



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Facultad de Odontología

Biología Bucal

Caracterización de Membranas Electro-hiladas para su Aplicación en el Área Dental

T E S I S

Que para optar por el grado de:

Doctor en Ciencias

P R E S E N T A

M.C. José Luis Suárez Franco

Director de Tesis:

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

DEPeI Facultad de Odontología

Ciudad Universitaria, CD.MX. Enero 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, por haberme brindado la oportunidad de ingresar al mundo de la investigación y también por ser más que tutor, por ser un gran amigo.

Se agradece la colaboración del Laboratorio de Materiales Avanzados del Instituto de Física de la U.N.A.M., en especial a la Dra. Cristina Zorrilla Cangas y al Dr. Jesús A. Arenas Alatorre, en la adquisición y caracterización de los espectros de mRAMAN, presentado en el presente trabajo.

Se agradece al Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP), con número de proyecto PROMEP/103.5/10/5701 (UV-555), por el financiamiento para realizar los estudios de doctorado de un servidor.

Se agradece el apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM: PAPIIT IN-210815 que ha permitido la realización de esta investigación.

Se agradece al Dr. Fernando Suaste Olmos, por la asesoría y por su excelente asistencia técnica durante el desarrollo de esta investigación.

Dedicatorias

A mis padres por el apoyo incondicional brindado a lo largo de mi vida

A Claudia, por ser cómplice de todas mis locuras

A mi hermana y mi cuñado Oscar por ser un siempre un gran ejemplo de lucha y superación

A mi abuelo, aún puedo escucharlo diciéndome “animo gacelín”

A mis amigos del laboratorio: Iri, Febe, Vla, Osmar, Laurita, Miguel, Gaby.

A los doctores: Dra. Patricia González Alva, Dra. Jeannette Serrano Bello, Dra. Adriana Patricia Pérez Sorcia, Dr Eduardo Villarreal Ramírez, por compartir su conocimiento.

Abreviaturas

PCL	Policaprolactona
PLA	Poliácido láctico
BMP	Proteína morfogenética de hueso
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
COL I	Colágena tipo I
GAG	Glucosaminoglucano
CO ₂	Dioxido de carbon
SEM	Microscopía electrónica de barrido
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
DC	Corriente directa
TFE	2,2,2-trifluoroetaol
HFP	1,1,1,3,3,3-hexafluoruro-2-propanol
CHCl ₃	Cloroformo
α -MEM	Medio mínimo esencial
DMEM	Medio modificado Dulbecco's
SFB	Suero fetal bovino
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos
FTIC	Isotiocinato de fluoreseína
APC	Células presentadoras de antígeno
HCL	Ácido clorhídrico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
MTT	(3-[4,5-dimetiltiazol-2-y]-2-5 bromuro difeniltetrazolio)
ALP	Fosfatasa alcalina
OPN	Osteopontina
PDL-29	Proteína del ligamento periodontal 29
PDL-48	Proteína del ligamento periodontal 48
μ CT	Microtomografía

Índice

Resumen	7
Abstract	8
1 Medicina regenerativa y bioingeniería de tejidos	9
2 Matriz-extracelular	11
3 Técnica de electro-hilado	11
4 Polímeros.....	12
5 Tecnología de capa celular	14
6 Justificación	16
7 Objetivos generales y específicos.....	18
8 Hipótesis	20
9 Metodología	21
9.1 Técnica de electro-hilado	21
9.1.1 Diseño de andamio.....	21
9.2 Ensayos biológicos	22
9.2.1 Aislamiento y cultivo celular.....	22
9.2.2 Cultivo de células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea	23
9.2.3 Caracterización de las células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal	24
9.3 Biocompatibilidad celular	25
9.3.1 Ensayo de Adhesión Celular	25
9.3.2 Ensayo de Viabilidad Celular (Citotoxicidad).....	26
9.4 Cultivo tridimensional	28

9.4.1	Caracterización del tejidos mineral depositado	28
9.4.2	Caracterización por FTIR.....	29
9.4.3	Caracterización por RAMAN.....	29
9.4.4	Caracterización por microtomografía.....	30
10	Resultados	30
10.1	Síntesis de andamios nano-fibrilares	31
10.2	Caracterización por medio de FTIR.....	32
10.3	Adhesión celular.....	33
10.4	Proliferación celular	34
10.5	Interacción célula-material	35
10.6	Caracterización de los cultivos 3D por SEM	36
10.7	Caracterización de los cultivos 3D por microscopía confocal.....	36
10.8	Caracterización de cultivos 3D por FTIR.....	38
10.9	Caracterización de cultivos 3D por RAMAN	40
10.10	Caracterización de cultivos 3D por μ CT	42
10.11	Caracterización por medio de RT-PCR	43
11	Discusión	44
12	Conclusiones	49
13	Perspectivas de la Investigación	50
14	Referencias.....	51
15	Anexo artículo	57

Resumen

La ingeniería de tejidos es una disciplina relativamente nueva, que se encarga de la búsqueda de estrategias en los tres diferentes campos que la componen como son la ciencia en materiales, células troncales y señales moleculares, con la búsqueda del estándar de oro que es regenerar los tejidos perdidos ya sea por trauma o por enfermedad. En este trabajo se realizó la síntesis y caracterización de andamios poliméricos que simulen las propiedades físico-químicas de la matriz celular de los tejidos que forman los tejidos de sostén del órgano dentario, con la finalidad de saber si estos andamios además de ser biocompatibles, inducen a mejor la respuesta biológica de células mesenquimales estromales tanto de médula ósea como de ligamento periodontal. Los resultados fueron la síntesis de andamios nanofibrilares que mostraron ser biocompatibles con las células mencionadas, además de inducir bajo ciertas condiciones la síntesis de tejido mineral. Este andamio podría en un futuro servir para mejorar la regeneración de los tejidos de soporte del diente, aunque, se necesita una investigación pre-clínica para determinar si existen aún riesgos, antes de pasar a ser utilizados en pacientes en la clínica dental.

Abstract

The tissue engineering is a relatively new discipline, which is responsible for finding strategies in the three different areas that compose such as materials science, stem cells and molecular signals, with the search of gold standard that is regenerate tissues lost either by trauma or illness. In this thesis the synthesis and characterization of polymeric scaffolds that mimic the physicochemical properties of the extracellular matrix of the tissues that form the supporting tissues of the dental organ was synthetized in order to know if these scaffolds could be biocompatibles and induce a better biological response by the mesenchymal stromal cells both isolated from bone marrow and periodontal ligament tissues. The results were the synthesis of nanofibers scaffolds that showed to be biocompatible with the aforementioned mesenchymal stem cells, inducing under certain conditions the deposit and synthesis of mineral tissues. This scaffold could be used to improve tissue dental tissue regeneration, although a pre-clinical research is needed to determine whether there are still risks, before going on to be used in patients in the dental clinic.

1 Medicina regenerativa y bioingeniería de tejidos

La medicina regenerativa es una disciplina en donde se incluye la bioingeniería de tejidos, cirugía, trasplantes de órganos, ciencia en materiales, biología del desarrollo y la biología de células troncales. Esta disciplina tiene como objetivo fundamental, el regenerar órganos, sin embargo, dicha disciplina sigue en una constante y vertiginosa evolución, así como, incorporando nuevas disciplinas, ya que, en la actualidad se pretenden incluir biosensores, los cuales puedan detectar agentes que amenacen a determinado órgano, igualmente se está experimentando a últimas fechas la impresión 3D, en donde mediante el desarrollo de tintas biológicas, se puedan modelar con determinados programas computacionales los órganos y así trasladar este modelado en algoritmos matemáticos a una estructura en tres dimensiones, que además sea funcionales para reemplazar órganos perdidos por múltiples razones (Gurtner and Chapman 2016).

La bioingeniería de tejidos, es una disciplina relativamente nueva y con un crecimiento exponencial, ya que tiene como principal objetivo regenerar los tejidos que conforman los órganos del cuerpo humano que han sido dañados, ya sea, por trauma o enfermedad y en estos tiempos donde la tendencia mundial es aumentar la calidad y expectativa de vida de las personas cobra importancia (Figura 1) (Drisko 2001; Williams 2009; Malchesky 2015).

Para poder regenerar un tejido, entran en juego una serie de factores fundamentales, los cuales tienen que estar actuando en sinergia para poder lograr el objetivo, que es devolver la forma y función del órgano en cuestión. Dentro de

estos tres factores el primero de ellos, es el diseño y fabricación de andamios que simulen las propiedades tanto físicas, químicas y mecánicas de la matriz extracelular nativa, en donde se encuentran sostenidas las células propias de cada órgano (Reilly and Engler 2010; VadalÃ , Mozetic et al. 2012 ; Matsuura, Utoh et al. 2014). En segundo lugar se encuentran las propias células, dentro de este apartado existen gran cantidad, sin embargo, las más prometedoras son las células troncales mesenquimales, ya que éstas, presentan una gran capacidad de proliferación, así como propiedades de inmunoregulación (Dominici, Le Blanc et al. 2006; Wada, Menicanin et al. 2009), que es importante a la hora de pensar en un rechazo que podrían presentar células ya comprometidas con un fenotipo determinado, finalmente dentro de las características a destacar de estas células, es que pueden ser inducidas a cualquier tipo de linaje celular, esto es una ventaja ya que dependiendo el tipo de tejido que se esté buscando regenerar es el tipo de inducción que se le deberá proporcionar (Rodriguez-Lozano, Insausti et al. ; Ashri, Ajlan et al. 2015; Zhu and Liang 2015). En tercer lugar, tenemos a las señales moleculares, donde principalmente se encuentran los factores de crecimiento y de diferenciación, como son la superfamilia de factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual es un gen que regula una serie de genes que inducen funciones específicas a las células, así mismo, la familia de la proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), en específico la BMP-2 y BMP-7, que se utilizan en la regeneración de defectos de tejido óseo (Marx ; VadalÃ , Mozetic et al. 2012; Zhu and Liang 2015; Fawzy El-Sayed and DÃ¶rfer 2016)

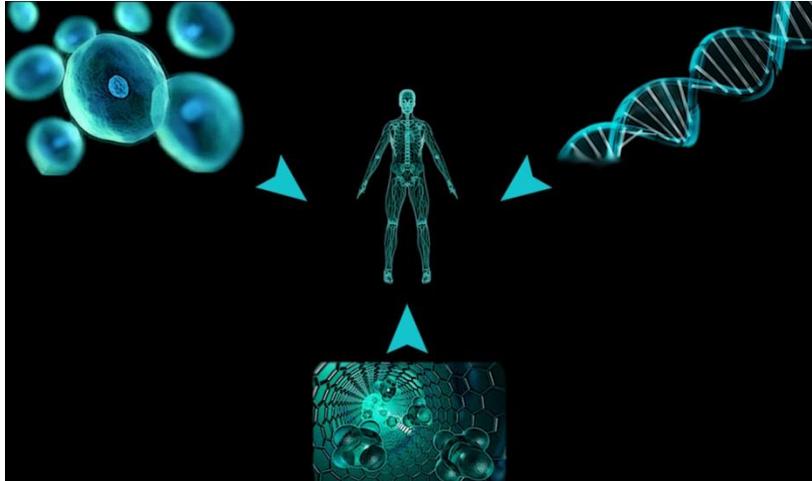


Figura 1. Ilustración de la interacción de andamios, células y señales moleculares, para hacer posible la regeneración de tejidos y órganos.

2 Matriz Extracelular

La matriz extracelular, es una red conformada por diferentes proteínas, dentro de la que destaca la proteína colágena I (COLI), la cual es una proteína conformada por la repetición de tres aminoácidos, que son: la prolina, hidroxiprolina y glicina. Además de la proteína colágena existen otras moléculas que juegan un papel importante, como son residuos de azúcares repetitivos llamados glucosaminoglucanos (GAG) y en menor medida otras proteínas. Esta matriz extracelular, le confiere la función de sostén a las células que conforman los tejidos, además de esto, la matriz extracelular posee funciones sensitivas y de señalización para los tejidos que conforma(Landis and Jacquet).

3 Técnica de electro-hilado

La técnica de electro-hilado, emerge como una alternativa altamente eficaz para la síntesis de andamios nanofibrilares (Figura 2) (Nseir, Regev et al.; Haaparanta,

Jarvinen et al. 2013). Ésta técnica tiene como fundamento la aplicación de un campo electromagnético a un polímero disuelto en diferentes tipos de solventes para generar sobre un colector metálico andamios en tres dimensiones, los cuales pueden estar compuestos de fibras tanto en escalas micrométricas y nanométricas, dependiendo la distancia que exista entre la punta de la jeringa que contiene el polímero y el colector metálico, dichas fibras presentan diferentes tipos de propiedades fisicoquímicas, dependiendo del polímero que se utilice para su preparación (Kai, Jin et al.; Kim, Park et al.; Liu, Thomopoulos et al.). A continuación se presenta una imagen del dispositivo de electro-hilado (Frenot and Chronakis 2003; Vadalá , Mozetic et al. 2012).

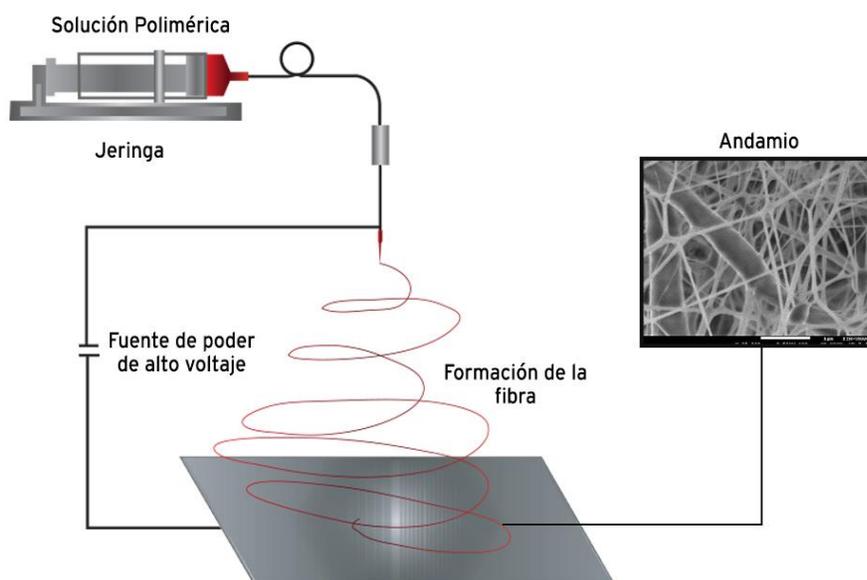
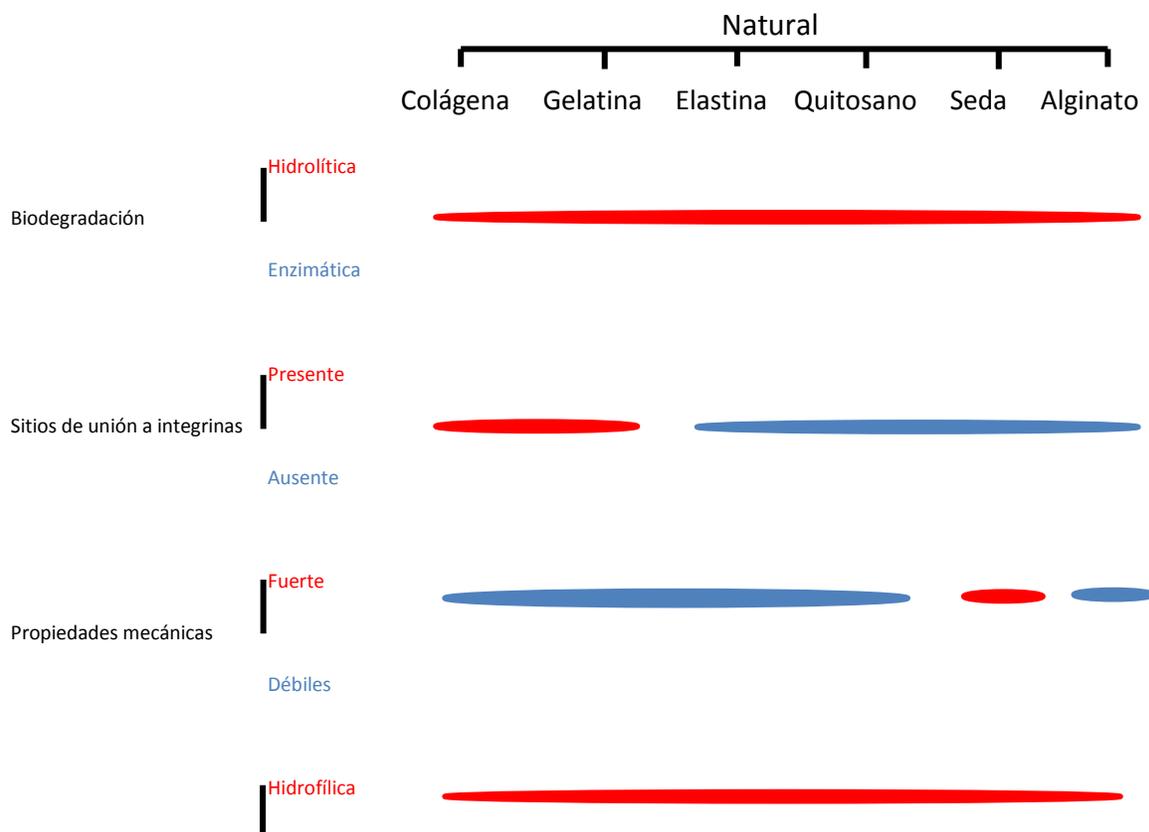


Figura 2. Ilustración del dispositivo de electro-hilado. El cual consta de un dispensador electrónico ajustable, en el cual se coloca una jeringa cargada con solución polimérica, un colector metálico y una fuente de poder de alto voltaje, cuyo electrodo positivo va conectado a la punta de la aguja y el electrodo negativo al colector metálico, cerrando el circuito y haciendo posible el depósito de fibras poliméricas, diseñando así andamios nano-fibrilares.

4 Polímeros

Los polímeros son biomoléculas sintetizadas por organismos vivos. Dentro de estos organismos vivos, podemos incluir plantas de muchos tipos, diferentes tipos de árboles e inclusive de bacterias. Estos materiales son escogidos como materiales que pueden ser utilizados en la medicina, ya que, son biodegradados debido a que átomos de oxígeno o nitrógeno son parte de su estructura principal, es decir, en su esqueleto químico. La biodegradación convierte estos polímeros en CO₂, agua, biomasa y otras sustancias que son recicladas por procesos biológicos (Yadav, Yadav et al.).

Existen diferentes tipos de polímeros con los cuales se pueden sintetizar mediante la técnica de electro-hilado andamios, dichos polímeros se pueden clasificar en dos grandes grupos dependiendo la naturaleza de su extracción, a continuación se ilustran (Figura 3) (Kim, Park et al. ; Gunn and Zhang 2010)



Propiedades físico-químicas

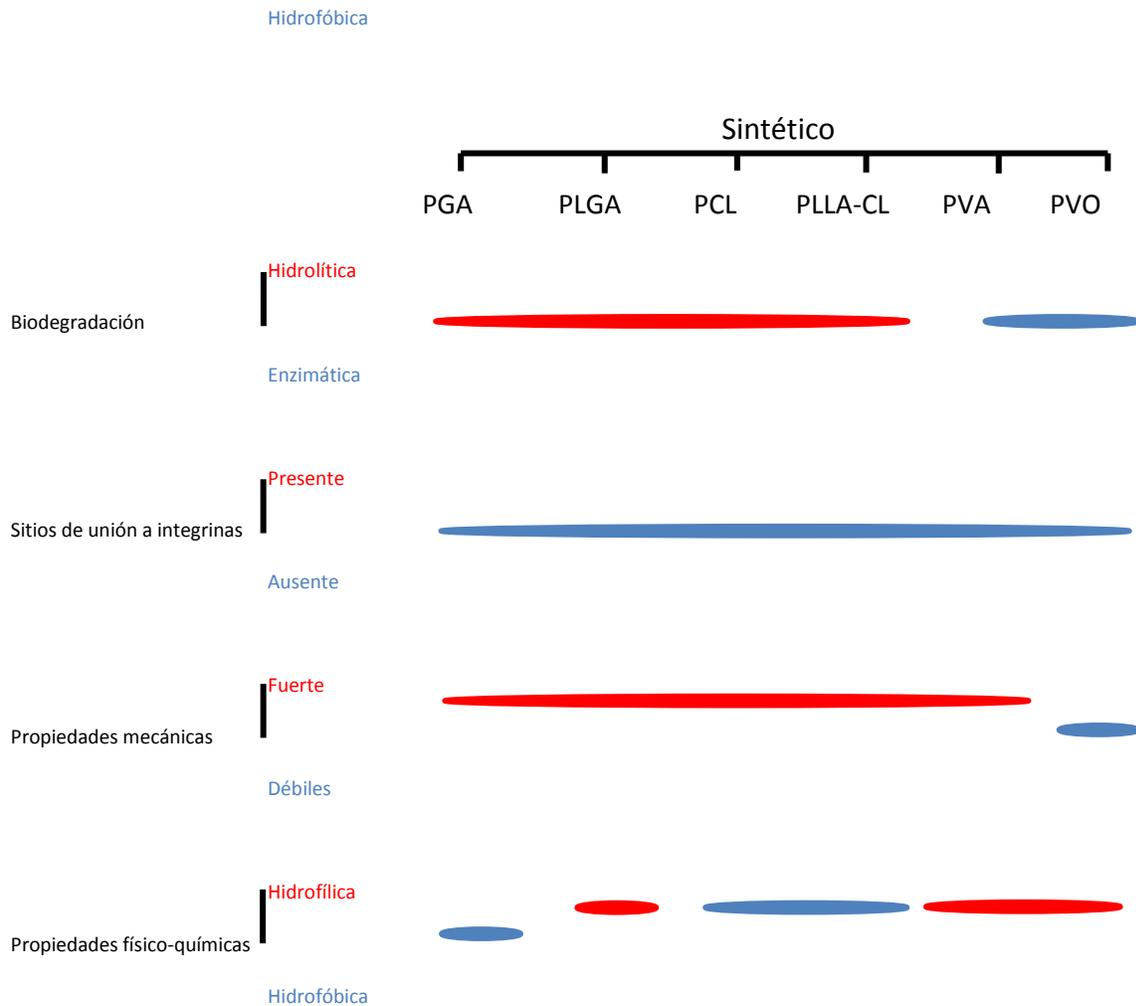


Figura 3. Tipos de polímeros utilizados para la fabricación de andamios fibrilares.

5 Tecnología de capa celular

La ingeniería de tejidos es una disciplina que se basa en la interacción de tres factores fundamentales, como son: los andamios, las células y las señales moleculares. Sin embargo existe una limitante en el diseño de órganos, ya que, éstos se conforman en tres dimensiones, lo que representa una limitante para los

investigadores (Martino, D'Angelo et al. 2012; Sakaguchi, Shimizu et al. 2013; Matsuura, Utoh et al. 2014).

No obstante, en los años recientes se ha venido innovando en el desarrollo de nuevas técnicas que permitan recrear y mimetizar la conformación tridimensional que presentan los tejidos y los órganos. Una de estas técnicas y que resulta muy prometedora en el área de la regeneración tisular, es el cultivo tridimensional en capas celulares (Meng, Leslie et al. 2014).

Esta técnica se basa en la capacidad anfipática que presenta el polímero poliisopropilacrilamida, este polímero posee la particularidad de ser hidrofóbico a 37°C lo que nos permite cultivar una capa de células y que estas se unan entre sí, mediante uniones intercelulares hasta llegar a confluencia, y posteriormente al cambiar la temperatura a 20°C, el polímero se torna hidrofílico, lo que nos permite un desprendimiento súbito de las células y que estas se mantengan unidas entre ellas, sin la necesidad de utilizar agentes enzimáticos para realizar este desprendimiento (Figura 4). Esta técnica se ha aplicado para la regeneración del ligamento periodontal, sin embargo, la capacidad es limitada debido a la labilidad de la capa celular, ya que, a pesar de que se formó tejido, no se pudo regenerar el cemento radicular, esto tal vez debido a que no se utilizó ningún tipo de andamio (Flores, Yashiro et al. 2008). Esto nos da la posibilidad de repetir el proceso y colocar capas sobre capas, para conseguir un tejido en tres dimensiones que puedan simular las condiciones en tres dimensiones que presentan los tejidos y órganos en el cuerpo humano (Martino, D'Angelo et al.

2012; Matsuura, Utoh et al. 2014; Meng, Leslie et al. 2014; Takahashi and Okano 2015).



Figura4. Plato de cultivo hecho con poli-isopropilacrilamida, el cual es hidrofóbico a 37°C e hidrofílico a 20°C (izquierda). Desprendimiento súbito de la capa celular, sin la necesidad de utilizar agentes enzimáticos. Ésta técnica, brinda la posibilidad de construir tejidos en tres dimensiones, imitando así la condiciones de los tejidos y órganos del cuerpo humano.

6 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En años reciente, las investigaciones enfocadas a la regeneración del tejido del cuerpo humano se han centrado con gran interés en explorar las aplicaciones biomédicas de las fibras poliméricas. Con un interés especial en las nuevas propiedades que presentan las membranas fibrilares en su superficie. Numerosos estudios han mostrado que los materiales nano-estructurados pueden influenciar la respuesta celular. Estos descubrimientos son excitantes porque el crecimiento celular se lleva a cabo en matrices extracelulares nano-estructuradas. La matriz de tejidos dentales en la cual los implantes son colocados posee una intrincada nanotopografía y las interacciones que se dan célula-matriz-sustrato ocurren en escalas nano-métricas del tipo fibrilar. Tal consideración ha generado un incremento en elucidar los efectos biológicos de las superficies fibrilares. Así este estudio pretende contribuir a entender cómo la topografía puede ser capaz de influenciar el ambiente celular y la diferenciación, sugiriendo nuevas líneas de investigación al proponer que la influencia puede estar relacionada en función de la morfología

superficial, es decir si nosotros manipulamos el tamaño de las morfologías superficiales de las fibras poliméricas para poder imitar la estructura física de la matriz extracelular nativa de los tejidos del cuerpo humano, llevando a que adquieran nuevas propiedades físico-químicas y de topografía superficial como interconexión de poros, una alta reactividad volumen/superficie; una gran resistencia ¿se aumentará la biocompatibilidad y la biomineralización generada por las células diferenciadas hacia fenotipos periodontales en este tipo de morfología? Si las membranas poliméricas están constituidas por partículas nano-estructuradas del tipo micro- y/o nano- fibrilar, ¿qué efecto tiene respecto a la morfología celular de células mesenquimales estromales diferenciadas hacia linajes periodontales? Si las membranas poliméricas están constituidas por nanofibras, ¿qué efecto tiene respecto al depósito de matriz extracelular y a la infiltración comparada con aquellas microfibrilares. Estas preguntas relacionadas al tema de biomateriales fibrilares con futuras aplicaciones en el sector salud son las que pretendemos responder, sin embargo, consideramos que en este estudio de tesis doctoral podemos obtener los aspectos básicos de cómo la topografía afecta la respuesta celular *in vitro*(Chen, Marino et al. 2006).

7 OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS:

a) Objetivo General

Caracterizar andamios nano-fibrilares poliméricos sintéticos, naturales y biodegradables de PCL, PCL/Gelatina y PLA sintetizados por la técnica de electrohilado que faciliten y guíen la respuesta celular -adhesión, proliferación y diferenciación- de las células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea y células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal.

b) Objetivos Específicos

Caracterización de andamios nano-fibrilares poliméricos de PCL, PCL/Gelatina y PLA que simulen propiedades biológicas (adsorción de proteínas y biodegradación), específicos para regenerar tejidos dentales.

Establecer el efecto de la morfología superficial de las nanofibras de PCL, PCL/Gelatina y PLA en la adhesión y proliferación de las células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea y células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal en cultivos celulares *in vitro*.

Determinar la diferenciación celular evaluando la interacción de las células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea y células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal sobre las fibras de PCL, PCL/Gelatina y PLA en un modelo de cultivo celular tridimensional como uso potencial en la bioingeniería de tejidos.

8 HIPÓTESIS

Los andamios nano-fibrilares de PCL, PCL/Gelatina y PLA guían la respuesta celular *-adhesión, proliferación y diferenciación-* de las células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea y células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal como uso potencial en la Bioingeniería de Tejidos Dentales.

9 METODOLOGIA

9.1 TECNICA DE ELECTRO-HILADO

9.1.1 Diseño de Andamios Electrohilados

EL aparato de electrohilado que fue utilizado para el diseño consiste de tres componentes principales: 1) un sistema de propulsión para las soluciones que se encuentran en la jeringa (Genie Plus k600, Kent Scientific) capaz de controlar el flujo de las soluciones; 2) Dos electrodos metálicos conectados entre sí; 3) una generador de polaridad única de alto voltaje (Gamma High Voltaje Research, mod. ES30) capaz de generar voltaje DC en rangos de 0 a 30 kV. El aparato propuesto se encuentra dentro de una cámara Plexiglass para aislar el sistema de campos externos y evitar cambios en las condiciones durante el proceso de electro-hilado. El proceso de elaboración de las membranas electro-hiladas, se llevó a cabo por la técnica de electro-hilado utilizando PCL con un peso molecular de 65,000 Da, Gelatina tipo B ambos adquiridos de la compañía SIGMA, Aldrich; PLA de un peso molecular de 192,000 Da. Se llevaron a cabo soluciones a base de los componentes de PCL (0,05 g/mL) y de Gelatina (0.05 g/mL) en 2,2,2-trifluoroetanol (TFE); 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) y cloroformo (CHCl_3) por separado, bajo agitación magnética a 37°C toda la noche. Para generar las soluciones de PCL y Gelatina dos proporciones de soluciones serán consideradas una de baja concentración (10% peso/volumen) y otra de alta concentración (80% peso/volumen) respectivamente. Para generar las membranas biohíbridas; las soluciones de PCL y Gelatina fueron mezcladas para obtener una única solución de PCL/Gelatina (50/50 peso/peso) en TFE con una concentración polimérica de

0.1 g/mL. La solución de PLA 10% se preparó disolviendo en una solución de etanol/cloroformo 90/10 v/v, 10 gr de PLA m/v con agitación magnética durante toda la noche.

Las soluciones de cada polímero (PCL, PCL/Gelatina y PLA), serán puestos en una jeringa de 5 mL con una aguja hipodérmica de 18 Ga conectada al polo positivo (BD Plastipack). El polo negativo estará ubicado en una plataforma metálica recubierto por papel aluminio para recolectar las fibras electro-hiladas. Durante la técnica de procesado por electro-hilado fueron considerados diferentes parámetros para optimizar la morfología final de las fibras (Alvarez-Perez, Guarino et al. 2010; Alvarez Perez, Guarino et al. 2010; Guarino, Urciuolo et al. 2012). En particular; la distancia entre la punta de la jeringa y el colector será fijada en 14 cm; el voltaje de 13 kV/cm y la velocidad del flujo será de 0.1, 0.5, 1 y 3 mL/h por un tiempo de depósito de 8 a 10 h para garantizar que sean procesadas la misma cantidad de volumen de las tres soluciones electro-hiladas

9.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS

9.2.1 Aislamiento y cultivo celular

Células troncales derivadas del ligamento periodontal (PDLSC)

El aislamiento y cultivo de las células de PDLSC fueron obtenidas de primeros premolares extraídos por motivos ortodóncicos. Las células troncales periodontales fueron removidas de la superficie de raíz dentaria utilizando el tercio medio de la raíz anatómica, utilizando una hoja de bisturí, posteriormente el ligamento periodontal se digirió mediante reacción enzimática, utilizando tripsina al 20% por 20 minutos a 37°C. La suspensión de células fueron tratadas con medio

fresco para detener la actividad enzimáticas, después la suspensión fue centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante fue descartado seguido de la adición de medio fresco, resuspendidas y sembrado en placas de 24 pozos, esto para la adhesión del tejido y cultivado en α -MEM suplementado con 10% de SFB (Sigma-Aldrich), 100 μ g/mL de penicilina/estreptomicina a 37°C en un ambiente húmedo de 5% con CO₂. Después de 24 hrs., el medio de cultivo fue cambiado para descartar las células no adheridas. Después de este tiempo, las células adheridas fueron tripsinizadas y pasadas a un frasco T25. Después de que el cultivo alcanzó confluencia después de 2 a 4 semanas, se consideró el pasaje número 1 (Flores, Yashiro et al. 2008; Tran, Doan et al. 2014).

9.2.2 Cultivo de células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea.

La línea celular de humano referente a las células madres mesenquimales derivadas de médula ósea fueron gentilmente donadas por el Dr Juan José Montesinos. Las células fueron extraídas de la médula ósea de pacientes y están fueron suspendidas en medio bajo en glucosa DMEM (Gibco BRL, Rockville, MD), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco BRL), 4mM L-glutamina 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, y 100 μ g/mL de gentamicina (todas las soluciones fueron obtenidas de Gibco BRL). La línea de células mesenquimales estromales, fue utilizada para caracterizar la biocompatibilidad y la bioactividad (modelos de diferenciación celular), sobre los andamios electrohilados de PCL y PCL/Gelatin. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de

37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad(Castro-Manreza, Mayani et al. 2014).

9.2.3 Caracterización de las células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal.

La caracterización inmunofenotípica y la capacidad de diferenciación de las células mesenquimales estromales se llevaron a cabo de acuerdo a lo previo descrito por Montesinos y colaboradores. Brevemente se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados con FITC, PE o APC, contra CD73, CD90, y CD45 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), CD105, CD 13, CD14, (Caltag, Buckingham, UK), y HLA-ABC,HLA-DR, CD31 y CD34 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), una vez realizado los ensayos se realizó el análisis citometría de flujo del cultivo de las células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal. Un total de 2×10^5 células, previamente bloqueadas con el bloqueador del receptor Fc (Human Blocking Reagent; Miltenyi Biotec), y resuspendidas en 100 mL de amortiguador de fosfato salino (PBS) con 3% de suero fetal bovino (SFB) y 1 mM de EDTA, y esto fue incubado con los anticuerpos mencionados anteriormente por 20-30 min. Estas células fueron subsecuentemente lavadas con 1 mL de PBS (con 3% de SFB y 1 mM de EDTA) y fijadas con solución de lisado FACS (BD Biosciences). Las células marcadas fueron analizadas por medio de equipo Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) y al menos 10,000 eventos por muestra fueron colectados. Los datos fueron analizados con el programa FlowJo ver. 2.6 (FlowJo LLC, Ashland OR, USA).

La diferenciación adipogénica y osteogénica se indujo mediante el Kit Stem Cells Kit™ (Stemcell technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada). La diferenciación adipogénica se determinó mediante la visualización de la presencia de vacuolas del reactivo Oil Red O-stained (Sigma-Aldrich) La diferenciación osteogénica se midió por medio de la tinción de la fosfatasa alcalina. La diferenciación condrogénica se indujo con el medio de inducción (Cambrex Bio Science, Walkersville, Inc., MD, USA), que fue suplementado con 10 ng/mL del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β , Cambrex). Las micromasas obtenidas fueron fijadas, incluidas y cortadas. Los cortes fueron teñidas con el reactivo de Azul de Alciano (Sigma-Aldrich).

9.3 Biocompatibilidad Celular

Los ensayos de biocompatibilidad de las células cultivadas sobre las superficies de las membranas electro-hiladas de PCL, PCL/Gelatina y PLA se evaluaron mediante los ensayos de; adhesión celular, de proliferación celular y de viabilidad celular.

9.3.1 Ensayo de Adhesión Celular

Para establecer el efecto de las membranas electro-hiladas sobre la adhesión celular, las células mesenquimales estromales y las células mesenquimales de fibroblasto periodontal, se cultivaron sobre la superficie de las membranas de PCL, PCL/Gelatina, y PLA en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de 2×10^3 y se cultivaron durante 4 y 24 hrs. Las células adheridas a las membranas electro-hiladas fueron evaluadas por medio de utilizar el ensayo de cristal violeta Brevemente; las células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea y

las células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal que se expandieron en cajas de cultivo de 75 cm², las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y diluidas en el medio de cultivo alfa-MEM a la concentración especificada párrafos arriba para ser sembradas sobre las membranas electrohiladas. Pasado el tiempo de incubación propuesto la adherencia celular fue evaluado por medio de cuantificar la absorbancia del colorante acoplado a la membrana plasmática de las células adheridas sobre los andamios que será extraída con 500µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. De la solución obtenida se tomaron 100µL que se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA y fue leído en un espectrofotómetro usando el filtro de 550 nm (Wallac Victor3 1420; PerkinElmer, Boston, MA). Los valores de la absorbancia obtenidos fueron extrapolados de acuerdo a una curva estándar para determinar la cantidad de células o el porcentaje de células adheridas a de las membranas electrohiladas de PCL y PCL/Gelatina. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre sustratos la misma placa de cultivo (plástico). Los experimentos de adhesión celular se realizaron por triplicado, repitiéndose por lo menos tres veces.

9.3.2 Ensayo de Viabilidad Celular (Citotoxicidad)

El análisis de la viabilidad celular, se llevó a cabo mediante el ensayo de azul de triazol (MTT), el fundamento de ésta técnica se basa en la habilidad de la enzima deshidrogenada mitocondrial para oxidar una sal de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y]-2-5 bromuro difeniltetrazolio) a un producto insoluble de color azul. Las células MSC fueron cultivadas a una densidad celular de 5.0×10^4 por triplicado por

3, 7, y 9 días de cultivo. Después de cada periodo experimental, las células fueron incubadas con MTT (50 mg/ml) a 37°C por 4 hrs. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante, a la caja de cultivo se le adicionó una solución con 0.04 M de ácido clorhídrico (HCl) en isopropanol y la placa se llevó a un lector de ELISA, para obtenerse la densidad óptica a una longitud de onda de 495 nm. Debido a que la generación del producto azul es (directamente) proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, la disminución de los valores que se obtengan en la absorbancia a 495 nm nos indicó una medida de la viabilidad celular. Los experimentos se realizaron por triplicado repitiéndose tres veces.

9.4 Interacción célula-material

Los análisis de la interacción de las células con los andamios se realizaron con el kit Cell Tracker Fluorescents. CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate). Este estuche contiene un colorante fluorescente adecuado para el control de los movimientos o localización celular. Después de incubarlo con las células, el medio de contraste es retenido, lo que permite el seguimiento de los movimientos celulares, el colorante tiene paso libre a través de la membrana. Se sembraron 1×10^4 células en los andamios, colocados en una placa de 48 pozos. Se dejaron por 24 horas. Posteriormente se lava con PBS (buffer salina fosfatos) y se incubaron a 37°C c/medio SRF/Cell Tracker a 1hr, pasando el tiempo indicado se retira el medio y se lava nuevamente con PBS. Se deja con DMEM/SFB durante 2hr. Por último se lavan con agua destilada y se

fijan con PFA 4%. Se observaron bajo un microscopio laser confocal con longitudes de onda de 492 y 517 nm (LASAF, Leica, Germany).

9.5 Cultivo tridimensional

Para llevar a cabo los cultivos 3D para los experimentos de bioactividad, se realizaron cultivos de las células troncales mesenquimales y de las células mesenquimales estromales de ligamento periodontal en capas tridimensionales. Brevemente; Las cajas de cultivo tratadas con polímeros que incrementan la adhesión celular se sembraron 2×10^6 células y se incubaron a 37°C por 3 horas; pasado el tiempo de incubación, las cajas se volvieron a incubar a 27°C para inducir una separación de la monocapa del polímero. Se extrajo lentamente para no distorsionar la monocapa, y se volvió a sembrar en otra caja donde previamente se ha sembrado con la misma cantidad de células antes mencionada, y se incubó a 37°C . Este procedimiento de cultivo en capas se continuó realizando hasta tener al menos de 4 a 6 capas celulares tanto de células troncales mesenquimales como de células mesenquimales estromales de ligamento periodontal (Flores, Yashiro et al. 2008; Tran, Doan et al. 2014). Ambas líneas celulares fueron tratadas con medio osteoinductor α -MEM, suplementado con 10% de SFB, $50 \mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato y 10^{-7} de dexametasona y una solución de antibióticos compuesta por penicilina (100 U/mL) y estreptomina ($100 \mu\text{g/mL}$).

9.5.1 Caracterización de Tejido Mineral Depositado

Se utilizaron técnicas de FTIR, RAMAN y microtomografía, para determinar las características de la fase mineral formada por las células tridimensionales, que

fueron mantenidas en diferenciación sobre los andamios hilados de PCL, durante 21 días.

9.5.2 Caracterización por FTIR

Los cultivos 3D de las células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea y de las células mesenquimales estromales derivadas del ligamento periodontal, que se cultivaron sobre los andamios de PCL, se sometieron a análisis espectroscópico infrarrojo transformado de Fourier utilizando el equipo IRAffinity-1S (SHIMADZU, Excellence in Science), haciendo 40 barridos por muestra en un rango de longitud de onda de 400nm a 4000nm, esto para localizar las bandas correspondientes a proteínas, carbohidratos, material genético y tejido mineral, depositado para determinar la síntesis de tejido mineral. El andamio de PCL carente de células fue utilizado como control donde se localizaron las bandas características del PCL.

9.5.3 Caracterización por RAMAN

Los cultivos 3D de las células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea y de las células mesenquimales estromales derivadas del ligamento periodontal, que se cultivaron sobre los andamios de PCL, se sometieron a análisis espectroscópico RAMAN utilizando el equipo DXR™ Raman Microscope (ThermoFisher, SCIENTIFIC), con el láser a una longitud de onda de 745nm, para localizar las bandas correspondientes a proteínas, carbohidratos, material genético y tejido mineral, depositado para determinar la síntesis de tejido mineral. El andamio de PCL carente de células fue utilizado como control donde se localizaron las bandas características del PCL Figura7.

9.5.4 Micro tomografía.

Las muestras se introdujeron a un microtomógrafo (Albira ARS, Oncovisión) donde el campo de visión se ubicó justo en medio de la muestra con una magnitud de corriente de 0.4 miliamperios (mA), un voltaje de 35 Kilovoltios (KV) y 1000 proyecciones para obtener imágenes de alta resolución. Posteriormente se reconstruyeron los 516 cortes que arrojó la adquisición de cada una de las muestras en el software del equipo. Para obtener las imágenes en 3D se procesaron dichas reconstrucciones en el software Osirix MD y se realizaron comparaciones entre los grupos. Para evaluar cuál de las muestras presentaba mayor densidad, se generó una ROI (región de interés) de 1 mm por lado en el centro de la muestra y se cuantificó por medio del programa PMOD la densidad de cada una.

10 Resultados

10.1 Síntesis de andamios nano-fibrilares

Se lograron sintetizar andamios nanofibrilares de PCL, PCL/gelatina y PLA desordenadas, mediante la técnica de electrohilado cuyo diámetro de fibra oscila entre 200 a 400 nm, lo cual nos indica que las condiciones establecidas, tanto de la preparación de la solución polimérica, como la de preparación del sistema son las adecuadas para la síntesis de andamios que simulen las características de la matriz celular nativa. Así mismo, se logró medir el tamaño de poro, es decir, el tamaño del espacio entre fibras que presenta el andamio, el cual oscila entre 900 a 2200 nm (Figura 5).

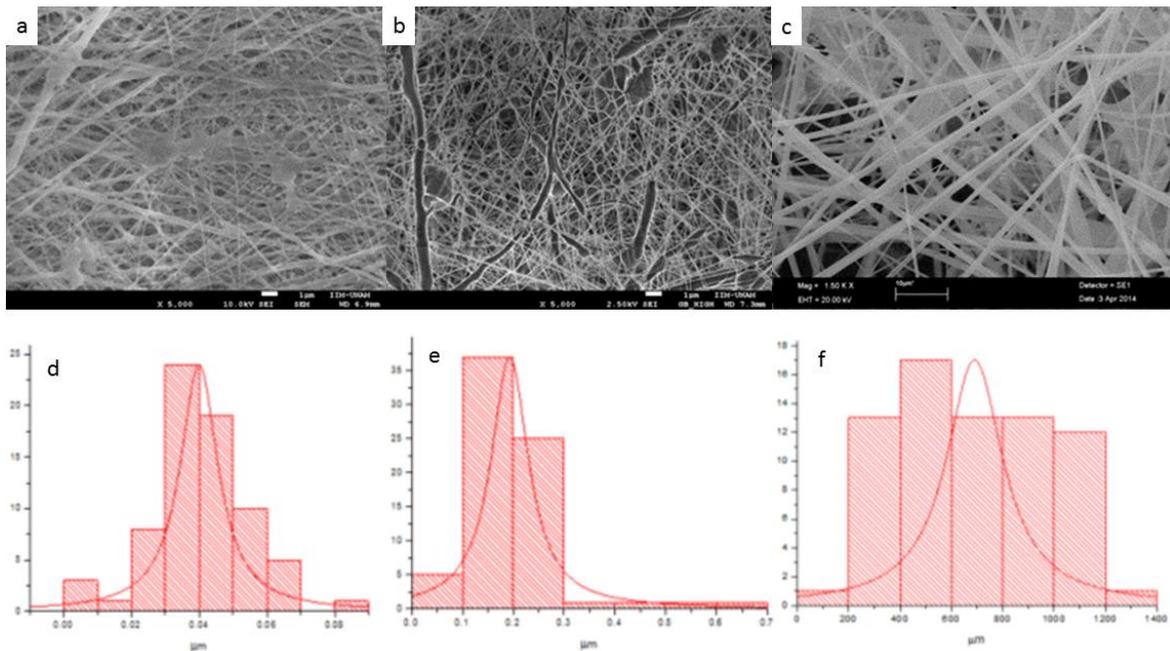


Figura 5. Micrografías electrónicas de barrido de las membranas hiladas de PLC (a), PCL/gelatina (b) y PLA (c). El análisis del tamaño de las fibras por el programa Images J nos arroja promedios de diámetro de 400 nm para las de PCL (d), de 200 nm para las de PCL/gelatina (e) y de 250 nm para las de PLA.

10.2 Caracterización por medio de FTIR

Para determinar la estabilidad de los andamios sintetizados, los andamios fueron caracterizados por medio de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

En la figura 6 se aprecian las bandas a 2949 cm^{-1} (CH_2 asimétrico), 2865 cm^{-1} (CH_2 simétrico), 1727 cm^{-1} (grupo carbonilo), 1293 cm^{-1} (C-O y C-C) y 1540 cm^{-1} (COC asimétrico) (Ghasemi-Mobarakeh, Prabhakaran et al. 2008) característicos del PCL. Asimismo, se observan las bandas correspondientes a las proteínas que aparecen aproximadamente en 1650 cm^{-1} (amida I) y 1540 cm^{-1} (amida II), que corresponden a las vibraciones de los enlaces C=O, N-H y C-N respectivamente. La banda en 1650 cm^{-1} es atribuida a la α -hélices y enrollamientos al azar correspondientes a la gelatina (Ki, Baek et al. 2005).

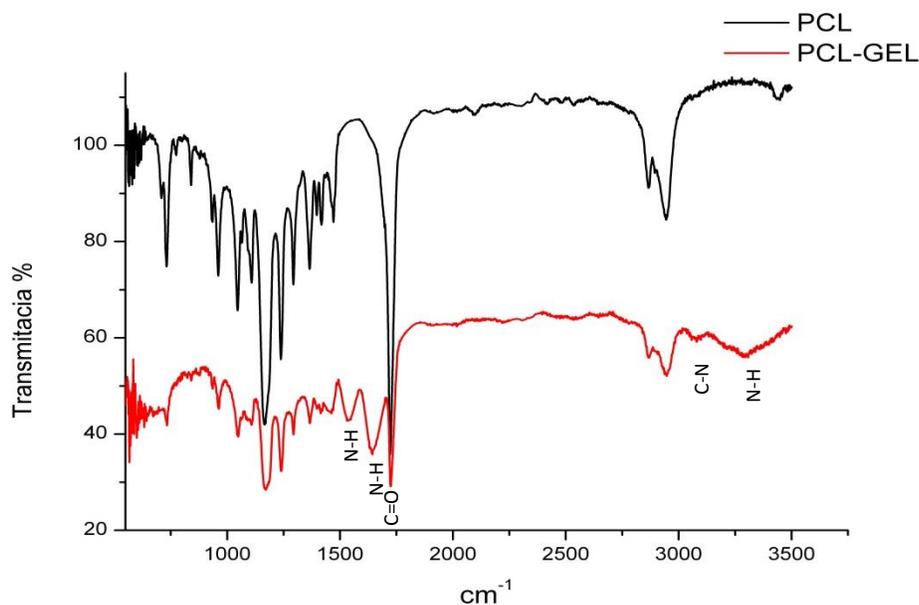


Figura 6. Espectros de FTIR de los andamios de PCL (a) y PCL/Gelatina (b) que corresponden a la vibración de los enlaces característicos del polímero y de la gelatina.

En la figura 7 se muestran las bandas a aproximadamente a 860 cm^{-1} que pertenece al C-COO, a 1180 cm^{-1} perteneciente al enlace C-O-C del grupo éster y a 1400 aproximadamente perteneciente al CH_3 característico del espectro PLA.

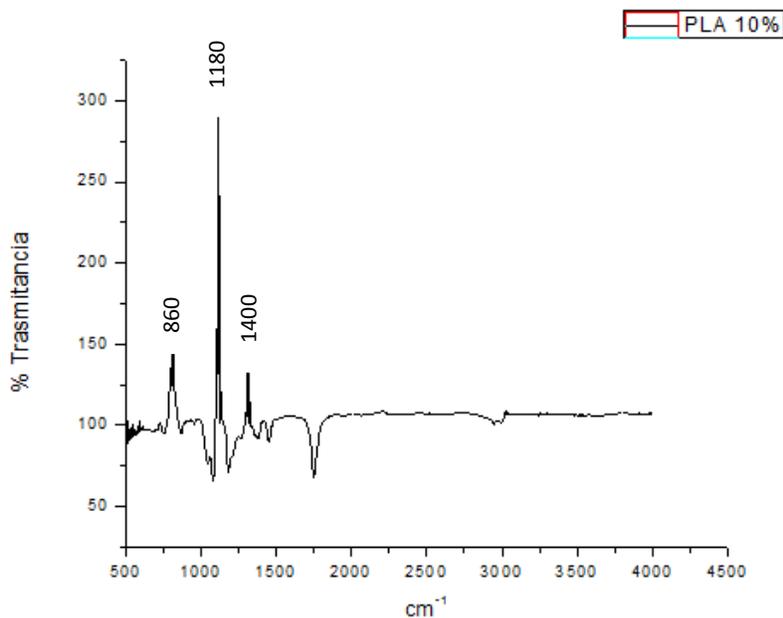


Figura 7. Espectros de FTIR de los andamios PLA que corresponden a la vibración de los enlaces característicos del polímero de ácido poliláctico.

10.3 Adhesión celular

La evaluación de la adhesión celular se realizó mediante el ensayo de cristal violeta. Los fibroblastos del ligamento periodontal localizados sobre los andamios de PCL, después de 4 hrs. de cultivo, mostraron una mayor tasa de adhesión al sustrato. Esta tendencia se observó a las 24 hrs. de cultivo. (Figura 8).

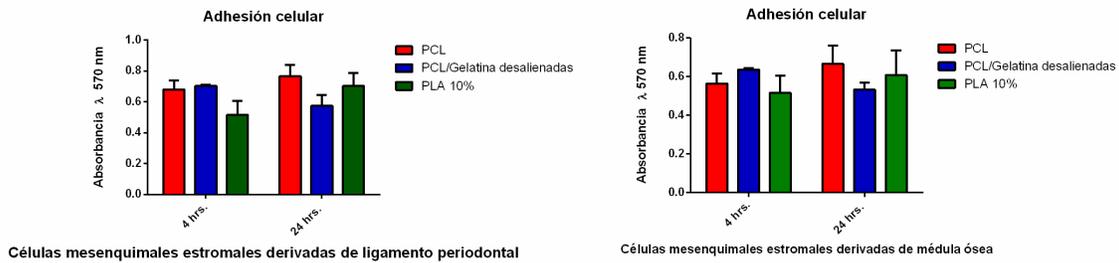


Figura 8. Ensayos de adhesión celular, donde ambas líneas celulares presentan mayor adhesión a las 24 horas, sobre los andamios de PCL.

10.4 Proliferación celular

Para evaluar la proliferación celular, se realizó el ensayo de MTT de las células mesenquimales derivadas de médula ósea y células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal, sobre los andamios de PCL, PCL/gelatinas y PLA 10%. Como se muestra en la figura 11 las células mesenquimales estromales derivadas del ligamento periodontal, muestran una mayor proliferación celular a los tres días, comparadas con las células mesenquimales derivadas de médula ósea en las tres condiciones, sin embargo, las células troncales sobre los andamios de PCL/Gelatina, presentan diferencias significativas ($P \leq 0.005$) en la proliferación comparadas con los fibroblastos del ligamento periodontal. A los siete días de cultivo, ambas líneas celulares presentan la misma tasa de proliferación sobre las tres condiciones de andamios. Sin embargo, a los nueve días de cultivo se invierte el efecto de la proliferación, es decir, los fibroblastos del ligamento periodontal, presentan una tasa mayor de proliferación, donde los fibroblastos del

ligamento periodontal, sobre los andamios de PCL, son los que presentan la proliferación más alta (Figura 9).

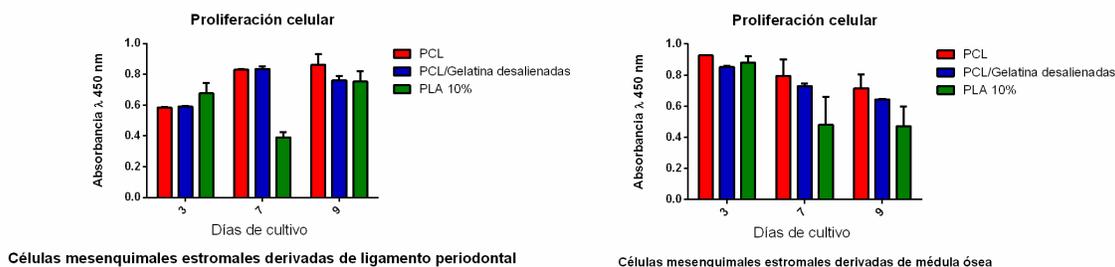


Figura 9. Gráfica lado derecho. Ensayo de proliferación celular a los días 3, 7 y 9, de las células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal sobre los tres andamios fibrilares poliméricos, donde las células presentaron una mayor proliferación al día 9 en el andamio de PCL. Gráfica lado izquierdo. Ensayo de proliferación celular, donde las células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea presentan una mayor proliferación al día 3, sobre los andamios de PCL.

10.5 Interacción célula-material

Para confirmar el ensayo de proliferación celular, el ensayo de viabilidad celular se realizó por medio del método de calceína, los resultados muestran que los andamios no son tóxicos para las células. En la figura 10 se pueden observar las células viables teñidas de color verde, esto debido al metabolismo de las células, además se puede apreciar la morfología que adquieren al estar en contacto directo con el patrón fibrilar de los andamios poliméricos.

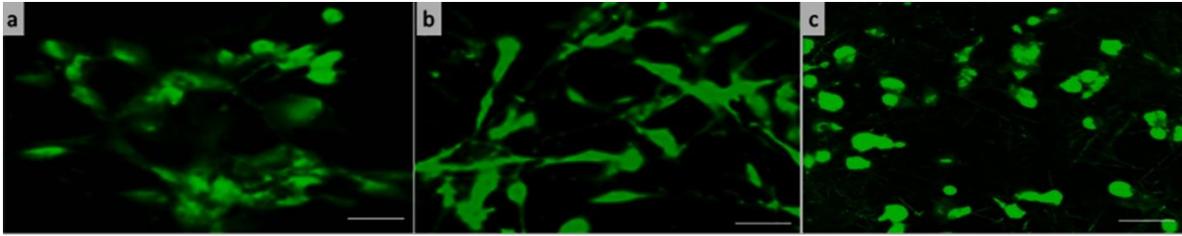


Figura10. Se ilustra la interacción de las células con los andamios de PCL, PCL/gelatina y PLA por microscopía confocal a las 24 horas de cultivo celular.

10.6 Caracterización de los cultivos 3D

Después de 21 días de cultivo, las capas celulares de células troncales mesenquimales y las células troncales derivadas de ligamento periodontal, se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 11). En las imágenes se pueden apreciar, la construcción en tres dimensiones del tejido, sobre los andamios de PCL. Para garantizar la construcción del tejido en tres dimensiones, las capas celulares sobre los andamios de PCL, se visualizaron mediante microscopía confocal, donde se puede observar mediante la fluorescencia, que el tejido está siendo formado en un espesor de 6 a 7 capas (Figura 12).

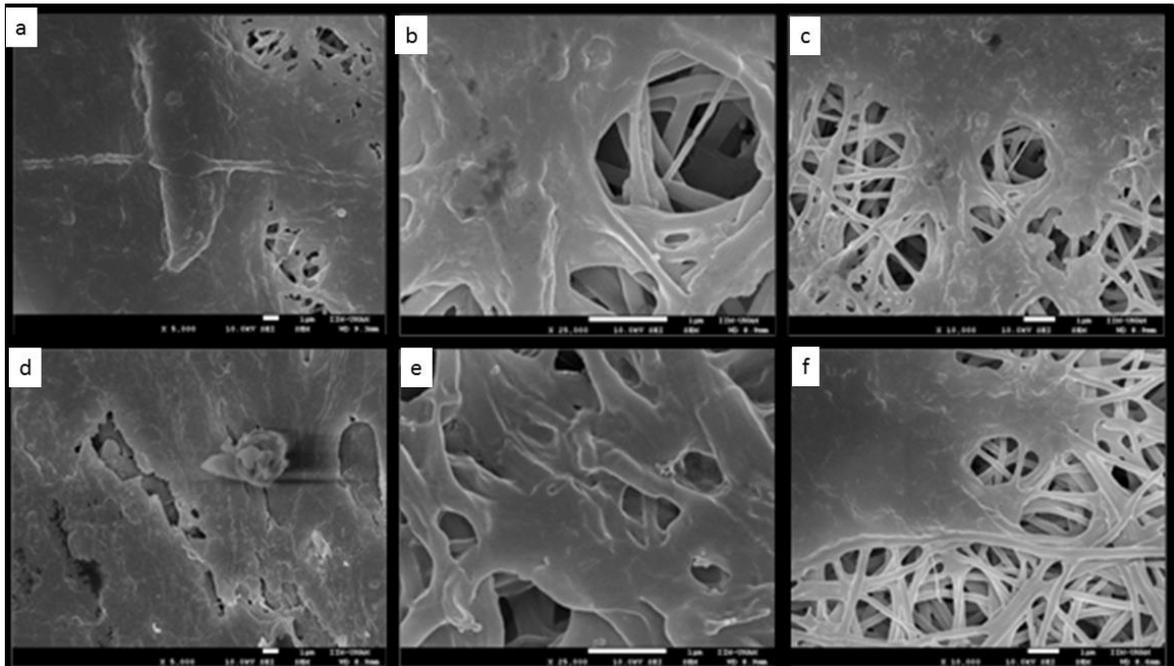


Figura 11. En el panel superior corresponden a microfotografías adquiridas por SEM, de los cultivos 3D, de células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal con diferentes magnificaciones (a-c). En el panel inferior corresponden a microfotografías de células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea (d-f). En ambos casos, se presenta la conformación en capas celulares del cultivo 3D.

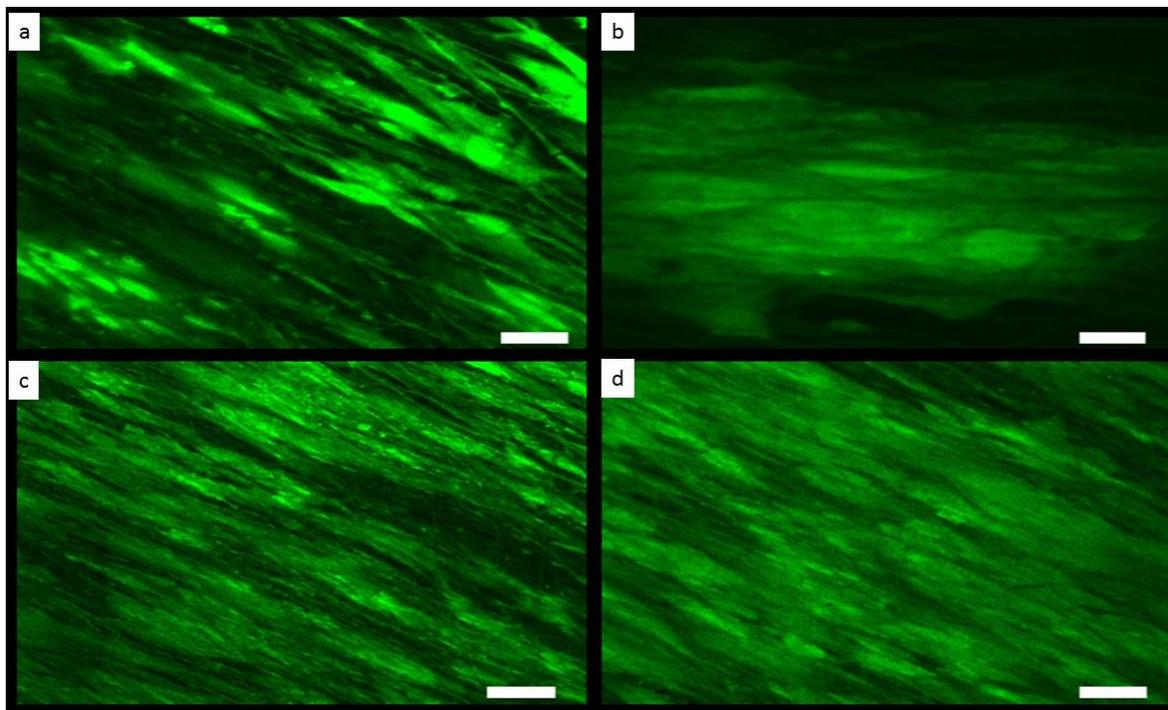


Figura 12. Microfotografía de cultivo 3D por microscopía confocal. (a y b) Corresponde al cultivo en 3D en capa celular de las células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea y (c y d) Corresponde al cultivo en 3D en capa celular de células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal. Barra = 10 μm

10.8 Caracterización de cultivos 3D por FTIR

Los espectros infrarrojos obtenidos muestran las bandas características del PCL, así como, la de los cultivos 3D con medio normal y medio mineralizante (Figura 13). Al amplificarse el área de interés podemos apreciar las bandas que corresponden a las amidas I y II respectivamente a 1660 y 1550 cm^{-1} con ambas condiciones de medio. Sin embargo, se logran apreciar también bandas a 960 y 1032 cm^{-1} , de los grupos fosfato, en los cultivos tratados con medio osteogénico (Figura 14). Estos resultados fueron corroborados con espectroscopia RAMAN, descrita líneas más abajo.

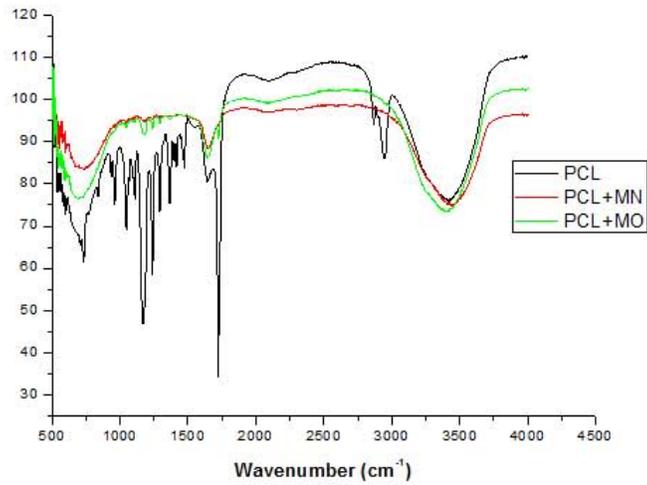


Figura.13 Espectro de los cultivos 3D y del PCL como control, donde aparecen bandas correspondientes a grupos amida y fosfatos.

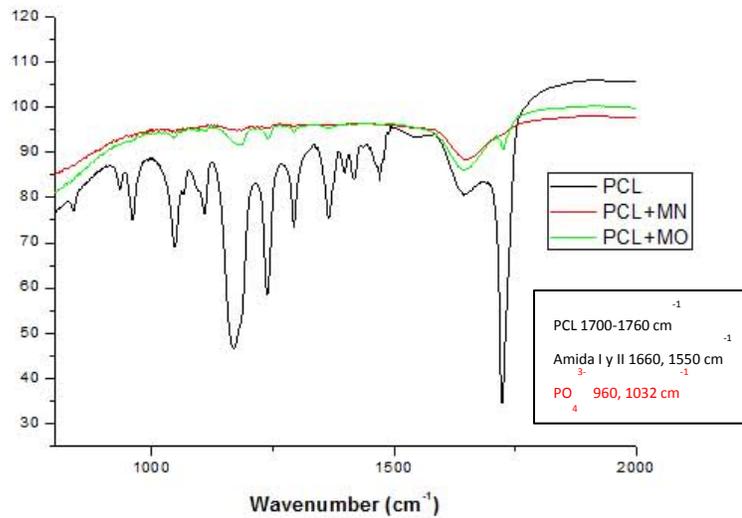


Figura.14 Magnificación del área de interés, donde se logran apreciar las bandas correspondientes a las amidas I y II, así como, a los grupos fosfato en el caso de los cultivos tratados con medio osteogénico.

10.9 Caracterización del cultivo 3D por RAMAN

Los espectros obtenidos, muestran las bandas características de presencias de proteínas principalmente las bandas que van desde 1283 cm^{-1} a 1658 cm^{-1} que corresponden a los grupos amina I y II respectivamente de las proteínas, esto en los cultivos en 3D (Figura 15) sin embargo este patrón no es visible en el andamio control, en el cual no están presentes (Figura 16). Además de estos grupos amina presentes en los cultivos, el cultivo también es posible observar las bandas que corresponden a lípidos que van $1095, 1575\text{ cm}^{-1}$, fosfolípidos de $1065, 1127, 1301\text{ cm}^{-1}$, hidroxiprolina 950 cm^{-1} prolina 921 cm^{-1} . Sin embargo existen otras cuatro bandas presentes únicamente en el cultivo 3D inducido con medio osteogénico que corresponden a PO_4^{3-} en las bandas $960, 1030, 1106\text{ cm}^{-1}$ y CO_3^{2-} en 1070 cm^{-1} (Figura 17). Esto nos indica que este cultivo inducido se encuentra sintetizando material mineral. El PCL por su parte presenta el patrón típico de bandas para éste material.

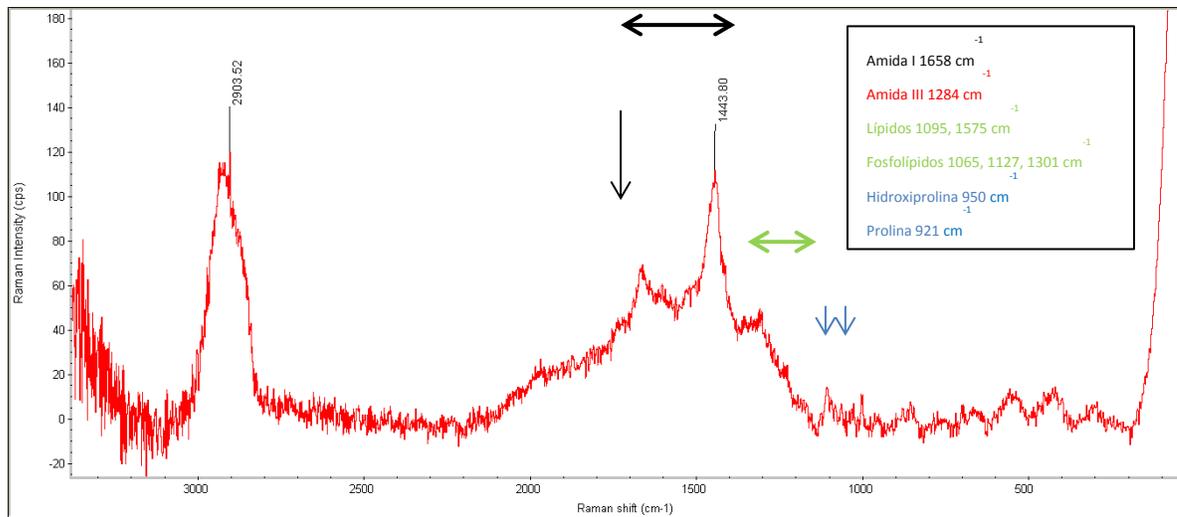


Figura.15.. Espectro correspondiente al cultivo 3D, tratado con medio normal, y su patrón de bandas característico.

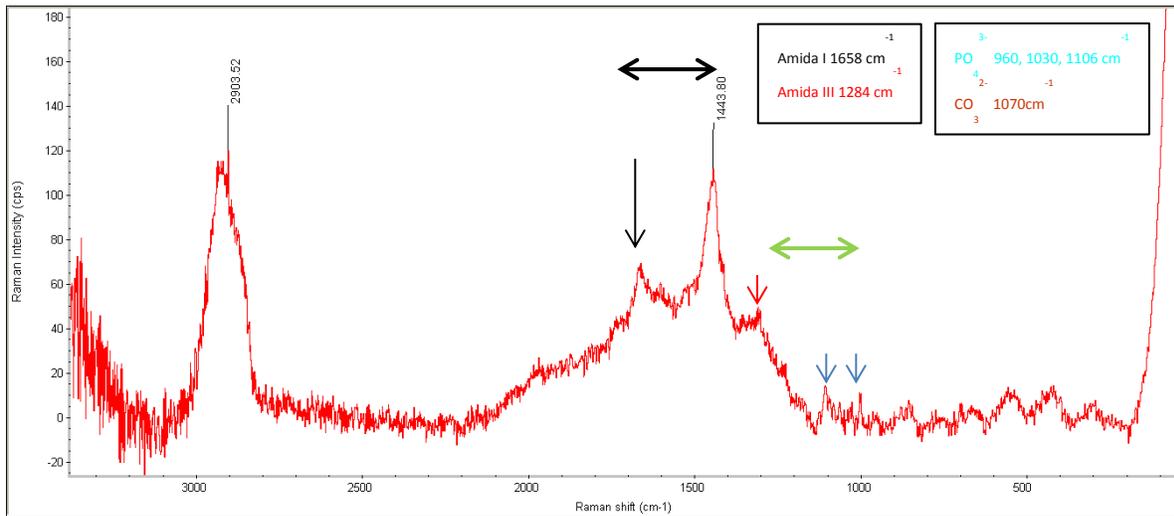


Figura.16 Espectro correspondiente al cultivo 3D, tratado con medio osteogénico, y su patrón de bandas característico.

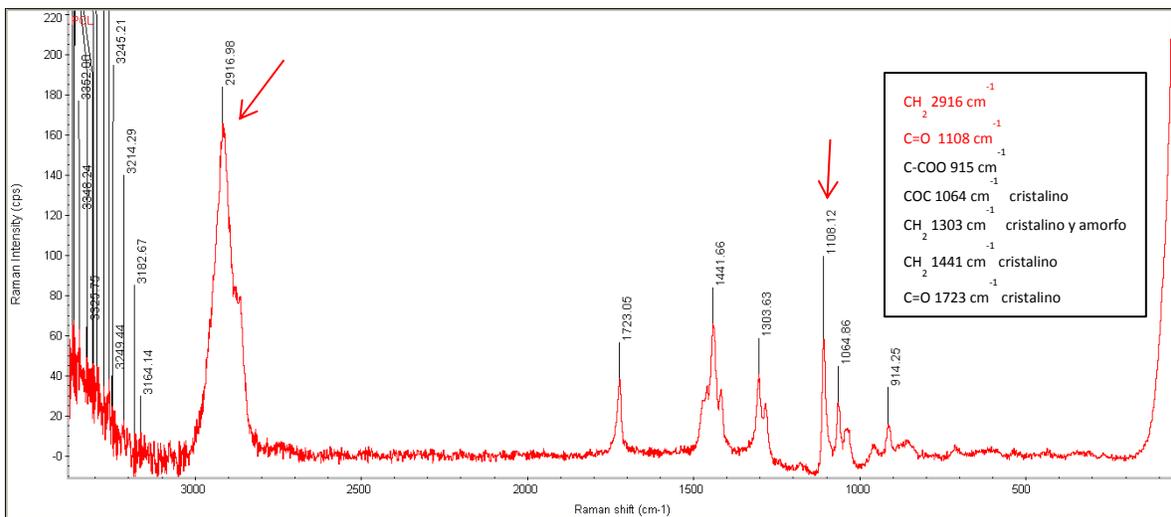


Figura 17. Andamio de PCL con sus bandas características

10.10 Caracterización por μ CT

Las imágenes tridimensionales fueron adquiridas con tomografía micro computarizada, en los cuales, se pueden apreciar las capas celulares que muestran la arquitectura característica estar creciendo durante 21 días. En la imagen de la (Figura 18b) se pueden apreciar que en los cultivos tridimensionales que estuvieron en presencia del medio inductor se observan algunas regiones mineralizadas caracterizadas por una sombras de baja densidad en el centro del defecto y confinadas principalmente a los bordes de del cultivo 3D. A diferencia de los cultivos que estuvieron en presencia de medio completo en ausencia de inductores de la mineralización se observan el crecimiento constante de las capas celulares una densidad homogénea (Figura 18a).

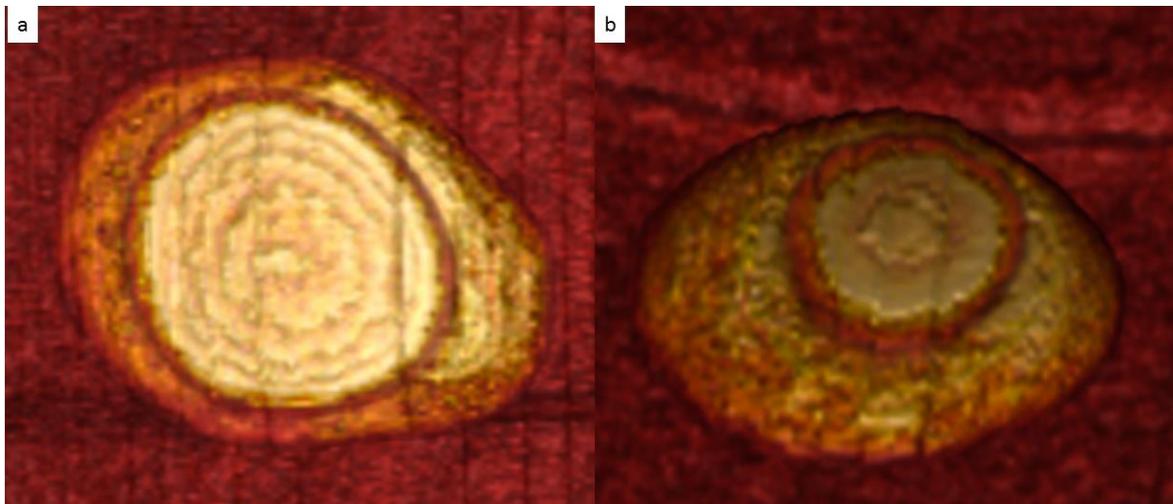


Figura 18. Determinación del patrón 3D obtenido por microtomografía del área de la matriz extracelular depositada por los cultivos en capas celulares. (a) Cultivo control en el andamio de PCL en ausencia de medio osteogénico. (b) Densidad de mineralización en el andamio de PCL con inductores de la osteogénesis. Las reconstrucciones de imagen se realizaron con una resolución de 18 μ m. Los círculos indican los bordes de las capas celulares que se mantuvieron en cultivo durante 21 días.

10.11 Caracterización por medio de RT-PCR

Transcurridos los 21 días de cultivo, se realizó la extracción del RNA mensajero de los cultivos 3D fabricados, y se realizaron los RT-PCR, de moléculas asociadas al proceso de biomineralización., para posteriormente realizar la semicuantificación con el programa Gel Quatum Express. Se obtuvo expresión de las moléculas de ALP, COLI y OPN en los cultivos correspondientes a las células troncales mesenquimales, no obteniendo presencia de los genes PDL-29 y PDL-48, que son genes propios de células del ligamento periodontal. En el caso de las células troncales derivadas del ligamento periodontal, se obtuvo presencia de los genes ALP, COLI, OPN, y también existió presencia de los mensajeros del ligamento periodontal, es decir, PDL-29 y PDL-48 (Figura 19).

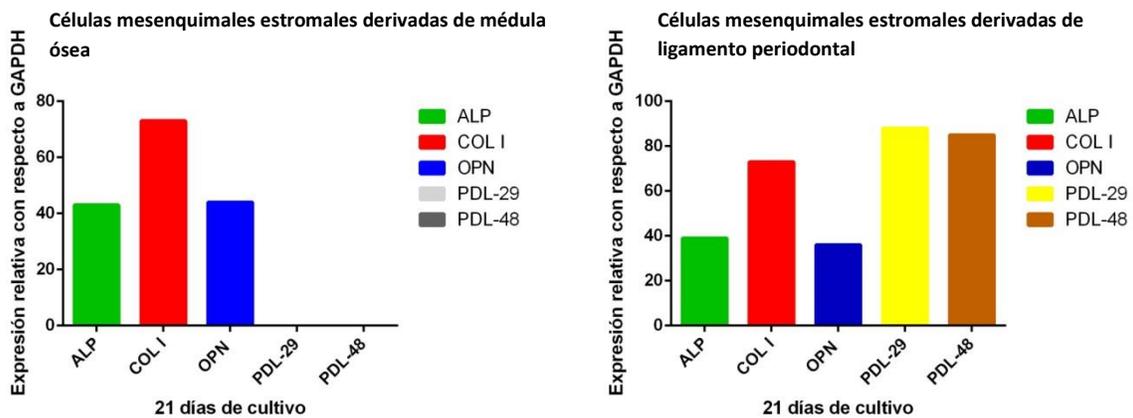


Figura.19. Izquierda. Semicuantificación de la presencia de los ARNm de moléculas asociadas al proceso de mineralización, en los cultivos 3D correspondientes a células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea; siendo negativos a moléculas expresadas por células mesenquimales estromales derivadas del ligamento periodontal. Derecha. Semicuantificación de la presencia de los ARNm de moléculas asociadas al proceso de mineralización, en los cultivos 3D correspondientes a células mesenquimales estromales derivadas de ligamento periodontal, en donde, se logra detectar la presencia de moléculas propias de ligamento periodontal, así como, moléculas asociadas al proceso de mineralización.

11 Discusión

La bioingeniería de tejidos es una disciplina que necesita tener una interacción entre los tres grandes pilares en los que se basa ésta, que son la ciencia e ingeniería en materiales, la investigación en células con potencial en la diferenciación a distintos tejidos y la señalización molecular, sin embargo, aún nos encontramos lejos de obtener los resultados tan esperados, que se resumen en la regeneración de órganos y tejidos que brinden a los pacientes una mejor calidad de vida (Stahl, Froum et al. 1982; Sun, Qu et al. 2012; Marx 2015; Zhu and Liang 2015).

En este trabajo se lograron sintetizar andamios de PCL, PCL/Gelatina y PLA, por el método de hilado (Frenot and Chronakis, 2003), éstos están formados por fibras con diámetros en escalas nanométricas. Dichas escalas se ha reportado que tienen una influencia directa en la respuesta celular y que por ende pueden activar señales de mecanotransducción cuando las células sensan la topografía y se propone que este sentido es en respuesta a los tamaños en que se logran al manipular las soluciones poliméricas por el hilado, las escalas nanométricas se propone que podrían inducir por si solas hacia un determinado linaje celular por parte de las células troncales ya que la energía superficial que se logra por la nanotecnología es un campo emergente (Collart-Dutilleul, Secret et al. ; Gao, Li et al. 2015).

Por otro lado, en el caso de las células sobre los andamios hilados de PCL se favoreció el proceso de adhesión a periodos cortos y el de proliferación a periodos largos en cultivo celular. Es claro que las células mesenquimales estromales

cultivadas sobre los andamio de PCL/Gelatina y PLA, también presentan un aumento en la adhesión y proliferación, sin embargo la cristalinidad y sus propiedades fisicoquímicas parecería afectar la respuesta cuando se compara con el andamio que mostro tener un mejor comportamiento como fue el andamio de PCL.

Los estudios de interacción célula-material por microscopía confocal indica que la disposición que adquieren las células en los andamio son de forma alargada. Esta disposición alargada podría ser mediada por moléculas de adhesión de las células como, por ejemplo, las integrinas que detectan la morfología fibrilar y que le permiten a las células poder comenzar con el proceso de adhesión celular y al cambio en la citoarquitectura celular debido a que el receptor manda la señal intracelular y se activa una modificación en las fibras de actina que responden a la superficie en rangos nanométricos y fibrilares lo que indica que las células están acostumbradas a crecer en matrices fibrilares porque imitan los rangos encontrados en las MEC de los tejidos dentales como las fibras de colágena tipo 1 y tipo 3. Así mismo podemos observar que al tener mayor área superficial provista por la nanoestructura de los andamios, las células adaptan su morfología a la forma del andamio es decir empiezan a seguir el patrón topográfico de las fibras, mejorando así la adhesión celular, lo cual es un prerrequisito para un andamio biocompatible. Esto corrobora los ensayos de adhesión celular, donde las células de ambas líneas, muestran una mayor adhesión celular sobre los andamios fibrilares poliméricos.

Los ensayos de viabilidad celular confirman lo que los ensayos de adhesión muestran, como estos andamios de PCL, PCL/gelatina y PLA, no son citotóxicos para líneas celulares. Esto comprueba que durante el procesado de las fibras por la técnica de hilado, los solventes utilizados son evaporados por la formación de la topografía fibrilar y que posteriormente por el proceso de esterilización para los cultivos celulares, no existen riesgos de toxicidad a los cultivos celulares (Valente, Silva et al.). Así mismo, el hecho de que se encuentren compuestos por fibras en escalas nanométricas mejoran la calidad de la respuesta celular, tanto de células troncales mesenquimales y células troncales derivadas del ligamento periodontal, que les permite la proliferación celular.

No obstante, en todos los andamios sintetizados, los andamios fibrilares de PCL fueron los que presentaron mejor respuesta biológica, ya que, ambas líneas celulares muestran una mayor adhesión y proliferación. Esto contrasta con estudios antes publicados que mencionan que las características que adquiere el polímero PCL en rangos fibrilares obtiene una energía superficial que hace que las proteínas se adsorban con mayor facilidad lo cual conlleva a una mejor respuesta de las células (Ghasemi-Mobarakeh, Prabhakaran et al. 2008; Alvarez-Perez, Guarino et al. 2010).

Debido a los resultados mostrados de biocompatibilidad y a las ventajas de las nanofibras de PCL, se eligieron los andamios de PCL, para seguir con la caracterización de cultivos tridimensionales. Los cultivos tridimensionales, se lograron caracterizar mediante SEM donde se aprecian las capas celulares, sin embargo, se realizó la caracterización por microscopía confocal donde se

corroborar la construcción de las capas celulares (Flores, Hasegawa et al. 2008). Estos cultivos al inducirlos y compararlos, mediante las técnicas de FTIR, RAMAN, μ CT y RT-PCR, nos muestran que se indujo un cambio de fenotipo, de uno estromal mesenquimal hacia un fenotipo mineralizante. Esto es importante debido a que en conjunto los andamios nanofibrilares, los cultivos tridimensionales y la inducción hacia un fenotipo predeterminado nos pueden dar la construcción de un tejido similar a los tejidos perdidos por la enfermedad periodontal, que como se mencionó en capítulos anteriores es una de las principales causas de pérdida de órganos dentarios (Flores, Yashiro et al. 2008; Gao, Li et al. 2015). Las pruebas espectroscópicas nos arrojaron datos importantes que nos permitieron distinguir entre cultivos control donde los tejidos se conservan como fenotipos mesenquimales con los cultivos experimentales donde se pueden apreciar la presencia de los componentes de una matriz extracelular mineralizada. Estas pruebas nos permitieron distinguir la presencia de bandas que concuerdan con lo antes publicado en formación de hueso compacto, donde las bandas de mayor interés son las que corresponden a la presencia de proteínas y específicamente a la presencia de prolina e hidroxiprolina. Estas bandas vibracionales son características de la presencia de una matriz extracelular, donde la que prevalece es la proteína colágena. De igual manera los cultivos 3D tratados con medio osteogénico, presentan bandas que corresponden a los fosfato de calcio y carbonatos de calcio, importantes en la nucleación y maduración de los cristales de hidroxiapatitas lo cual nos indica la presencia de tejidos mineralizados (Abou Neel, Aljabo et al. ; Branson, Bonnin et al.). Fue corroborado por la μ CT donde se

puede apreciar la densidad de color referente a tejido mineral (Ru, Liu et al.), y por RT-PCR donde se analizó la presencia de genes característicos que están involucrados en el proceso de biomineralización (Gao, Li et al. ; Lee, Lee et al. ; Sanaei-rad, Jafarzadeh Kashi et al.).

12 Conclusiones

Se lograron sintetizar andamios poliméricos por la técnica de hilado con morfología fibrilar en rangos nanométricos.

La escala topográfica de las nanofibras de las membranas sintetizadas se encuentra en las escalas reportadas de la colágena de las matrices extracelulares de tejidos dentales.

Las membranas poliméricas fibrilares de PCL fue la que mostró mejor respuesta de biocompatibilidad y bioactividad al compararse con la de PCL/gelatina y PLA.

Se realizaron cultivos tridimensionales, lo cual nos provee de una aproximación de los eventos que suceden en los tejidos con la finalidad de proponer un modelo de regeneración tisular.

Los cultivos 3D de células mesenquimales estromales sobre los andamios de PCL nos permitieron analizar los cambios de fenotipo hacia un linaje osteogénico.

El tejido mineralizado presento las bandas características del componente principal, colágena, calcio y fosfatos.

El andamio nanofibrilar de PCL podría ser una opción para la regeneración periodontal en un futuro cercano.

13 Perspectivas de la Investigación.

Las perspectivas a futuro de esta investigación, van dirigidas a realizar pruebas de los andamios de PCL solo y junto con los cultivos en capa celular en modelos animales a los cuales se les haya realizado un defecto de tamaño crítico para poder saber si el material solo o en conjunto con las capas celulares pueden reparar este defecto de tamaño crítico en modelos animales. Así mismo se puede realizar andamios aglomerados de PCL para poder saber si es eficaz este tipo de materiales, pensando en la regeneración de los tejidos periodontal en un futuro.

19 Referencias

- Abou Neel, E. A., A. Aljabo, et al. (2016) "Demineralizationâ€“remineralization dynamics in teeth and bone." International Journal of Nanomedicine **11**: 4743-4763.
- Alvarez-Perez, M. A., V. Guarino, et al. (2010). "Influence of Gelatin Cues in PCL Electrospun Membranes on Nerve Outgrowth." Biomacromolecules **11**(9): 2238-2246.
- Alvarez Perez, M. A., V. Guarino, et al. (2010). "In vitro mineralization and bone osteogenesis in poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibers." Journal of Biomedical Materials Research Part A **100A**(11): 3008-3019.
- Ashri, N. Y., S. A. Ajlan, et al. (2015). "Dental pulp stem cells: Biology and use for periodontal tissue engineering." Saudi Medical Journal **36**(12): 1391-1399.
- Branson, O., E. A. Bonnin, et al. (2016) "Nanometer-Scale Chemistry of a Calcite Biomineralization Template: Implications for Skeletal Composition and Nucleation." Proceedings of the National Academy of Sciences.
- Castro-Manreza, M. E., H. Mayani, et al. (2014). "Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: A Comparative In Vitro Analysis of Their Immunosuppressive Properties Against T Cells." Stem Cells and Development **23**(11): 1217-1232.
- Collart-Dutilleul, P. Y., E. Secret, et al. (2014) "Adhesion and proliferation of human mesenchymal stem cells from dental pulp on porous silicon scaffolds." ACS Appl Mater Interfaces **6**(3): 1719-28.

- Chen, S. C., V. Marino, et al. (2006). "Location of putative stem cells in human periodontal ligament." Journal of Periodontal Research **41**(6): 547-553.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Drisko, C. H. (2001). "Nonsurgical periodontal therapy." Periodontology 2000 **25**(1): 77-88.
- Fawzy El-Sayed, K. M. and C. E. DÄ¶rfer (2016). "Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem." Stem Cells International **2016**: 7154327.
- Flores, M. G., M. Hasegawa, et al. (2008). "Cementum–periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique." Journal of Periodontal Research **43**(3): 364-371.
- Flores, M. G., R. Yashiro, et al. (2008). "Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats." Journal of Clinical Periodontology **35**(12): 1066-1072.
- Frenot, A. and I. S. Chronakis (2003). "Polymer nanofibers assembled by electrospinning." Current Opinion in Colloid & Interface Science **8**(1): 64-75.
- Gao, H., B. Li, et al. (2015) "Influence of nanotopography on periodontal ligament stem cell functions and cell sheet based periodontal regeneration." International Journal of Nanomedicine **10**: 4009-4027.

- Gao, H., B. Li, et al. (2015). "Influence of nanotopography on periodontal ligament stem cell functions and cell sheet based periodontal regeneration." International Journal of Nanomedicine **10**: 4009-4027.
- Ghasemi-Mobarakeh, L., M. P. Prabhakaran, et al. (2008). "Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering." Biomaterials **29**(34): 4532-4539.
- Guarino, V., F. Urciuolo, et al. (2012). "Osteogenic differentiation and mineralization in fibre-reinforced tubular scaffolds: theoretical study and experimental evidences." Journal of the Royal Society Interface **9**(74): 2201-2212.
- Gunn, J. and M. Zhang (2010). "Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges." Trends in Biotechnology **28**(4): 189-197.
- Gurtner, G. C. and M. A. Chapman (2016). "Regenerative Medicine: Charting a New Course in Wound Healing." Advances in Wound Care **5**(7): 314-328.
- Haaparanta, A. M., E. Jarvinen, et al. (2013). "Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering." J Mater Sci Mater Med **25**(4): 1129-36.
- Kai, D., G. Jin, et al. (2012) "Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells." Biotechnol J **8**(1): 59-72.
- Ki, C. S., D. H. Baek, et al. (2005). "Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin formic acid solution." Polymer **46**(14): 5094-5102.
- Kim, J. H., C. H. Park, et al. (2012) "Advanced biomatrix designs for regenerative therapy of periodontal tissues." J Dent Res **93**(12): 1203-11.

- Landis, W. J. and R. Jacquet. (2013). "Association of Calcium and Phosphate Ions with Collagen in the Mineralization of Vertebrate Tissues." Calcified Tissue International **93**(4): 329-337.
- Lee, H.-S., J. Lee, et al. (2013). "Comparative Gene-Expression Analysis of the Dental Follicle and Periodontal Ligament in Humans." PLoS ONE **8**(12): e84201.
- Liu, W., S. Thomopoulos, et al. (2012). "Electrospun nanofibers for regenerative medicine." Adv Healthc Mater **1**(1): 10-25.
- Malchesky, P. S. (2015). "Artificial Organs 2015: A Year in Review." Artificial Organs **40**(3): 294-321.
- Martino, S., F. D'Angelo, et al. (2012). "Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine." Biotechnology Advances **30**(1): 338-351.
- Marx, V. (2015). "Tissue engineering: Organs from the lab." Nature **522**(7556): 373-377.
- Matsuura, K., R. Utoh, et al. (2014). "Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine." Journal of Controlled Release **190**: 228-239.
- Meng, X., P. Leslie, et al. (2014). "Stem cells in a three-dimensional scaffold environment." SpringerPlus **3**: 80.
- Nseir, N., O. Regev, et al. (2013). "Biodegradable scaffold fabricated of electrospun albumin fibers: mechanical and biological characterization." Tissue Eng Part C Methods **19**(4): 257-64.
- Reilly, G. C. and A. J. Engler (2010). "Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation." Journal of Biomechanics **43**(1): 55-62.

- Rodriguez-Lozano, F. J., C. L. Insausti, et al. (2012). "Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **17**(6): e1062-7.
- Ru, N., S. S.-Y. Liu, et al. (2012). "In vivo microcomputed tomography evaluation of rat alveolar bone and root resorption during orthodontic tooth movement." The Angle Orthodontist **83**(3): 402-409.
- Sakaguchi, K., T. Shimizu, et al. (2013). "In Vitro Engineering of Vascularized Tissue Surrogates." Scientific Reports **3**: 1316.
- Sanaei-rad, P., T.-s. Jafarzadeh Kashi, et al. (2016). "Enhancement of stem cell differentiation to osteogenic lineage on hydroxyapatite-coated hybrid PLGA/gelatin nanofiber scaffolds." Biologicals.
- Stahl, S. S., S. J. Froum, et al. (1982). "Periodontal healing following open debridement flap procedures. II. Histologic observations." J Periodontol **53**(1): 15-21.
- Sun, H. H., T. J. Qu, et al. (2012). "Designing biomaterials for in situ periodontal tissue regeneration." Biotechnol Prog **28**(1): 3-20.
- Takahashi, H. and T. Okano (2015). "Cell Sheet-Based Tissue Engineering for Organizing Anisotropic Tissue Constructs Produced Using Microfabricated Thermoresponsive Substrates." Advanced Healthcare Materials **4**(16): 2388-2407.
- Tran, H. L. B., V. N. Doan, et al. (2014). "Various methods for isolation of multipotent human periodontal ligament cells for regenerative medicine." In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal **50**(7): 597-602.

- Tran, H. L. B., V. N. Doan, et al. (2014). "Various methods for isolation of multipotent human periodontal ligament cells for regenerative medicine." In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal **50**(7): 597-602.
- VadalÃ , G., P. Mozetic, et al. (2012). "Bioactive electrospun scaffold for annulus fibrosus repair and regeneration." European Spine Journal **21**(Suppl 1): 20-26.
- VadalÃ , G., P. Mozetic, et al. (2012). "Bioactive electrospun scaffold for annulus fibrosus repair and regeneration." European Spine Journal **21**(Suppl 1): 20-26.
- Valente, T. A. M., D. M. Silva, et al. (2016). "Effect of Sterilization Methods on Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Fiber Alignment for Biomedical Applications." ACS Applied Materials & Interfaces **8**(5): 3241-3249.
- Wada, N., D. Menicanin, et al. (2009). "Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells." Journal of Cellular Physiology **219**(3): 667-676.
- Williams, D. F. (2009). "On the nature of biomaterials." Biomaterials **30**(30): 5897-5909.
- Yadav, P., H. Yadav, et al. (2015). "Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review." Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR **9**(9): ZE21-ZE25.
- Zhu, W. and M. Liang (2015). "Periodontal Ligament Stem Cells: Current Status, Concerns, and Future Prospects." Stem Cells International **2015**: 972313.

Research Article

Effects of Surface Morphology of ZnAl_2O_4 Ceramic Materials on Osteoblastic Cells Responses

José Luis Suárez-Franco,¹ Manuel García-Hipólito,² Miguel Ángel Surárez-Rosales,²
José Arturo Fernández-Pedrero,¹ Octavio Álvarez-Fregoso,²
Julio Alberto Juárez-Islas,² and Marco Antonio Álvarez-Pérez^{1,3}

¹Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, DF, Mexico

²Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, DF, Mexico

³Tissue Bioengineering Laboratory, Division of Research and Postgraduate Studies, Faculty of Dentistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Circuito Exterior s/n, Coyoacán, 04510 Mexico City, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Marco Antonio Álvarez-Pérez; marcoalp@unam.mx

Received 5 September 2012; Revised 16 January 2013; Accepted 17 January 2013

Academic Editor: Nabeen Kumar Shrestha

Copyright © 2013 José Luis Suárez-Franco et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Ceramic scaffolds are widely studied in the tissue engineering field due to their potential in medical applications as bone substitutes or as bone-filling materials. The purpose of this study was to investigate the effect of surface morphology of nanostructure thin films of ZnAl_2O_4 prepared by spray pyrolysis and bulk pellets of polycrystalline ZnAl_2O_4 prepared by chemical coprecipitation reaction on the *in vitro* cell adhesion, viability, and cell-material interactions of osteoblastic cells. Our result showed that cell attachment was significantly enhanced from 60 to 80% on the ZnAl_2O_4 nanostructured material surface when compared with bulk ceramic surfaces. Moreover, our results showed that the balance of morphological properties of the thin film nanostructure ceramic improves cell-material interaction with enhanced spreading and filopodia with multiple cellular extensions on the surface of the ceramic and enhancing cell viability/proliferation in comparison with bulk ceramic surfaces used as control. Altogether, these results suggest that zinc aluminate nanostructured materials have a great potential to be used in dental implant and bone substitute applications.

1. Introduction

Oxide spinel material is a very large group of structurally related compounds [1], many of which are of considerable technological or geological importance [2]. Spinel exhibits a wide range of electronic and magnetic properties. The normal spinel is a typical example of a material with the general formula $(X)_2(Y)_4O_4$, where X and Y are divalent and trivalent ions, respectively, and the symbols () and [] refer to the 8 tetrahedral coordinated A sites and 16 octahedral coordinated B sites, respectively, within the cubic cell. ZnAl_2O_4 is an oxide spinel with a close packed face centered cubic structure and $Fd\bar{3}m$ space group symmetry [3]. Moreover, its band gap of 3.8 eV makes it transparent for light possessing wavelengths

>320 nm; these characteristics allow to use it as a host lattice for applications in thin film electroluminescent displays, mechano-optical stress sensors, and stress imaging devices. On the other hand, this material has good catalytic properties such as cracking, dehydration, and dehydrogenation [4]. The spinel zinc aluminates have been widely used as ceramic and as catalytic material in chemical and petrochemical industries [5] and more recently as transparent conductor. Regarding the biological application potentials of this ZnAl_2O_4 ceramic material in thin films and in bulk are very scarce. The search for bone substitute is still a challenge to researchers. The composition, as well as the topography, of such materials is of importance for determining the biological response to such materials [6]. The roughness of materials

is considered to be important to predict interfacial behavior at the material-tissue interface and its interaction with the biological environment. Surface roughness influences cell bioactivity, being important in several bone formation stages, including adhesion, proliferation, differentiation, synthesis of bone matrix, maturation, and calcification of the tissue on the materials surface [7–10]. Besides, bioactivity or bioinertness could result in materials with different physical characteristic that could influence biological behavior [11, 12]. Recently, a number of studies have been carried out to investigate the Zn-doped ceramics as biomaterials in bone tissue engineering [13, 14]. Similar to calcium, zinc has long been recognized as an essential trace element for the proper maintenance of bone growth, with over 85% of the total body zinc residing in bone [15, 16]. Zn has a stimulatory effect on bone formation, and its deficiency has been associated with retardation and failure of bone growth in animals [17, 18]. Zn-substituted ceramics were found that modulate the attachment, proliferation, and differentiation of osteoblasts and modulate the activity of bone formation by the cells [19–21]. In this context, the aim of this study was to investigate the effect of surface morphology of nanostructured thin films of ZnAl_2O_4 prepared by spray pyrolysis and bulk pellets of polycrystalline ZnAl_2O_4 prepared by chemical coprecipitation: reaction on the biological response of osteoblastic cells in order to evaluate the surface cell adhesion, spreading, cell viability process at *in vitro* cell culture and compare these results with respect to the different surface morphologies between a nanostructured thin film and a traditional polycrystalline ceramic surface.

2. Experimental Details

2.1. Synthesis and Characterization of ZnAl_2O_4 Material. The ultrasonic spray pyrolysis technique is a well-established process for depositing films. Some advantages of this process are as follow: a high deposition rate, the possibility to coat large areas, its low cost, its ease of operation, and the quality of the coatings obtained. Films of zinc aluminate were deposited by an ultrasonic spray pyrolysis technique described earlier [22]. Basically, this technique consists of an ultrasonic generator used to produce a mist from the spraying solution. This mist is carried to a hot substrate placed on a tin bath through a tubing setup using humid air as a carrier gas (10 liters/minute). When the mist of the solution gets in touch with the hot substrate, the solvents in the solution are vaporized producing a solid coating on the substrate. The nozzle in this system is localized approximately 1 cm above the substrate. The spraying solution consisted of 0.05 M zinc acetate and aluminum chloride in deionized water as solvent. The solution flow rate was 3 mL/minute for all cases. The substrate temperature (T_s) during deposition was in the range from 300°C to 550°C; the substrates used were Corning 7059 glass slides. The deposition time was adjusted (4 to 6 minutes) to deposit films with approximately the same thickness. The thickness of the films studied was about 5 μm as measured by a Sloan Dektak IIA profilometer. The chemical composition of the films was measured with a Leica-Cambridge electron microscope Mo. Stereoscan 440, equipped with a Beryllium window X-ray

detector, using Energy Dispersive Spectroscopy (EDS). The standard used for the EDS measurements was the Multi-element X-ray Reference Standard (Microspec), Serial 0034, part no. 8160-53. The surface morphology was analyzed by means of the scanning electron microscopy (SEM) cited above. The crystalline structure features of the deposited films were analyzed by X-ray diffraction (XRD), using a Siemens D-5000 diffractometer with a wavelength radiation of 1.5406 Å (CuK_α).

A very simple chemical precipitation process was used for the synthesis of zinc aluminate spinel powder. The start materials were $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Sigma-Aldrich (98%) and $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ Riedel-de Haën at 0.05 M blended in methanol. This simple process consists of three steps: (1) precursor material dissolution in a compatible solvent to form the precursor mixture, (2) solvent evaporation and solute precipitation, and (3) powder annealing. The initial mixture was heat treated at 250°C for 30 minutes to evaporate the solvent. The chemical agglomerates were grounded in an agate mortar to obtain fine powder, which was compressed to form a small disk with a dimension of 1.2 cm in diameter and a thickness of 0.13 cm. The applied pressure for pellets preparation was 150 Kg/cm^2 . These pellets were annealed at $T_a = 600^\circ\text{C}$, during 14 hours in air atmosphere.

The crystalline structure of these pellets was analyzed by X-ray diffraction (XRD) using a Bruker-D8 plus Diffractometer with CuK_α radiation at 1.5405 Å. Their chemical composition was measured using Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) with a Cambridge-Leica electron microscope mod. Stereoscan 440 was equipped with a Beryllium window X-ray detector, and their surface topography was obtained by means of the above-mentioned SEM microscope.

2.2. Biological Response

2.2.1. Cell Culture. Biological assays were performed using human osteoblastic cells as reported previously [23]. For cell culture, human osteoblastic cells were cultured in 75 cm^2 cell culture flasks containing a Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic solution (streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and penicillin 100 U/mL, Sigma Chem. Co). The cell cultures were incubated in a 100% humidified environment at 37°C in atmosphere of 95% air and 5% CO_2 . Human osteoblastic cells on passage 4–6 were used for all the experimental procedures. In order to perform the *in vitro* cell response assays, all ZnAl_2O_4 bulk and 550°C nanostructured material surfaces were cleaned with distilled water and sterilized by exposure to UV light ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 300 uW/cm^2).

2.2.2. Cell Attachment. The cell adhesion of human osteoblastic cells onto ZnAl_2O_4 bulk and thin film nanostructure materials was evaluated using the vibrant cell adhesion assay kit (Molecular Probes). Human osteoblastic cells, cultured in a 75 cm^2 cell culture flask, were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with calcein AM stock solution to a final concentration of $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ in serum-free medium for 30 min. After incubation, the cells were washed

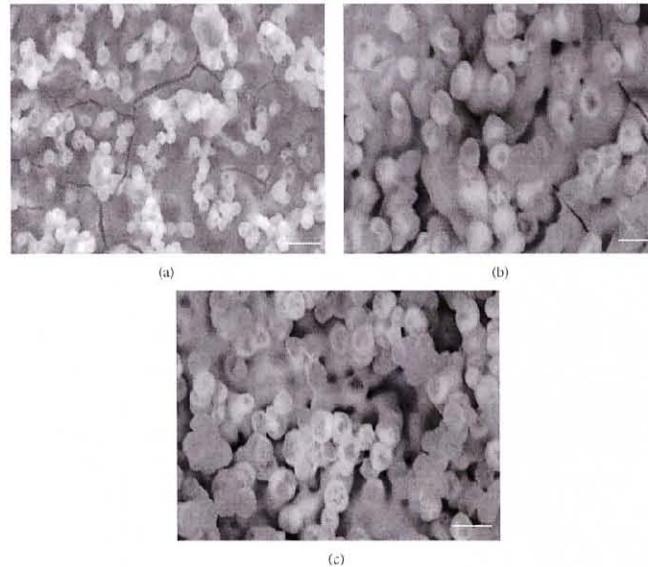


FIGURE 1. SEM micrographs of surface morphology of ZnAl_2O_4 films as a function of the T_f : (a) 300°C, (b) 450°C, and (c) 550°C. Bar = 100 nm.

with PBS, trypsinized, and the cell pellet was collected and diluted with DMEM culture medium to obtain the requisite cell concentration. The human osteoblastic cells at concentration of 1.5×10^3 cells/cm² were seeded onto ZnAl_2O_4 bulk and thin film nanostructured materials and incubated for 4 h and 24 h. The fluorescence was quantified using a fluorescein filter set with a Wallac Victor3 1420 spectrophotometer (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). The percentage cell adhesion was obtained by dividing the corrected (background subtracted) fluorescence of adherent cells by the total corrected fluorescence of control cells and multiplying by 100%. Conventional polystyrene 24-well culture plates were used as a control.

2.2.3. MTT Assay. Cell viability of human osteoblastic cells seeded at concentration of 1×10^4 cells/cm² onto ZnAl_2O_4 bulk and thin film nanostructured materials was checked by the MTT assay for 3, 5, and 7 days of culture. This assay is based on the ability of mitochondrial dehydrogenases of living cells to oxidize a tetrazolium salt (3-[4,5-dimethylthiazolyl-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), to an insoluble blue formazan product. The concentration of the blue formazan product is directly proportional to the number of metabolically active cells. The human osteoblastic cells seeded onto ZnAl_2O_4 bulk and thin film nanostructure materials at prescribed time were washed with PBS and incubated with fresh cultured medium containing 0.5 mg/mL of MTT for 4 h at 37°C in the dark. Then, the supernatant

was removed and dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well. After 50 minutes of slow shaking, the absorbance was quantified by spectrophotometry at 570 nm with a plate reader. The culture medium during experimental time was changed every other day with fresh media.

2.2.4. Cell Morphology. For cytoskeletal organization of the human osteoblastic cells cultured onto ZnAl_2O_4 bulk and thin film nanostructured materials, the cells were seeded at concentration of 1×10^5 cells/cm² and incubated for 24 hours in DMEM cultured medium. After 24 hours, the samples were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature (RT), permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 minutes, washed twice with PBS and incubated with α actin antibody diluted 1:100 in 0.2% of bovine serum albumin (BSA)-PBS for 1 h at RT. The cells were then gently washed twice with 0.2% BSA-PBS and twice with PBS. Then, cells were incubated with FITC secondary antibody diluted 1:1000 in PBS for 1 hour. The cells were gently washed with PBS and visualized by means of indirect immunofluorescence (Axiophot, Carl ZeissR, Germany).

2.2.5. Statistical Analysis. Data are presented as mean standard deviation. Statistical analysis was performed on adhesion and MTT assay results using Student's *t*-test, and *P* value <0.05 was considered significant.

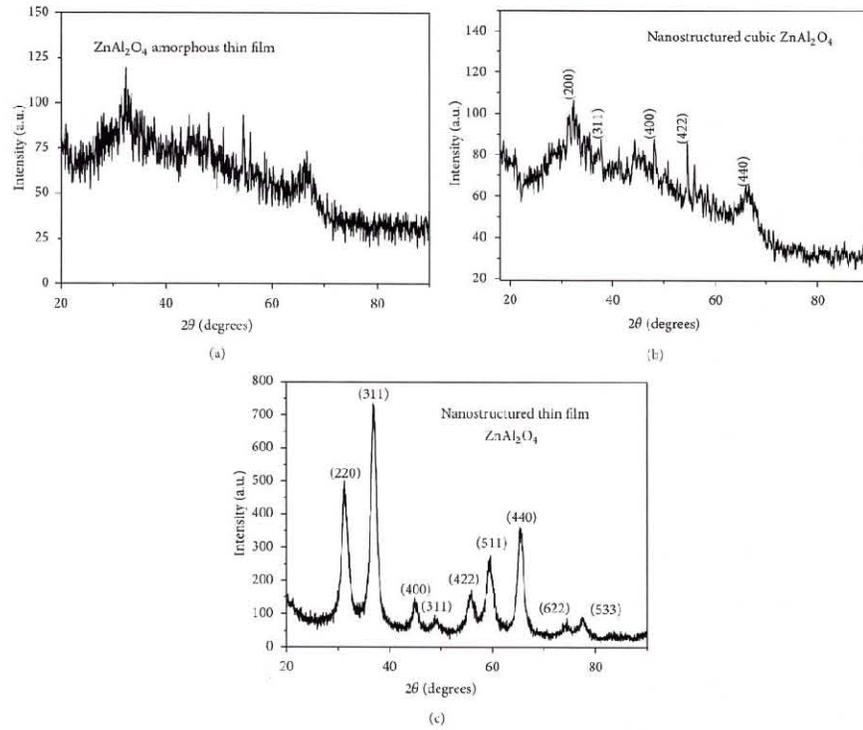


FIGURE 2: X-ray diffraction histograms of ZnAl_2O_4 thin films as a function of the T_s : (a) amorphous = 300°C . (b) nanostructured = 450°C , and (c) nanostructure = 550°C .

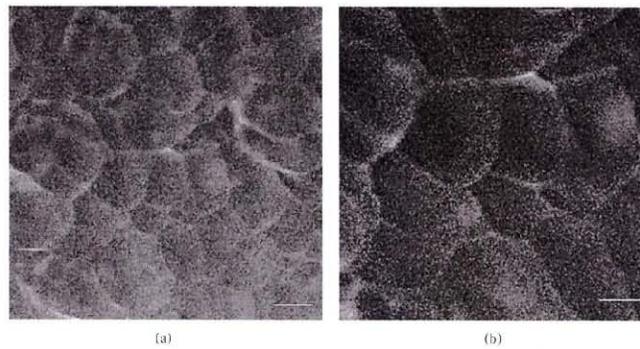


FIGURE 3: Surface morphology of the sintered pellets sample of ZnAl_2O_4 . The surface is smooth, homogeneous (a), and without porous regions (b). Bar = 10 microns.

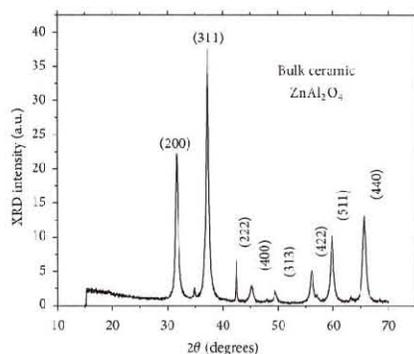


FIGURE 4: XRD of the bulk ceramic sample annealed at 600°C.

3. Results and Discussion

The surface morphology of ZnAl_2O_4 coatings deposited on glass substrates is presented in Figure 1. SEM micrographs show the samples deposited at 300°C Figure 1(a), 450°C Figure 1(b), and 550°C Figure 1(c). It is possible to observe rough but continuous coatings with good adherence to the substrate. This figure shows that the surface morphology of the layers depends on substrate temperature. Coatings deposited at 300°C and 450°C present some cracks. By increasing the substrate temperature to (500–550°C), the cracks disappear and a relatively more dense material is reached. These features could be explained because at higher substrate temperature, the deposited radicals are characterized by higher surface kinetic energy, which permits them better accommodation and consequently produces a better processed and compacted material.

At $T_s = 550^\circ\text{C}$, the thin film shows a nanogranular morphology with a great quantity of porous regions, which mimics the surface morphology of the human bone.

The chemical composition of the films deposited at substrate temperature of 550°C was determined by EDS, with the atomic percentages of Zn = 13.6, Al = 27.8, O = 57.1, and Cl = 1.50, which means that we have ZnAl_2O_4 ceramic compound of stoichiometric composition doped with 1.50% of chlorine.

XRD measurements carried out on the ZnAl_2O_4 coatings deposited by spray pyrolysis technique are presented in Figures 2(a), 2(b), and 2(c). These XRD patterns are shown for ZnAl_2O_4 at these three different substrate temperatures: 300°C, 450°C, and 550°C. The zinc aluminate coatings remain in the amorphous state when deposited at substrate temperatures up to 400°C (Figure 2(a)); as the substrate temperature is increased to 450°C, some peaks corresponding to hexagonal phase of ZnO (zincite, ICDD Card File no. 36-1451) are observed in Figure 2(b). In case of the sample deposited at 550°C Figure 2(c), only a cubic spinel crystalline phase of ZnAl_2O_4 (galinite) was found (ICDD Card File no.

05-0669 [24]). The calculated lattice parameters ($a = b = c = 8.0859 \text{ \AA}$) for the cubic spinel phase in the films deposited at 550°C are in agreement with the reported values ($a = b = c = 8.0848 \text{ \AA}$) [24]. Furthermore, it promoted the crystal growth of this material with a preferential (311) orientation normal to the coatings surface. Considerable peaks broadening can be observed due to the nanometric dimension of the grains in the thin film. By using the Debye-Scherrer formula for the broadening fitting curve XRD program, the particle size was evaluated. The average particle diameter was around $20 \pm 5 \text{ nm}$, considering that the grains are spheres.

The surface morphology of the polycrystalline ZnAl_2O_4 pellets sample obtained by chemical coprecipitation process is presented in Figure 3 and its XRD measurements pattern is shown in Figure 4. It is clear that this type of ceramic shows a smooth and homogeneous surface morphology without any observable porous region. Its average grain size is about $8.5 \pm 2.0 \mu\text{m}$.

The biomaterial surface interaction between scaffolds and tissue cells is a significant subject for biomaterials science. Information originating from this interaction is essential to aid the design and fabrication of new biocompatible materials [25]. Our results showed that when we culture osteoblastic cells on ZnAl_2O_4 nanostructured materials, the cell morphology had attached and undergone significant spreading, elongated demonstrating areas, where filopodia had intimately adapted with multiple cellular extensions on the surface of the ceramic (Figure 5(b)). In contrast, osteoblastic cells culture on ZnAl_2O_4 bulk materials showed neither or small elongation or extension (Figure 5(a)). These morphological results could be supported by the results of cell adhesion values after 4 and 24 h, presented as the cellular percentage of attached cells in relation to control tissue cultures plates. The cellular adhesion as the first step to assess the compatibility of the cell-material interaction surface was 60 to 80% greater on the ZnAl_2O_4 nanostructured material surface where it should be noted that the adherent values at all-time points were consistently higher when comparing with bulk ceramic surfaces (Figure 6). Statistical analyses indicated that there were statistically significant differences in the cell response, where osteoblastic cells attachment occurred preferred on the rough ceramic surface followed by the smooth surface ceramic. Moreover, it is important to remark that increased cellular attachment obtained on ZnAl_2O_4 bulk and 550°C thin film nanostructured materials is a good indicator that the surface is not toxic to the cells. We perform the cell viability test assessed by the MTT assay to confirm it. The results of the MTT assay are presented as the optical absorbance at 570 nm as shown in Figure 7. Both ZnAl_2O_4 nanostructure and bulk ceramics exhibited excellent biocompatibility. Among the two ceramics, it can be seen that cell viability is always higher on a nanostructured material than a bulk material, where we found high levels of MTT conversion and continue until day 7. This increment is directly proportional to the increase of metabolic active cells on the surface of ZnAl_2O_4 and inversely proportional to the toxicity effect of the surface topography of the material where significant differences in mean optical density are always presented as confirmed by Student's *t*-test. This increase in

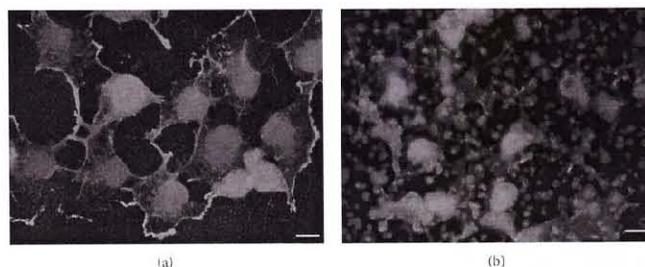


FIGURE 5: Cytoskeletal organization morphology micrographs of the attachment of osteoblastic cells after 24 h on (a) bulk ZnAl_2O_4 ceramic and (b) ZnAl_2O_4 thin film nanostructured ceramic at $T_c = 550^\circ\text{C}$. Bar = 20 nm.

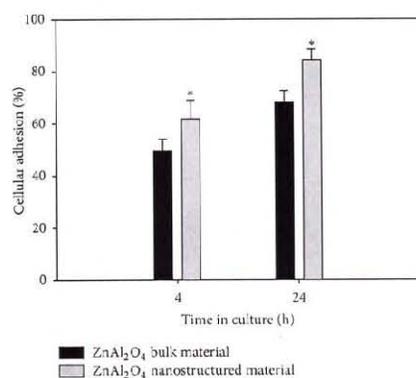


FIGURE 6: Quantitative cell adhesion of osteoblastic cells seeded on ZnAl_2O_4 (■) bulk material and (□) thin films nanostructure at $T_c = 550^\circ\text{C}$, after 4 and 24 h of culture, expressed as percent of cell attachment. Asterisk denotes significant differences ($P < 0.05$) between ceramic materials as determined by Student's t -test.

adhesion and viability by MTT activity of cells could be favored for the presence of ZnAl_2O_4 nanoparticle material. These results are in agreement with the idea that topography of extracellular microenvironment can influence cellular responses from attachment and migration to differentiation and production of new tissue [26–29]. Moreover, it has also been reported that surface energy is a more influential surface characteristic on cellular adhesion and proliferation [30, 31]. So the enhanced cellular adhesion and viability on ZnAl_2O_4 nanostructure ceramic could be due to the positive influence of the component of the surface energy. However, further studies are needed with these materials to fully understand the tissue cell-material interactions.

4. Conclusion

ZnAl_2O_4 nanostructure and bulk spinel ceramic have been evaluated for their *in vitro* biocompatibility to explore their

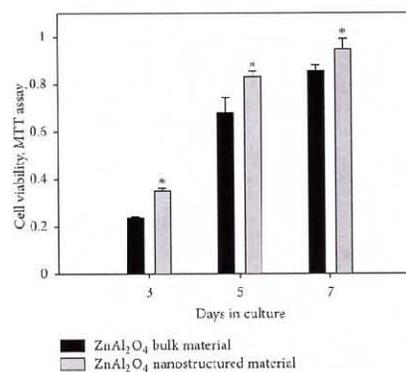


FIGURE 7: Cell viability determined by MTT assay after 3, 5, and 7 days of cell culture on ZnAl_2O_4 (■) bulk material and (□) thin films nanostructure at $T_c = 550^\circ\text{C}$. Error bars represent mean \pm SE. $n = 3$ cultures under each conditions. Asterisk denotes significant differences ($P < 0.05$) between ceramic materials as determined by Student's t -test.

potential to be used in dental implant and bone substitute applications. The *in vitro* attachment and morphological and viability responses of osteoblastic cells suggest that nanostructured ceramic appears to be the most conducive to cells compared to the bulk ceramic surface. The results of these studies could lead to a relatively new generation of bioceramics with surface characteristics specific to the needs of individual tissue types as bone or oral cavity.

Acknowledgments

The authors wish to thank Omar Novelo-Peralta, Raul Reyes, and Adriana Tejada-Cruz from IIM-UNAM for their technical assistance during the course of this study. This study was supported by UNAM-DGAPA: (PAPIIT Grant no. 213912) and CONACYT (Grant no. 129780).

References

- [1] R. J. Hill, I. R. Craig, and G. V. Gibbs, "Systematics of the spinel structure type," *Physics and Chemistry of Minerals*, vol. 4, no. 4, pp. 317–339, 1979.
- [2] D. L. Anderson, "The earth as a planet: paradigms and paradoxes," *Science*, vol. 223, no. 4634, pp. 347–355, 1984.
- [3] S. K. Sampath, D. G. Kanhere, and R. Pandey, "Electronic structure of spinel oxides: zinc aluminate and zinc gallate," *Journal of Physics Condensed Matter*, vol. 11, no. 18, pp. 3635–3644, 1999.
- [4] S. Maitur, M. Veith, M. Haas et al., "Single-source sol-gel synthesis of nanocrystalline $ZnAl_2O_4$: structural and optical properties," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 84, no. 9, pp. 1921–1928, 2001.
- [5] T. El-Nabarawy, A. A. Actia, and M. N. Alaya, "Effect of thermal treatment on the structural, textural and catalytic properties of the $ZnO-Al_2O_3$ system," *Materials Letters*, vol. 24, no. 5, pp. 319–325, 1995.
- [6] H. Dinopoulos, R. Dimitriou, and P. V. Giannoudis, "Bone graft substitutes: what are the options?" *Surgeon*, vol. 10, no. 4, pp. 230–239, 2012.
- [7] C. Zink, H. Hall, D. M. Brunette, and N. D. Spencer, "Orthogonal nanometer-micrometer roughness gradients probe morphological influences cell behavior," *Biomaterials*, vol. 33, no. 32, pp. 8055–8061, 2012.
- [8] T. P. Kunzler, T. Drobek, M. Schuler, and N. D. Spencer, "Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients," *Biomaterials*, vol. 28, no. 13, pp. 2175–2182, 2007.
- [9] T. P. Kunzler, C. Huwiler, T. Drobek, J. Vörös, and N. D. Spencer, "Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients," *Biomaterials*, vol. 28, no. 33, pp. 5000–5006, 2007.
- [10] D. Khang, J. Choi, Y. M. Im et al., "Role of subnano-, nano- and submicron- surface features on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells," *Biomaterials*, vol. 33, no. 26, pp. 5997–6007, 2012.
- [11] P. Ducheyne and Q. Qiu, "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function," *Biomaterials*, vol. 20, no. 23–24, pp. 2287–2303, 1999.
- [12] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, and J. A. Planell, "Biomaterials in orthopaedics," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 5, no. 27, pp. 1137–1158, 2008.
- [13] C. Wu, J. Chang, and W. Zhai, "A novel hardystonite bioceramic: preparation and characteristics," *Ceramics International*, vol. 31, no. 1, pp. 27–31, 2005.
- [14] Y. Ramaswamy, C. Wu, H. Zhou, and H. Zreiqat, "Biological response of human bone cells to zinc-modified Ca-Si-based ceramics," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 5, pp. 1487–1497, 2008.
- [15] H. Tapiero and K. D. Tew, "Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 57, no. 9, pp. 399–411, 2003.
- [16] C. J. Boehlert and K. Knittel, "The microstructure, tensile properties, and creep behavior of Mg-Zn alloys containing 0–4.4 wt.% Zn," *Materials Science and Engineering A*, vol. 417, no. 1–2, pp. 315–321, 2006.
- [17] M. Yamaguchi, H. Oishi, and Y. Suketa, "Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture," *Biochemical Pharmacology*, vol. 36, no. 22, pp. 4007–4012, 1987.
- [18] Y. Tokudome and M. Otsuka, "Possibility of alveolar bone promotion enhancement by using lipophilic and/or hydrophilic zinc related copund in zinc deficient osteoporosis rats," *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 35, no. 5, pp. 1496–1501, 2012.
- [19] A. Ito, H. Kawamura, M. Otsuka et al., "Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation," *Materials Science and Engineering C*, vol. 22, no. 1, pp. 21–25, 2002.
- [20] Y. Tokudome, A. Ito, and M. Otsuka, "Effect of Zinc-containing b-tricalcium phosphate nanoparticles injection on jawbone mineral density and mechanical strength of osteoporosis model rats," *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 34, no. 8, pp. 1215–1218, 2011.
- [21] N. Saha, A. K. Dubey, and B. Basu, "Cellular proliferation, cellular viability, and biocompatibility of HA-ZnO composites," *Journal of Biomedical Materials Research B*, vol. 100, no. 1, pp. 256–264, 2012.
- [22] J. C. Vigié and J. Spitz, "Chemical vapor deposition at low temperatures," *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 122, no. 4, pp. 585–588, 1975.
- [23] H. Arzate, M. A. Alvarez-Perez, M. E. Aguilar-Mendoza, and G. Alvarez-Fregoso, "Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro," *Journal of Periodontal Research*, vol. 33, no. 5, pp. 249–258, 1998.
- [24] Powder diffraction file card No. 05-0669, "International center for Diffraction Data," 1990.
- [25] S. Chung and M. W. King, "Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 58, no. 6, pp. 423–438, 2011.
- [26] O. Adamopoulos and T. Papadopoulos, "Nanstructured bioceramics for maxillofacial applications," *Journal of Materials Science*, vol. 18, no. 8, pp. 1587–1597, 2007.
- [27] M. J. Dalby, D. McCloy, M. Robertson et al., "Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2980–2987, 2006.
- [28] L. L. Hench and I. Thompson, "Twenty-first century challenges for biomaterials," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 7, no. 4, pp. S379–S391, 2010.
- [29] D. E. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2941–2953, 2008.
- [30] B. Feng, J. Weng, B. C. Yang, S. X. Qu, and X. D. Zhang, "Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast," *Biomaterials*, vol. 24, no. 25, pp. 4663–4670, 2003.
- [31] P. Thevenot, W. Hu, and L. Tang, "Surface chemistry influences implant biocompatibility," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 4, pp. 270–280, 2008.