcionalizados con biominerales (Ca^{+} , PO_4^{-} , CO_3^{-} , entre otros) podría finalmente llevar a encontrar un material que se pueda utilizar como andamiaje para inducir la neoformación ósea. En este punto; los nanocomposite fibrilares están abriendo la posibilidad de diseñar andamios que puedan imitar la morfología, estructura y función del hueso con el fin de optimizar la integración con los tejidos circundantes (21).

El ácido poli-láctico (PLA) es un biopolímero aprobado por la FDA y actualmente es uno de los elementos más empleado en la síntesis de materiales y el más estudiado para ser utilizado en la ingeniería de tejido óseo. El PLA posee buenas propiedades mecánicas, baja toxicidad y una

cinética de biodegradación predecible. A pesar de ser un material biocompatible por sí mismo, no posee un potencial bioactivo para ser utilizado en la ingeniería tisular ósea (22).

En un composite, tanto el componente cerámico como el polimérico intervienen en ambos aspectos, será la biocerámica la que principalmente proporcione el carácter bioactivo de la matriz sintética. Por ello, la elección del tipo de biocerámica a incorporar es de suma importancia en el desarrollo de nuevos andamios ya que, la síntesis se llevará a cabo en función del carácter bioactivo que se pretende dar a la matriz. Por tal motivo; es deseable conjuntar las propiedades de la HA y el PLA para establecer un andamio composite con características nanofibrilares que ofrezca las ventajas de ambos componentes. Con esto expuesto; el propósito del estudio fue sintetizar un andamio composite a partir de nanohidroxiapatita y nanofibras de ácido poliláctico en distintas concentraciones utilizando la técnica de hilado por presión de gas y evaluar la respuesta de la biocompatibilidad de células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea.

MATERIALES Y MÉTODOS

SÍNTESIS DE LOS ANDAMIOS DE PLA Y PLA/HA

Los andamios de PLA fueron sintetizados mediante la técnica de hilado por presión de gas (AJS), siguiendo los parámetros descritos a continuación: El PLA utilizado fue de un peso molecular de 192,000 (Nature Works). Se prepararon soluciones al 6, 7, y 10% de PLA (peso/volumen) en cloroformo con etanol en una relación 3:1 (volumen/volumen). Para la construcción de los composites de PLA/HA se adicionó 0.1 g de nanohidroxiapatita a la solución polimérica de PLA (6, 7, y 10%) incubándose en agitación durante 24h. Una vez obtenidas las mezclas de PLA/HA, se colocaron en el contenedor de un dispositivo de atomización por presión de gas a

temperatura ambiente y una humedad relativa de 55% con una punta de 0.3 mm alimentado por gravedad conectado a un tanque de gas argón. Los andamios hilados fueron depositados sobre sustratos de papel encerado con una presión de 25 psi del gas argón y manteniendo una distancia de 11 cm de la punta al colector para optimizar la morfología final de los andamios hilados.

CULTIVO CELULAR

Para la caracterización biológica se emplearon cultivos de células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSC) donadas por el Laboratorio de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Ciudad de México. Las células BM-MSC fueron cultivadas y expandidas en medio de cultivo alpha-MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y fungisona (0.3 µg/mL) y 100 mM de glutamina. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad.

ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR

Para establecer el efecto de los andamios hilados de PLA (6, 7, y 10%) y de los composites de PLA/HA (6, 7, y 10%) sobre la adhesión celular, las células BM-MSC fueron cultivadas sobre andamios de 8 mm de diámetro. Se depositaron en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de 1×10^5 células/mL con 500 µl de medio alpha-MEM y se cultivaron durante 4 y 24 horas a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad. Posterior al tiempo de sembrado; las células no adheridas a las superficies de los andamios fueron removidas por medio de tres lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos). Las células adheridas a los andamios fueron fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA)

durante 30 minutos. La adherencia celular fue evaluada de acuerdo al método de cristal violeta; las células fijadas fueron incubadas con 0.1% de cristal violeta por 10 minutos, lavadas 3 veces con agua bidestilada para remover el colorante no específico y posteriormente el colorante fue extraído con 500 μ L de duodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. De la solución obtenida se tomaron 100 μ L que se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA y fue leído en un lector de placas (Lector de placas Stat Fax 3200, AWARENESS Technology) a una absorbancia de 570 nm. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre los mismo platos plásticos. Los valores de la absorbancia obtenidos fueron convertidos a porcentajes de células adheridas considerando el plato de cultivo celular como el 100% de la adhesión. Los experimentos de adhesión celular se realizaron por triplicado, repitiéndose por lo menos tres veces.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (CITOTOXICIDAD)

La viabilidad celular de los andamios nanofibrilares de PLA y PLA/HA (6, 7, y 10%) al sembrar las células BM-MSC se llevó a cabo por el ensayo de azul de triazol (MTT) basado en la habilidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial para oxidar una sal de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y]-2-5 bromuro difeniltetrazolio) a un producto insoluble de color azul. Las células BM-MSC fueron cultivadas a una densidad celular de 1×10^5 células/mL en medio α -MEM a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad por triplicado por 3, 5, 7, y 10 días de cultivo. Después de cada período experimental, los andamios fueron incubados con MTT (50 mg/mL) a 37°C por 4 horas. Pasado este tiempo, el sobrenadante fue removido y se le adicionó una solución de dimetil sulfoxido (DMSO) y se dejó actuar por 30 minutos. De la solución obtenida se tomaron 200 μ L que se colocaron en pozos de una placa de 96 pozos para

ensayos de ELISA, se llevó a un lector de placas (Lector de placas Stat Fax 3200, AWARENESS Technology inc.) para obtener la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm. Debido a que la generación del producto azul es (directamente) proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, los valores que se obtengan en la absorbancia a 570 nm indicaría una medida de la proliferación celular la cual estaría asociada a la viabilidad celular. Los experimentos se realizaron por triplicado repitiéndose tres veces.

INTERACCIÓN CÉLULA-MATERIAL

Para evaluar la respuesta morfológica de la células BM-MSC a la superficie nanofibrilar; las células fueron sembradas a una concentración de 1×10^5 células/mL sobre los andamios de PLA y PLA/HA (6, 7, y 10%) y se incubaron durante 24h. Posteriormente para visualizar la interacción morfológica de las células sobre el material; se fijaron con 4% de PFA durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron con PBS y se deshidrataron en series crecientes de etanol en PBS (25, 50, 75, 90, y 100%) por 5 minutos respectivamente. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente y se sometieron a un recubrimiento metálico con oro. La morfología que adquirieron las células al interactuar con los andamios nanofibrilares fue observada por la técnica de Microscopia Electrónica de Barrido en bajo voltaje (JEOL JSM-7600F Field Emission Scanning Electron Microscope, USA) para obtener imágenes a diferentes magnificaciones buscando los puntos de adhesión celular.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los datos cuantificables fueron expresados en promedios \pm desviación standard. El análisis estadístico fue llevado a cabo usando el análisis de ANOVA de dos vías para determinar la significancia estadística. Un valor de $p < 0.5$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Para estudiar la respuesta adhesión celular, interacción célula-material y de la viabilidad celular en los andamios nanofibrilares sintetizados de PLA y composites de PLA/HA se utilizaron como modelo de estudio las células troncales mesenquimales derivadas de la medula ósea (BM-MSC).

ADHESIÓN CELULAR

Para cuantificar la adhesión celular presentada en los andamios nanofibrilares de PLA y composites de PLA/HA (6,7, y 10%) se utilizó la prueba de absorbancia con el cristal violeta a 4 y 24 horas. Los valores de absorbancia fueron convertidos a porcentajes de adhesión celular considerando que el plato de cultivo correspondía al 100% de adhesión. En la figura 1 se muestran los resultados de los porcentajes a 4 y 24 h con respecto al control. Se aprecia que a las 4 h de cultivo celular existe un comportamiento similar de los andamios nanofibrilares de PLA y de los composites PLA/HA cuando se comparan con el control. Por otro lado; a las 24 h de cultivo celular se observa claramente que la tendencia que mostró el grupo de andamios nanofibrilares composites de PLA/HA (6, 7, y 10%) se incrementa, lo cual se traduce en una mejor respuesta de adhesión o interacción celular que puede atribuirse a la presencia de la biocerámica de hidroxiapatita. El análisis estadístico indica una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.1$ en la respuesta de adhesión celular entre el grupo de andamios de PLA/HA (6, y 7%) y el control, obteniéndose así una adhesión de 180 y 138% respectivamente comparado con el control que fue tomado como 100%.

VIABILIDAD CELULAR

Una buena respuesta de adhesión celular es indicativo que el material no afecta biológicamente

a las BM-MSC. Para corroborar esto; se evaluó la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT cuantificándose la absorbancia a 570nm en los grupos experimentales (nanofibras composites de PLA/HA) y controles (nanofibras de PLA). Los andamios de PLA y PLA/HA al 6% mostraron una respuesta de viabilidad similar en el tiempo experimental de cultivo. Sin embargo; se puede observar una mejor respuesta de viabilidad en los andamios composites del 7 y 10 % de PLA/HA cuando se comparan con los controles hilados de PLA al 7 y 10% a los 3, 5, y 7 días de cultivo celular (figura 2). Al comparar dicha respuesta se aprecia una mayor viabilidad celular en los andamios nanofibrilares composite la cual disminuye en los valores de absorbancia del MTT a los 10 días en todos los grupos. Esto es posible explicarlo ya que se llega al periodo de confluencia celular y que las células troncales BM-MSC en presencia de la biocerámica de hidroxiapatita comienzan a sufrir un proceso de diferenciación hacia el linaje osteoblástico, debido al carácter osteogénica de la hidroxiapatita.

INTERACCIÓN CÉLULA-MATERIAL

En la figura 3 se muestra la interacción de las células BM-MSC sobre los andamios composite nanofibrilares de PLA/HA (A-6%, B-7%, y C-10%). Las imágenes nos indican que las células fueron capaces de colonizar y extenderse sobre la superficie de los andamios nanofibrilares y también fueron capaces de penetrar en el interior de la malla fibrilar de los andamios. Las células BM-MSC cultivadas sobre los andamios composites de PLA/HA (6, 7, y 10%) mostraron una mayor adhesión celular por área en comparación con los cultivados en los andamios nanofibrilares solo de PLA. Este resultado de las microfotografías de la interacción célula-material comprueba los resultados obtenidos en la respuesta de adhesión en la figura 1; donde los andamios con la mejor respuestas son los dopados con la biocerámica

de HA. Por otra parte, se aprecian algunos puntos de adhesión como filopodios o pseudópodos de las células BM-MSc al estar en contacto directo con

las morfologías nanofibrilares de los andamios lo cual se traduce en un sensado por parte de las células de la superficie del andamio.

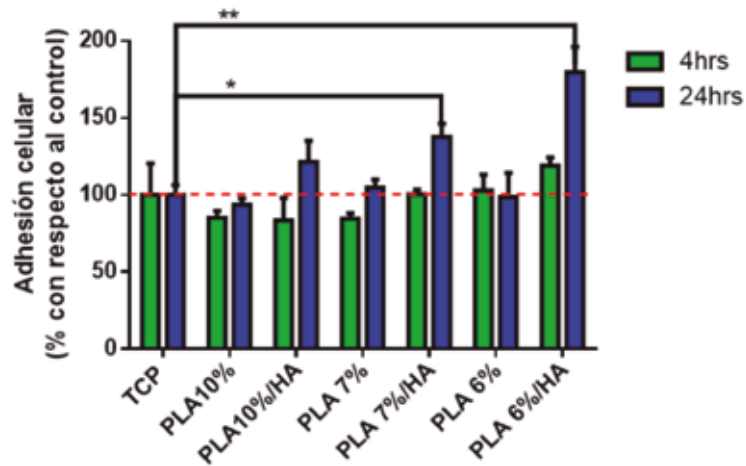


Figura 1. Gráfica de porcentaje de adhesión celular de las células BM-MSc evaluada a las 4 y 24 h post-siembra en los andamios nanofibrilares de PLA y composites nanofibrilares de PLA/HA; considerando a la placa de cultivo celular como el 100 por ciento de adhesión.

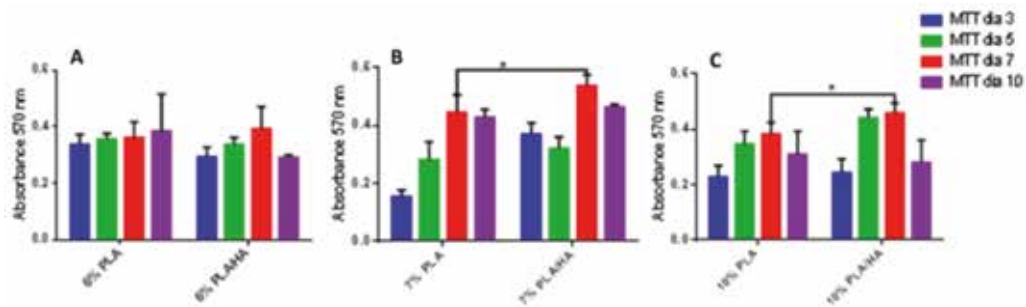


Figura 2. Gráficas de viabilidad celular de las células BM-MSc sembrada sobre los andamios nanofibrilares de PLA y composites nanofibrilares de PLA/HA a las diferentes concentraciones de 6% (A), 7% (B) y 10% (C) evaluadas por el ensayo de MTT a los 3, 5, 7, y 10 días de cultivo celular.

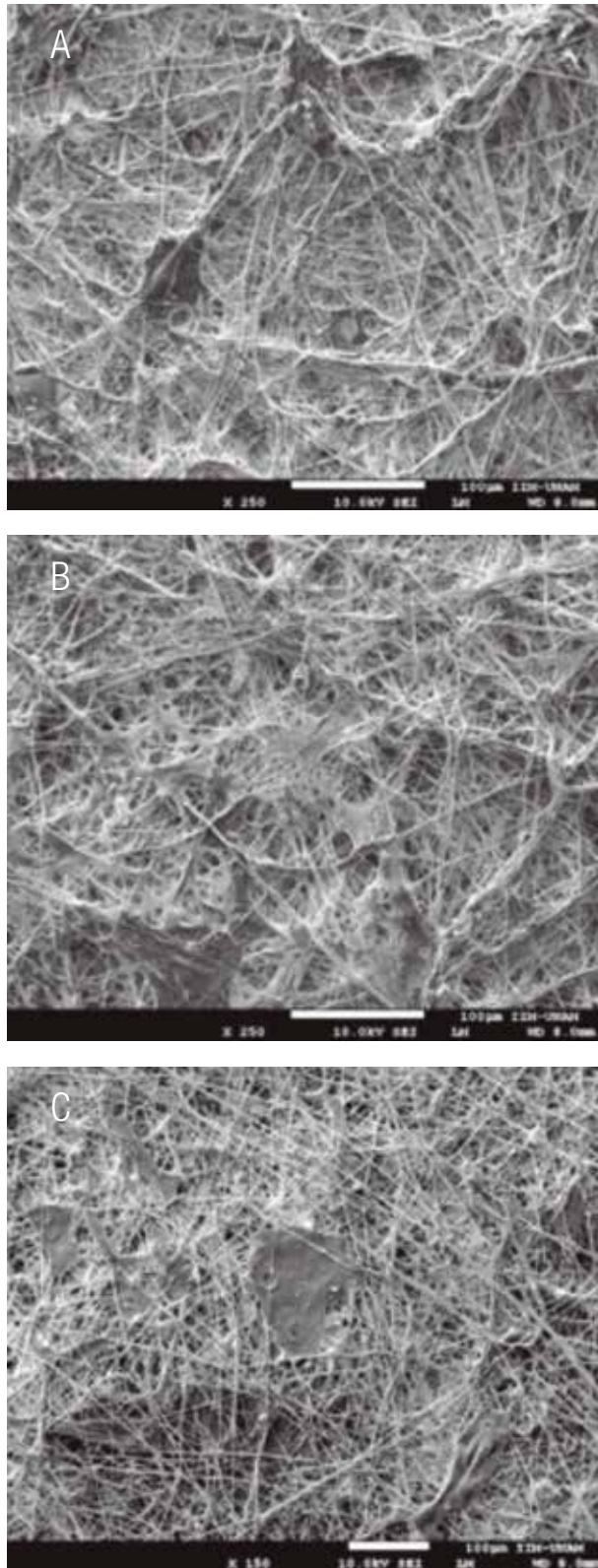


Figura 3. Micrografías de SEM representativas de la interacción célula-material de las células BM-MSC sembradas en los andamios nanofibrilares composite de PLA/HA (A-6%, B-7% y C-10%) a las 24h de cultivo celular. Se aprecia la organización del citoesqueleto celular de las células BM-MSC adheridas en las superficies nanofibrilares y la interconexión que existe entre ellas.

DISCUSIÓN

La biocompatibilidad del PLA ha sido probada desde los años 70. Este material ha sido aprobado por la FDA para su contacto con fluidos biológicos humanos (3, 17, 18, 23). Por otra parte la HA ha sido ampliamente estudiada por su biocompatibilidad y potencial osteogénico que la ha llevado a ser utilizada como un material para injertos en defectos óseos. Al combinar estos dos materiales en forma de un andamio nanofibrilar composite se mezclan las propiedades de ambos materiales potenciando su uso en la ingeniería de tejidos (17). Debido a las características como forma y carga eléctrica, se esperaba que las nanofibras composites de PLA/HA tuvieran una mayor interacción con la membrana celular comparadas con los andamios de PLA. Además; la química superficial y la topografía que brinda el composite en cuanto al cambio de rugosidad y textura de las nanofibras incrementan la respuesta de adhesión celular. Asimismo; la presencia de la nanocerámica de HA influye directamente en la viabilidad celular y en la preservación de la biocompatibilidad para el PLA aumentando la respuesta biológica (22-24).

Durante los ensayos de viabilidad celular, se encuentra una disminución en los valores de absorbancia en el ensayo de MTT a los 10 días en ambos grupos. Es posible explicar esta disminución ya que aparentemente dentro de este rango de tiempo se los cultivos celulares llega a un estadio de confluencia celular del 90 al 100% y/o por la posible señalización del cambio fenotípico hacia pre-osteoblastos. Esto también podría estar influenciado por una modificación celular del crecimiento por contacto célula-célula, célula-material; que induce una señalización; lo cual podría llevar a una diferenciación celular conducida por la presencia de la biocerámica (25). La presencia de los cristales de HA, se ha reportado tienen un potencial osteoinductor (26) y osteoconductor (27); sin embargo, en

esta etapa de la investigación estamos lejos de poder demostrarlo, ya que se necesitaría llevar a cabo más estudios en cuanto al poder bioactivo del andamio nanofibrilar de PLA/HA. La cual puede interpretarse como una nueva línea de investigación en el campo de la biomineralización celular (29, 30).

Durante la etapa de evaluación de la interacción célula-material encontramos la formación de puntos específicos de adhesión entre las células BM-MSC y las nanofibras, lo cual lo podemos interpretar como una respuesta biológica a la topografía y diámetro de la malla fibrilar (31). Estos datos están en concordancia con los resultados de adhesión celular donde encontramos que la respuesta se ve aumentada a las 24 h de cultivo celular. Esta respuesta es importante ya que se propone que todo biomaterial debe proporcionar un ambiente adecuado para que se lleve a cabo la adherencia celular para posteriormente las células puedan proliferar (32). Asimismo estos estudios de biocompatibilidad preliminar nos indican que los andamios composites de PLA/HA y del PLA mismo no tienen una citotoxicidad en el modelo utilizado.

Por otro lado; una posible aplicación de la fabricación de andamios nanofibrilares composites de PLA/HA por medio de la técnica de AJS en el campo odontológico es primeramente que debido a su potencial biocompatible y osteo- (inductor-conductor) se puedan diseñar estrategias para guiar el crecimiento del hueso en la superficie de estos para favorecer los aumentos de reborde alveolar en procesos quirúrgicos (33). Además, debido a que son membranas de fácil manipulación podría favorecerse la ingeniería tisular guiada que en combinación con la naturaleza osteoconductiva de la nanocerámica de HA incorporada podría facilitarse el crecimiento óseo en terapias de regeneración (30, 33). Aunado a que el tamaño de los poros que presentan las nanofibras puede ser ventajoso para minimizar la infiltración de los

fibroblastos, y por lo tanto una reducción de la extensión de formación de tejido fibroso. Por último, en la aplicación clínica, los sustratos nanofibrilares desarrollados para el presente documento pueden llevar a cubrir lesiones óseas y el medio ambiente osteoinductivo y osteoconductor creado por los sustratos podría ser eficaz para la curación y regeneración del tejido mineralizado.

CONCLUSIONES

Los andamios nanofibrilares de PLA/HA aumentan la respuesta de biocompatibilidad debido a la presencia de los cristales de HA.

La topografía a manera de nanofibras resulta en una superficie biológicamente más atractiva para los procesos de adhesión y proliferación celular para las células BM-MSc.

No se encontraron respuestas citotóxicas en los andamios sintetizados por la técnica AJS por los solventes utilizados.

Sin embargo; se requiere de más estudios para evaluar su aplicación hacia tejidos mineralizados analizando el potencial de bioactividad de los andamios en modelos de biomineralización celular *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento al estudio por parte de DGAPA-UNAM: proyecto PAPIIT IN210815. NVB agradece el apoyo de la beca posdoctoral por parte de la DGAPA-UNAM. Los autores agradecen al Dr. Omar Novelo Peralta del Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica (LUME-UNAM) del Instituto de Investigaciones en Materiales, por su valiosa ayuda técnica en el análisis de las muestras poliméricas en la interacción célula material.

REFERENCIAS

1. Vallet-Regí M. "Ceramics for medical applications. Perspective Article". *Journal of the Chemical Society, Dalton Transaction* 2001; 2: 97-108.
2. *Handbook of biomaterial properties*. Ed By J. Black and G. Hasting, Chapman and Hall. 1998.
3. <http://europa.eu.int/comm/research/growth/gcc/projects/in-action-biomat03.html>
4. Vallet-Regí M., González-Calbet J. "Calcium phosphates in the substitution of bone tissue". *Progress in Solid State Chemistry* 2004; 32 (1): 1-31.
5. Vallet-Regí M., Ragel C. V., Salinas A. J. "Glasses with medical applications". *European Journal of Inorganic Chemistry* 2003; 6: 1029-1042.
6. Zhang F., Chang J., Lu J., Lin K., Ning C. "Bioinspired structure of bioceramics for bone regeneration in load-bearing sites". *Acta Biomaterialia* 2007; 3 (6): 896-904.
7. Huang Z. M., Zhang Y. Z., Kotaki M., Ramakrishna S. "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites". *Composites Science and Technology* 2003; 63 (15): 2223-2253.
8. Cabañas M. V., Vallet-Regí M. "Calcium phosphate coatings deposited by aerosol chemical vapour deposition". *Journal of Materials Chemistry* 2003; 3: 1104-1107.
9. Vallet-Regí M., Román J., Padilla S., Doadrio J. C., Gil F. J. "Bioactivity and mechanical properties of SiO₂-CaO-P₂O₅ glass-ceramics". *Journal of Materials Chemistry* 2005; 15: 1353-1359.
10. Frayssinet P., Gineste L., Conte P., Fages J., Rouquet N. "Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement". *Biomaterials* 1998; 19(11-12), 971-977.

11. Kim H. M. "Bioactive ceramics: Challenges and perspectives". *Journal of the Ceramic Society of Japan* 2001; 109 (4): 49-57.
12. Greenspan D.C. "Bioactive ceramic implant materials". *Current Opinion in Solid State & Materials Science* 1999; 4 (4): 389-393.
13. Rámila A., Padilla S., Muñoz B., Vallet-Regí M. "A new hydroxyapatite/glass biphasic materials: in vitro bioactivity". *Chemistry of Materials* 2002; 14: 2439-2443.
14. Vallet-Regí M., Rámila A., Padilla S., Muñoz B. "Bioactive glasses as accelerators of the apatites bioactivity". *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003; 66: 580-585.
15. Bouler J. M., Legeros R. Z., Daculsi G. "Biphasic calcium phosphates: influence of three síntesis parameters on the HA/beta TCP ratio". *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2000; 51 (4): 680-684.
16. Vallet-Regí M., Salinas A. J., Ramírez-Castellanos J., González-Calbet J. M. "Nanostructure of bioactive sol-gel glasses and organic-inorganic hybrids". *Chemistry of Materials* 2005; 17, 1874-1879.
17. Doshi J., Reneker D. H. "Electrospinning process and application of electro-spun fibers". *Electrostatics* 1995; 35: 151-160.
18. Reneker D. H., Chun I. "Nanometre diameter fibres of polymer produced by electrospinning". *Nanotechnology* 1996; 7 (3): 216-223.
19. Subbiah T., Bhat G. S., Tock R. W., Parameswaran S., Ramkumar S. S. "Electrospinning of Nanofibers". *Journal of Applied Polymer Science* 2005; 96(2): 557-569.
20. Hohman M. M., Shin M., Rutledge G., Brenner M. P. "Electrospinning and electrically forced jets. Stability theory". *Physics of Fluids* 2001; 13 (8): 2201-2220.
21. Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W. E., Yong T., Ma Z., Ramaseshan R. "Electrospun nanofibers: solving global issues". *Materials Today* 2006; 9 (3): 40-50.
22. Xiao L., Wang B., Yang G., Gauthier M. "Poly (Lactic Acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications". *Biomedical Science, Engineering and Technology, Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.), ISBN: 978-953-307-471-9; 2012.*
23. Taddei P., Di Foggia M., Causa F., Ambrosio L., Fagnano C. "In vitro bioactivity of poly(ϵ -caprolactone)-apatite (PCL-AP) scaffolds for bone tissue engineering: the influence of the PCL/AP ratio". *The International journal of Artificial Organs* 2006; 29: 719-725.
24. Zhang P., Hong Z., Yu T., Chen X., Jing X. "In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide)". *Biomaterials* 2009; 30 (1): 58-70.
25. Danoux C. B., Barbieri D., Yuan H., de Bruijn J. D., van Blitterswijk C. A., Habibovic P. "In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration". *Biomatter* 2014; 4:e27664. doi: 10.4161/biom.27664.
26. Jing W., Zhang M., Jin L., Zhao J., Gao Q., Ren M., Fan Q. "Assessment of osteoinduction using a porous hydroxyapatite coating prepared by micro-arc oxidation on a new titanium alloy". *International Journal of Surgery*. 2015; 24:51-56.
27. Chang B. S., Lee C. K., Hong K. S., Youn H. J., Ryu H. S., Chung S. S., Park K. W. "Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations". *Biomaterials* 2000; 21 (12): 1291-1298.

28. Woo K. M., Chen V. J., Ma P. X. "Nanofibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment". *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003; 67 (2): 531-537.
29. Smith L. A., Liu X., Hu J., Ma X. "The influence of three-dimensional nanofibrous scaffolds on the osteogenic differentiation of embryonic stem cells". *Biomaterials* 2009; 30 (13): 2516-2522.
30. Gupta K. CH., Haider A., Choi Y., Kang I. "Nanofibrous scaffolds in biomedical applications". *Biomaterials Research* 2014; 18 (5): 1-11.
31. Persson M., Lorite G. S., Kokkonen H. E., Cho S. W., Lehenkari P. P., Skrifvars M., Tuukkanen J. "Effect of bioactive extruded PLA/HA composite films on focal adhesion formation of preosteoblastic cells". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014; 121:409-16.
32. Washburn N. R., Yamada, K. M., Simon C. G., Kennedy S. B., Amis E. J. High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation. *Biomaterials* 2004; 25 (7-8): 1215-24.
33. Jeong S. I., Ko E. K., Yum J., Jung Ch. H., Lee Y. M., Shin H. "Nanofibrous Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Guided Tissue Regeneration". *Macromolecular Bioscience* 2008; 8:328-338.



Attribution (BY-NC) - (BY) You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggest the licensor endorses you or your use. (NC) You may not use the material for commercial purposes.