



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

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

Tesis:

**“Fabricación y caracterización de andamios compuestos de
PLA/nMg/nHA (85/10/5 wt%)”**

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

P R E S E N T A:

Químico Farmacobiólogo
Héctor Saucedo Martínez

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



Morelia, Michoacán,
México, Junio
2018

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

Químico Farmacobiólogo
Héctor Saucedo Martínez

Doctor en Investigación Biomédica Básica
Marco Aurelio Pardo Galván
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencias (Biología)
Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

PhD
Virginia Angélica Robinson Fuentes
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencias Químico Biológicas
Martha Eva Viveros Sandoval
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Esta tesis fue realizada en el programa de posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
acreditado en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad – CONACYT
como programa Consolidado

El autor de esta tesis, estudiante de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez” de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
agradece al CONACyT la beca que le fue otorgada
para la realización de la
Maestría en Ciencias de la Salud.

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

Laboratorio de Biología Celular Humana

TABLA DE ABREVIATURAS

ALP	Fosfatasa alcalina
BCP	Fosfato de calcio bifásico
β-TCP	Beta- fosfato tricálcico
CaP	Fosfato de calcio
CHA	Colágeno-hidroxiapatita
CO₂	Dióxido de carbono
Cr-Co	Cromo-cobalto
EDS	Espectroscopia de energía dispersa
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Food and drug administration
HA	Hidroxiapatita
HCA	Apatita hidroxicarbonato
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MEM	Medio mínimo esencial
Mg-NPs	Nanopartículas de magnesio
nHA	Nano hidroxiapatita
nMg	Nano magnesio
PCL	Policaprolactona
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
SBF	Fluido corporal simulado
TA	Temperatura ambiente
TCP	Fosfato tricálcico
w/w	Peso/peso
3D	Tridimensional

ÍNDICE

1.	RESUMEN	5
2.	ABSTRACT	6
3.	INTRODUCCIÓN	7
4.	MARCO TEÓRICO	8
4.1	Ingeniería de tejido óseo	8
4.2	Andamios	9
4.3	Biomateriales utilizados en bioingeniería de tejidos	10
4.4	Biocerámicas	11
4.5	Materiales poliméricos	12
4.6	Biocompositos	13
4.7	Andamios de tercera generación	14
4.8	Andamios con magnesio	14
4.9	Andamios en la actualidad	15
5.	JUSTIFICACIÓN	17
6.	HIPÓTESIS	18
7.	OBJETIVOS	18
7.1	Objetivo general	18
7.2	Objetivos específicos	18
8.	MATERIALES	19
8.1	Andamios	19
8.2	Modelo acelular	19
8.3	Modelo celular	19
9.	MÉTODOS	20
9.1	Fabricación de las nanopartículas de magnesio	20
9.2	Fabricación de los andamios	20
9.3	Caracterización acelular de los andamios	21
9.4	Análisis de viabilidad, citotoxicidad, adhesión y proliferación celular de preosteoblastos	22
9.5	Análisis del proceso de diferenciación de preosteoblastos	24
10.	RESULTADOS	26
10.1	Fabricación de nanopartículas de magnesio	26
10.2	Fabricación de andamios	27
10.3	Evaluación de tamaño poro y composición de los andamios	27
10.4	Porosidad estimada	32
10.5	Bioactividad en SFB	33
10.6	Evaluación de hidrólisis y pH en agua	38
10.7	Evaluación de hidrólisis y pH en PBS	38
10.8	Evaluación de la adhesión	39
10.9	Evaluación de proliferación celular	40
10.10	Citotoxicidad de los productos de degradación	41
10.11	Determinación de formación de colágeno	42

10.12	Determinación de grado de mineralización	42
10.13	Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina	43
10.14	Análisis celular por microscopía electrónica de barrido	46
11.	RESUMEN DE RESULTADOS	50
12.	DISCUSIÓN	51
13.	CONCLUSIONES	57
14.	REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Fases de la reabsorción y formación de hueso nuevo	8
2.	Impresora 3D	15
3.	Tamaño y forma de las nanopartículas de Mg(OH) ₂ por MEB	26
4.	EDS de elementos que componen las nanopartículas de Mg(OH) ₂	26
5.	Andamio de cuatro composiciones diferentes	27
6.	Andamio de composición PLA/nMg/nHA	27
7.	Tamaño de poros por MEB x 100	28
8.	EDS de elementos que componen el andamio PLA/nMg/nHA	29
9.	EDS de elementos que componen el andamio PLA/nMg	29
10.	EDS de elementos que componen el andamio PLA/nHA	30
11.	EDS de elementos que componen el andamio PLA	30
12.	Mapping de los elementos que componen la superficie de andamio PLA/nMg/nHA	31
13.	Porosidad estimada con jPOR	32
14.	Bioactividad en SFB del andamio PLA	33
15.	Bioactividad en SFB del andamio PLA/nHA	34
16.	Bioactividad en SFB del andamio PLA/nMg	35
17.	Bioactividad en SFB del andamio PLA/nMg/nHA	36
18.	Medición de pH de los andamios sumergidos en agua	37
19.	Medición de pH de los andamios sumergidos en PBS	38
20.	Porcentaje de adhesión celular en cada andamio	39
21.	Proliferación celular en cada andamio	40
22.	Prueba de citotoxicidad	41
23.	Determinación de colágeno con picosirius	42
24.	Determinación de grado de mineralización con tinción de rojo de alizarina	43
25.	Curva estándar de proteína total determinada con Bradford	44
26.	Actividad alcalino fosfatasa normalizada con proteína total	45
27.	Adhesión y mineralización celular por MEB del andamio PLA	46
28.	Adhesión y mineralización celular por MEB del andamio PLA/nHA	47
29.	Adhesión y mineralización celular por MEB del andamio PLA/nMg	48
30.	Adhesión y mineralización celular por MEB del andamio PLA/nMg/nHA	49

ÍNDICE DE TABLAS

1.	Proporción en la distribución del tamaño del agente porógeno	21
2.	Tamaños de poros en los andamios	28
3.	Medición de pH de los andamios sumergidos en agua	37
4.	Medición de pH de los andamios sumergidos en agua	38
5.	Porcentaje de adhesión celular en cada andamio	39
6.	Prueba de citotoxicidad	41
7.	Proteína total de cada lisado celular	44
8.	Determinación de 4-MUP por fluorescencia	44

1. RESUMEN

Introducción: La fabricación de andamios de diversos biomateriales es un área de la ingeniería de tejidos que se presenta como una alternativa para terapias donde son necesarios los injertos de hueso, ya que éstos además de ser un reemplazo del hueso, buscan la regeneración ósea guiada. Para cumplir con lo anterior es necesario que el biomaterial empleado, aparte de ser un sustituto temporal del hueso, sea un compuesto capaz de reabsorberse y ser sustituido gradualmente con tejido óseo nuevo. En la actualidad existen varios biomateriales propuestos, entre ellos la hidroxiapatita, el ácido poliláctico y sus derivados, pero estos últimos al degradarse producen ácidos que pueden llegar a afectar la biocompatibilidad. Se ha propuesto la utilización de magnesio (Mg) en forma de nanopartículas de $Mg(OH)_2$ para evitar la acidificación del medio provocado por ácido poliláctico y como molécula altamente osteoinductora. **Objetivo General:** Evaluar la biodegradabilidad, biocompatibilidad, osteoinductividad y osteoconductividad *in vitro* de biomateriales de PLA/nMg/nHA diseñados como andamios de regeneración ósea. **Objetivos específicos:** 1. Fabricar andamios de PLA/nMg/nHA (85/10/5 wt%) y los controles de referencia. 2. Realizar la caracterización acelular de los andamios. 3. Realizar estudios de viabilidad, citotoxicidad, adhesión y proliferación celular de preosteoblastos expuestos a los andamios. 4. Analizar el proceso de diferenciación osteogénico de preosteoblastos expuestos a los andamios. **Materiales y Métodos:** Se fabricaron andamios PLA/nMg/nHA, PLA/nMg, PLA/nHA y PLA. Se estimó la porosidad por MEB. La evaluación de bioactividad se realizó en solución SFB y se observó la formación de HA. Se usó la línea celular MC3T3-E1 para la evaluación de la viabilidad y adhesión con un ensayo de azul de alamar. El proceso de diferenciación de la línea celular se evaluó cuantificando el grado de mineralización con una tinción de rojo de alizarina, la actividad de la alcalino fosfatasa por 4-MUP y la formación de colágena con una tinción de Rojo Sirius. **Resultados:** Se logró la fabricación de nanopartículas de $Mg(OH)_2$ con un tamaño de partícula <213 nm y sin la aparición de elementos contaminantes. Se fabricaron 50 andamios de cada una de las 4 mezclas. Los andamios PLA/nMg/nHA mostraron tener poros interconectados de 45-393 μm y una porosidad de 58.42%. Se observaron partículas de HA neoformada en solución SFB en los 4 tipos de andamio. Sólo para el andamio PLA/nMg/nHA sumergido en agua el pH se mantuvo entre 7 y 7.4, que es el similar al fisiológico. Ninguno de los productos de degradación fue citotóxico, ya que la viabilidad fue superior al 80%. La adhesión celular sobre el andamio PLA/nMg/nHA fue de 22.76% tras 4 h; se duplicó el cultivo tras 3 días y se mantuvo después de 5 días. Para el marcador de diferenciación de colágeno y para la mineralización de la matriz extracelular, el andamio PLA/nMg/nHA fue el único en mostrar una secuencia similar a la descrita en controles inducidos a diferenciación. Los andamios que contenían Mg presentaron mayor actividad de la alcalino fosfatasa. **Conclusión:** Los andamios con composición PLA/nMg/nHA (85/10/5 wt%) presentan una mejor biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoinducción y osteoconducción que los andamios que únicamente contienen PLA, PLA/nMg o PLA/nHA. Las nanopartículas de hidroxiapatita y de hidróxido de magnesio en el mismo andamio permiten la liberación más controlada del magnesio al ambiente donde es colocado el andamio.

Palabras clave: Regeneración ósea, preosteoblastos, magnesio, hidroxiapatita, ácido poliláctico

2. ABSTRACT

Introduction: The manufacture of scaffolds of various biomaterials is an area of tissue engineering that is presented as an alternative for therapies where bone grafts are necessary since these, besides being a bone replacement, seek guided bone regeneration. In order to comply with the above, it is necessary that the biomaterial used, in addition to being a temporary substitute for bone, is a compound capable of being reabsorbed and gradually replaced with new bone tissue. Currently, there are several proposed biomaterials, including hydroxyapatite, polylactic acid, and its derivatives, but the latter, when degraded, produce acids that can affect biocompatibility. The use of magnesium (Mg), in the form of $Mg(OH)_2$ nanoparticles, has been proposed to avoid the acidification of the medium provoked by polylactic acid and as a highly osteoinductive molecule. **General Objective:** To evaluate the biodegradability, biocompatibility, osteoinductivity, and *in vitro* osteoconductivity of PLA/nMg/nHA biomaterials designed as bone regeneration scaffolds. **Specific objectives:** 1. Manufacture scaffolds of PLA/ nMg/nHA (85/10/5 wt %) and the reference controls. 2. Perform the acellular characterization of the scaffolds. 3. Conduct viability, cytotoxicity, adhesion, and cell proliferation studies of preosteoblasts exposed to scaffolds. 4. Analyze the process of osteogenic differentiation of preosteoblasts exposed to scaffolds. **Materials and Methods:** PLA/nMg/nHA, PLA/nMg, PLA/nHA, and PLA scaffolds were manufactured. Porosity was estimated by SEM. The evaluation of bioactivity was performed in SFB and the formation of HA was observed. The MC3T3-E1 cell line was used for evaluation of viability and adhesion with an Alamar Blue assay. The differentiation process of the cell line was evaluated by quantifying the grade of mineralization with an alizarin red stain, the activity of alkaline phosphatase by 4-MUP, and the formation of collagen with a Red Sirius stain. **Results:** The production of $Mg(OH)_2$ nanoparticles with a particle size <213 nm and without the appearance of contaminants was achieved. Fifty scaffolds of each of the 4 mixtures were manufactured. PLA/nMg/nHA scaffolds showed interconnected pores of 45-393 μ m and a porosity of 58.42%. Newly formed HA particles were observed in SFB solution in the 4 types of scaffolds. Only for the PLA/nMg/nHA scaffold submerged in water maintained the pH between 7 and 7.4, which is similar to the physiological pH. None of the degradation products were cytotoxic, since the viability was greater than 80%. Cell adhesion on the PLA/nMg /nHA scaffold was 22.76% after 4h; the culture was doubled after 3 days and maintained after 5 days. For the collagen differentiation marker and for extracellular matrix mineralization, the PLA/nMg/nHA scaffold was the only one to show a sequence similar to that described in control cultures induced to differentiation. The scaffolds that contained Mg showed greater activity of alkaline phosphatase. **Conclusion:** Scaffolds with PLA/nMg/nHA composition (85/10/5 wt%) have better biocompatibility, biodegradability, osteoinduction, and osteoconduction than scaffolds that only contain PLA, PLA/nMg or PLA/nHA. The nanoparticles of hydroxyapatite and magnesium hydroxide in the same scaffold allow for more controlled release of the magnesium to the environment where the scaffold is placed.

Key words: Bone regeneration, preosteoblasts, magnesium, hydroxyapatite, polylactic acid

3. INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción. Este fenómeno equilibrado, denominado proceso de remodelado, permite la renovación de un 5-15 % del hueso total al año en condiciones normales. A partir de los 50 años de edad existe un predominio de la reabsorción y la masa ósea empieza a disminuir (Fernández-Tresguerres y col., 2006a). La osteoporosis y la osteopenia son enfermedades sistémicas, metabólicas y multifactoriales, caracterizadas por masa ósea baja y deterioro microarquitectónico del hueso, con un consecuente aumento de la fragilidad ósea y susceptibilidad a las fracturas. Las terapias actuales de tratamiento, que consisten en el uso de prótesis y en la aplicación de injertos, presentan dificultades que limitan su uso (Alvarez, 2009).

La fabricación de andamios de diversos biomateriales es un área de la ingeniería de tejidos que se presenta como una alternativa viable para la terapia de sustitución de hueso en padecimientos como la osteoporosis y la osteopenia, así como para otro tipo de terapias donde sea necesario el injerto de hueso. Estos andamios, además de ser un remplazo del hueso, favorecen la regeneración ósea guiada. Para cumplir con lo anterior, es necesario que el biomaterial sea un sustituto temporal del hueso, es decir, de un compuesto capaz de reabsorberse y ser sustituido gradualmente con tejido óseo nuevo (Allo y col., 2012).

En la actualidad existen varios biomateriales propuestos para su utilización como andamios, entre ellos la hidroxiapatita, el ácido poliláctico y sus derivados, pero estos últimos al degradarse producen productos ácidos que pueden llegar a ser citotóxicos. Para evitar el daño por el cambio de pH, se ha propuesto la utilización de magnesio en forma de nanopartículas de hidróxido de magnesio para regular la acidez; además, la incorporación de estas nanopartículas en algunos materiales ha demostrado mejorar las propiedades mecánicas y de osteoinducción (Lee y col., 2014).

Para este trabajo se propone la fabricación y caracterización de un andamio de un compuesto diseñado a partir de ácido poliláctico como soporte, hidroxiapatita como fase bioactiva que actúa como elemento nucleante de la colonización celular, y nanopartículas de hidróxido de magnesio para regular el ambiente ácido generado por la hidrólisis del ácido poliláctico, además de mejorar las propiedades de osteoinducción.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Ingeniería de tejido óseo

El hueso, el componente central del sistema musculo-esquelético, es un tejido conectivo duro calcificado que tiene como funciones proteger órganos vitales, proveer soporte para la movilidad del cuerpo, y almacenar calcio y otros iones, al igual que células madres mesenquimales y hematopoyéticas. Es prácticamente el único tejido (a excepción del embrionario) en constante renovación y que posee íntegra su capacidad de regenerarse. Sin embargo, dependiendo del tipo de defecto y de los factores causales de las lesiones óseas, existen situaciones en las cuales la regeneración ósea puede verse truncada y es necesario utilizar técnicas que estimulen una correcta reposición del tejido. Esta constante renovación ósea, caracterizada por una homeostasis entre la reabsorción y aposición ósea, renueva de un 5-10% del hueso total al año (Fernández-Tresguerres y col., 2006a).

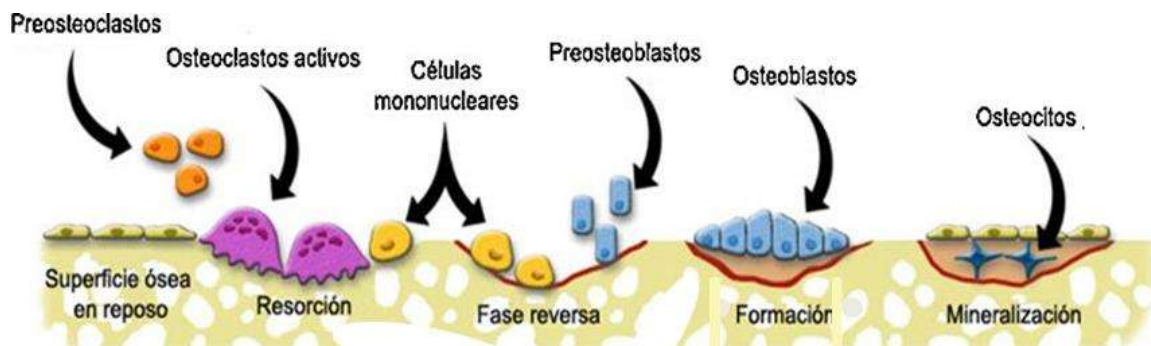


Figura 1. Fases de la reabsorción y formación de hueso nuevo.

La formación de hueso nuevo consiste en cuatro fases principales, la reabsorción de la matriz mineral por los osteoclastos, la fase reversa donde se reclutan los preosteoblastos, la fase de formación donde maduran los preosteoblastos a osteoblastos capaces de secretar sustancia nueva y, por último, la fase de mineralización donde los osteoblastos maduran a osteocitos y pasan a formar parte de la estructura del hueso (Mellibovsky y Díez, 2006) (Figura 1).

La “ingeniería de tejidos”, tanto su definición como el uso del término, apareció en la literatura en el año de 1988 por Skalak y Fox y desde ese entonces ha atraído la atención de la ciencia, la ingeniería y la medicina (Wang, 2007). La ingeniería de tejidos tiene como objetivo eliminar las desventajas o problemas que presentan las terapias de reparación y

regeneración de tejidos que se utilizan actualmente (Thavornyutikarn y col., 2014). El interés de las nuevas tecnologías biológicas, como la ingeniería de tejidos, es la regeneración de tejidos, que implica la restitución íntegra del tejido dañado; a diferencia de la reparación donde se forma un tejido cicatricial con características diferentes al original (Larena-Pellejero, 2007).

Actualmente, la necesidad de implantes óseos está en aumento, con más de 400,000 operaciones con injerto óseo realizadas anualmente en Europa y más de 600,000 en Estados Unidos (Wu y col., 2014). En México, los cambios demográficos indican que la cantidad anual de fracturas de cadera aumentará de 29,732 en 2005 a 155,874 en el 2050 (Carlos y col., 2013). En general, un proceso de ingeniería de tejidos comienza con la fabricación de un andamio compatible biológicamente, que apoyará a las células vivas para su adhesión, proliferación y diferenciación, para entonces promover la regeneración tisular (Thavornyutikarn y col., 2014).

4.2 Andamios

El andamio es una matriz tridimensional porosa que tiene como función principal la de soportar la adhesión, proliferación y migración celular, así como su diferenciación y maduración en un fenotipo osteoblástico (Alvarez, 2009). Para la regeneración ósea, los biomateriales deben cumplir con ciertos requisitos dependientes de su geometría, composición química y propiedades mecánicas óptimas para que la viabilidad, proliferación y regeneración celular sean posibles (Thavornyutikarn y col., 2014). En base a ello, al momento de diseñar un andamio tridimensional se debe considerar que éste cumpla con ciertos criterios ideales tales como:

- *Biocompatibilidad*: capacidad de integrarse al organismo hospedero sin que haya efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmune.
- *Biodegradabilidad*: habilidad para degradarse mediante hidrólisis, a tasas que sean cercanas a las tasas de formación de hueso nuevo. Los productos de la degradación no deben ser tóxicos.
- *Resistencia y compatibilidad mecánica*: resistir cargas mecánicas según sea la posición del tejido óseo que reemplaza. Las propiedades mecánicas como el módulo

de elasticidad, la resistencia a la tracción, a la fractura, a la fatiga y el porcentaje de elongación, entre otros, deben ser lo más parecidas a las del tejido que se reemplaza (compatibilidad mecánica) para evitar la osteopenia, misma que se asocia al uso de implantes óseos (O'Brien, 2011).

- *Osteoinductividad*: habilidad de inducir la formación de hueso nuevo a través de estímulos mecánicos o biomoleculares, reclutando células progenitoras y permitiendo la diferenciación en un fenotipo controlado o linajes particulares.
- *Osteoconductividad*: actuar como soporte estructural en la formación y crecimiento de nuevo hueso. Esta propiedad se combina con la biodegradabilidad, pues el material del implante, que inicialmente ayudó como soporte, debe ser reabsorbido para dar espacio al nuevo tejido.
- *Biofuncionalidad*: el diseño del implante debe cumplir con la función biológica para la que se creó, restaurando las funciones del tejido reemplazado; se asocia directamente a la forma, el lugar donde se implanta, el método de implante, las condiciones de la cirugía y el tiempo de implantación.
- *Alta porosidad y un tamaño de poro adecuado*: para facilitar la implantación, difusión celular a través de toda la nanoestructura y favorecer la vascularización. El tamaño del poro afecta los procesos de velocidad de migración celular, de difusión de nutrientes y de evacuación de desechos del metabolismo celular (Mallick y col., 2015).
- *Fabricación*: de fácil y reproducible procesado, modificable y esterilizable, para obtener distintas configuraciones en atención al tipo y tamaño del defecto óseo.
- *Bajo costo*: que sea asequible para cualquier interesado (Velasco y col., 2015).

4.3 Biomateriales utilizados en bioingeniería de tejidos

En la actualidad existen una gran variedad de materiales utilizados en la fabricación de andamios, cada uno con ventajas distintas, pero todas encaminadas a que tengan características mecánicas que soporten la carga a la que son sometidos, una buena compatibilidad en condiciones fisiológicas y, en recientes años, que además sean un buen soporte para la regeneración del tejido óseo (Thavornnyutikarn y col., 2014). Entre los

biomateriales utilizados se encuentran las biocerámicas, los polímeros sintéticos, los polímeros naturales y los compositos.

4.4 Biocerámicas

Las cerámicas son componentes no metálicos con estructura cristalina que tienen un alto nivel de fuerza y son utilizadas comúnmente en la ingeniería de tejidos debido a su buena biocompatibilidad (Murphy y col. 2013). Sin embargo, las cerámicas tienen una baja resistencia a la fractura (alta fragilidad). Son de interés clínico una amplia variedad de materiales inorgánicos bioactivos que son similares, en composición, a la fase mineral del hueso, los fosfatos de calcio, como el fosfato tricálcico y la hidroxiapatita, los vidrios bioactivos y sus combinaciones (Stevens, 2008).

Fosfatos de calcio: Las cerámicas más frecuentemente utilizadas son el fosfato de calcio (CaP), la hidroxiapatita (HA), el beta fosfato tricálcico (β -TCP) o la mezcla de HA y β -TCP, conocida como fosfato de calcio bifásico (BCP) (Murphy y col., 2013). Éstos han sido investigados para aplicaciones biomédicas como la elaboración de andamios porosos (Bose y col., 2012). Tienen una excelente biocompatibilidad, la cual es atribuible a su similitud estructural con la fase mineral del hueso (Murphy y col., 2013). Están caracterizados por su bioactividad, por su habilidad para unirse directamente al tejido óseo circundante, por su osteoconductividad y su habilidad para soportar la adhesión, proliferación y diferenciación de células osteoblásticas tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, las cerámicas son materiales frágiles y tienen un índice de degradación lento en el cuerpo, pudiendo persistir durante meses e incluso años, lo cual los limita para su utilización en aplicaciones de regeneración ósea (Murphy y col., 2013). La HA tiene propiedades mecánicas poco satisfactorias; comparadas con el hueso humano, la fuerza de compresión es mucho más alta, sin embargo, falla tanto en la resistencia a la tensión como a la fractura. Por lo que, el uso solo de fosfatos de calcio se limita a sitios sin carga, a pesar de su buena biocompatibilidad y osteoconductividad (Thavornnyutikarn y col., 2014).

4.5 Materiales poliméricos

Los biopolímeros tanto sintéticos como naturales han sido ampliamente utilizados en la fabricación de dispositivos médicos y de andamios en la ingeniería de tejidos debido a su excelente biocompatibilidad, composición química modificable y biodegradación ajustable; además, apoyan el crecimiento y la remodelación del tejido durante su tiempo de vida funcional y antes de ser reabsorbido por el cuerpo. Sin embargo, el inconveniente de éstos es su fuerza mecánica inestable que los hace inapropiados para utilizarse como andamios que soporten carga (Wu y col., 2014).

Biopolímeros sintéticos: Los polímeros sintéticos, además de ser biocompatibles y biodegradables, presentan un ritmo de degradación controlable, propiedades mecánicas reproducibles y una fácil fabricación con formas moldeables y en los tamaños requeridos, con características y porosidades diferentes, así como una larga vida útil y pueden ser esterilizados (Stevens, 2008). Estos polímeros han sido aprobados por la FDA para su uso en aplicaciones clínicas específicas como dispositivos médicos, suturas, materiales para prótesis, materiales dentales, implantes, polímeros para liberación controlada de fármacos, tejidos y encapsulantes (Murphy y col., 2013). Sin embargo, la mayor desventaja que presentan muchos de los polímeros sintéticos es la liberación de productos ácidos que pueden alterar el pH del tejido circundante, causando reacciones inflamatorias al erosionarse. Así mismo, presentan incompatibilidad mecánica e incapacidad para integrarse al tejido hospedero (Murphy y col., 2013). Dentro de los polímeros sintéticos utilizados en la ingeniería de tejidos se encuentran los poliésteres, y de los más utilizados son el ácido láctico y el ácido glicólico. Estos materiales pueden ser degradados en productos metabólicos naturales mediante hidrólisis. Estos poliésteres y sus copolímeros han sido ampliamente investigados. El ácido poliláctico (PLA) fue el primer poliéster estudiado para la aplicación en la ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Debido a su habilidad de promover el crecimiento de osteoblastos y mantener su fenotipo, ha sido utilizado como implante a largo plazo en el campo de la ingeniería de tejidos (Murphy y col., 2013).

4.6 Biocompositos

En un intento por incrementar tanto las propiedades mecánicas como las biológicas de los andamios, para imitar el hueso natural, se han estudiado compositos de polímero y cerámica, denominados materiales biocompositos debido a que éstos tienen la fuerza necesaria que coincide con las propiedades del hueso, que incluyen bajo módulo elástico y una alta resistencia (Wu y col., 2014). En este contexto, los biomateriales inorgánicos, tales como cerámicas y vidrios, así como los sistemas orgánicos, tales como polímeros biodegradables, intentan imitar la composición ósea real al combinar la resistencia de la fase polimérica con la fuerza compresiva de la fase inorgánica, generando así materiales con buena resistencia mecánica, con perfiles de degradación mejorados, osteoconductivos, osteoinductivos y moldeables. La adición de cerámica al polímero no sólo contrarresta la pobre bioactividad de los polímeros, también regula los productos ácidos de degradación (Thavornnyutikarn y col., 2014); la alcalinidad del relleno inorgánico neutraliza la degradación ácida de los polímeros como el PLA (Stevens, 2008). Los andamios compuestos de polímero/biovidrio han mostrado ser prometedores en la regeneración ósea guiada (ROG): un nanocompuesto de colágeno y biovidrio mostró mineralización temprana dentro de los 3 días de inmersión en fluido corporal simulado (SBF), junto con el aumento de la expresión de ALP después de 21 días de cultivo (Bose y col., 2012). Así mismo, se han realizado combinaciones de tres materiales, dos polímeros, para mejorar las propiedades entre ellos, y una cerámica, HA. Rui Fang y colaboradores, en el 2010, diseñaron un composito de estas características, con la combinación de PCL/PLA/HA a diferentes concentraciones de HA mediante la técnica de electrohilado, en el cual concluyeron mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB), que las nanofibras obtenidas son de una estructura porosa y que se mejoró la rugosidad de la superficie de los polímeros lisos y la baja cristalinidad (Fang y col., 2010). Otro estudio realizado en el 2012 con estos biomateriales mostró que a mayor porcentaje de hidroxiapatita se observa una mayor porosidad y biodegradabilidad, y una menor hidrofobicidad (Liao y col., 2012).

4.7 Andamios de tercera generación

En la actualidad el objetivo de los nuevos biomateriales es desarrollar compuestos que estimulen respuestas celulares específicas a nivel molecular donde los procesos de degradación del andamio generen compuestos que estimulen la bioactividad; que sean osteoinductivos. Esta propiedad está asociada con la composición del material y la porosidad. Así, esta generación de andamios incluye la elaboración de nanomateriales compuestos con el fin de simular la matriz extracelular del hueso y con la posibilidad de utilizar el propio andamio como un sistema de administración de biomoléculas o fármacos (Cattalini y col., 2013). Los materiales mayormente utilizados en esta generación son polímeros biodegradables de origen natural o sintético como poli(α -hidroxiésteres), colágeno, ácido hialurónico y quitosano; cerámicos como vidrios de silicato, cerámicos vidriosos, alúmina, zirconia, hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio; metales como el titano, acero inoxidable, aleaciones Cr-Co y nanopartículas de Mg (Mg-NPs); además de una gran variedad de compositos, por ejemplo: ácido hialurónico/colágeno, biovidrio/hidroxiapatita, ácido poliláctico/ácido poliglicólico, zirconia/biovidrio, ácido poliláctico/policaprolactona, ácido poliláctico/ hidroxiapatita, poliuretano/ácido poliláctico, hidroxiapatita/alúmina, entre otros (Boissard y col., 2009, Do y col., 2015). Todos ellos con la finalidad de obtener materiales con morfologías diferentes, con macro y nano estructuras, buscando optimizar sus propiedades (Cifuentes y col., 2016).

4.8 Andamios con magnesio

La adición de magnesio en forma de nanopartículas a compositos de nueva generación, ha mostrado grandes resultados en combinación con polímeros sintéticos. Estas nanopartículas permiten formar andamios con mayor resistencia, que soportan mayor carga y que además ayudan a regular el pH, principalmente en combinación con los derivados del ácido poliláctico o ácido poliglicólico, debido a los productos de degradación ácidos de éstos (Lee y col., 2014). Además, el magnesio se ha presentado como un gran osteoinductor al ser un componente básico en el metabolismo celular y el cual participa de manera activa en una gran cantidad de funciones celulares como la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, algunas de las cuales pueden ayudar al desarrollo de las células en los andamios implantados,

que a su vez es degradado sin ningún problema por el organismo (Baaij y col. 2015) (Park y col. 2010). Aunado a esto, el magnesio es un material fácil de obtener, de bajo costo y amigable con el medio ambiente (Hickey y col., 2015). Debido a este potencial, existe actualmente una carrera por probar la interacción de estas partículas de magnesio en compositos que ya han demostrado buenas características como andamios.

Se han propuesto andamios con ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) en combinación con hidróxido de magnesio para regeneración de cartílago, esto debido a la capacidad del hidróxido de neutralizar los desechos ácidos del polímero, aunado a esto se propone como un componente que puede evitar la respuesta inflamatoria en donde se coloca, debido a su captación de calcio (Park y col., 2018).

4.9 Andamios en la actualidad

Actualmente no existe el material perfecto, el ideal, pero cada día hay nuevas propuestas de compositos, de nuevas moléculas con actividad osteoinductiva, pistas que nos acercan a este objetivo. Esta búsqueda además lleva consigo la perfección en las técnicas empleadas en la fabricación de andamios: en estos momentos existe una gran cantidad de técnicas empleadas en la fabricación, como la utilización de moldes con múltiples agentes porógenos como cloruro de sodio, micropartículas de hielo o bicarbonato de sodio, además de técnicas de modelado e impresión 3D (Figura 2), las cuales actualmente se perfeccionan a cada momento y nos ofrecen nuevas ventajas.

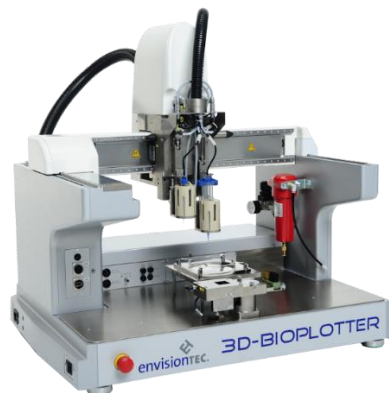


Figura 2. Impresora 3D. Impresora de órganos de diversos biomateriales.

En la actualidad, son necesarios nuevos conceptos de diseño y técnicas de fabricación, así como la validación de los mismos en modelos celulares y animales. Un problema que no ha sido ampliamente estudiado es la integración de los andamios con el tejido circundante. Para atacar este problema es necesario el diseño de andamios con superficies internas que promuevan la adhesión celular y guíen la diferenciación celular, con superficies externas diseñadas para asegurar su integración con el tejido circundante, evitando la extrusión y el movimiento.

5. JUSTIFICACIÓN

Los injertos de hueso son cada día más necesarios, ya sea para operaciones maxilofaciales, prótesis dentales, defectos óseos o tratamientos para enfermedades como la osteopenia y la osteoporosis, enfermedades que actualmente en México incrementan cada año por ser enfermedades que afectan principalmente a los adultos mayores. Debido al incremento en la esperanza de vida en nuestro país, es que existe un mayor índice de personas con estos padecimientos (Carlos y col., 2013).

En la actualidad, la reparación en los defectos del hueso incluye a los autoinjertos y los aloinjertos, los cuales se obtienen de una forma invasiva que en muchos casos no permite obtener una cantidad adecuada de hueso; además, el tratamiento requerido antes de la implantación para minimizar el efecto de la respuesta inmune puede afectar las propiedades mecánicas, osteoinductivas y osteoconductoras del injerto (Alvarez, 2009, Bose y col., 2012).

La ingeniería en tejidos y la creación de andamios fabricados a partir de diversos biocompositos han demostrado ser una alternativa viable para tratamientos donde son necesarios injertos de hueso, ya que muchos de ellos no presentan inmunogenicidad, son biocompatibles, biodegradables y pueden participar en una regeneración ósea guiada (Murphy y col., 2013).

El adición de nanopartículas de ciertos metales, como el magnesio, a los biocompositos de algunos polímeros ha demostrado mejorar sus propiedades mecánicas y a su vez mejoran la regulación del pH de los productos de degradación de éstos, ayudando así a generar una mejor biocompatibilidad; además, el uso de magnesio ha mostrado aumentar el efecto osteoinductivo en combinación con algunos polímeros (Cifuentes y col., 2016).

6. HIPÓTESIS

Los andamios con composiciones de PLA/nMg/nHA (85/10/5 wt%) presentan diferencias significativas en sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoinducción y osteoconducción que aquellos que contienen únicamente PLA, PLA/nMg o PLA/nHA.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

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

7.2 Objetivos específicos

1. Fabricar andamios de PLA/nMg/nHA (85/10/5 wt%) y los controles de referencia (PLA, PLA/nHA y PLA/nMg).
2. Realizar la caracterización acelular de los andamios.
3. Realizar estudios de viabilidad, citotoxicidad, adhesión y proliferación celular de preosteoblastos expuestos a los andamios.
4. Analizar el proceso de diferenciación osteogénico de preosteoblastos expuestos a los andamios.

8. MATERIALES

8.1 Andamios

Se utilizaron como materia prima para la fabricación de los andamios gránulos de PLA de 3 mm marca GoodFellow[®], HA en forma de nanopartículas de tamaño < 200 nm de Sigma–Aldrich[®] y, para la fabricación de las nanopartículas de hidróxido de magnesio, se utilizaron pellets de NaOH de J.T. Baker[®] y Mg(NO₃)₂·6H₂O marca Vectec[®]. Como agente porógeno se utilizaron cristales de NaCl de la marca J.T. Baker[®].

8.2 Modelo acelular

Para la evaluación acelular de los andamios se utilizó buffer de fosfatos al 1X (PBS 1X) y fluido corporal simulado (SBF), también conocido como Solución de Kokubo. Esta solución es ampliamente aceptada para valorar la bioactividad de andamios a través de la formación de HA (Kokubo y Takadama 2006).

8.3 Modelo Celular

Se utilizó la línea celular MC3T3-E1 subclona 4 (ATCC[®] CRL-2593[™]) bajo condiciones de proliferación exponencial. El modelo celular se mantuvo, en condiciones de proliferación exponencial, a 37 °C y en una atmósfera con 6% de CO₂; las resiembras se realizaron 2 veces por semana (lunes y jueves) a una dilución de 1:4 utilizando medio mínimo esencial alfa (MEM-alfa) Gibco[®] que no contiene ácido ascórbico.

9. MÉTODOS

9.1 Fabricación de las nanopartículas de magnesio

Las nanopartículas de magnesio se obtuvieron realizando una reacción de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ con NaOH , en el que se disolvieron 5 g de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ y 1.6 g NaOH en 100 y 200 mL de agua destilada, respectivamente. Una vez completada la disolución, la solución de NaOH es vertida, gota a gota, en la solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ la cual se encuentra en agitación constante. Entonces, el precipitado se lavó múltiples veces, centrifugándolo a 3500 rpm por 5 min, decantando el sobrenadante y resuspendiendo en agua tridestilada. Posteriormente se secó por deshidratación en concentraciones crecientes de etanol al 25%, 50%, 75%, y 99.98%, este último por duplicado. Se resuspendió una última vez en etanol al 99.98% para pasar a una caja de Petri, en la cual se dejó evaporar el etanol por aireado por 24 h, obteniendo 0.9 g de nanopartículas de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ a en forma de un polvo blanco y muy fino.

Las partículas obtenidas se analizaron por microscopía electrónica de barrido (MEB) para verificar la formación y el tamaño de las nanopartículas, así como su composición mediante el análisis de espectroscopía de energía dispersiva (EDS).

9.2 Fabricación de los andamios

Los andamios se prepararon mediante la técnica de disolución y colada, con sal fusionada como agente porógeno. El polímero se disolvió en cloroformo (80 mg/mL) a temperatura ambiente durante 8 horas utilizando un agitador a 300 rpm. Una vez disuelto el polímero se añadieron las nanopartículas de HA y las nanopartículas de Mg para obtener un composito con una proporción PLA/nMg/nHA de 85/10/5 wt%. Para los compositos que se utilizaron como referencia comparativa, se omitió la adición de uno o dos los componentes, generando compositos PLA/nMg (90/10 wt%), PLA/nHA (95/5 wt%) y PLA (100 wt%). En todos los casos, la suspensión se mantenía homogénea por ultrasonido.

Para formar el andamio 3D poroso, primero se prepararon los moldes de teflón, de 1 cm de alto por 1 cm de diámetro, con el agente porógeno: se llenó cada molde con 0.67 g NaCl en partículas previamente seleccionadas por tamizado con tamaños que van de 100-500 μm y se incubaron durante 22 h a 37°C y 95 % de humedad relativa para fusionar las zonas de

contacto de los cristales (Tabla 1). Enseguida, se vertió la suspensión de cada composito en los moldes, hasta completar el volumen del mismo, procurando cubrir todo el agente porógeno y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se sumergieron en agua destilada para extraer el agente porógeno. Se realizaron cambios de agua a las 24 h aproximadamente y a las 48 h se desmoldaron y se sumergieron en agua desionizada por otras 24 h. Finalmente, se secaron a temperatura ambiente por 24 h.

Los andamios se esterilizaron sumergiéndolos durante 6 h en etanol al 70%, seguido de 3 lavados con agua tridestilada estéril y la exposición del biomaterial a luz UV en una campana de flujo laminar por 12 h, todo bajo condiciones de esterilidad.

Tabla 1. Proporción en la distribución del tamaño del agente porógeno.

Porcentaje en la mezcla	Tamaño de cristal*
5%	< 149 μm
5%	150 - 250 μm
10%	251 - 297 μm
65%	298 - 400 μm
15%	> 400 μm

*Los cristales de NaCl se tamizaron y se separaron por tamaño, para posteriormente mezclarse en una proporción específica para obtener poros de tamaños más homogéneos.

9.3 Caracterización acelular de los andamios

La interconexión, tamaño y distribución de los poros se determinó por MEB y la composición de los elementos que componen cada andamio por EDS. Se calculó la porosidad estimada usando el software ImageJ v.1.5i con el macro jPOR.txt. Los andamios fueron preparados para su análisis por MEB metalizando la superficie de éstos con cobre y el análisis se llevó a cabo en un equipo de microscopía JEOL® modelo JSM-6400.

La degradación por hidrólisis y su efecto sobre el pH se determinó sumergiendo cada andamio en 30 mL de PBS 1X durante 3 semanas y en 30 mL agua tridestilada por 4 semanas, de los cuales se monitoreó el pH cada 7 días. Se tomaron muestras del agua con los productos de degradación tras las 4 semanas y se esterilizaron por filtración usando una membrana de 0.22 μm , los cuales se utilizarían posteriormente para una prueba de citotoxicidad en cultivo.

Para valorar la bioactividad de los andamios, se sumergieron en 30 mL de SBF y se tomó una muestra de cada material los días 1, 7, 14 y 21 para evaluar la formación de HA en las superficies de las muestras por MEB acoplado al EDS.

9.4 Análisis de viabilidad, citotoxicidad, adhesión y proliferación celular de preosteoblastos

El ensayo de azul de alamar fue la técnica utilizada para evaluar la viabilidad celular, en la cual se mide la actividad metabólica celular a través de la conversión de la resazurina. Se realizó añadiendo 5% en volumen de azul de alamar respecto al volumen final de una suspensión de células, se incubó 3 h (2 h en el caso de la citotoxicidad) a 37 °C y en una atmósfera con 6% de CO₂, para posteriormente medir la absorbancia (Abs) a 570 y 600 nm. Para calcular el porcentaje de viabilidad se empleó la fórmula obtenida del protocolo alamarBlue® Assay por Thermo Scientific™:

$$ARLW = ALW - (AHW \times RO) \times 100$$

Donde:

ARLW = porcentaje de reducción de resazurina.

RO = factor de corrección. $RO = AOLW / AOHW$.

$AOLW = AO570 = \text{Abs a 570 nm del medio con azul de alamar} - \text{Abs a 600 nm del medio solo}$.

$AOHW = AO600 = \text{Abs a 600 nm del medio con azul de alamar} - \text{Abs a 600 nm del medio solo}$.

$ALW = A570 = \text{Abs a 570 nm de la muestra} - \text{Abs a 570 nm del medio solo}$.

$AHW = A600 = \text{Abs a 600 nm de la muestra} - \text{Abs a 600 nm del medio solo}$.

Para evaluar la adhesión celular se colocó cada andamio en un pozo de una placa para cultivo de 24 pozos y se agregó 1 mL de una suspensión de 500,000 células/mL; se incubó durante 4 h para permitir la adhesión celular. Como control positivo se agregó a uno de los pozos una suspensión con confluencia inicial de 50,000 células/mL. Pasadas las 4 h se cambió el andamio a un pozo nuevo y se agregó 1 mL de MEM-alfa tanto al andamio, como al pozo donde estaba previamente el andamio, y se realizó el ensayo de azul de alamar en ambos

pozos, donde la suma de ambos porcentajes de reducción de resazurina hace referencia al 100% y el porcentaje que se encuentre en el andamio será nuestro porcentaje de adhesión.

Para evaluar la proliferación de las células que se adhirieron al estar en contacto con los distintos andamios, se agregó 1 mL de MEM-alfa a las células usadas en el ensayo de adhesión al andamio y se determinó espectrofotométricamente la reducción de azul de alamar los días 1, 3 y 5, realizando cambios de medio antes de realizar el ensayo de azul de alamar. Como referencia, se montaron cultivos controles con confluencia inicial de 50,000 células/mL en las mismas condiciones, pero sin andamio.

La evaluación de citotoxicidad de los productos de degradación del biomaterial se realizó colocando 1 mL de una suspensión de 250,000 células/mL en un plato para cultivo de 35 mm con área de 9 cm²; se agregó 0.8 mL de MEM-alfa y 0.2 mL del degradado (10% del volumen final de 2 mL) previamente obtenidos por filtración de las pruebas de degradación por hidrólisis, se incubó durante 24 h y se realizó un cambio de medio agregando 2 mL de MEM-alfa; se determinó la viabilidad de las células midiendo la reducción de azul de alamar. Se montaron cultivos controles sustituyendo los productos de degradación con el mismo volumen de agua en las mismas condiciones, los cuales fueron utilizados como una referencia de una viabilidad del 100%.

Para evaluar la adhesión por MEB se colocó cada andamio en un pozo de una placa para cultivo de 24 pozos y se agrega 1 mL de una suspensión de 500,000 células/mL a cada andamio; como control se agregó a uno de los pozos una suspensión con confluencia inicial de 50,000 células/mL. Se colocaron muestras suficientes para evaluar cada día de muestreo, el cual se realizó los días 0, 1, 7, 14 y 21.

Cada vez que se tomó muestra, el andamio se retiró del medio, se lavó 2 veces con 1 mL PBS 1X, con cuidado de no desprender las células, se fijaba agregando 200 µL de una solución de formaldehído 2% y glutaraldehído 0.2% en PBS 1X y se incubaba por 30 min a temperatura ambiente (TA), se retiraba el fijador y se dejaba secar en campana toda la noche. Una vez seco el biomaterial, éste se deshidratava con lavados con 1 mL de etanol en concentraciones crecientes, primero un lavado con etanol al 25%, posteriormente al 50%, al 75% y, por último, dos lavados con etanol al 99% y se dejaba secar toda la noche por aereado. Una vez

deshidratadas las muestras, éstas se metalizaron con Cu para realizar las pruebas de MEB y EDS.

9.5 Análisis del proceso de diferenciación de preosteoblastos

Se determinó la actividad de fosfatasa alcalina, formación de colágeno y el grado de mineralización como marcadores de diferenciación; para evaluar cada uno de los marcadores se colocó cada andamio en un pozo de una placa para cultivo de 24 pozos y se agregó 1 mL de una suspensión de 500,000 células/mL (día 0) en MEM-alfa; pasados 3 días, los andamios se cambiaban a un pozo nuevo en el cual se mantenían el resto del experimento y en el cual se realizaron cambios de medio 2 veces por semana (lunes y jueves). Se usó un andamio por cada día que fuese a muestrearse.

Para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina se requiere del lisado de las células. La lisis se realizó retirando el andamio del cultivo celular y realizando 2 lavados de éste con 1 mL de PBS 1X, al que posteriormente se le agregaron 400 µL de igepal 0.2%, se incubó 30 min a TA con agitación suave, se pasó el sobrenadante a un micro tubo, procurando absorber todo el igepal dentro del andamio introduciendo la punta de la pipeta en el interior del andamio, se centrifugó 15 min a 16,000 xg, se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo y se almacenó a -70 °C hasta su análisis.

La determinación de la actividad alcalino fosfatasa (ALP) se realizó con una prueba de reducción de 4-MUP (4-metil-umbelliferil fosfato) los días 1, 5, 7, 10, 14 y 21. Para cada muestra, se agregaron en una placa de 96 pocillos de fondo negro 50 µL del lisado de células y 10 µL de una solución de Tris 50 mM con 0.1% de BSA y 4-MUP 200 µM y se incubó por 30 min. Se midió la fluorescencia con una excitación de 360 nm y una emisión de 450 nm en el equipo Thermo Scientific Varioskan® Flash. Este resultado se normalizó con la medición de proteína total, misma que se determinó por el método de Bradford, de acuerdo al protocolo de Bio-Rad Bradford Protein Assay® para una cubeta de 1 mL, utilizando el espectrofotómetro Spectronic® 20 Genesys™ y una curva estándar con BSA.

El grado de mineralización se determinó con una tinción *in situ* con rojo de alizarina S (RAS), que permite contabilizar los depósitos de calcio y cuantificar el grado de mineralización por espectrofotometría. El ensayo se realizó los días 7, 14, 21 y 28. La tinción se llevó a cabo

retirando el andamio del medio de cultivo, lavándolo 2 veces con 1 mL de PBS 1X fijándolo por inmersión en 2 mL de etanol al 70 % durante 1 h a 4° C. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el etanol y se realizaron 3 lavados con agua destilada, cuidando de no remover la capa celular. Se añadieron 300 μ L de RAS, asegurando cubrir todo el material y procurando no dañar la capa celular; se incubó 20 min a TA en agitación y oscuridad. Se retiró el colorante y se lavó el andamio múltiples veces con agua destilada hasta la desaparición del color. Se agregó 1 mL de solución 0.5 N de HCl con 5% de SDS, y se incubó 30 min a TA en agitación y oscuridad. Finalmente, se recuperó 1 mL del sobrenadante y se leyó por espectrofotometría a 415 nm, utilizando como blanco la solución de 0.5 0N de HCl con 5% de SDS. La medición fue realizada en cubeta de 1 mL en el equipo Spectronic® 20 Genesys™.

La formación de colágeno se midió con una tinción de Rojo Sirius (Picrosirius) y, al igual que en las determinaciones anteriores, se montaron los andamios con una suspensión de células de concentración conocida, de los cuales se tomaron muestras los días 10, 14, 21 y 28. Para realizar la tinción de Picrosirius el andamio se retiró del medio de cultivo y se lavó 2 veces con 1 mL de PBS 1X; se fijó con 300 μ L de solución de Bouin's por 1 h a TA, en agitación y oscuridad. Posteriormente, se retiró el fijador y se llenaron los pozos con 2 mL de agua destilada (en una placa para cultivo de 24 pozos), se incubó por 15 min a TA, se retiró el agua y se lavó el andamio múltiples veces con agua destilada hasta eliminar el color amarillo. Una vez eliminado todo el sobrante de la solución de Bouin's, se secó el andamio por aireado hasta eliminar toda el agua (30 min aproximadamente). Una vez seco, se tiñó agregando 300 μ L de Picrosirius (100 mg de Red Sirius en 100 mL ácido pícrico), incubándolo 1 h a TA en agitación y oscuridad. Trascurrido el tiempo, se retiró el colorante y se lavó múltiples veces con HCl 0.01N, hasta la desaparición del color en el lavado; finalmente, se extrajo el colorante con 1 mL de NaOH 0.1 N, el cual se dejó incubar por 30 min a TA en agitación y oscuridad. Se cuantificó la concentración relativa de colágeno por espectrofotometría a 550 nm; la medición se llevó a cabo en cubeta de 1 mL en el equipo Spectronic® 20 Genesys™.

10. RESULTADOS

10.1 Fabricación de nanopartículas de magnesio

El polvo obtenido de la reacción de nitrato de magnesio con hidróxido de sodio fue sometido a MEB en el que se observaron pequeños cúmulos de partículas con forma de hojuelas muy finas con diámetros entre 28 y 213 nm (Figura 3). El EDS mostró sólo dos picos, uno para la aparición del elemento magnesio y otro para el elemento oxígeno, componentes del producto de la reacción $Mg(OH)_2$ (Figura 4).

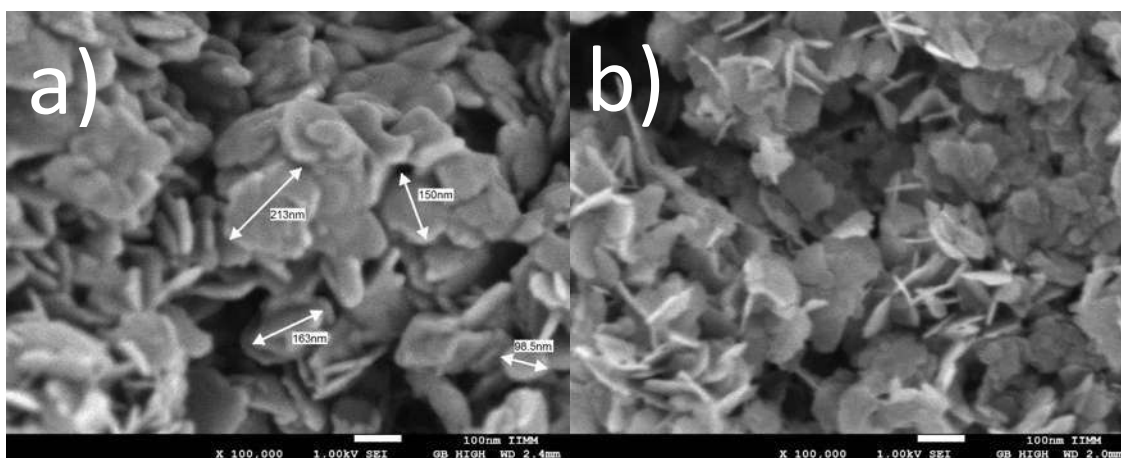


Figura 3. Tamaño y forma de las nanopartículas de $Mg(OH)_2$ por MEB. a) Se observan tamaños entre los 28 y 213 nm de diámetro. b) Las nanopartículas se observan como hojuelas irregulares y finas.

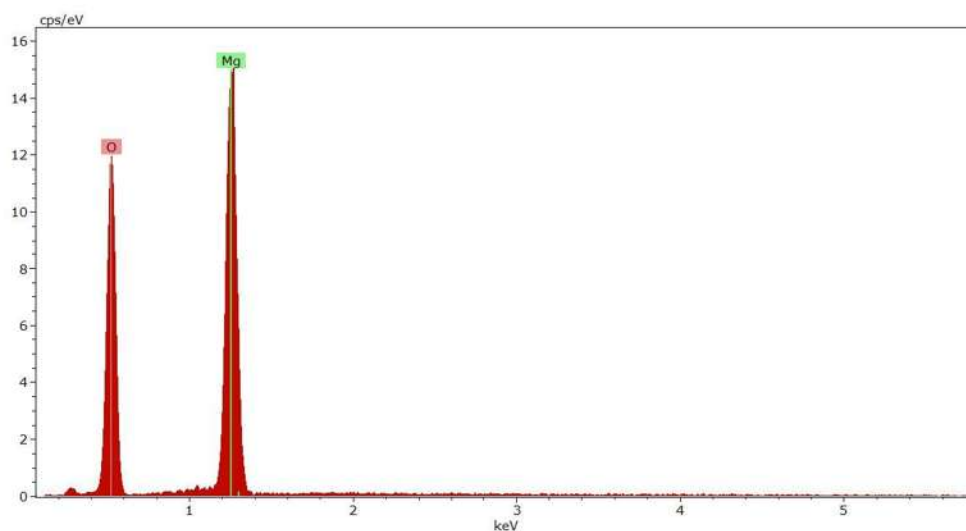


Figura 4. EDS de elementos que componen las nanopartículas de $Mg(OH)_2$. Se observan únicamente señales de oxígeno y magnesio.

10.2 Fabricación de andamios

Se fabricaron 50 andamios de cada composición (PLA, PLA/nHA, PLA/nMg y PLA/nMg/nHA). Los andamios tienen forma de pequeños cilindros, de 4 mm de alto y 9 mm de diámetro, de color blanco en las cuatro composiciones (Figuras 5 y 6).

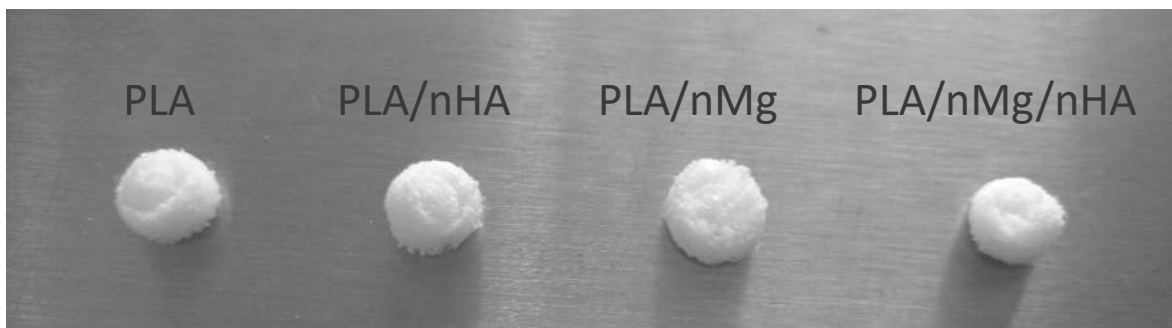


Figura 5. Andamio de cuatro composiciones diferentes. Las cuatro composiciones a simple vista son muy similares en tamaño y forma.

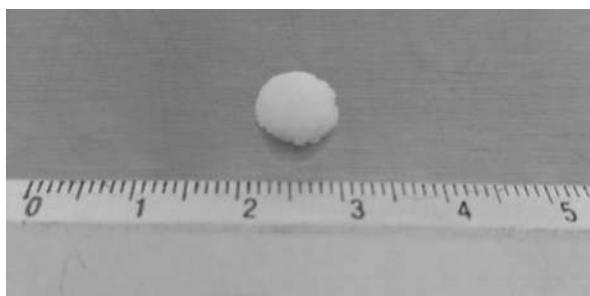


Figura 6. Andamio de composición PLA/nMg/nHA. Andamio con forma cilíndrica con 9 mm de diámetro y 4 mm de altura.

10.3 Evaluación de tamaño de poro y composición de los andamios

Al observar al MEB cada andamio, se observaron tamaños de poro distintos y de morfología amorfa (Tabla 2) (Figura 7).

En el EDS del andamio PLA/nMg/nHA se observan picos de los elementos oxígeno y carbono, que son los principales componentes del ácido poliláctico; también se observan picos de magnesio, fósforo y calcio, componente de las nanopartículas de Mg e HA; por último, se encontraron picos de cobre, material de recubrimiento necesario para observar muestras orgánicas, y en menor cantidad aparecen unas pequeñas trazas de silicio (Figura 8).

Además, en los “mapping” se observa una distribución homogénea de los elementos en toda la superficie del andamio.

Tabla 2. Tamaños de poros en los andamios.

Composición	Tamaño de poro mínimo (µm)	Tamaño de poro máximo (µm)
PLA	33	360
PLA/nHA	30	578
PLA/nMg	102	280
PLA/nHA/nMg	45	393

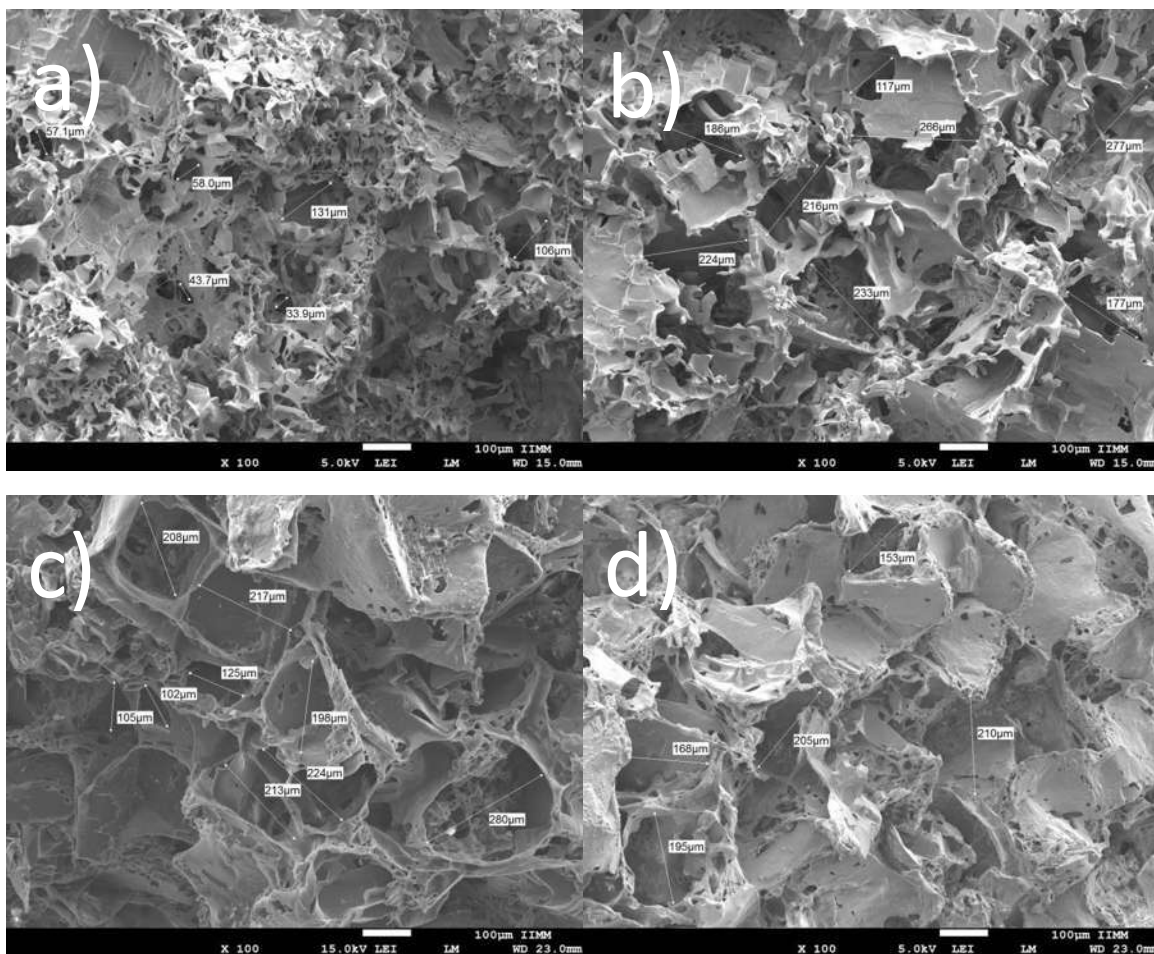


Figura 7. Tamaño de poros por MEB x 100. a) Andamio PLA con tamaños de poro de 33 - 360 µm. b) Andamio PLA/nHA con tamaños de poro de 30 - 578 µm. c) Andamio PLA/nMg con tamaños de poro de 102 - 280 µm. d) Andamio PLA/nHA/nMg con tamaños de poro de 45 - 393 µm.

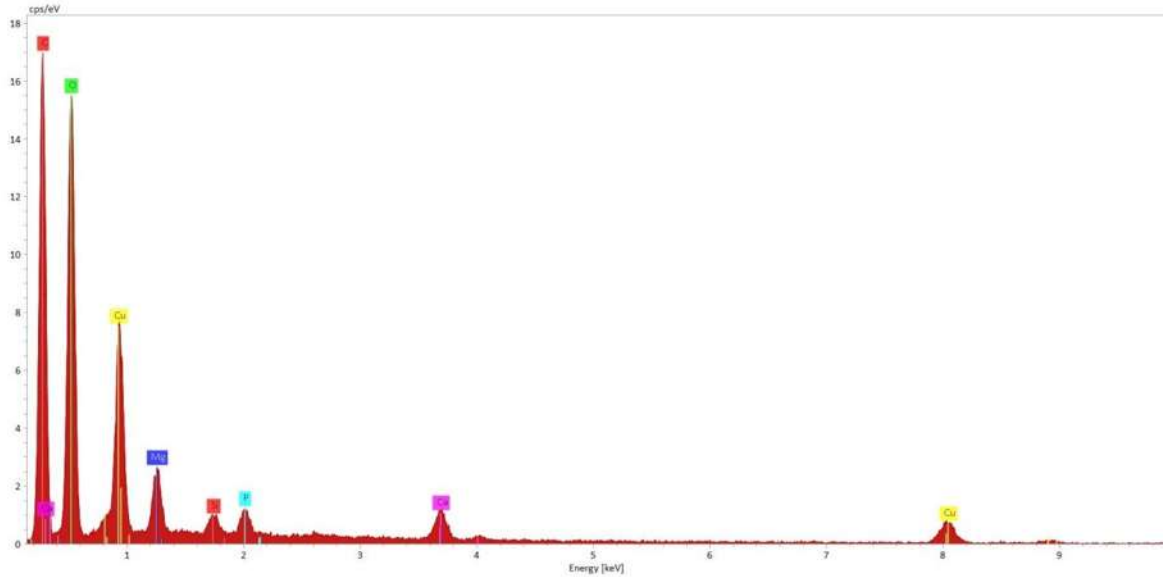


Figura 8. EDS de elementos que componen el andamio PLA/nMg/nHA. Hay señal de los elementos cobre, carbono, oxígeno, calcio, fósforo, magnesio y silicio.

En el andamio PLA/nMg, el EDS muestra señales de los elementos carbono y oxígeno, composición del polímero, y además vemos un pico de magnesio, que combinado con el oxígeno son los elementos que componen las nanopartículas de hidróxido de magnesio. También en este mismo espectro, vemos señales del recubrimiento de cobre y una señal de silicio (Figura 9).

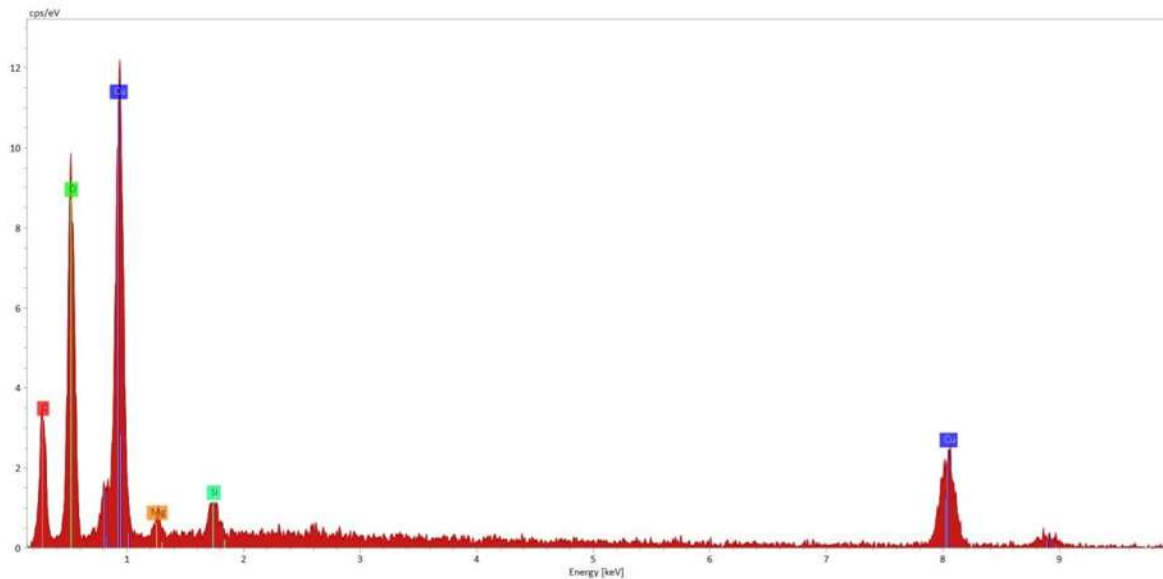


Figura 9. EDS de elementos que componen el andamio PLA/nMg. Hay señal de los elementos cobre, carbono, oxígeno, magnesio y silicio.

En el caso del EDS de la composición PLA/nHA, al igual que en los anteriores, vemos la señal de carbono, oxígeno y cobre, pero en este caso también vemos las señales de calcio y fósforo, correspondientes a la hidroxiapatita (Figura 10). Para la composición de PLA, únicamente vemos la señal de carbono y oxígeno del polímero, así como una de cobre, correspondiente al recubrimiento, y una señal de silicio (Figura 11).

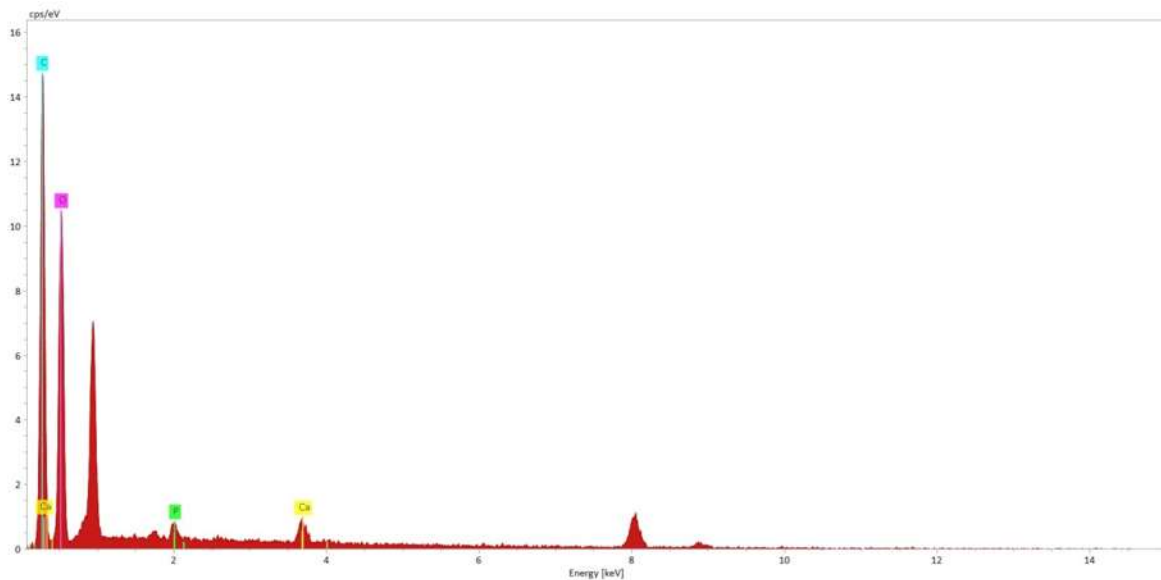


Figura 10. EDS de elementos que componen el andamio PLA/nHA. Hay señal de los elementos cobre, carbono, oxígeno, calcio y fósforo.

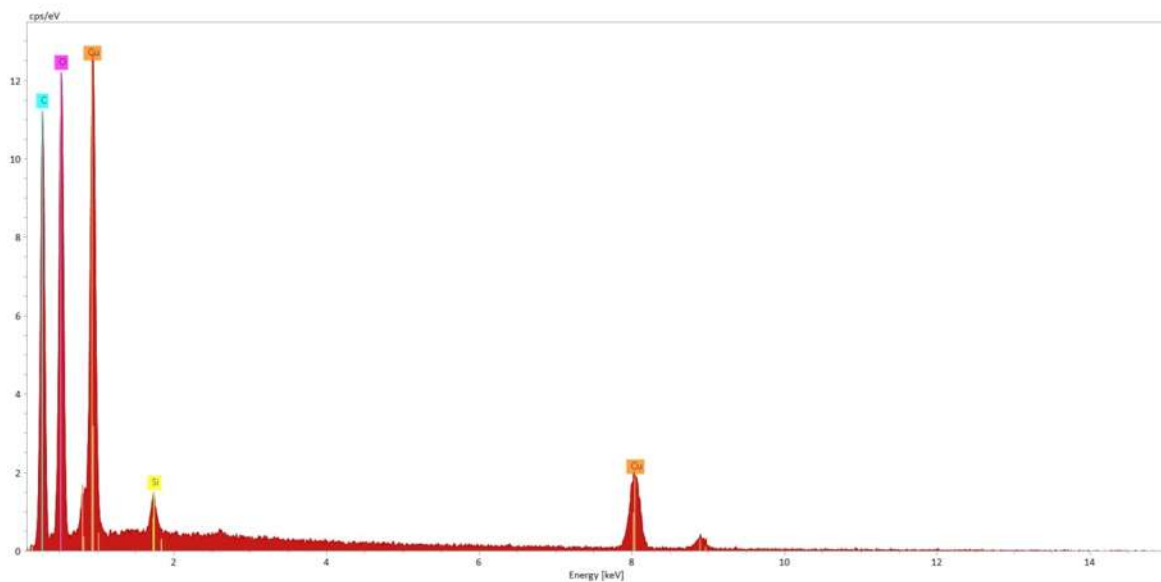


Figura 11. EDS de elementos que componen el andamio PLA. Hay señal de los elementos cobre, carbono, oxígeno y silicio.

En los “mapping” de todas las composiciones de referencia también se observa homogeneidad en la distribución de los elementos que componen las nanopartículas, en toda la superficie del andamio (Figura 12).

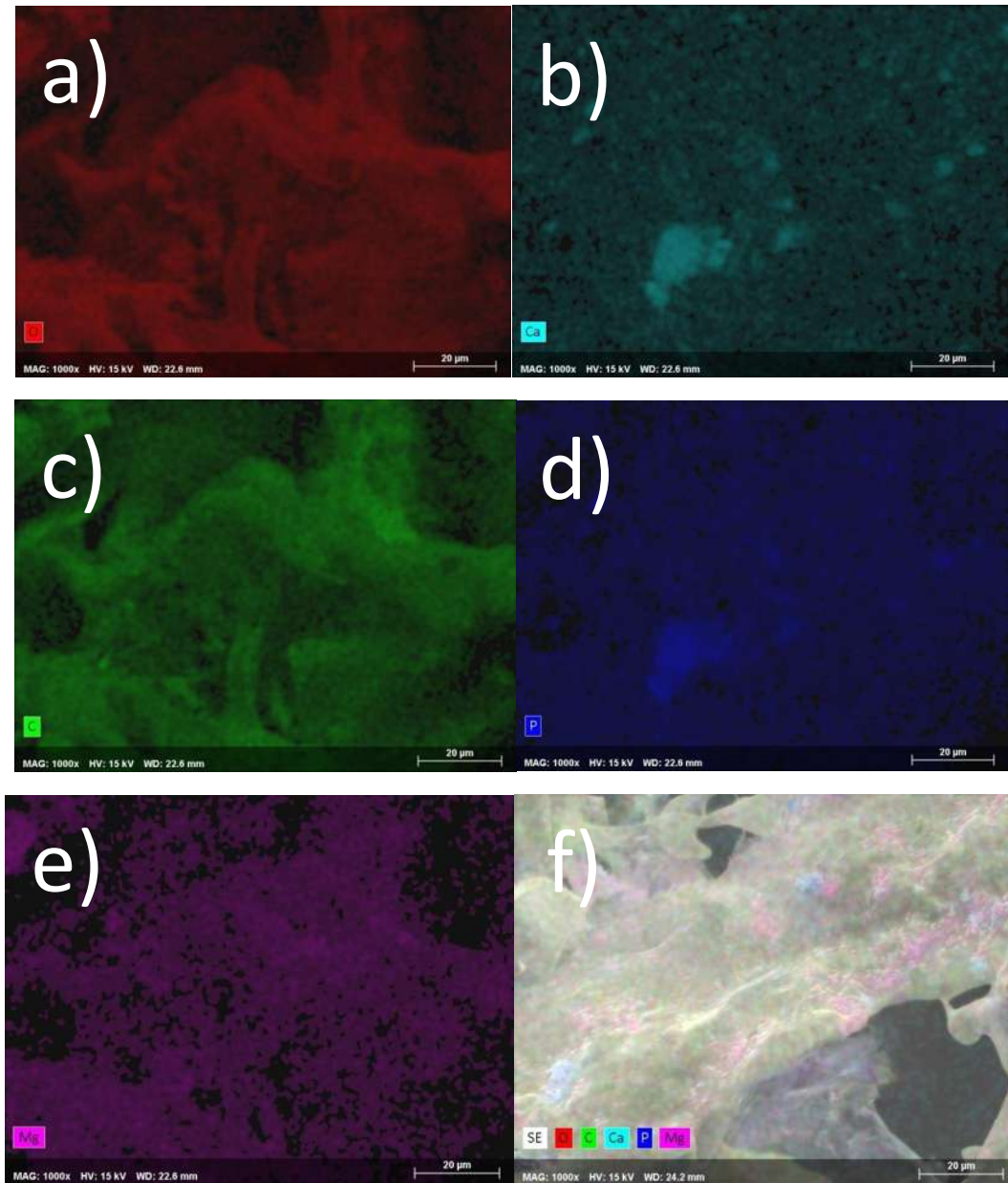


Figura 12. Mapping de los elementos que componen la superficie del andamio PLA/nMg/nHA. a) Dispersión del oxígeno. b) Dispersión del calcio. c) Dispersión del carbono. d) Dispersión del fósforo. e) Dispersión del magnesio. f) Superficie tomada para el EDS.

10.4 Porosidad estimada

La porosidad estimada por contraste de imagen utilizando el software ImageJ con el macro jPOR, para las cuatro composiciones fue del 56 al 64% (Figura 13).

Al calcular la porosidad estimada, utilizando el software ImageJ con el macro jPOR, que determina la porosidad estimada por contraste de imagen, en las cuatro composiciones se observan porosidades entre el 56 y el 64 % (Figura 13).

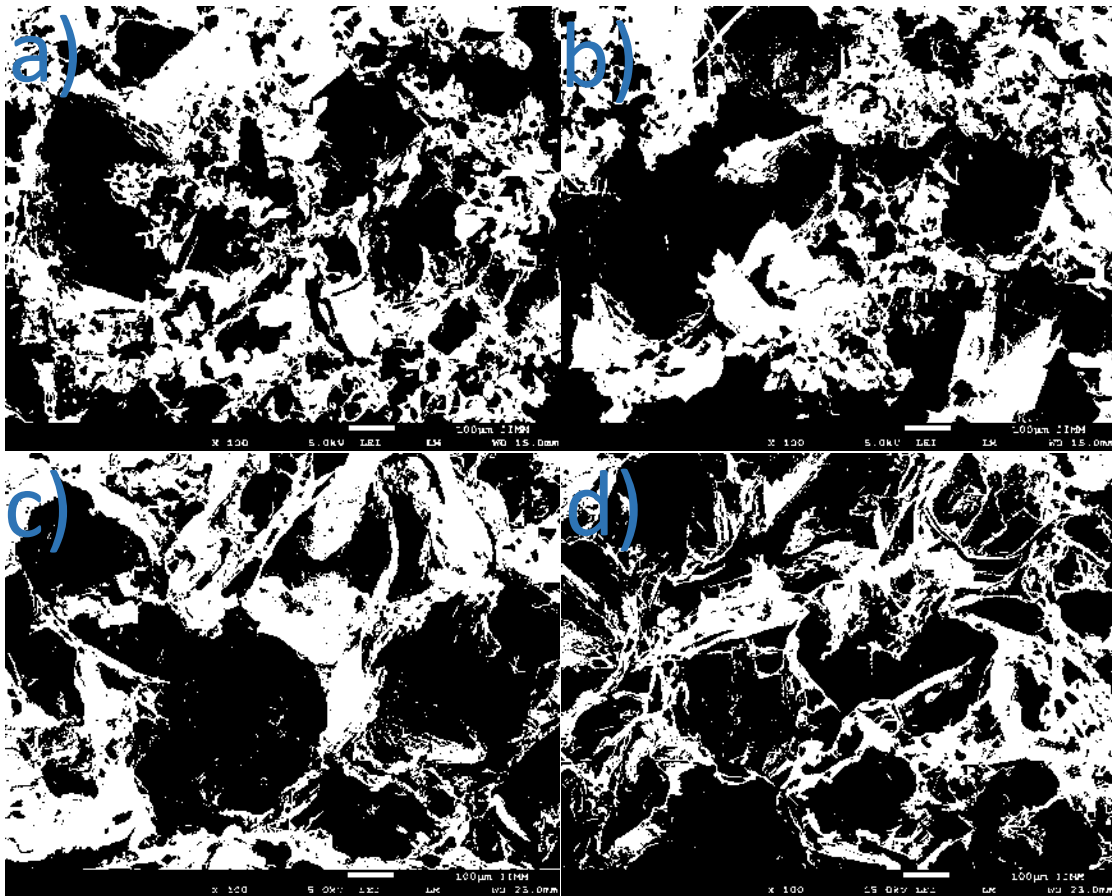


Figura 13. Porosidad estimada con jPOR. a) Andamio PLA con porosidad estimada del 56.49%. b) Andamio PLA/nHA con porosidad estimada del 57.27%. c) Andamio PLA/nHA/nMg con porosidad estimada del 58.42% d) Andamio PLA/nMg con porosidad estimada del 63.99%.

10.5 Bioactividad en SFB

La bioactividad *in vitro* se observó por la formación de hidroxiapatita después de sumergir los andamios en SFB. Para el día 1 de experimentación, la superficie de los andamios no presenta hidroxiapatita neoformada. En el caso del andamio de PLA se observó una superficie corrugada, pero sin ningún granulo (Figura 14a). En el andamio PLA/nHA se observó una superficie con pequeños grumos correspondiente a la hidroxiapatita integrada en el polímero (Figura 15a). Para el PLA/nMg, igualmente una superficie con gránulos pequeños correspondientes a las nanopartículas, pero en este caso del hidróxido de magnesio (Figura 16a). Para el PLA/nMg/nHA se observó una superficie muy similar a la de los últimos dos, con gránulos de las nanopartículas que lo integran (Figura 17a).

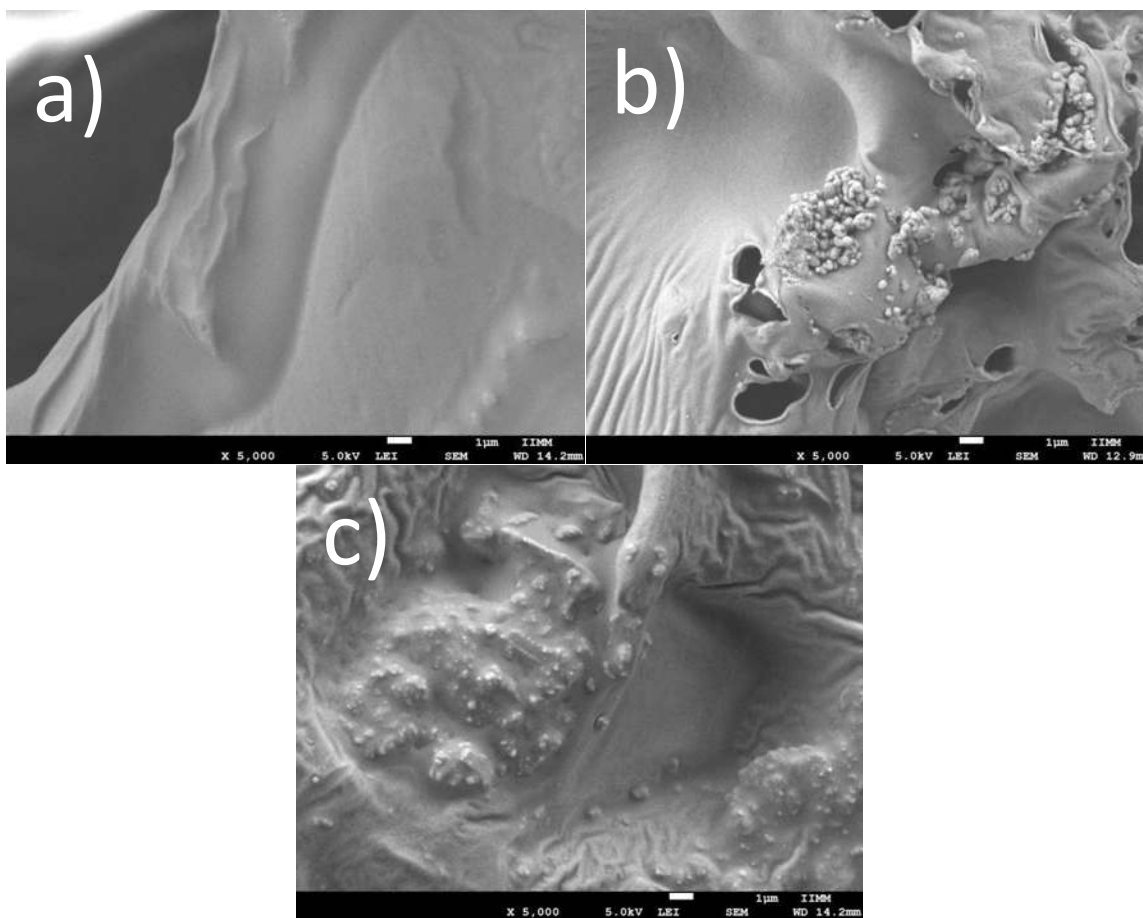


Figura 14. Bioactividad en SFB del andamio PLA. a) Día 1. b) Día 14. c) Día 21.

Ya para el día 14, en el caso del andamio de PLA, se observa con claridad la formación de estructuras de hidroxiapatita en toda la superficie del andamio (Figura 14b). La formación de estructuras de hidroxiapatita en el caso del andamio PLA/nMg igualmente se observa abundantemente, además se observa una mayor formación de estas estructuras donde hay una mayor concentración de las nanopartículas de hidróxido de magnesio (Figura 16b).

En el caso de los andamios cuya composición ya incluye la hidroxiapatita (PLA/nHA y PLA/nHA/nMg), es más difícil de apreciar las estructuras de hidroxiapatita neoformada, pero se pueden apreciar como pequeñas elevaciones en los gránulos de las nanopartículas de la superficie que componen el andamio, creciendo así donde ya existe hidroxiapatita (Figuras 15b y 17b).

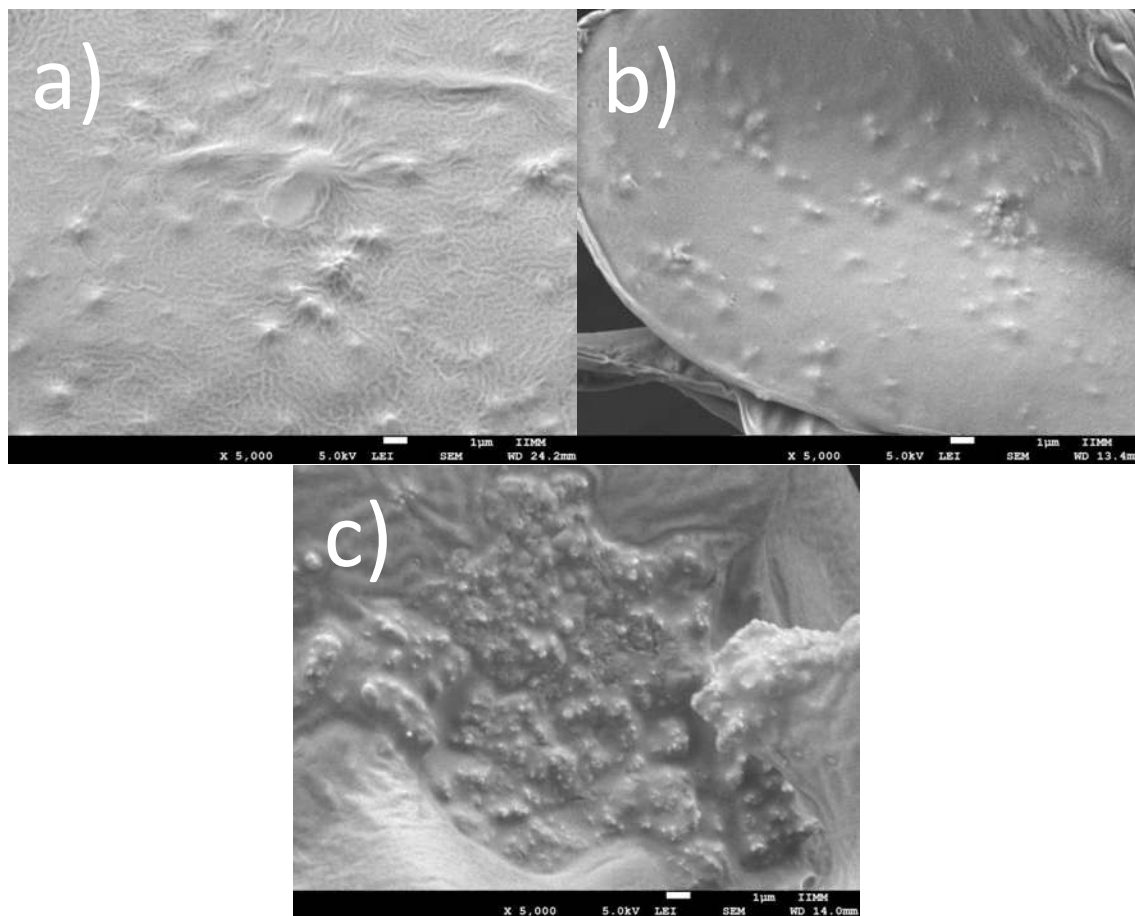


Figura 15. Bioactividad en SFB del andamio PLA/nHA. a) Día 1. b) Día 14. c) Día 21.

Para el día 21 de experimentación, en el caso del andamio PLA se observa cómo crecieron las estructuras de hidroxiapatita (Figura 14c), al igual que en el andamio PLA/nHA (Figura

15c). En ambos casos observamos cómo estas estructuras comienzan a formar pequeñas islas recubiertas de hidroxiapatita.

En el caso del andamio PLA/nMg se observan, al igual que para el día 14, las pequeñas estructuras de hidroxiapatita, pero acompañadas de un gran cambio en la morfología de la superficie, donde se da la desaparición de la mayoría de los gránulos que conformaban inicialmente las nanopartículas de magnesio, dejando en su lugar pequeños cráteres en toda la superficie del andamio (Figura 16c).

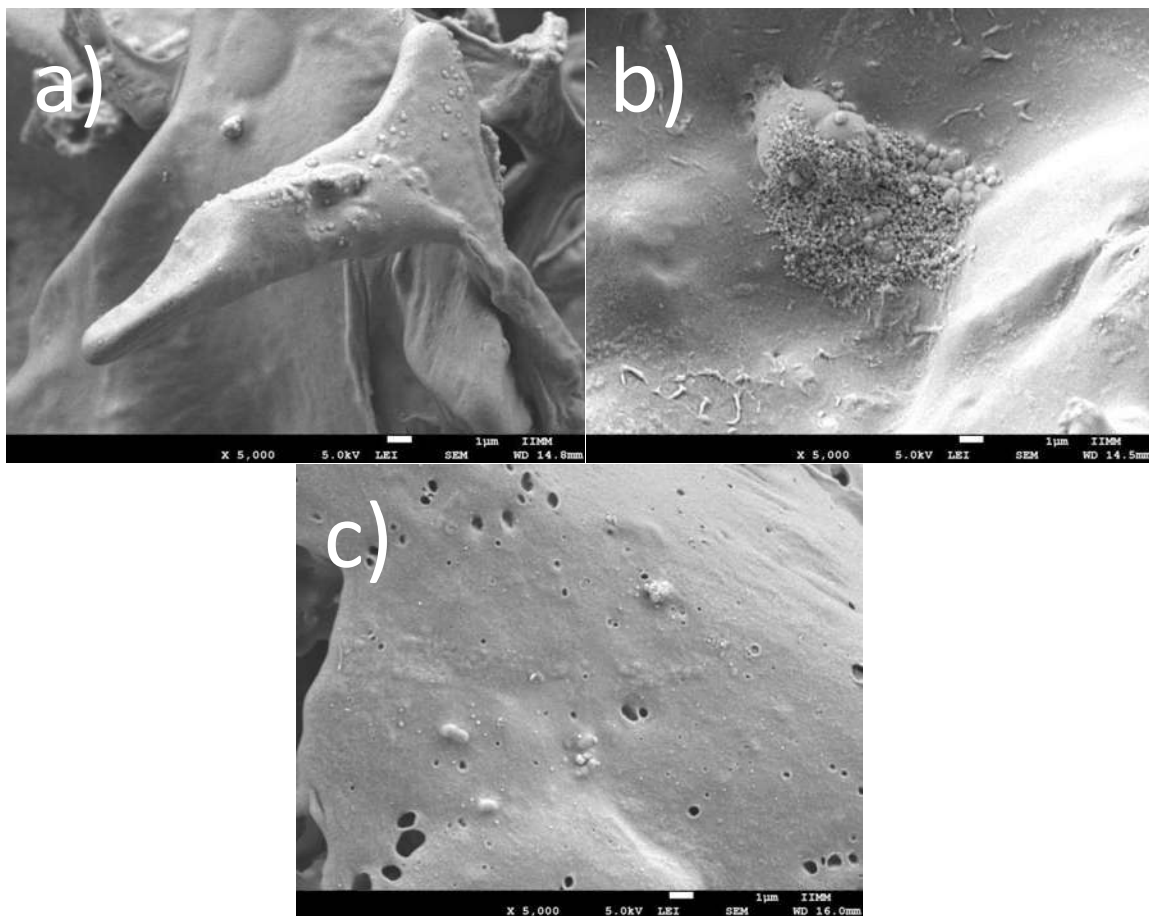


Figura 16. Bioactividad en SFB del andamio PLA/nMg. a) Día 1. b) Día 14. c) Día 21.

Por último, para el andamio PLA/nMg/nHA se pueden observar, al igual que en el anterior caso, las estructuras de pequeñas formaciones de hidroxiapatita, pero la desaparición de lo que originalmente eran los gránulos de magnesio (Figura 17c), con la diferencia de que en éstos no se observan los cráteres mostrados en el caso del andamio PLA/nMg (Figura 16c).

Lo que se observa es una superficie muy corrugada continua con pequeños granos de hidroxiapatita (Figura 17c).

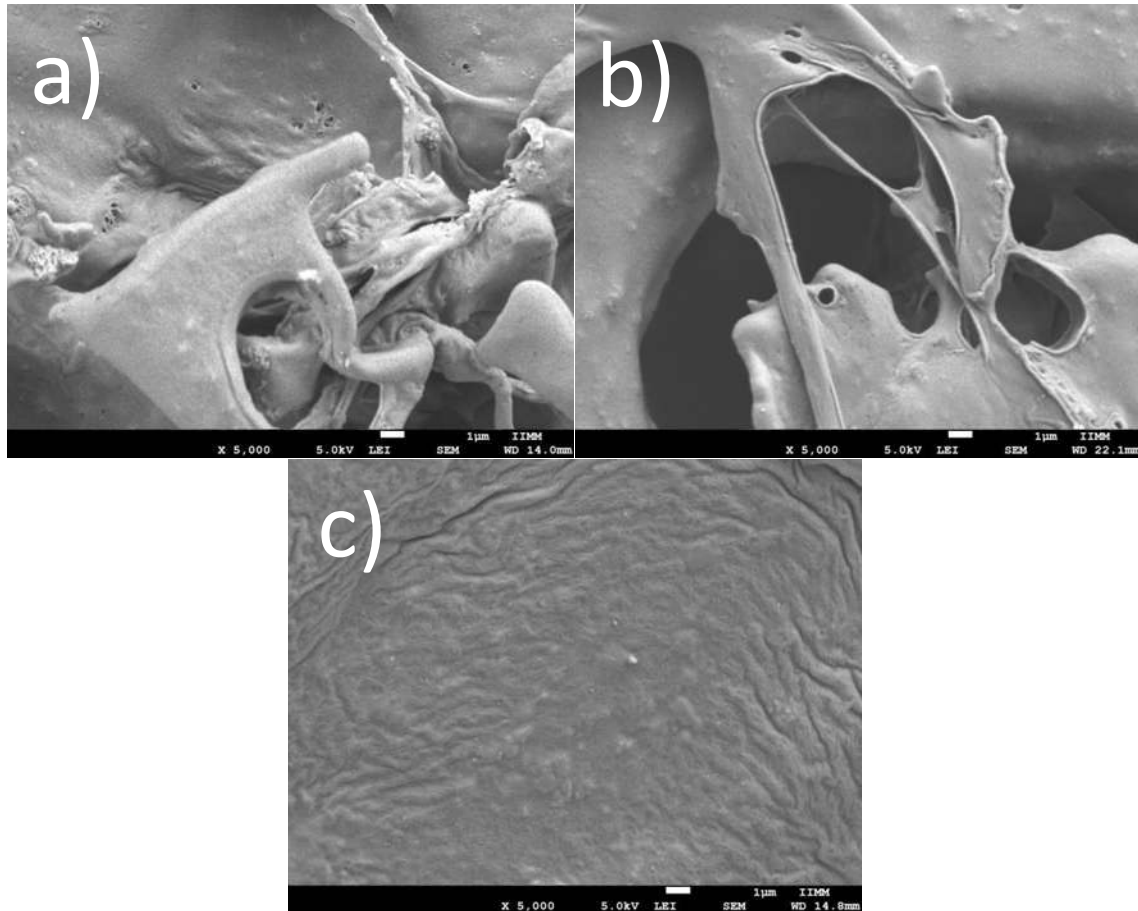


Figura 17. Bioactividad en SFB del andamio PLA/nHA/nMg. a) Día 1. b) Día 14. c) Día 21.

10.6 Evaluación de hidrólisis y pH en agua

El día en que comenzó el experimento se midió el pH inmediatamente después de sumergir el andamio, tomando como control agua sin andamio con un pH inicial de 6.7; el pH máximo se presentó en el andamio de PLA/nHA/nMg, con un pH 7.1, y el mínimo en el de PLA, con un pH de 6.6.

Para el día 1 se alcanzó el máximo de pH, siendo el de PLA/nMg con pH de 8.5, seguido del PLA/nHA/nMg con 7.5; el control de agua se mantuvo en un pH de 6.6.

Al seguir con el experimento se observó una disminución gradual del pH para todos los andamios, esto debido a la hidrólisis del ácido poliláctico. Para el último día de experimentación, el control también presentó una acidez mayor, con pH de 6.2 para el día 28. El pH más bajo lo alcanzó el andamio de PLA con un pH de 5.5 seguido del PLA/nHA con pH de 5.7, mientras que los andamios que integraban nanopartículas de magnesio concluyeron en pH de 6.6 (Figura 18) (Tabla 3).

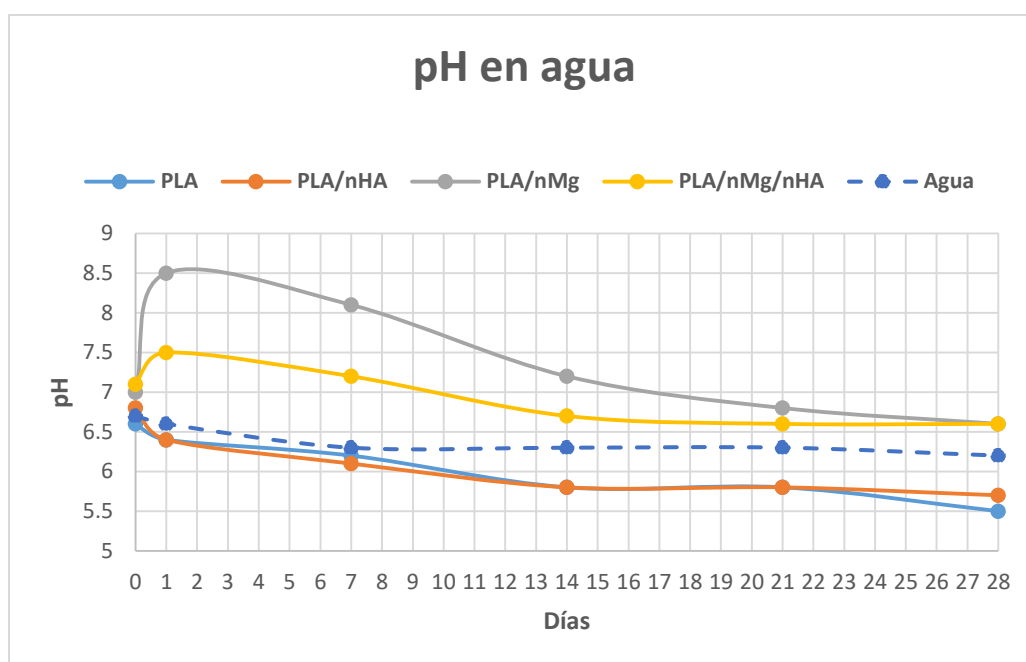


Figura 18. Medición de pH de los andamios sumergidos en agua. Se realizaron mediciones durante 4 semanas.

Tabla 3. Medición de pH de los andamios sumergidos en agua

pH	Día 0	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
PLA	6.6	6.4	6.2	5.8	5.8	5.5
PLA/nHA	6.8	6.4	6.1	5.8	5.8	5.7
PLA/nMg	7.0	8.5	8.1	7.2	6.8	6.6
PLA/nMg/nHA	7.1	7.5	7.2	6.7	6.6	6.6
Agua	6.7	6.6	6.3	6.3	6.3	6.2

10.7 Evaluación de hidrólisis y pH en PBS

En PBS, el pH de las muestras fue más constante, manteniéndose en el intervalo de 7.0 a 7.7. El control (PBS sin andamio) comenzó con un pH de 7.4, para el día 1 del experimento cambió a 7.5 y partir de ahí bajó a 7.2 al llegar al día 21.

El pH más bajo lo registro la composición de PLA, la cual inició con un pH para el día 1 de 7.6, que bajó para el día 7 a pH 7, manteniéndose después y hasta el día 21 sin cambios.

En el pH de las otras tres composiciones no hubo cambios bruscos, manteniéndose en un pH de 7.45 +/- 0.2 (Figura 19) (Tabla 4).

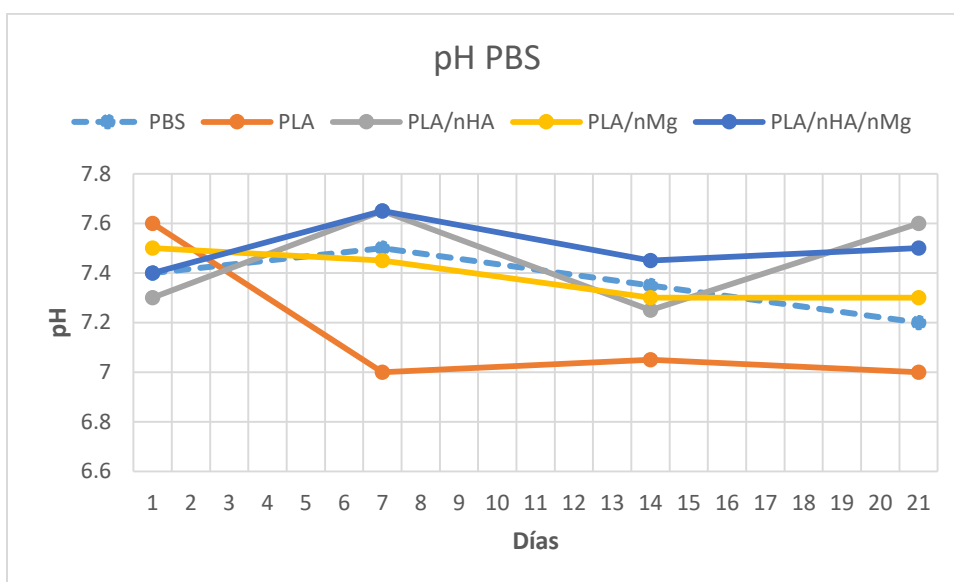


Figura 19. Medición de pH de los andamios sumergidos en PBS. Se realizaron mediciones durante 3 semanas.

Tabla 4. Medición de pH de los andamios sumergidos en PBS.

pH	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
PBS	7.4	7.50	7.35	7.2
PLA	7.6	7.00	7.05	7.0
PLA/nHA	7.3	7.65	7.25	7.6
PLA/nMg	7.5	7.45	7.30	7.3
PLA/nMg/nHA	7.4	7.65	7.45	7.5

10.8 Evaluación de la adhesión

Al evaluar la adhesión tras 4 horas de haber colocado las 500,000 células sobre el andamio, se midió la reducción de azul de alamar para realizar el cálculo del ARLW de las células que se adhirieron al plato y el de las que se adhirieron al andamio. Se sumaron ambos ARLW y se usó como un control del 100% de las células viables; se calculó el porcentaje final de las células en el andamio respecto al 100%, determinando así el porcentaje de adhesión de preosteoblastos (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de adhesión celular en cada andamio.

Composición	Andamio (ARLW)	Plato (ARLW)	100% (Andamio + Plato)	% Adhesión (Andamio)
PLA	16.345	55.791	72.136	22.66
PLA/nHA	12.697	60.903	73.600	17.25
PLA/nMg	20.936	52.574	73.510	28.48
PLA/nMg/nHA	17.760	60.268	78.028	22.76

Nota: Reducción de azul de alamar (ARLW)

Los andamios con mayor porcentaje de adhesión fueron aquellos que contenían magnesio, siendo el más alto el PLA/nMg con un 28.48%, seguido del andamio PLA/nHA/nMg con un 22.76%. Por otra parte, el andamio de PLA presentó un porcentaje de adhesión de 22.66 y el de PLA/nHA presentó el más bajo porcentaje, con un 17.25% (Figura 20).

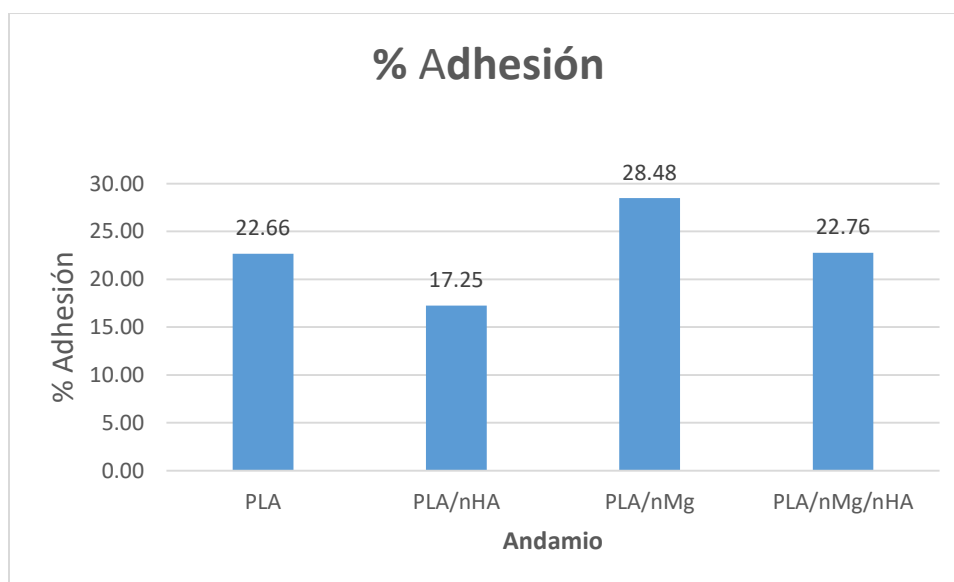


Figura 20. Porcentaje de adhesión celular en cada andamio. Porcentaje de adhesión celular tras cuatro horas en una muestra con 500,000 células.

10.9 Evaluación de proliferación celular

Se tomó la reducción de azul de alamar como criterio de viabilidad. El día cero sería la reducción utilizada para calcular la adhesión, siendo estas células adheridas las que seguirían proliferando. Tras 3 días, los cultivos que más proliferaron fueron de nuevo los que contenían en su composición nanopartículas de magnesio, en los cuales hubo un crecimiento mayor al 50%. En el caso del andamio PLA/nMg pasó de un porcentaje de reducción de azul de alamar de 20.94% a un 50.81%, seguido del andamio PLA/nHA/nMg que pasó de un 17.75% a un 41.93%.

El andamio PLA, por su parte, pasó de 16.34% a un 22.11% y el andamio PLA/nHA de un 12.70% a un 20.73%.

Para el día 5, los andamios con magnesio se mantuvieron con un crecimiento mínimo, el PLA/nMg pasó a un 51.66% y el PLA/nHA/nMg a un 44.34%. Los andamios sin magnesio siguieron creciendo y alcanzaron, para el caso del andamio PLA, un 32.07% y para el PLA/nHA un porcentaje del 28.65.

El control de 50,000 células por su parte comenzó para el día 0 con un 10.85%, para el día 3 se duplicó, llegando a un 22.04%, y ya para el día 5 alcanzó un 30.62%, comportamiento similar al de los andamios PLA y PLA/nHA (Figura 21).

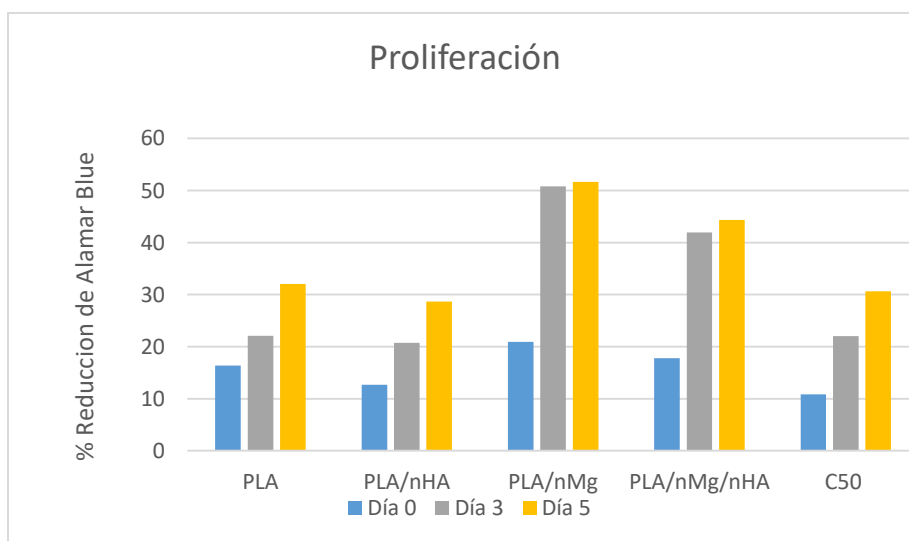


Figura 21. Proliferación celular en cada andamio. Se evaluó la viabilidad celular los días 0, 3 y 5 en cada andamio y se comparó con un control de 50,000 células.

10.10 Citotoxicidad de los productos de degradación

Se evaluó la citotoxicidad usando un 10% v/v del agua obtenida en la prueba de hidrólisis, en un cultivo con condiciones óptimas. Se utilizó la reducción de azul de alamar para ver la viabilidad celular y se tomó como referencia del 100% un cultivo en las mismas condiciones, pero adicionado 10% v/v de agua tridestilada (Tabla 6).

Tabla 6. Prueba de citotoxicidad.

Producto de degradación (10% v/v)	ARLW	% Viabilidad
PLA	52.392	81.45
PLA/nHA	59.721	92.84
PLA/nMg	56.044	87.13
PLA/nMg/nHA	58.021	90.20
Control (Agua tridestilada)	64.325	100.00

A partir del control (100 % viabilidad) y tras 24 horas de experimentación, el porcentaje de viabilidad más alto se obtuvo del degradado del andamio PLA/nHA con un 92.84%, seguido del PLA/nHA/nMg con un 90.20 %. El PLA/nMg obtuvo un 87% de viabilidad y, por último, el de PLA un 81.44% (Figura 22).

Todos los porcentajes fueron mayores al 80%, lo que significa que ninguno fue citotóxico.

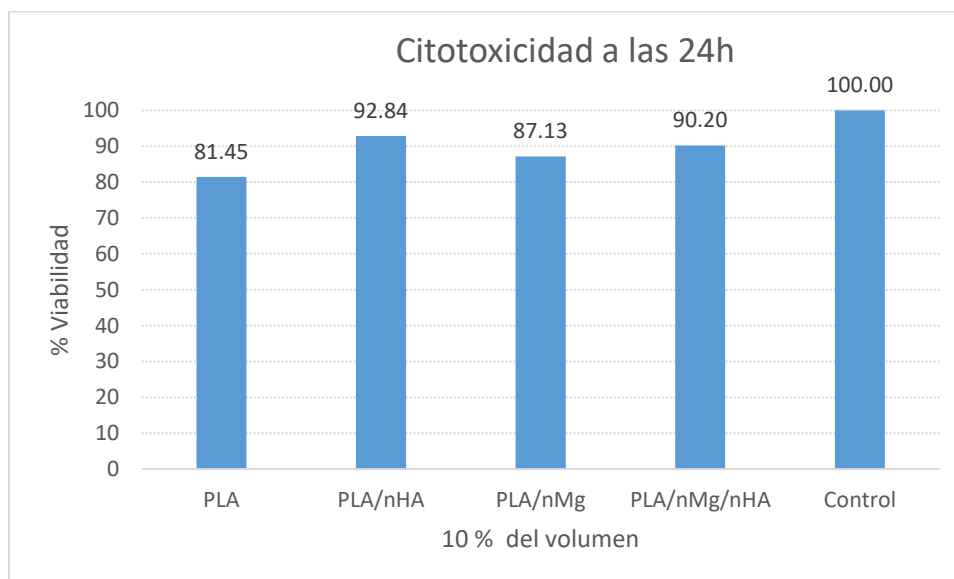


Figura 22. Prueba de citotoxicidad. La viabilidad de todos cultivos superó una viabilidad del 80%, lo cual nos indica que ninguno es citotóxico.

10.11 Determinación de formación de colágeno

Al observar las absorbancias del Picosirius para la determinación de colágeno, marcador temprano de diferenciación de preosteoblastos, el andamio que contenía mayor cantidad de colágeno fue el PLA/nHA/nMg que desde el día 3 fue mayor a cualquier otra composición; para el día 7 encontró su pico máximo de expresión y decayó para el día 21. En el caso del PLA y PLA/nHA el comportamiento fue similar, en el cual se incrementa la expresión conforme pasan los días y para el día 21 es reportada su máxima expresión, pero nunca alcanzando la expresión del andamio con la combinación PLA/nMg/nHA. En el caso del PLA/nMg, no existe un crecimiento en la expresión con el pasar de los días, pero su expresión inicial es mayor que la de los andamios PLA y PLA/nHA (Figura 23).

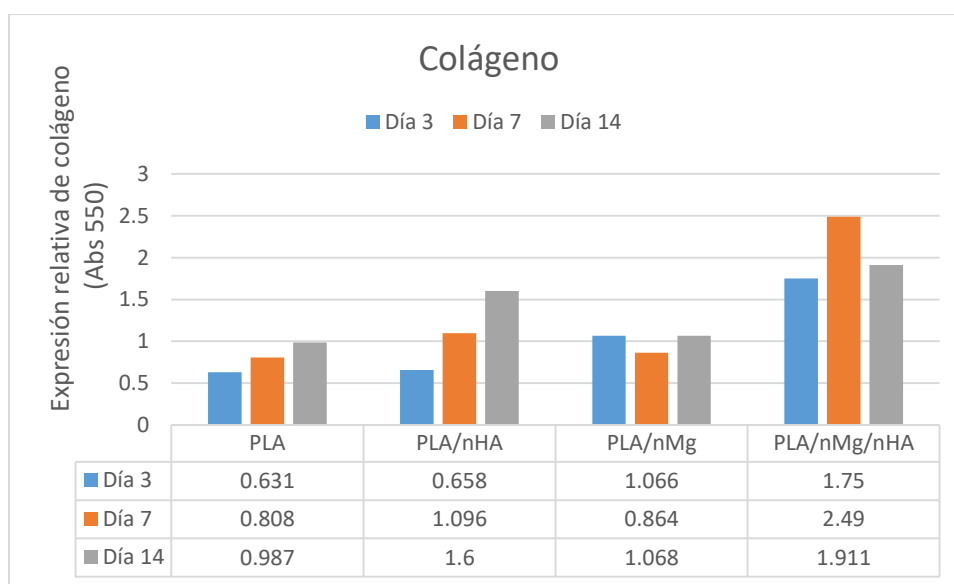


Figura 23. Determinación de colágeno con Picosirius.

10.12 Determinación de grado de mineralización

Para la determinación de mineralización con rojo de alizarina observamos que, al igual que pasa con el colágeno, el que mayor mineralización lograda tiene es el andamio PLA/nHA/nMg que desde el día 7 supera las demás composiciones y que alcanza su máximo el día 28, el cual es muy similar al alcanzado ya para el día 21.

En el caso del PLA, lo que se observa es que existe un crecimiento del día 7 al 14 de experimentación, pero decae ligeramente para el día 21 y se recupera para el día 28.

Para el andamio PLA/nHA observamos un crecimiento al pasar los días, llegando a un pico máximo el día 21 y el cual decae para el día 28.

En la mezcla de PLA/nMg observamos una expresión similar al andamio PLA/nHA/nMg para el día 7, pero ésta decae al pasar de los días hasta un mínimo el día 21, el cual se asemeja al comportamiento del andamio de PLA, el cual igualmente se recupera para el día 28, pero por debajo de la mineralización inicial (Figura 24).

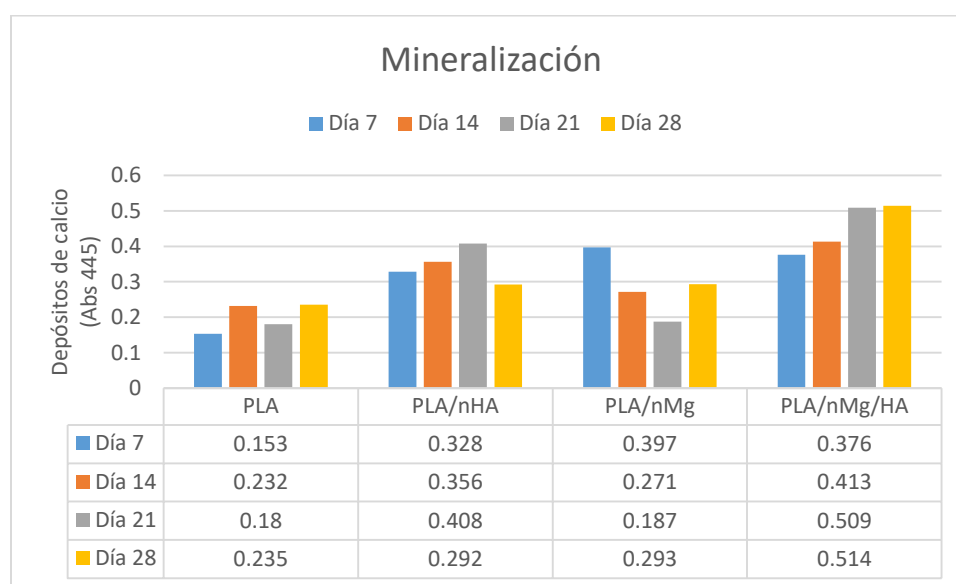


Figura 24. Determinación de grado de mineralización con tinción de rojo de alizarina.

10.13 Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina

Para esta determinación se realizó el ensayo de 4-MUP en un lisado celular, el cual se normalizó con proteína total por Bradford. Para determinar el Bradford se realizó primero una curva utilizando BSA y se calculó una curva para ver el comportamiento lineal (Figura 25).

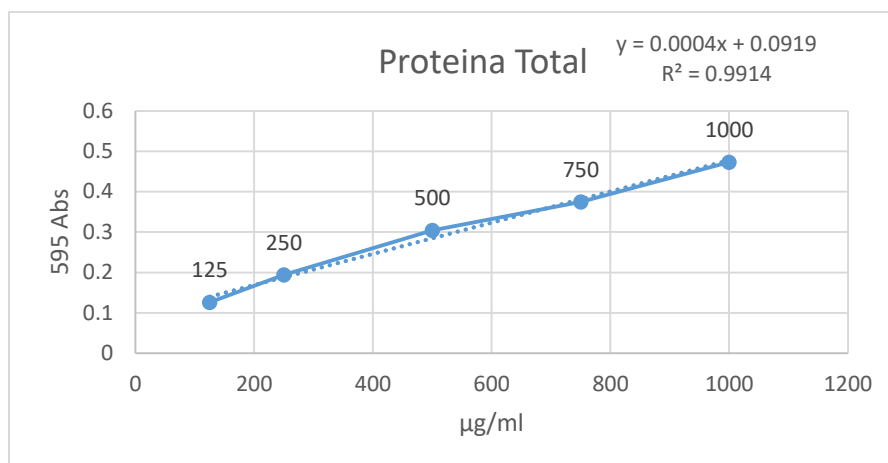


Figura 25. Curva estándar de proteína total determinada con Bradford. Curva realizada a partir diluciones de un estándar de BSA.

Se determinó proteína total de cada lisado (Tabla 7) y se determinó la fluorescencia del sustrato 4-MUP para determinar la actividad alcalino fosfatasa (Tabla 8). Se normalizaron los datos haciendo una relación entre la lectura de fluorescencia del 4-MUP y la determinación de la proteína total (URF/µg/ml), para determinar la actividad de la enzima respecto a la cantidad de proteína en el lisado (Figura 26).

Tabla 7. Proteína total de cada lisado celular.

µg/ml	PLA	PLA/nHA	PLA/nMg	PLA/nMg/nHA
Día 1	192.75	232.75	167.75	125.25
Día 5	182.75	300.25	145.25	297.75
Día 7	335.25	430.25	292.75	277.75
Día 10	355.25	435.25	67.75	307.75
Día 14	137.75	165.25	47.75	167.75
Día 21	562.75	520.25	245.25	195.25

Tabla 8. Determinación de 4-MUP por fluorescencia: determinación indirecta de la actividad alcalino fosfatasa en cada lisado celular.

URF	PLA	PLA/nHA	PLA/ nMg	PLA/nMg/nHA
Día 1	6.9685	8.5516	6.3585	3.7179
Día 5	13.0177	12.2487	6.9999	6.4502
Día 7	12.8470	11.6640	7.8583	6.7808
Día 10	10.1599	20.9377	17.8237	5.8027
Día 14	31.4709	40.9310	33.6549	27.5860
Día 21	135.7310	157.6880	202.3500	116.4390

La mayor actividad alcalino fosfato se encontró en el andamio PLA/nMg, alcanzando su pico máximo el día 21, el cual comienza con incremento significativo el día 10 hasta llegar al día 21. Para este día 21, el que también tiene un incremento significativo es el andamio PLA/nHA/nMg, el cual comienza el día 14 y se triplica para el día 21. Mientras que para los andamios PLA y PLA/nHA, se observó un incremento para el día 14, incluso superior al andamio PLA/nHA/nMg, pero el cual se mantiene para el día 21 (Figura 26).

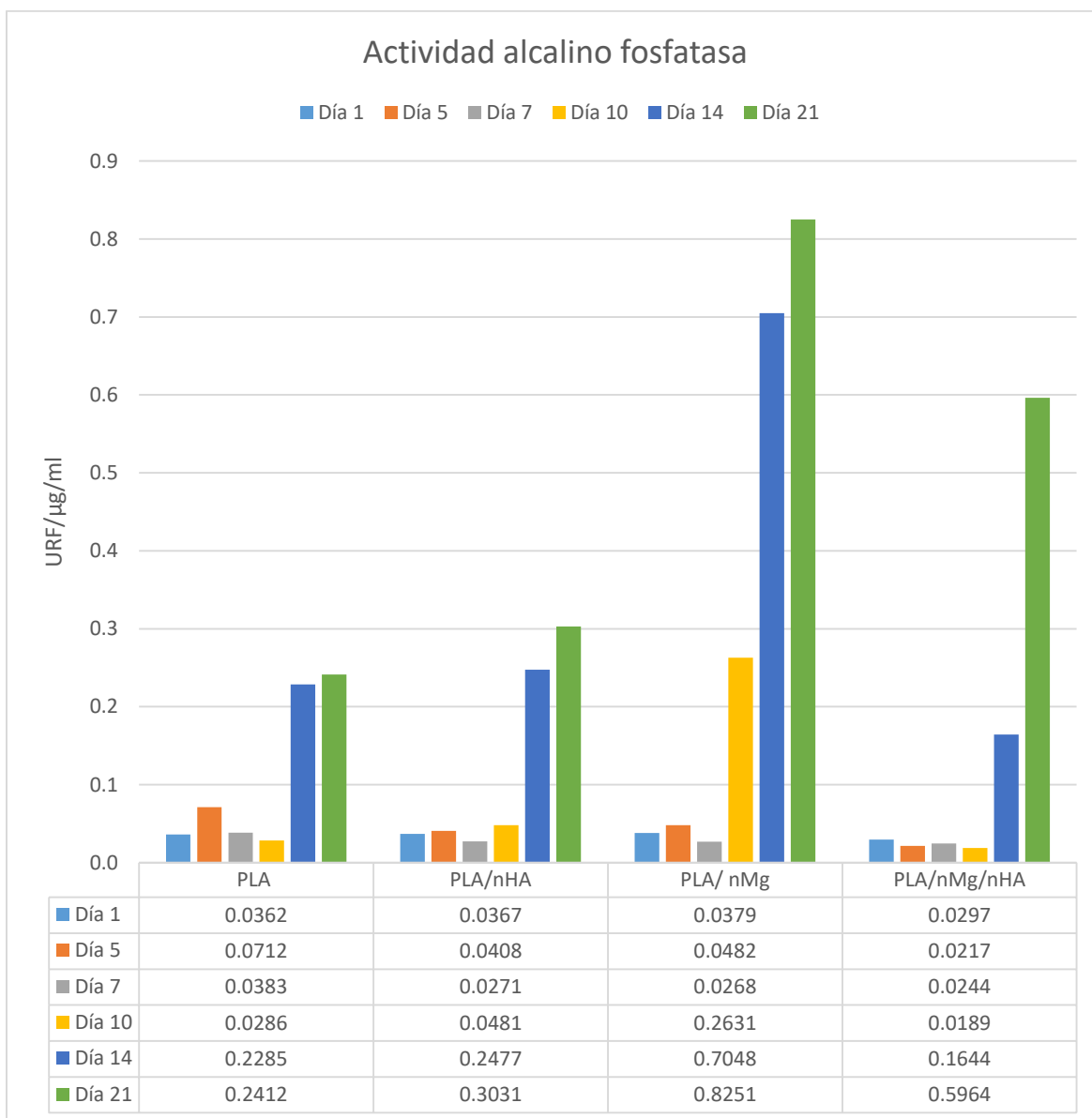


Figura 26. Actividad alcalino fosfatasa normalizada con proteína total.

10.14 Análisis celular por microscopía electrónica de barrido

Se realizó una comparativa por microscopía de los andamios en cultivo a diferentes días. En el PLA se observa como poco a poco el andamio va recubriendo de células, las cuales se observan como una pequeña capa viscosa y amorfa. Para el día 28 ya es visible gran parte de su mineralización (Figura 27).

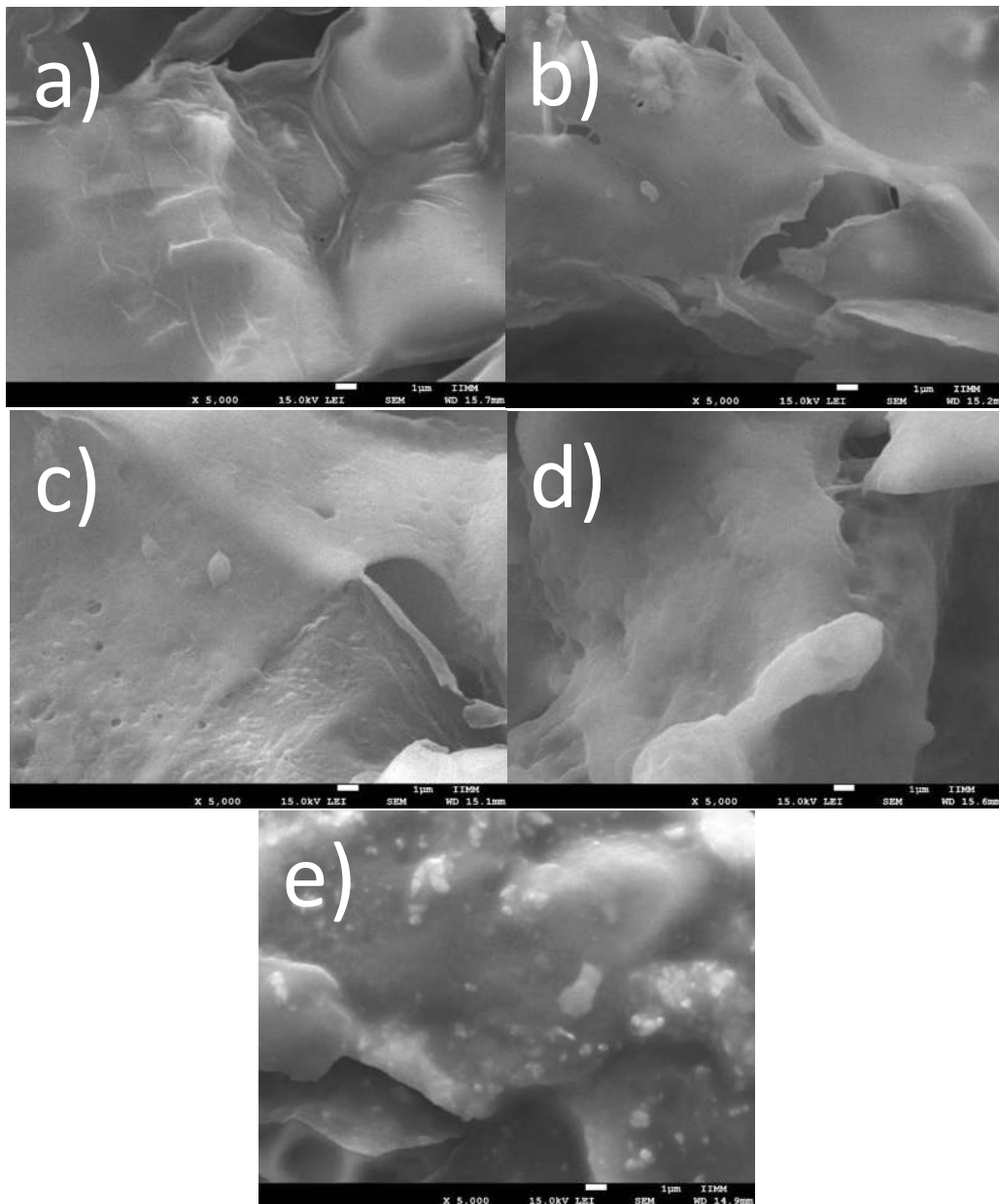


Figura 27. Adhesión y mineralización celular por MEB del andamio PLA. a) Andamio sin células. b) Día 0 de cultivo. c) Día 7 del cultivo. d) Día 21 del cultivo. e) Día 28 del cultivo.

En el andamio PLA/nHA también se observa cómo se va cubriendo de células al paso de los días, observando también parte de la mineralización, pero en este caso es más difícil de visualizar debido al contenido propio de hidroxiapatita del andamio (Figura 28).

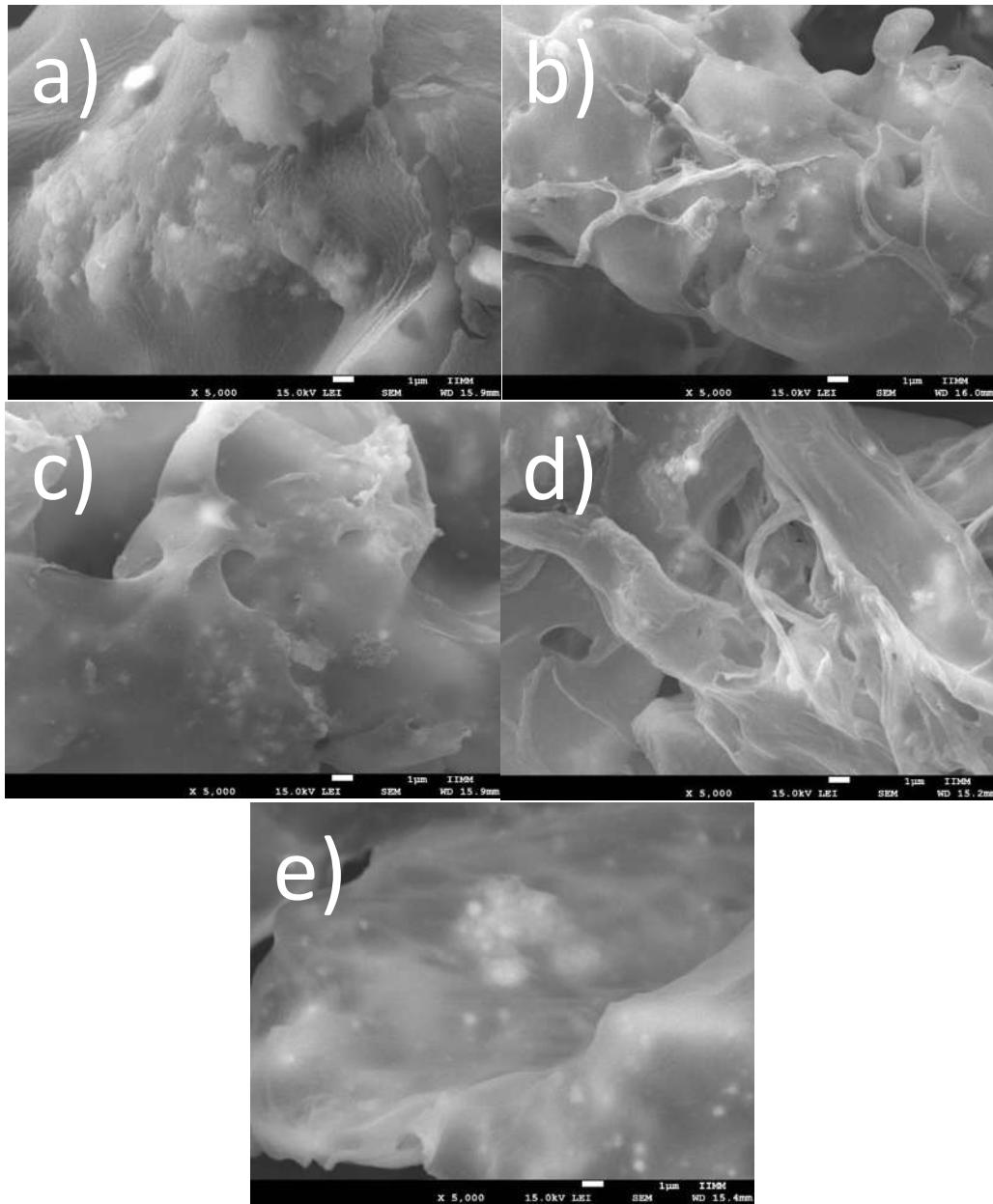


Figura 28. Adhesión y mineralización celular por MEB del andamio PLA/nHA. a) Andamio sin células. b) Día 0 de cultivo. c) Día 7 del cultivo. d) Día 21 del cultivo. e) Día 28 del cultivo.

Para los andamios PLA/nMg y PLA/nHA/nMg se observa la extensión de la capa celular día con día; llegando el día 21, la capa cubre casi totalmente el material (Figura 29). En el caso de PLA/nHA/nMg para el día 28 se observa una alta formación de hidroxapatita con estructuras que sobresalen de la capa celular en forma de pequeñas esferas (Figura 30).

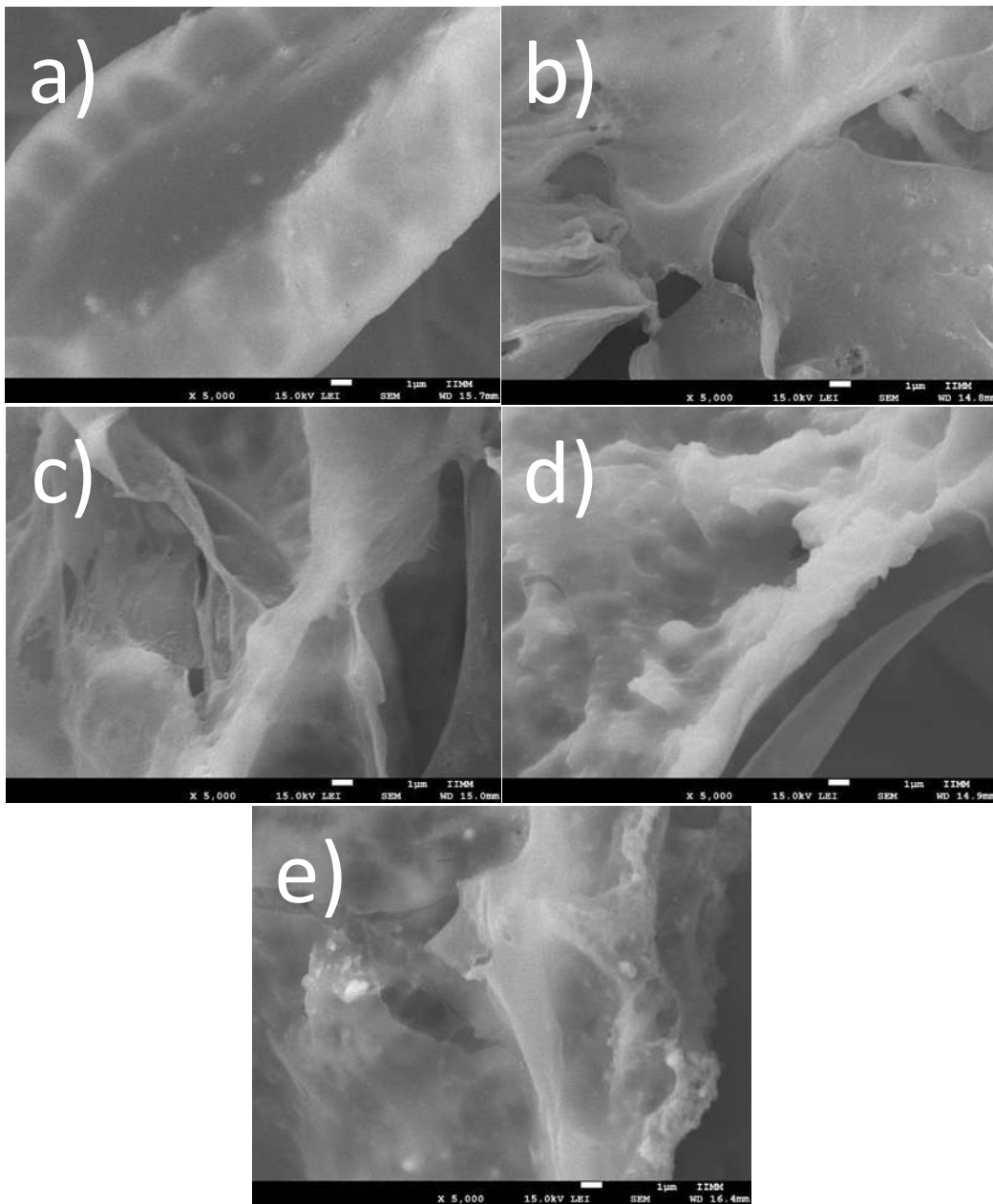


Figura 29. Adhesión y mineralización celular por MEB del andamio PLA/nMg. a) Andamio sin células. b) Día 0 de cultivo. c) Día 7 del cultivo. d) Día 21 del cultivo. e) Día 28 del cultivo.

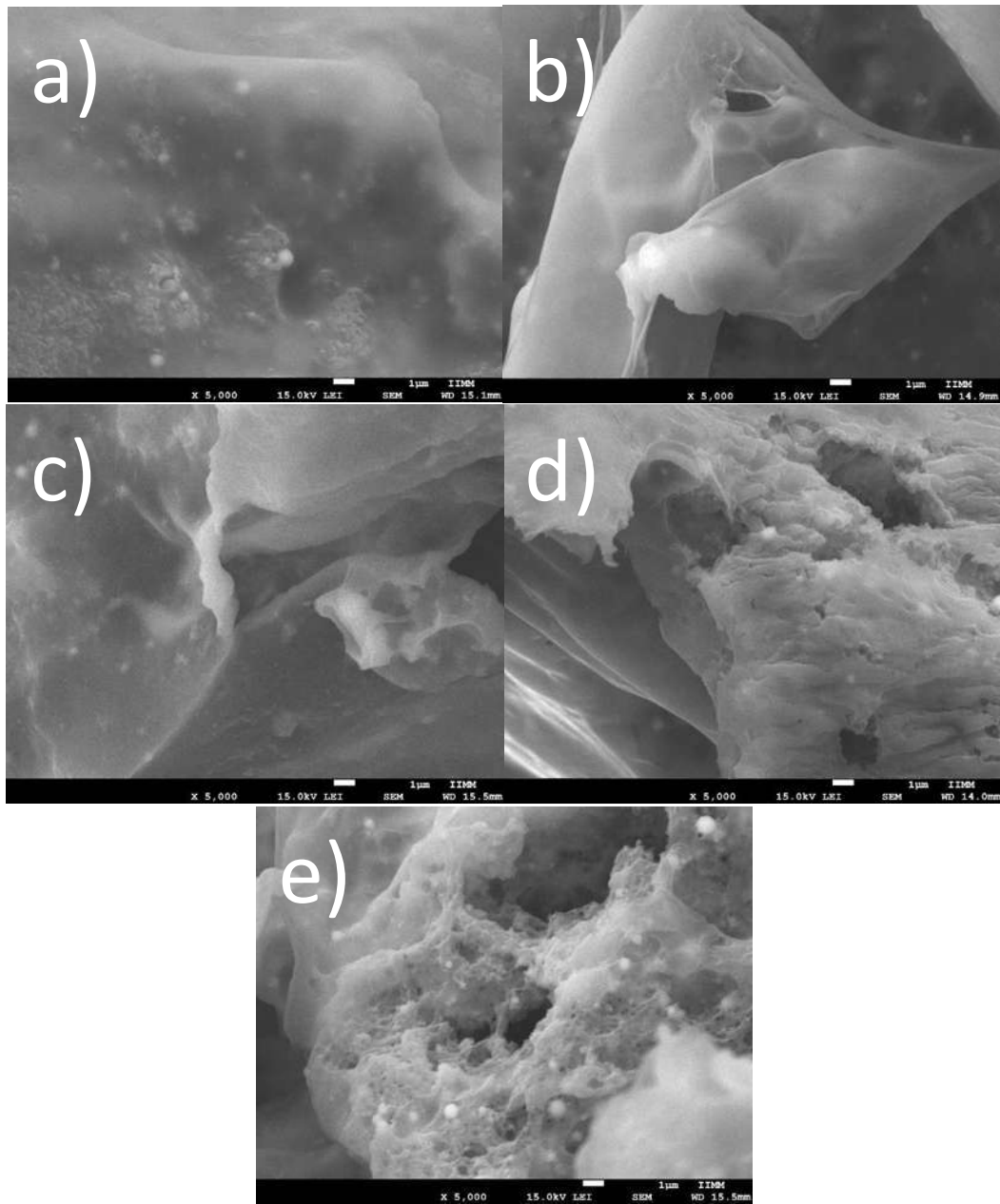


Figura 30. Adhesión y mineralización celular por MEB del andamio PLA/nMg/nHA. a) Andamio sin células. b) Día 0 de cultivo. c) Día 7 del cultivo. d) Día 21 del cultivo. e) Día 28 del cultivo.

11. RESUMEN DE RESULTADOS

Tabla 9. Resumen de resultados.

	PLA	PLA/nHA	PLA/nMg	PLA/nMg/nHA
Biocompatibilidad				
Tamaño de poro*	✓	✓	✓	✓
Porosidad*	✓	✓	✓	✓
SFB*	✓	✓	✓	✓
Citotoxicidad*	✓	✓	✓	✓
Biodegradabilidad				
pH en agua*				✓
pH en PBS*		✓	✓	✓
Osteoconducción				
Adhesión °	3°	4°	1°	2°
Proliferación °	3°	4°	1°	2°
Osteoinducción				
Colágeno°	4°	2°	3°	1°
Mineralización °	4°	2°	3°	1°
Fosfatasa alcalina°	4°	3°	1°	2°

*✓ = cumplió con las características deseadas.

° Se ordenaron los andamios que mejor cumplieran con las características deseadas siendo el 1° el mejor andamio y 4° el peor andamio.

12. DISCUSIÓN

Este estudio se creó con la intención de generar más datos sobre la utilidad de la incorporación de nanopartículas de magnesio a biomateriales poliméricos dirigidos a la regeneración ósea.

Actualmente existe una variedad de trabajos de regeneración ósea en los que se usan andamios de diversos polímeros incorporando magnesio en su composición; como el trabajo realizado por Johnson y colaboradores (2013) que utilizó películas de PLGA, con partículas de nanohidroxiapatita, recubiertas de magnesio; o el publicado por Man y colaboradores (2014) el cual utilizó andamios tridimensionales de policaprolactona recubiertos con micropartículas de magnesio. Sin embargo, la mayoría de ellos se centran en probar sus propiedades físicas o de degradación; como los trabajos realizados por Cifuentes y colaboradores (2016) que trabajan andamios tridimensionales no porosos con diversas formas de nanopartículas de magnesio, evaluando cómo estos cambios de forma modifican las propiedades de compresión o de degradación. También se pueden encontrar trabajos evaluando sus propiedades en contacto con un medio biológico, donde la mayoría se centran en su biocompatibilidad y la citotoxicidad del biomaterial en cultivo celular, como el trabajo publicado por Hichey y colaboradores (2015) que usó pequeñas láminas de PLA con nanopartículas de hidroxiapatita y nanopartículas de óxido de magnesio, las cuales adicionó a un cultivo primario de osteoblastos para probar adhesión y citotoxicidad.

Muy pocos trabajos van más allá en su conocimientos sobre cómo estos andamios pueden interactuar con un medio biológico; algunos trabajos, como los trabajos de Kum y colaboradores (2014) así como el trabajo de Park y colaboradores (2108), apuestan por observar el papel que puede tener el hidróxido de magnesio como antiinflamatorio, Kum en películas de PLA y Park en andamios de PGLA para regeneración de cartílago.

Hay que recordar que el hueso es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción, con una gran capacidad regenerativa; es justamente esto lo que los andamios de tercera generación buscan rectificar el camino en el uso de biomateriales, tomar esa capacidad

regenerativa que normalmente tiene el hueso y estimularla, creándose así el concepto de osteoinducción. Es aquí donde las nanopartículas de magnesio juegan un papel importante ya que éstas, al ser un componente normal en el hueso y que participan en una gran cantidad de procesos celulares, buscan que las células formadoras de hueso estimulen su desarrollo y, por consecuencia, la formación del hueso. El uso de magnesio como osteoinductor se ha propuesto en combinación con algunos otros metales (Park y cols., 2010). Este grupo evaluó cómo la adición de iones magnesio al titanio puede estimular a que se diferencien, además de ayudar a que las células proliferen mejor, usando diversos marcadores de diferenciación. Pero, aunque se sigue la propuesta del uso de nanopartículas de magnesio en combinación con otros materiales, una vez más, la mayoría se centran en estudios de resistencia y biocompatibilidad y dejan de lado la capacidad inductiva del magnesio. Por eso mismo, este trabajo muestra evidencia de que el magnesio en combinación con otros materiales como los polímeros, además de ayudar a la biocompatibilidad, puede generar una respuesta celular específica de inducción a la regeneración ósea.

Se utilizaron nanopartículas de hidróxido de magnesio para fabricar los andamios, debido a la facilidad de obtención y la buena biocompatibilidad de éstas. Las partículas obtenidas tuvieron tamaños menores a los 218 nm, tamaños muy inferiores a los reportados en reacciones similares (Henrist y cols., 2002), donde se estudiaron diversos métodos de obtención de estas nanopartículas y lograron obtener tamaños promedio de 500 nm. Además de obtener partículas de menor tamaño a lo reportado, no presentaron elementos contaminantes provenientes de la reacción de formación. Con este tamaño de partículas también fue posible observar una mejor integración en los polímeros, como se observa en los “mappings” del EDS en donde se aprecia una mayor dispersión de los elementos que forman las nanopartículas en la superficie del andamio.

Por otro lado, los andamios PLA/nMg/nHA obtenidos en este trabajo, tienen tamaños de poro de entre 45 -393 μm con una porosidad estimada del 58.42%, que los hace ideales para promover la osteogénesis. Karageorgiou y Kaplan (2005) establecen que el tamaño de poro debe ser mayor a 100 μm e idealmente se busca que sea >300 μm , pero sin pasar de los 500 μm lo que permitiría la infiltración celular para que las células proliferen dentro del andamio; además de que permitiría la entrada de nutrientes y salida de desechos. Asimismo, proponen

que la porosidad del andamio debe ser mayor al 50%, pero sin pasar del 70%, ya que el ser muy poroso o con poros muy grande puede favorecer la entrada de oxígeno que a su vez favorece la degradación del andamio a una velocidad desfavorable. Entonces, los andamios aquí obtenidos cumplen con las características deseables establecidas por Karageorgiou y Kaplan (2005).

Al sumergir los andamios en SFB se observó que en todas las composiciones existió formación de hidroxiapatita, esto nos habla de que la superficie de los andamios tiene una buena capacidad bioactiva. Pero además, se observó en el caso de los andamios que contienen magnesio, que la hidroxiapatita tiene una preferencia a formarse donde se encuentran las nanopartículas de magnesio. Esto también se vió reflejado en el andamio PLA/nMg/nHA ya que en el “mapping” se observó que la dispersión del magnesio es muy similar a la del calcio y el fósforo, elementos que componen a la hidroxiapatita. Al paso de los días en la solución, se observó que las nanopartículas de hidróxido de magnesio tienden a disolverse con mayor velocidad que las de hidroxiapatita o que el polímero mismo. Se observa que el andamio PLA/nMg para el día 21 ha perdido casi todas sus partículas de magnesio dejando pequeños espacios donde estaban éstas integradas al polímero. Para el polímero PLA/nMg/nHA no se observa esta pérdida tan acentuada, muy probablemente debido a un efecto protector de la hidroxiapatita, la cual se integra de igual manera al polímero y que parece tener afinidad por el magnesio, efecto que no se observa en el andamio PLA/nMg debido a que la hidroxiapatita formada por la solución de SFB está integrada al polímero superficialmente. Esta afinidad de las nanopartículas de magnesio con el calcio se reporta en los trabajos de Park y colaboradores (2018) y es justamente esta afinidad una de las causantes del factor antiinflamatorio de sus andamios, ya que la captación del calcio puede evitar el inicio de la actividad inflamatoria.

La pérdida de magnesio se ve reflejada al medir el pH del andamio sumergido en agua. El andamio PLA/nMg incrementa su pH rápidamente al liberar hidróxido del magnesio; esta elevación del pH también sucede en el andamio PLA/nMg/nHA pero no tan abruptamente. Aunque para todas las mezclas, al pasar los días, comienza un proceso de acidificación ocasionado por el ácido láctico liberado durante la degradación del polímero.

El pH que más se asemeja a un pH fisiológico de 7.4, ideal para un andamio creado para la regeneración ósea, fue sin duda el pH del andamio PLA/nMg/nHA sumergido en agua. Esto debido a la liberación gradual del magnesio, dada por la interacción de éste con la hidroxiapatita. En el caso de los andamios sumergidos en PBS, cuyo pH es similar a un ambiente fisiológico, todas las combinaciones de andamio, exceptuando el de PLA, permanecieron en un pH de 7.45 +/- 0.2; para el de PLA, el pH disminuyó por debajo de 7. Esto quiere decir que en un ambiente fisiológico todos los andamios poseen el potencial de ser altamente biocompatibles, siendo el andamio PLA el que posiblemente causase mayor daño. Cifuentes y colaboradores (2016), al igual que Brown y colaboradores (2014), reportan que en los andamios tridimensionales no porosos que contienen Mg, el pH en PBS se mantiene relativamente constante.

Los andamios con magnesio (PLA/nMg/nHA y PLA/nMg) fueron los que presentaron mejores resultados en los ensayos de proliferación y adhesión. La proliferación celular fue de casi el doble, en comparación con los andamios que no contienen magnesio; esto probablemente debido a la participación del magnesio en una gran cantidad de procesos celulares ligados a la proliferación, como la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.

Al poner en cultivo los productos de degradación del andamio sumergido en agua por 30 días, se observó que ninguno tiene un efecto citotóxico, acentuando así la biocompatibilidad de todos los andamios de este trabajo. Este resultado era de esperarse debido a que los componentes individuales se han reportado como no citotóxicos.

La capacidad osteoinductora de los andamios se determinó con 3 marcadores de diferenciación: formación de colágeno, mineralización y actividad alcalino fosfatasa. En relación al colágeno, Vergara-Hernández (2017), quien utilizó la línea celular MC3T3-E1 inducida a diferenciación con ácido ascórbico en las mismas condiciones que este trabajo, establece que el comportamiento que debe seguir un cultivo diferenciado es una expresión de colágeno con un pico máximo el día 7 que decae para el día 14. El único andamio que siguió este comportamiento fue el de composición PLA/nMg/nHA, con el pico máximo el

día 7 y la decaída para el día 14. Los andamios PLA y PLA/nHA para el día 14 aun no llegaban a su expresión máxima, e incluso para este día no llegan a la expresión que tiene el andamio PLA/nMg/nHA desde el día 3. En el caso del andamio PLA/nMg, aunque la expresión al día 3 es mejor que la de los andamios que no contienen magnesio, ésta decae para el día 7, día en que se esperaría el pico máximo de expresión y donde parece que se comporta como el andamio que sólo contiene el polímero (PLA).

Referente a la mineralización, Vergara-Hernández (2017) obtuvo un incremento en la mineralización a partir del día 7 y que llega a una expresión máxima para el día 21, en un cultivo inducido a diferenciación. En este trabajo, tanto en el andamio PLA/nHA como en el andamio PLA/nMg/nHA, existe un incremento en la mineralización hasta el día 21, pero en el andamio PLA/nHA se detiene para este día, mientras que el de PLA/nMg/nHA continúa mineralizando para el día 28, aunque de manera mínima, además de alcanzar una mineralización mayor que cualquier otro andamio desde el inicio del experimento. Es visible también una mayor mineralización en las microscopías del andamio PLA/nMg/nHA para el día 28, que coincide con la tinción de rojo de alizarina.

Para el andamio de PLA no se observó un incremento significativo en la mineralización a través de los días. Al igual que en el caso del colágeno, el andamio PLA/nMg presentó una mineralización mayor para el día 7, que la de los andamios que no tienen magnesio, pero comienza a decaer y a comportarse como el andamio de PLA. Se propone que en el andamio PLA/nMg se disuelven las nanopartículas de magnesio a una velocidad acelerada y que, con los cambios de medio, se pierde definitivamente la función del magnesio; esto explicaría el comportamiento similar al observado para el andamio que contiene únicamente PLA.

Finalmente, la actividad alcalino fosfatasa en un cultivo inducido a diferenciación mantiene una actividad basal hasta el día 7, que incrementa para el día 10 siendo su máxima actividad y decae nuevamente para el día 14 (Vergara-Hernández, 2017). En los datos obtenidos en este trabajo, ninguno se comportó de esta manera, todos incrementaron la actividad hasta el día 14, excepto el andamio PLA/nMg que comenzó desde el día 10 y continuo hasta el día 21. Para el día 21, la máxima actividad enzimática la obtuvo el andamio PLA/nMg seguida

del andamio PLA/nMg/nHA; para los andamios sin magnesio la actividad alcalino fosfatasa fue menor a la media alcanzada por los andamios con magnesio.

Hasta donde es de nuestro conocimiento, no hay trabajos de materiales poliméricos adicionados con magnesio donde se midan marcadores de diferenciación, por lo que los datos obtenidos son un aporte importante en el estudio de estos materiales. Uno de los pocos estudios donde se evaluaron marcadores y que utilizan magnesio es el realizado por Park y colaboradores en el 2010, pero fueron andamios de titanio adicionados con iones de magnesio. En éste se evaluaron marcadores como sialoproteína ósea, osteocalcina y fosfatasa alcalina a nivel transcripcional, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa y cuyos resultados del marcador de alcalino fosfatasa fueron similares a los obtenidos en este trabajo, con un aumento de la expresión hasta el día 14.

El andamio PLA/nMg/nHA fue el que presentó una mejor osteoinductividad, al ser el que mejor comportamiento obtuvo en las pruebas de los marcadores de diferenciación (ver resumen de resultados).

Con estos resultados queda claro el potencial de las nanopartículas de magnesio en materiales poliméricos y de cómo éstos al combinarse con otros compuestos, como la hidroxiapatita, pueden inducir una respuesta celular capaz de promover la proliferación y la diferenciación celular de preosteoblastos, así como reforzar la respuesta a la regeneración ósea. Además, es de destacar que el andamio propuesto PLA/nMg/nHA tuvo un comportamiento sobresaliente comparado con los andamios de referencia, con composiciones que actualmente se encuentran en el mercado de biomateriales aplicados en regeneración ósea. Actualmente no existe un material ideal que permita una regeneración ósea perfecta, por lo que es importante explorar nuevas ideas como las expuestas en este trabajo, que permitan diseñar andamios de biomateriales con nuevas características que mejoren las condiciones de salud de las personas que necesitan implantes de hueso.

13. CONCLUSIONES

Los andamios con composición PLA/nMg/nHA (85/10/5 wt%) presentan una mejora significativa en las características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoinducción y osteoconducción que los andamios que únicamente contienen PLA, PLA/nMg o PLA/nHA. Las nanopartículas de hidroxiapatita y de hidróxido de magnesio en el mismo andamio permiten la liberación más controlada del magnesio al ambiente donde es colocado el andamio, favoreciendo la proliferación y diferenciación de preosteoblastos.

14. REFERENCIAS

Allo, B. A., Costa, D. O., Dixon, S. J., Mequanint, K., & Rizkalla, A. S. (2012). Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(4), 432–463.

Alvarez, J. F. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 98–109.

Boissard, C. I. R., Bourban, P. E., Tami, A. E., Alini, M., & Eglin, D. (2009). Nanohydroxyapatite/poly (éster urethane) scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5(9), 3316–3327.

Baaij, J. H. F., Hoenderop, J. G. J., & Bindels, R. J. M. (2015). Magnesium in Man: Implications for Health and Disease. *Physiological Reviews*, 95(1), 1–46.

Brown, A., Zaky, S., Ray, H., & Sfeir, C. (2015). Porous magnesium/PLGA composite scaffolds for enhanced bone regeneration following tooth extraction. *Acta Biomaterialia*, 11(C), 543–553

Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 546–554.

Carlos, F., Clark, P., Galindo-Suárez, R. M., & Chico-Barba, L. G. (2013). Health care costs of osteopenia, osteoporosis, and fragility fractures in Mexico. *Archives of Osteoporosis*, 8(1), 125.

Cattalini, J. P., García, J., Boccaccini, A. R., Lucangioli, S., & Mouriño, V. (2013). A New Calcium Releasing Nano-composite Biomaterial for Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Procedia Engineering*, 59, 78–84.

Cifuentes, S. C., Gavilán, R., Liebllich, M., Benavente, R., & González-Carrasco, J. L. (2016). In vitro degradation of biodegradable polylactic acid/magnesium composites: Relevance of Mg particle shape. *Acta Biomaterialia*, 32, 348–357.

Cifuentes, S. C., Liebllich, M., Saldaña, L., Olivenza, M. A. P., Pérez, C., & Carrasco, J. L. G. (2016). Innovative biodegradable and bioabsorbable polymer matrix composites reinforced with magnesium base particles (PLA/Mg) for bone repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress.

Do, A., Khorsand, B., Geary, S. M., & Salem, A. K. (2015). 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 4(12), 1742–1762.

Fang, R., Zhang, E., Xu, L., & Wei, S. (2010). Electrospun PCL/PLA/HA based nanofibers as scaffold for osteoblast-like cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(11), 7747–7751.

Fernández-Tresguerres, I., Alobera, M. A., Del Canto, M. & Blanco, L. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11, 47-51.

Hickey, D. J., Ercan, B., Sun, L., & Webster, T. J. (2015). Adding MgO nanoparticles to hydroxyapatite-PLLA nanocomposites for improved bone tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 14, 175–184.

Johnson, I., Akari, K., & Liu, H. (2013). Nanostructured hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite coating for controlling magnesium degradation in simulated body fluid. *Nanotechnology*, 24(37).

Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907–2915.

Kum, C. H., Seo, S. H., Kang, S. N., Park, B. J., Ahn, D. J., Joung, Y. K., & Han, D. K. (2014). Effect of magnesium hydroxide nanoparticles with rod and plate shape on mechanical and biological properties of poly(L-lactide) composites. *Macromolecular Research*, 22(9), 1032–1041.

Larena-Pellejero, A. (2007). Aplicaciones de nuevos nanomateriales en cirugía ortopédica y traumatología. *Patología Del Aparato Locomotor*. 5(2):116-124.

Lee, H. W., Seo, S. H., Kum, C. H., Park, B. J., Joung, Y. K., Son, T. Il, & Han, D. K. (2014). Fabrication and characteristics of anti-inflammatory magnesium hydroxide incorporated PLGA scaffolds formed with various porogen materials. *Macromolecular Research*, 22(2), 210–218.

Liao, G. Y., Jiang, S., Xia, H., & Jiang, K. (2012). Preparation and Characterization of Aligned PLLA/PCL/HA Composite Fibrous Membranes. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 49(11), 946–951.

Man, H., Chu, P. K., Leung, F. K. L., Cheung, K. M. C., Luk, K. D. K., & Yeung, K. W. K. (2014). Engineered polycaprolactone – magnesium hybrid biodegradable porous scaffold for bone tissue engineering. *Progress in Natural Science: Materials International*, 24(5), 561–567.

Mellibovsky, L., & Díez, A. (2006). Qué significa la calidad ósea. *Seminarios de La Fundación Española de Reumatología*, 7(4), 165–176.

Mallick, S., Tripathi, S., & Srivastava, P. (2015). Advancement in Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Review. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 10, 37-54.

Murphy, C. M., O'Brien, F. J., Little, D. G., & Schindeler, A. (2013). Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European Cells and Materials*, 26, 120–132.

O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95.

Park, J. W., Kim, Y. J., Jang, J. H., & Song, H. (2010). Osteoblast response to magnesium ion-incorporated nanoporous titanium oxide surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 21(11), 1278–1287.

Park, K. S., Kim, B. J., Lih, E., Park, W., Lee, S. H., Joung, Y. K., & Han, D. K. (2018). Versatile effects of magnesium hydroxide nanoparticles in PLGA scaffold-mediated chondrogenesis. *Acta Biomaterialia*, 73, 204–2016.

Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, 11(5), 18–25.

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

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

Vergara-Hernández, J.A. (2017). Evaluación de la eficacia de la osteoinducción y osteoconducción durante la interacción de preosteoblastos de ratón (MC3T3-E1) con biomateriales a base de poliuretano e hidroxiapatita. Trabajo para optar el título de Química Farmacobióloga. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chavez”.

Wang, M. (2007). Materials selection and scaffold fabrication for tissue engineering in orthopaedics. *Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bone and Scaffold Materials: Techniques and Applications*, (c), 259–288.

Wu, S., Liu, X., Yeung, K. W. K., Liu, C., & Yang, X. (2014). Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 80, 1–36. JOUR.