

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE NANOFIBRAS ELECTROHILADAS DE
ALCOHOL POLIVINÍLICO, QUITOSANO E HIDROXIAPATITA
CON PLATA (PVA/QTS/AgHAp) EN EL PROCESO DE
REGENERACIÓN
ÓSEA EN UN MODELO *in vitro*

POR

L.B.G. ALBERTO ALLENDE VILLARREAL ZEA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA

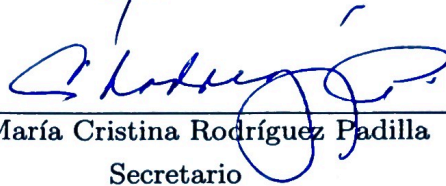
2024

**EVALUACIÓN DE NANOFIBRAS ELECTROHILADAS DE
PVA/QTS/AgHAp EN EL PROCESO DE REGENERACIÓN ÓSEA
EN UN MODELO *in vitro***

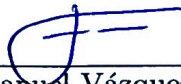
Comité de Tesis



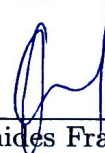
Dra. Diana Guette Zárate Triviño
Presidente



Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dr. José Manuel Vázquez Guillen
Vocal



Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal



Dra. Diana Elia Caballero Hernández
Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirector de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a la **Dra. Diana G. Zárate Triviño** por su apoyo y asesoramiento para la realización de esta tesis; además, agradezco sus consejos, paciencia y motivación fuera y dentro del laboratorio que contribuyeron en mi formación académica y personal.

A mi comité de tesis **Dr. Moisés A. Franco**, **Dra. Diana Caballero Hernández**, **Dr. Manuel Vázquez Guillén** y al **Dr. Juan José Martínez Sanmiguel**, los cuales contribuyeron al hacer las observaciones y correcciones pertinentes en este trabajo. Así mismo, un agradecimiento al **Dr. Menchaca** por sus consejos y a la **Dra. Licet Villarreal** por permitirme trabajar en el área de microbiología.

A mis compañeros y amigos del laboratorio el **Mc. Bruno A. Valades**, por su ayuda en la síntesis de nanofibras y redacción de esta tesis; a la **Mc. Jennifer C. Leos** por su apoyo en el cultivo celular y ensayo de mineralización; y al **Mc. Raúl Rangel** por brindarme su conocimiento y colaboración principalmente en la realización del ELISA. De manera general, les agradezco todo su apoyo y convivencia haciendo una grata experiencia dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros Gera, Armando, Nayeli, Emilio, Jessy, Cris, Helene, Luis Roberto, Yajaira, Luís Ayala y todos aquellos con los que tuve la oportunidad de convivir, les agradezco por su ayuda y su amistad.

A mi **familia** por todo su apoyo, tiempo y esfuerzo brindado para que pudiera cumplir una meta más en mi vida. A mi novia **Fernanda Porrás Chimal** por siempre apoyarme y alentarme para dar lo mejor de mí.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Especialmente a la **Dra. Cistina Rodríguez Padilla** por brindar las instalaciones y equipos necesarios para realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo económico para la realización de mis estudios. A Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme formar parte de la comunidad académica.

¡Muchas gracias a todos por su apoyo!

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mi familia, **Alberto Villarreal Garza**, **Evelyn Margarita Zea Montalvo** y **Andrés Eugenio Villarreal Zea** quienes siempre estuvieron para apoyarme.

Índice general

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Histología del hueso	3
2.1.1. Remodelación del tejido óseo	4
2.1.2. Osteoblasto	6
2.1.3. Reparación de tejidos: Injertos óseos	7
2.1.4. Ingeniería de tejidos	7
2.2. Nanotecnología	8
2.2.1. Nanofibras	9
2.2.2. Materiales para la regeneración de tejido óseo	9
2.2.3. Quitosano	10
2.2.4. Alcohol polivinílico	12
2.2.5. Hidroxiapatita	14
2.2.6. Nanopartículas de plata	14
2.3. Electrohilado	15
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivo	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Estandarización de la síntesis de nanofibras	20

6.1.1.	Preparación de hidroxiapatita con nanopartículas de plata . . .	20
6.1.2.	Preparación de la solución PVA/Qts/AgHAp y electrohilado .	20
6.2.	Caracterización del andamio PVA/Qts/AgHAp	21
6.2.1.	Microscopia electrónica de barrido	21
6.2.2.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	21
6.2.3.	Ángulo de contacto	21
6.2.4.	Prueba de hinchamiento	22
6.2.5.	Ensayo de degradabilidad	22
6.3.	Modelo <i>in vitro</i>	23
6.4.	Prueba de viabilidad celular en MG-63 con precursores AgHAp por ensayo de MTS	23
6.5.	Prueba de viabilidad celular en MG-63 con nanofibras de PVA/ Qts/AgHAP por ensayo de MTS	24
6.6.	Ensayo de mineralización basado en rojo de Alizarina	24
6.7.	Identificación de proteínas específicas en la regeneración ósea de la línea celular MG-63 tratadas con nanofibras	25
6.8.	Actividad antimicrobiana	26
6.9.	Análisis estadístico	26
7.	Resultados	27
7.1.	Estandarización de la síntesis de la fibra PVA/Qts/AgHAP	27
7.2.	Caracterización de la fibra PVA/Qts/AgHAP	29
7.2.1.	Caracterización morfológica por Microscopía Electrónica de Barrido	29
7.2.2.	Caracterización por Espectrofotómetro de transformada de Fourier	30
7.2.3.	Caracterización por ángulo de contacto	31
7.2.4.	Prueba de Hinchamiento	32

7.2.5. Caracterización por Degradabilidad	33
7.3. Determinación de la viabilidad celular en MG-63 con precursores de AgHAP.	34
7.4. Determinación de la viabilidad celular en MG-63 con nanofibras de PVA/Qts/AgHAP.	37
7.5. Determinación de la mineralización de la fibra en un modelo <i>in vitro</i> .	38
7.6. Determinación de proteínas específicas en la regeneración ósea de la línea celular MG-63 tratadas con nanofibra	39
7.7. Determinación de la actividad antimicrobiana de la fibra en un modelo <i>in vitro</i>	42
8. Discusión	44
9. Conclusión	51
10.Perspectivas	52
Bibliografía	53

Índice de tablas

- 1. Propiedades físicas del PVA en estado puro (Aslam, Kalyar y Raza 2018) 13
- 2. Parámetros evaluados utilizando la solución de PVA/Qts/AgHAP . . . 28
- 3. Porcentaje de degradación de las fibras al día 30 34

Índice de figuras

1.	Proceso de remodelación ósea.	6
2.	Estructura molecular del quitosano (Chatterjee et al. 2022).	10
3.	Estructura molecular del PVA (Salman, Bakr y Humad 2018).	12
4.	Estructura molecular de la hidroxiapatita (Panda, Biswas y Paul 2021).	14
5.	Fotografía de una fibra PVA/Qts/AgHA.	27
6.	Microscopía electrónica de barrido de la fibra PVA/Qts/AgHAp con un objetivo de 10'000X.	29
7.	Microscopía electrónica de barrido de la fibra PVA/Qts/AgHAP con un objetivo de 25'000X.	30
8.	Espectrofotometría transformada de Fourier de la fibra PVA/Qts/AgHAP y sus elementos.	31
9.	Determinación del ángulo de contacto de las fibras PVA/Qts y las que contienen HAp o AgHAp a diferentes concentraciones.	32
10.	Determinación del hinchamiento de las fibras PVA/Qts y las que contienen HAp o AgHAp a diferentes concentraciones.	33
11.	Determinación del porcentaje de degradación de la fibra HAp e AgHAp a diferentes concentraciones.	34
12.	Determinación de la concentración no citotóxica de AgNO ₃ en la línea celular MG-63 a 24 horas.	35
13.	Determinación de la concentración no citotóxica de HAp en la línea celular MG-63 a 24 horas.	36
14.	Determinación de la concentración no citotóxica de AgHAP en la línea celular MG-63 a 24 horas.	36
15.	Determinación de la concentración no citotóxica de la fibra PVA/Qts en la línea celular MG-63 a 24 horas.	37
16.	Determinación de la concentración no citotóxica de la fibra PVA/Qts/HAP en la línea celular MG-63 a 24 horas.	38

17.	Porcentaje de mineralización de 3, 7 y 14 días en células MG-63.	39
18.	Determinación de la expresión relativa de fosfatasa alcalina (ALP) en la línea celular MG-63 a: a) 7 días; b) 14 días; c) y su comparación entre ambos tiempos.	40
19.	Determinación de la expresión relativa de proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) en la línea celular MG-63 a: a) 7 días; b) 14 días; c) su comparación entre ambos tiempos; d) y su comparación entre la fibra PVA/Qts frente a las fibras que contienen HAp e AgHAp.	41
20.	Determinación de la expresión relativa de osteocalcina (OCN) en la línea celular MG-63 a: a) 7 días; b) 14 días; c) su comparación entre ambos tiempos; d) y su comparación entre la fibra PVA/Qts frente a las fibras que contienen HAp e AgHAp.	41
21.	Actividad antimicrobiana en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> a las 24 horas en Agar Muller-Hinton para las muestras: 1. Fibra PVA/Qts, 2. Fibra PVA/Qts/HAp 10, 3. Fibra PVA/Qts/HAp 15, 4. Fibra PVA/Qts/AgHAp 10 y 5. Fibra PVA/Qts/AgHAp 15.	43
22.	Actividad antimicrobiana en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> a las 24 horas en Agar Muller-Hinton para las muestras: 1. Fibra PVA/Qts, 2. Fibra PVA/Qts/HAp 10, 3. Fibra PVA/Qts/HAp 15, 4. Fibra PVA/Qts/AgHAp 10 y 5. Fibra PVA/Qts/AgHAp 15 embebida en la solución PVA/Qts/AgHAp 15.	43

Abreviaturas

AgHAp	Hidroxiapatita con plata
ALP	Fosfatasa alcalina
BMP-2	Proteína morfogénica ósea 2
HAp	Hidroxiapatita
OCN	Osteocalcina
PVA	Alcohol polivinílico
PVA/Qts	Fibra a base de alcohol polivinílico y quitosano
PVA/Qts/AgHAp	Fibra a base de alcohol polivinílico y quitosano cargada con hidroxiapatita con plata
Qts	Quitosano

Resumen

El hueso es un tejido dinámico que constantemente se encuentra remodelándose al sustituir las zonas dañadas por una matriz calcificada de *novo*. Sin embargo, en algunas ocasiones los daños producidos por trastornos o traumas no permiten que células, como los osteoblastos regeneren el tejido de manera rápida y efectiva. La OMS estima que aproximadamente 436 millones de fracturas se producen al año, es por ello de vital importancia la necesidad de utilizar nuevos tratamientos que permitan una regeneración adecuada; la implementación de nuevos procedimientos como las membranas nanofibrosas electrohiladas han demostrado permitir, mejorar y desarrollar la remodelación ósea, ya que incrementan el área superficial, modifican el perfil de liberación de activos, funciona como soporte y tienen capacidad de mimetizar la matriz extracelular. En este trabajo se estandarizó el proceso de síntesis y evaluación de la actividad biológica de una membrana nanofibrosa, producida a partir de dos polímeros bioactivos, poli (vinil alcohol) y quitosano adicionado con nanopartículas de hidroxiapatita con plata por medio de la técnica de electrohilado. La morfología de la nanofibra se caracterizó por microscopia electrónica de barrido (SEM), con un tamaño promedio de 127.5 nm, así como su hidrofobicidad por ángulo de contacto donde se observaron propiedades hidrofílicas y una tasa de degradación prolongada. Además, se realizó una espectroscopia de infrarrojo FT-IR para identificar la interacción de los grupos funcionales del material, donde se observó que la capacidad de hinchamiento es debido a los grupos funcionales OH y NH₃. La viabilidad celular del material se evaluó empleando la técnica colorimétrica de MTS en la línea celular preosteoblástica MG-63, así como la mineralización por rojo de alizarina y la producción de proteínas específicas de regeneración ósea como: fosfatasa alcalina, la proteína morfogénica ósea 2 y osteocalcina por medio de ELISA. Se demostró que el material promovió la actividad mineralizante y proteica de las células, principalmente para aquellas muestras con hidroxiapatita a 10 µg/ml. Finalmente se realizó un antibiograma para evaluar la actividad antimicrobiana de la membrana electrohilada donde se probó que tienen características bacteriostáticas. Por lo tanto, se encontró que las fibras de PVA/Qts adicionadas con 10 µg/ml de HAp son un buen modelo de regeneración ósea, mientras que las muestras PVA/Qts cargadas con 10 µg/ml de AgHAp pueden ser un buen modelo para tratamientos de reparación y osteomielitis. Demostrando la posibilidad de la membrana para ser utilizada en regeneración ósea.

Abstract

Bone is a dynamic tissue that is constantly remodeling itself *in novo*, replacing damaged areas with a new calcified matrix. However, the damage caused by disorders or trauma sometimes does not allow cells like osteoblasts to repair the damage quickly and effectively. The World Health Organization estimates that approximately 436 million fractures occur each year, therefore the urgent importance to develop treatments that allow adequate regeneration. The development of new materials, such as electrospun membranes, that have the advantage of mimicking the extracellular matrix and incrementing the surface area, which are excellent alternatives in treatments for the regeneration of bone tissue. In this work, it was standardized the synthesis of the membrane from poly(vinyl alcohol) and chitosan by adding hydroxyapatite and silver nanoparticles by electrospinning. Once the nanofiber was obtained, the morphology was characterized by SEM, where it had a size of 127.5 nm, the hydrophobicity with a goniometer, the swelling and degradability of the fiber, where it show been hydrophilic and a prolonged degree of degradation. FT-IR spectroscopy determinated that his capacity was due to the bonds on the fuctional groups OH and NH₃. Fiber viability was evaluated on the osteoblast cell line MG-63, it showed no cytotoxicity at the concentrations analyzed; the material stimulated the mineralization and production of osteocalcin with a dose of hydroxyapatite at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Finally, the membrane has antimicrobial and antifungal activity. Demonstrating that the membrane can be suitable for stimulating the regeneration of bone cell lines.

1. Introducción

En el 2021 la Organización Mundial de Salud dio a conocer que aproximadamente 1,710 millones de personas presentan algún trastorno musculoesquelético, trayendo como consecuencia un estilo de vida condicionado en donde la movilidad se ve comprometida y por ende produciendo una menor capacidad de participación social y económica. Así mismo menciona que hay alrededor de 436 millones de fracturas por año las cuales pueden ocurrir a cualquier persona sin importar su género, edad u otros factores; aunque, este tipo de malestares se presentan más a menudo en adultos mayores, se espera que las cifras sigan aumentando en personas jóvenes con estilos de vida activos.

Los tratamientos convencionales de relleno y regeneración ósea se caracterizan por utilizar materiales cerámicos, principalmente como relleno entre prótesis metálicas y el hueso; sin embargo, los tratamientos convencionales como cementos óseos presentan la desventaja de presentar nula o baja biocompatibilidad e inadecuadas propiedades mecánicas.

La búsqueda por encontrar nuevos materiales y técnicas para la regeneración de tejido óseo ha llevado a los investigadores a probar tratamientos que simplifiquen o reduzcan los tiempos de regeneración ocasionados por traumatismos, deformaciones, cáncer u otros padecimientos.

Por lo anterior, el estudio y comprensión de la naturaleza del hueso se ha vuelto de gran importancia, ya que puntos clave como la morfología, función y procesos regenerativos han dado pie a la implementación de métodos que van desde cirugías de injertos óseos hasta el uso de andamios que fungen como estructuras de soporte o plantillas para las células promoviendo la formación de nuevo tejido. Los avances reportados en la implementación de andamios para la regeneración de tejido óseo han promovido su uso teniendo como consecuencia un gran auge en los últimos años.

Entre las distintas técnicas para la producción de andamios se destaca al electrohilado (electrospinning), ya que esta permite sintetizar fibras de tamaños nano y

micrométricas las cuales aportan ventajas como buena relación área volumen, flexibilidad de superficie, alta porosidad, buen rendimiento mecánico, siendo este último superior a las observadas en sales inorgánicas (polvos) y cementos óseos; además la capacidad de imitar la matriz extracelular nativa provee así la adherencia y el crecimiento celular sobre la membrana producida. Básicamente esta técnica consiste en el uso de una solución polimérica que ha sido cargada eléctricamente para romper su tensión superficial y así poder ser eyectado y dirigido por fuerzas eléctricas hacia una lámina colectora; en el transcurso del viaje se evapora la parte soluble de la solución mientras que el material residual se estira hasta formar finas fibras que se depositan en el colector.

Para el electrohilado se han investigado diferentes materiales que le proporcionen al andamio la capacidad de regenerar el tejido óseo; para ellos se han seleccionado materiales tanto naturales como sintéticos que aporten la capacidad de biomimetizar el tejido deseado y promuevan la bioactividad celular, característica dada por los polímeros naturales como lo es el quitosano; así como propiedades mecánicas como lo son tracción y resistencia de los polímeros sintéticos como se ha descrito anteriormente sobre el PVA. Además, la implementación de polímeros con cerámicos como la hidroxiapatita para hueso provee de una excelente biocompatibilidad y bioactividad, pudiendo ser un modelo de regeneración superior al de los polvos y rellenos óseos.

Las células de osteosarcoma humano (MG-63) son un gran modelo *in vitro* para la regeneración de tejido óseo, ya que estas células tienen la capacidad de secretar proteínas que promueven la calcificación y regeneración del tejido óseo, un ejemplo de esto es la hormona paratiroidea (PTH), las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), la osteocalcina (OCN), entre otras.

Por esta razón, este trabajo propone obtener nanofibras por la técnica de electrohilado elaboradas a partir de PVA/QTS/AgHap y evaluar su potencial como andamio de regeneración ósea en un modelo *in vitro* de células de osteosarcoma humano MG-63.

2. Antecedentes

2.1. Histología del hueso

El hueso es un tejido conectivo mineralizado altamente vascularizado que proporciona resistencia y densidad necesaria para la movilidad. Estas características son esenciales para la composición del hueso compacto y trabecular. El hueso compacto está constituido por laminillas de matriz osteoide calcificada, en su composición micrométrica se encuentra una fase orgánica (compuesta principalmente por colágeno) y otra fase inorgánica principalmente constituida por hidroxapatita (Alcázar 2002).

Desde el punto de vista macroscópico se pueden clasificar dos tipos de estructura de acuerdo con la disposición de las laminillas óseas a las cuales se les denominan hueso compacto o trabecular. De manera particular el hueso compacto o cortical se caracteriza por presentar una alta densidad, gran dureza y fragilidad; en cuanto a su localización en el hueso este se encuentra en la parte externa (rodeando la zona trabecular) y está constituido por laminillas en disposición concéntrica conocidas como osteonas las cuales envuelven a los conductos de Havers en los que se encuentran nervios, vasos sanguíneos y linfáticos. En cambio, el hueso trabecular o esponjoso presenta una menor densidad, pero mayor porosidad que el hueso compacto; su estructura está constituida por laminillas en forma de red (trabéculas) que cruzan las cavidades internas del hueso en donde se encuentra la medula ósea (Hernández-Gil et al. 2006).

A nivel microscópico la matriz ósea extracelular está constituida por sales inorgánicas (70%), elementos orgánicos (20%) y agua (10%). La matriz inorgánica se encuentra formada principalmente por iones fosfato y calcio los cuales pasan por un proceso de nucleación para formar cristales de hidroxapatita representado químicamente como $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, siendo este el componente mayoritario de la matriz inorgánica ósea; además existen cantidades significativas, pero en menor proporción de sodio,

potasio, magnesio, entre otros compuestos presentes en el hueso. Por otra parte, la matriz orgánica está conformada principalmente por proteínas colágenas (90%), especialmente el colágeno tipo I, además podemos encontrar proteínas no colágenas como la osteocalcina, osteonectina, osteopontina, proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de crecimiento y proteoglicanos (Bhattacharai et al. 2018).

Las características que le confieren la composición del hueso tanto a escala macrométrica como la micrométrica permite que el hueso cumpla con funciones clásicas previamente descritas, entre las que destacan la locomoción, soporte y protección de tejidos blandos, almacenamiento de iones calcio y fosfato, así como la capacidad hematopoyética conferida por la médula ósea (Florencio-Silva et al. 2015).

2.1.1. Remodelación del tejido óseo

Como otros tejidos el hueso a lo largo de su vida sufre remodelaciones constantes por lo que se le conoce como un tejido dinámico; así mismo, la función principal de estas remodelaciones es prevenir la acumulación de daño óseo mejorando la resistencia mecánica, así como el mantenimiento de sales, entre ellas el calcio. Para ello, esta tarea es llevada a cabo por un conjunto de células:

- **Osteoblastos:** Son células cuboides que se derivan de las de las células madre mesenquimales (MSC). Estas células comprenden el 4-6% del total de las células presentes en la superficie ósea; su función principal es la secreción de osteoide hacia la matriz ósea para la formación de *novo* del hueso. Algunos factores de diferenciación que podemos encontrar son la hormona paratiroidea (PTH), y las citocinas como las interleucinas (IL) 6 y 11, las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y osteocalcina (OCN).
- **Osteocitos:** Son las células más abundantes con un 90-95% de las células óseas totales; se encuentran dentro de la matriz ósea mineralizada y se derivan de la diferenciación de osteoblastos. Estas células funcionan como mecanosensores detectando presiones y cargas mecánicas, ayudando a la adaptación del hueso a las fuerzas mecánicas ejercidas por las actividades cotidianas. A diferencia de los osteoblastos estas células presentan una expresión a la baja de osteocalcina y PTH a medida que se diferencian, además expresan CD44 un receptor de membrana que no se encuentra presente en osteoblastos.

- **Osteoclastos:** Células multinucleadas que se originan a partir del linaje de las células madre hematopoyéticas; los osteoclastos comprenden solo el 1-2% de las células: Su función principal es la reabsorción ósea de tejido viejo o dañado, para que posteriormente los osteoblastos puedan generar nuevamente la matriz ósea. Para llevar a cabo su función estas células liberan enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, entre otras (Florencio-Silva et al. 2015).
- **Células del revestimiento óseo:** Son células que se encuentran sobre la superficie ósea. Su principal función es mantener el equilibrio entre la formación ósea, al dirigir la liberación de minerales en el hueso; y la absorción del material dañado llevada a cabo por los osteoclastos. Para llevar a cabo este equilibrio estas células liberan RANKL y el factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1) regulando de esta manera la diferenciación de los osteoclastos (Bhattarai et al. 2018).

La acción de estas células promueve la remodelación ósea en un ciclo complejo en el que además intervienen factores locales incluyendo moléculas autocrinas y paracrinas así como factores de crecimiento, citocinas y prostaglandinas. El ciclo de remodelación se divide en cuatro etapas consecutivas, iniciando con el reclutamiento de precursores osteoclásticos por la acción de RANKL y M-CSF hacia la superficie trabecular o endóstica en la profundidad de una osteona; a continuación, los osteoclastos maduros labran una laguna (laguna de Howship) que posteriormente, en la fase de inversión es invadida por células lining, lo que permite que osteoblastos maduros regeneren la cavidad. Para finalizar, se produce mineralización y la producción de hueso maduro. En el esqueleto adulto de una persona sana existen aproximadamente 2 millones de sitios de remodelación que trabajan a una velocidad de $25 \mu m$ por día reemplazando un volumen óseo de $0.025 mm^3$ en cada micrositio, obteniendo una tasa de remodelado anual del 10% (3% en hueso cortical y 30% en trabecular) (Arboleya y Castaneda 2013).

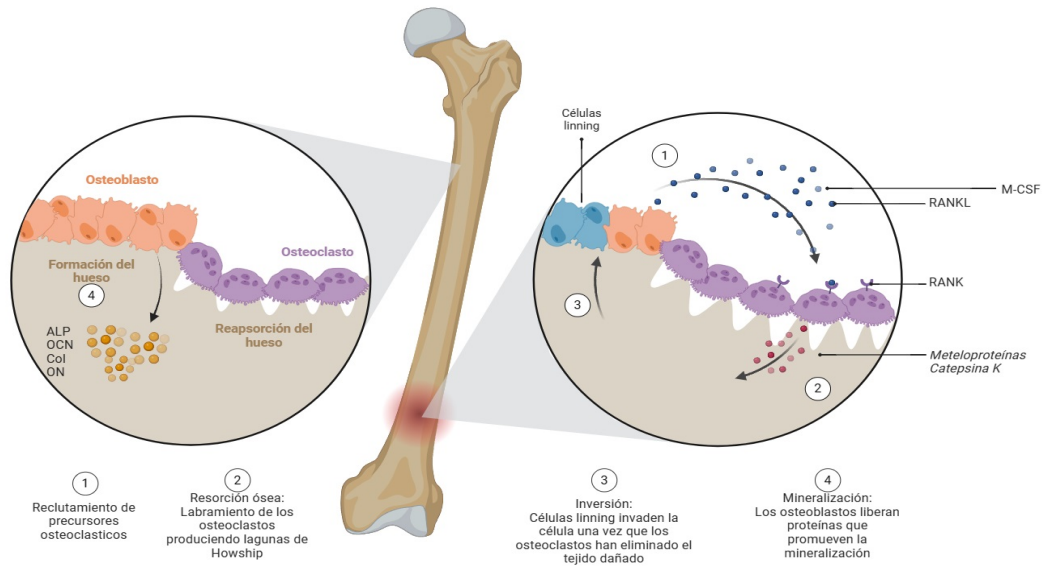


Figura 1: Proceso de remodelación ósea.

2.1.2. Osteoblasto

El encargado de la formación ósea una vez que los osteoclastos han absorbido el tejido óseo dañado son los osteoblastos. Estas células responden a señales procedentes de los sitios de remodelado producidos por la matriz reabsorbida o de los osteoclastos y una vez situados en la superficie ósea producen la matriz osteoide. Sin embargo, para que esto pueda darse, previamente las células madre mesenquimales empiezan un proceso de diferenciación a células osteoblásticas, en donde el regulador maestro de diferenciación Runx2 marca previamente este linaje celular. Además, otros estudios demuestran que intervienen más factores, siendo los más relevantes PTH/PTHrp, GH/IGF-1, TGF- β y la vía Wnt. También, numerosos factores regulan la proliferación, diferenciación y metabolismo de los osteoblastos, entre los más importantes podemos destacar la hormona paratiroidea (PTH), y las citocinas como las interleucinas (IL) 6 y 11, las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y los factores transformantes del crecimiento beta (TGF- β s) (Chen, Deng e Y.-P. Li 2012).

2.1.3. Reparación de tejidos: Injertos óseos

La regeneración ósea al ser un ciclo complejo debe de mantener una homeostasis entre sus componentes para poder llevarse a cabo de manera adecuada. Sin embargo, este proceso puede verse afectado por fracturas de unión tardía produciendo una demanda regenerativa más allá del potencial de autocuración. En estos casos se requiere intervención quirúrgica para tratar los defectos óseos por medio de injertos óseos naturales como (Bhattarai et al. 2018):

- **Autoinjertos:** Los injertos autólogos consiste en extraer una parte del hueso del paciente e insértalo en la zona dañada. Esto presenta la ventaja de evitar el rechazo inmune, además de conservar sus propiedades regenerativas y de remodelación; sin embargo, su uso es limitado debido a la morbilidad en el sitio de recolección.
- **Aloinjertos:** El injerto óseo se toma de un donante, pudiéndose recolectar mayores cantidades que en el autoinjerto. La desventaja de estos injertos es su falta de integración y mayor porcentaje de rechazo que los autoinjertos.
- **Xenoinjertos:** Los injertos heterólogos, se derivan de otras especies animales, por lo general estos pueden ser de origen porcino o bovino. Su disponibilidad es prácticamente ilimitada, pero tienen como desventaja de presentar el mayor porcentaje de rechazo, además de que se corre el riesgo de una posible transmisión de zoonosis si no se realiza un procedimiento adecuado.

Por las desventajas presentadas en los injertos óseos naturales, se ha buscado la manera de solucionar estos problemas con el uso de la ciencia de los materiales, utilizando injertos óseos sintéticos como biomateriales prometedores para el futuro.

2.1.4. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo relativamente nuevo en el cual se busca restablecer la función de órganos a partir del trabajo conjunto de células y biomateriales.

Los biomateriales son de gran importancia en la ingeniería de tejidos ya que proveen de un entorno adecuado para que exista unión celular, proliferación, diferenciación y neogénesis tisular. Sin embargo, hoy en día existen diferentes tipos de biomateriales incluidos, hidrogeles, andamios porosos y fibras que buscan cumplir con la mayoría si no es que todos los requisitos necesarios para poder ser usados como bioimplantes. En este caso, para que un andamio sea considerado como óptimo en la regeneración de tejidos este debe tener la capacidad de imitar las propiedades mecánicas y funcionales de la matriz extracelular (Han et al. 2021).

La regeneración de tejido óseo presenta un desafío importante que es la implementación de un biomaterial que no solo imite la matriz extracelular ósea, sino que además tenga una función osteoconductora que produzca la restauración del hueso dañado. También, los andamios de tejido óseo deben poseer una gran resistencia mecánica, porosidad, poros interconectados y una gran superficie que permita la integración de células osteogénicas; por lo que se ha visto que los andamios nanofibrosos son más que adecuados para la ingeniería de tejidos óseos debido a que imitan de gran manera la matriz extracelular ósea lo que permite un mejor soporte para la adhesión de células pre-osteoblásticas como las MG-63 (Udomluck et al. 2019)

Las células pre-osteoblásticas MG-63 son obtenidas de osteosarcoma y representan un gran modelo *in vitro* para la regeneración de tejido óseo, ya que presentan la capacidad de secretar proteínas que promueven la calcificación y regeneración del tejido óseo como la hormona paratiroidea (PTH), las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y osteocalcina (OCN) (Arboleya y Castaneda 2013).

2.2. Nanotecnología

La nanotecnología se puede definir como la capacidad de observar, medir, manipular, ensamblar, controlar y fabricar materia a escala nanométrica. Se le ha designado a la nanotecnología como parte una la ciencia, ingeniería y tecnología que permite aplicaciones novedosas en campos como la química, física, biología e incluso hasta ramas como la medicina e ingeniería (Bayda et al. 2019).

Desde que se acuñó el término de “*nanotecnología*” en 1959 por Richard Feynman ha existido un creciente interés en su aplicación, siendo así que es considerada como una

de las tecnologías más prometedoras de nuestro siglo. Tanto es así que los avances en este campo en los últimos años han permitido la implementación de nuevos materiales como nanopartículas, nanofibras y nanocompuestos (Oliveira et al. 2021).

2.2.1. Nanofibras

Las nanofibras como su nombre lo indica son fibras de tamaño nanométricas hechas a partir de una gran variedad de polímeros, carbón y semiconductores para diferentes aplicaciones que van desde la ingeniería de tejidos, filtración de medios, refuerzo de nanocompuestos, por mencionar algunas (Tan y Lim 2006).

Desde hace algunos años se han desarrollado métodos para producir fibras a partir de distintos polímeros como lo son un hilado húmedo, seco, fundido y en gel; sin embargo, estas técnicas mostraron no ser las más adecuadas para obtener fibras de tamaño nanométrico, ya que muchos de los rangos de los diámetros de las fibras sintetizadas alcanzaban a medir entre 10-100 μm . Años más tarde en 1887, Charles V. Boys sintetizó una fibra ultrafina con diámetros nanométricos por una técnica a la cual se le denominó electrohilado.

Actualmente, la versatilidad de producir nanofibras poliméricas es gracias a técnicas como separación de fases, síntesis de plantilla, autoensamblaje, entre otras; pero el electrohilado se mantiene como una de las herramientas más importantes ya que es económica, simple y ajustable, lo que permite adecuar esta técnica para mimetizar estructuras fibrosas de la matriz extracelular nativa del tejido (Stocco et al. 2021).

2.2.2. Materiales para la regeneración de tejido óseo

Los materiales empleados son de vital importancia en la producción de nanofibras para la regeneración de tejidos óseos, ya que estos deben cumplir con características específicas propias del tejido a regenerar (propiedades mecánicas, adherencia y proliferación celular, porosidad y osteoconductividad) y de la técnica que se empleara. Por lo general, se utilizan polímeros tanto sintéticos como naturales, ya que de esta manera complementan las deficiencias que presentan de manera individual, obteniendo así los mejores resultados. Los polímeros sintéticos tienen propiedades mecánicas

modificables, además de algunas propiedades fisicoquímicas como elasticidad, resistencia a altas temperaturas, entre otras; pero comúnmente presentan baja actividad y adherencia celular. En cambio, los polímeros naturales tienen mayor bioactividad, tienen buena solubilidad, biodegradabilidad y capacidad de adsorción; pero presentan deficiencias en ciertas propiedades mecánicas (M. Zhang et al. 2022).

2.2.3. Quitosano

El quitosano es un polímero derivado de la quitina, esta última es el biopolímero más abundante después de la celulosa. La quitina puede ser encontrada en un amplio rango de eucariotas como crustáceos, insectos y hongos. La quitina es un polímero cuyos monómeros constan de N-acetil-D-glucosamina, cuando una desacetilación y las unidades repetitivas en el polímero están predominantemente sin el grupo funcional acetilo, es decir, como β -1,4-D-glucosamina, el polímero es conocido como quitosano (Kou, Peters y Mucalo 2021; Romero-Serrano y Pereira 2020).

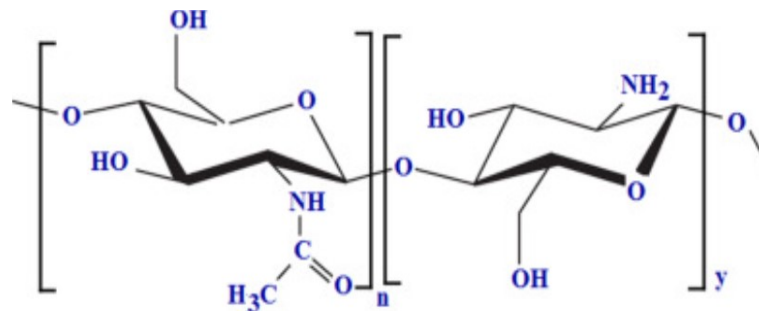


Figura 2: Estructura molecular del quitosano (Chatterjee et al. 2022).

El quitosano posee la característica de ser biocompatible, biodegradable y no tóxico; estas características en conjunto con su gran disponibilidad lo hacen ideal para la producción de biomateriales. Actualmente una gran variedad de productos derivados del quitosano se está reportando en la literatura científica, algunas aplicaciones reportadas incluyen: la preservación de alimentos, biotecnología, suplementos dietéticos, antifúngicos y antibacteriales (Romero-Serrano y Pereira 2020).

Propiedades físicas

El quitosano resulta un polisacárido catiónico, además de esto el quitosano es un polímero insoluble a pH neutro y básico debido a sus enlaces intra e intermoleculares formados por enlaces de hidrogeno. La forma cristalina de sus grupos amino protonables le permiten ser soluble en soluciones acidas ya que se incrementa la polaridad y las repulsiones electrostáticas. El quitosano está formado por unidades moleculares de D-glucosamina y N-acetil- D-glucosamina. A diferencia de la celulosa el quitosano muestra mayor reactividad, lo que confiere mayor versatilidad para reacciones químicas, debido a las posibles sustituciones en los sitios activos aminos ubicados en la posición C2 (Romero–Serrano y Pereira 2020).

Aplicaciones

Debido a las buenas propiedades del quitosano como la biodegradabilidad, el origen natural, la abundancia este material ha sido empleado en áreas como la medicina, agricultura, procesamiento de alimentos, mejora nutricional, cosméticos y tratamiento de aguas y desecho.

Algunos ejemplos de aplicaciones biomédicas son piel artificial, suturas quirúrgicas, vasos sanguíneos artificiales, liberación controlada de fármacos, lentes de contacto, líquido para el humor ocular, vendajes, esponjas, apósitos para quemaduras, control del colesterol en sangre, ingeniería de tejidos (Cheba 2020; Ibrahim y El-Zairy 2015).

El quitosano se ha empleado en gran variedad de campos los cuales incluye regeneración de tejido nervioso, piel y hueso; este último con interesantes resultados al sintetizar nanofibras electrohiladas a partir de quitosano y policaprolactona (PCL) obteniendo fibras de 350 a 500 nm. También se observó que andamios nanofibrosos a base de hidroxiapatita (HA) y quitosano muestran mejores resultados en evaluaciones mediante tinción con fosfatasa alcalina (ALP) en células madre mesenquimales derivadas de medula ósea (BMSC) en comparación con otras membranas compuestas de HA/quitosano. Además, en los resultados obtenidos por Liu et al. muestra la reparación de un defecto calvarial de tamaño crítico con el andamio HA/quitosano (Aoki et al. 2020).

2.2.4. Alcohol polivinílico

El alcohol polivinílico (PVA) fue descubierto en el año 1924 por los científicos alemanes W. Haehnel y W.O. Herrmann mientras obtenía una solución de poli (vinil alcohol) saponificando poli (vinil éster) con solución de sosa cáustica (Halima 2016). El polímero de PVA fue introducido comercialmente en los Estados Unidos de América hasta 1939 (Aslam, Kalyar y Raza 2018; Halima 2016; Jaffe y Rosenblum 1990).

El PVA es un polímero sintético lineal hidrofílico, no tóxico muy estable durante largos periodos en diferentes condiciones de pH y temperatura (Echeverri Cuartas, Vallejo y Londoño 2009; Baker et al. 2012; Halima 2016). Este se produce por la hidrólisis parcial o total del acetato de polivinilo para eliminar los grupos acetatos, a su vez la cantidad hidroxilación determina las características físicas, las propiedades químicas y las propiedades mecánicas del PVA, es decir que cuanto mayor sea el grado de hidroxilación y polimerización del PVA, menor será la solubilidad en agua y más difícil será su cristalización, (Baker et al. 2012). Debido a lo anterior el PVA se puede clasificar en dos grupos, a saber: totalmente hidrolizado y parcialmente hidrolizado (Halima 2016).

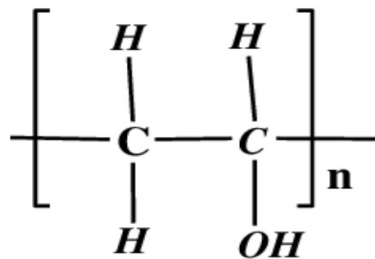


Figura 3: Estructura molecular del PVA (Salman, Bakr y Humad 2018).

Propiedades físicas

PVA tiene la característica de ser semicristalino o lineal sintético cremoso o blanquecino, insípido, inodoro, no tóxico, biocompatible, termoestable, granular o en polvo, además de esto posee muy buenas propiedades ópticas, gran rigidez dieléctrica y excelente capacidad de almacenamiento de carga. También, presenta propiedades como la viscosidad y solubilidad las cuales se ven influenciadas por el peso molecular y la

cantidad de grupos acetatos presentes en el material (Aslam, Kalyar y Raza 2018).

Propiedades físicas del PVA en estado puro

Propiedades físicas	Descripción
Apariencia	Cremosa a blanquecina, granular, en polvo
Densidad aparente	641 kg s/m^3
Punto de ebullición	228°C
Punto de fusión	230°C <i>Totalmente hidrolizado</i> 180°- 190°C <i>Parcialmente hidrolizado</i>
Densidad	1.19 - 1.31 g/cm^3
Calor específico	1,5 J/(g-K)

Tabla 1: Propiedades físicas del PVA en estado puro (Aslam, Kalyar y Raza 2018)

Las características fisicoquímicas es decir densidad, cristalinidad, formación de película, solubilidad en agua, volumen molar, grado de polimerización, se guían por el número de grupos hidroxilo presentes en el polímero del PVA (Aslam, Kalyar y Raza 2018). Las propiedades físicas del PVA puro se enlistan en la tabla 1.

Aplicaciones

El PVA ha servido para desarrollar hidrogeles y membranas con funciones biomédicas como lentes de contacto, hemodiálisis, así como materiales médicos, implantes para reemplazar cartílago. Las propiedades del PVA lo han convertido en un buen candidato para simular tejidos del cuerpo como lo son los cartílagos y hueso (Baker et al. 2012).

La utilización de PVA de medio peso molecular (124000 g/mol) en andamios electrohilados con partículas cerámicas nanométricas de hidroxiapatita (HAp) han generado la síntesis de nanofibras de 150 nm de diámetro los cuales mostraron mejores resultados en la actividad de ALP, en la tinción de rojo de alizarina y en la diferenciación de osteoblastos en comparación con andamios únicamente de PVA (Aoki et al. 2020).

2.2.5. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (Hap) es un biocerámico que constituye la mayor parte de la fase inorgánica del hueso. Su fórmula general $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, siendo el 39% en peso de Ca, 18.5% en P y 3.38% de OH. La hidroxiapatita sintética al ser muy similar química y estructuralmente a la que se encuentra de manera natural en el hueso es ampliamente utilizada como biomaterial osteogénico (Murugan y Parcha 2021).

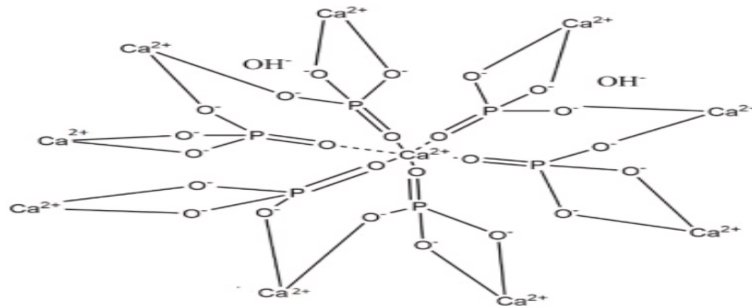


Figura 4: Estructura molecular de la hidroxiapatita (Panda, Biswas y Paul 2021).

La incorporación de hidroxiapatita en andamios como las nanofibras para la ingeniería de tejidos óseos han mostrado un buen desempeño en la bioactividad, biocompatibilidad y capacidad osteoconductora; sin embargo, su uso como nano hidroxiapatita ha incrementado estas características y ha mejorado la capacidad de integración ósea, así como su similitud con el componente mineral del tejido óseo natural (Stocco et al. 2021).

2.2.6. Nanopartículas de plata

Por otro lado, la plata es un metal que se ha utilizado para aplicaciones principalmente antibacterianas; pero, en los últimos años con los avances en nanomateriales, se logró producir nanopartículas de plata (AgNP) ampliando su uso; un ejemplo de esto es la reparación de heridas, tratamientos contra el cáncer y la promoción de regeneración ósea (Xue et al. 2017).

Sin embargo, la implementación de nanopartículas de plata en la regeneración de

tejido óseo debe ser tomado con cuidado, ya que se ha visto que su uso en altas concentraciones puede ser citotóxico para las células presentes en estos tejidos. Además, se ha observado que las AgNP tiene una baja osteoconductividad por lo que su uso en conjunto con biocerámicos como la hidroxiapatita podría promover la viabilidad celular (Albrektsson y Johansson 2001).

Aplicación

La aplicación de nanopartículas de hidroxiapatita se ha combinado con distintos polímeros sintéticos como lo es el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico, polica-prolactona y el poli (ácido láctico-co-glicólico) mejorando el crecimiento de células osteoblásticas y el aumento de osteogénesis. La mezcla de hidroxiapatita con un polímero natural como el quitosano mostro buenos resultados en la formación de hueso similar al hueso natural, además de presentar buenas propiedades mecánicas (Rajula et al. 2021).

También se ha observado que la implementación de AgNP promueve la proliferación celular y osteogénesis de las células madre mesenquimales (MSC) por lo que se ha concluido que su uso podría ser beneficioso para la curación de heridas óseas (R. Zhang et al. 2015).

2.3. Electrohilado

El electrohilado nos permite producir fibras de tamaño nanométrico por la inducción de fuerzas electroestáticas aplicadas a una solución polimérica, expulsando la solución por un potencial de alto voltaje entre una aguja cargada positivamente y un colector conectado a tierra. Para que esto suceda la carga electroestática debe superar la tensión superficial de la solución polimérica; cuando esto ocurre se produce una estructura en forma de cono elongado (Cono de Taylor) en la punta de la aguja, lo que posteriormente se convertirá en chorro eyectado; durante el trayecto hacia el colector la parte del solvente se evapora, mientras que el material restante se une en forma de hilos largos pero delgados sobre el colector. De manera general, la técnica de electrohilado está conformada por tres unidades principales para llevar

a cabo su función, un suministro de alto voltaje, una placa colectora y un eyector (Keshvardoostchokami et al. 2021).

Las nanofibras producidas a partir de la técnica de electrohilado proporcionan características favorables para su uso en la regeneración de tejidos, entre las más importantes esta su capacidad de procesar una gran variedad de polímeros tanto naturales como sintéticos, ya que su uso de manera individual no cumple con los requerimientos necesarios como bioactividad (polímeros sintéticos) y mecánicas (polímeros naturales). Así mismo el control de las propiedades de las nanofibras electrohiladas en base a los materiales utilizados y los parámetros de procesamiento proveen una gran ventaja sobre otras técnicas; ya que nos permite imitar fácilmente la matriz extracelular con una buena interconectividad espacial (porosidad) de tal modo que las células sean capaces de iniciar un proceso regenerativo. (Niemczyk-Soczynska et al. 2021).

El control de los parámetros en el electrohilado es de vital importancia a la hora de producir nanofibras como andamios en la ingeniería de tejidos, como lo es el voltaje, velocidad de flujo, grosor del eyector y la distancia entre el colector y el eyector. El incremento o disminución de algún parámetro, puede afectar negativamente la síntesis de las nanofibras producidas.

3. Justificación

En los últimos años se ha incrementado el número de personas que presentan algún trastorno o daño en el tejido óseo, lo que ha llevado a la necesidad de buscar nuevas técnicas y materiales que mejoren y reduzcan los tiempos de recuperación. Actualmente se están investigando materiales en el área de ingeniería de tejidos para la producción de andamios tanto naturales como sintéticos que promuevan la regeneración del hueso obteniendo hasta el momento buenos resultados, pero con deficiencias en la adhesión y proliferación celular o mecánicas. Avances en el área de la nanotecnología permiten el uso de técnicas como el electrohilado capaces de producir membranas con fibras nanométricas que imiten la matriz extracelular de los tejidos, siendo esta una de sus principales características frente a otros tratamientos como lo son nanopartículas o películas. Aunado a esto, el uso de nanomateriales como la hidroxiapatita (HAp) y la plata han tenido como consecuencia una mejor respuesta osteoconductora con las células osteoblásticas permitiendo una mejor regeneración. Por lo tanto, en este trabajo se propuso producir un andamio membranoso con fibras de tamaño nanométrico a base PVA/Qts adicionadas con AgHAp sintetizadas por la técnica de electrohilado con el objetivo de promover la regeneración ósea.

4. Hipótesis

Las nanofibras producidas a partir de alcohol polivinílico, quitosano y cargadas con hidroxiapatita con plata (PVA/Qts/AgHap) promueven el proceso de regeneración ósea en un modelo *in vitro* con células MG-63.

5. Objetivo

Desarrollar y evaluar el potencial de nanofibras electrohiladas de PVA/Qts/AgHAp en el proceso de regeneración ósea en un modelo *in vitro* de células osteoblásticas MG-63.

Objetivos específicos

1. Optimizar la síntesis de nanofibras y caracterizar fisicoquímicamente la síntesis de nanofibras de PVA/QTS/AgHap.
2. Examinar la viabilidad celular en MG-63 expuestas a nanofibras electrohiladas de PVA/Qts/AgHap por la técnica de MTS.
3. Analizar el proceso de mineralización a los 3, 7 y 14 días en células MG-63 cultivadas en nanofibras PVA/Qts/AgHap
4. Determinar la producción de proteínas y factores de crecimiento relacionado con el proceso de regeneración ósea en células MG-63 cultivadas en nanofibras.
5. Evaluar la actividad antimicrobiana y antifúngica de las nanofibras electrohiladas en *E. coli* y *S. aureus*.

6. Materiales y métodos

6.1. Estandarización de la síntesis de nanofibras

6.1.1. Preparación de hidroxiapatita con nanopartículas de plata

La síntesis de AgHap se realizó en base al método de coprecipitación de acuerdo con metodología de Martínez-Sanimiguel y colaboradores (2019).

Al fosfato de amonio dihidrogenado ($NH_4H_2PO_4$) al 0.012 M se le agregó nitrato de calcio tetrahidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) a 0.02 M a una relación 1:1 por titulación en agitación a 15 000 rpm. Se añadió urea al 0.03 M y nitrato de plata a 0.10 mg/mL ambos por goteo para obtener un volumen final de 100 mL, posteriormente se calentó a 80°C durante 30 minutos y se ajustó el pH a 5.5 utilizando una solución de hidróxido de amonio (NH_3) y se mantuvo en agitación durante 1 hora, posteriormente se dejó reposando durante 24 horas a 25°C. Se separó el precipitado y fue lavado con agua destilada a través de dos ciclos repetidos de centrifugación de 10 minutos a 4000 rpm y fue resuspendido en 25 mL de agua destilada, se secó a 80°C por 24 horas obteniendo una pasta grisácea y se maceró hasta obtener un polvo fino de AgHAp.

6.1.2. Preparación de la solución PVA/Qts/AgHAp y electrohilado

Se preparó una solución de PVA al 10% y se añadió una solución de Qts al 2% en relación 3:1 p/p. Posteriormente, se agregó 250 $\mu g/mL$ de AgHAp en la solución PVA/Qts, se mantuvo en agitación a 300 rpm durante 1 h. Finalmente, la solución

PVA/Qts/AgHAp se electrohiló a un flujo de 1 $\mu\text{L}/\text{h}$ con un voltaje de 20 kV, una humedad relativa menor a 35 % hasta que se obtuvo un grosor de 2 mm.

6.2. Caracterización del andamio PVA/Qts/AgHAp

6.2.1. Microscopia electrónica de barrido

El andamio electrohilado PVA/Qts/AgHAp se colocó sobre una cinta de grafito y se recubrieron con una capa de oro, posterior a ello se observó en un microscopio electrónico de barrido JOEL JXA 840A a 10,000 y 25,000x manteniendo condiciones de vacío.

6.2.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Las nanofibras obtenidas fueron cortadas en segmentos de 5 mm x 5mm y se analizaron por espectrofotometría de infrarrojo marca Perkin Elmer modelo Spectrum One con aditamento de (reflectancia totalmente atenuada) ART, en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} y 24 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} .

6.2.3. Ángulo de contacto

Para cada muestra se realizaron mediciones por triplicado dejando caer 7 μL de agua sobre la superficie del andamio por 1 segundo y se tomaron fotos para su estudio. Para su análisis se utilizó el programa Image J tomando el ángulo formado entre la superficie del material y la superficie de la gota.

6.2.4. Prueba de hinchamiento

El hinchamiento de las nanofibras se estudió utilizando solución salina y se evaluó el incremento del peso respecto al tiempo. Para ello se registró el peso inicial de las nanofibras (M_i), posteriormente los andamios fueron depositados en una placa de 6 pozos a los cuales se les adicionó $300 \mu L/$ de solución salina. Se realizaron mediciones en los minutos 0.5, 1, 3, 5, 7, 15, 30, 60 de incubación (M_s). Al terminó de cada tiempo se retiró el medio y posteriormente se pesó. Finalmente, se obtuvo el peso seco (M_s) de cada membrana. El ensayo de hinchamiento se realizó por triplicado y fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Hinchamiento}(\%) = \frac{M_s - M_i}{M_i} \times 100 \quad (6.1)$$

6.2.5. Ensayo de degradabilidad

La degradación de las nanofibras fue estudiada utilizando solución salina, y se evaluó la pérdida de peso de las nanofibras en función del tiempo. Las nanofibras fueron depositadas en placas de 6 pozos, posteriormente se añadieron 2 mL de solución salina a cada uno. Previo a sumergirlas en la solución salina, se registró su peso inicial (M_i). Además, se realizaron mediciones en los días 1, 3, 5, 7 14, 21 y 28 de incubación. Posteriormente, se retiró la solución salina, se dejó secar la membrana por dos días y finalmente se obtuvo el peso seco (M_s) de cada membrana al día 30. La degradación será calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Degradación}(\%) = \frac{M_i - M_s}{M_i} \times 100 \quad (6.2)$$

El ensayo se realizó por triplicado y se consideraron el promedio de 3 muestras para su posterior análisis.

6.3. Modelo in vitro

Se utilizó la línea celular MG-63 (Osteosarcoma humano), la cual fue obtenida del banco de líneas celulares del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Para su mantenimiento y proliferación se usó el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado al 5 % con suero fetal bovino y con antibiótico/antimicótico al 1 %. Las células crecieron en monocapas adherentes y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda al 5 % de CO₂.

6.4. Prueba de viabilidad celular en MG-63 con precursores AgHAp por ensayo de MTS

Utilizando tripsina al 0.05 % se disgregaron las células en la caja de cultivo y se resuspendieron en medio suplementado. En cajas de 96 pozos se sembraron 5,000 células por pozo y se procedió a incubar por 24 horas.

Se utilizaron concentraciones de hidroxiapatita, hidroxiapatita con plata y nitrato de plata a 250, 100, 50, 25, 15, 10 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ previamente esterilizados por tratamiento térmico a 200 °C y se dejó el tratamiento durante 24 horas. Se preparó la solución de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3- carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] añadiendo metosulfato de fenazina (PMS) y fueron disueltas en buffer de fosfatos o PBS (137 mM cloruro de sodio (NaCl), 2.7 mM cloruro de calcio (CaCl₂), 10 mM fosfato de sódico (Na_2HPO_4), and 1.8 mM Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)) en una relación 2:1:1 p/p/v (MTS). A la placa de células previamente tratada se le retiró el tratamiento y se agregaron 20 μL de MTS y 80 μL de DMEM a cada pozo en oscuridad y se incubaron durante 4 horas envuelta en aluminio y se midió la absorbancia en un lector de placa a una longitud de onda de 490 nm utilizando el equipo Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos de América).

6.5. Prueba de viabilidad celular en MG-63 con nanofibras de PVA/Qts/AgHAP por ensayo de MTS

Para este ensayo las fibras fueron esterilizadas por luz ultravioleta durante 20 minutos a 3000 microjoules utilizando el equipo CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, después se realizaron dos lavados con solución salina para eliminar los residuos del material y se volvió a esterilizar en las condiciones previas. En campana se cultivaron 5 000 células de la línea celular MG-63 viables sobre las fibras en placas de 96 pozos y se añadió un volumen final de 100 μ L de DMEM. A continuación, se evaluaron la citotoxicidad del material por triplicado en diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Al transcurrir el tiempo se utilizó el reactivo de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] para estimar la viabilidad celular relativa a partir de la absorbancia, para ello se colocaron 20 μ L/ por pocillo de solución fresca preparada de MTS/PMS/PBS (2/1/1) μ g//mL en PBS estéril y se dejará incubar durante 4 h a 37 °C en CO₂ al 5%. La absorbancia de cada pozo se medirá a 490 nm usando un lector de microplacas ELISA, la fórmula para calcular la viabilidad relativa se expresa a continuación:

$$\text{Viabilidad}(\%) = \frac{\text{Absorbancia del tratamiento}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100 \quad (6.3)$$

6.6. Ensayo de mineralización basado en rojo de Alizarina

Para este ensayo las fibras se sometieron a un proceso de esterilización ultravioleta en el CL-1000 Ultraviolet Crosslinker a 3000 microjoules por 20 minutos. Después se realizaron dos lavados con PBS para eliminar la materia residual del material y se volvió a colocar a radiación UV para ser esterilizado de nuevo, después se colocaron 300-5000 células MG-63 viables sobre las fibras en una placa de 96 y 24 pozos respectivamente, se llevó a un volumen final de 100 μ L y 1 mL de medio osteogénico (DMEM suplementado con SFB 10%, antibiótico antimicótico al 1%, 50mg/mL de ácido ascórbico, 10mM de β -glicerofosfato y 10nM de dexametasona),

se evaluó la mineralización del material en diferentes tiempos (al día 3, 7, 14 y 21). Después del tiempo de exposición al material se fijaron las células con formaldehído al 10 % y se dejaron almacenadas durante 2 horas a 4 °C; posteriormente, se retiró el formaldehído, se hicieron dos lavados con agua bidestilada y se dejaron secar las placas; a continuación, se agregaron 100 μL de solución rojo de alizarina a cada pocillo. Se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave. Después se retiró la solución de rojo de alizarina, se lavaron los pocillos 4 veces con agua destilada y se dejó secar los pozos por 5 minutos; por último, se añadió ácido acético al 10 %. La absorbancia de cada pozo se midió a 405 nm usando un lector de microplacas ELISA.

6.7. Identificación de proteínas específicas en la regeneración ósea de la línea celular MG-63 tratadas con nanofibras

Para el análisis de este ensayo se realizó una ELISA indirecta para identificar las proteínas fosfatasa alcalina (ALP), proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) y osteocalcina (OCN), en donde se utilizó β -actina como control para normalizar los valores proteicos. Para ello se cultivaron 10,000 y 5,000 células en placas de 96 pozos para los ensayos de 7 y 14 días, respectivamente. A continuación, se utilizó medio osteogénico para tratar las células MG-63 y tras la formación de una monocapa se colocaron las nanofibras. Una vez transcurridos los 7 y 14 días se prosiguió a realizar dos lavados con PBS, para posteriormente fijar las células con formaldehído al 4 % por 15 minutos; a continuación, se realizaron dos lavados con PBS y se añadió la solución permeabilizante (0.04g de citrato de sodio, 40 μL tritón X-100 y 40 mL de agua bidestilada), dejándose en incubación por 20 minutos; posteriormente se realizaron dos lavados con TBS al 1X (En un litro de agua bidestilada se añaden 20 mM de Tris, 150mM de NaCl ajustando el pH a 7.6) y se colocó nuevamente formaldehído al 4 % dejándose toda la noche en refrigeración a 4 °C. Una vez realizado esto, se prosiguió a eliminar el formaldehído y se hicieron dos lavados con TBS 1X, luego se adicionaron los anticuerpos primarios anti-ALP, anti-BMP-2, anti-OCN y anti- β -actina de ratón y fueron disueltos en una relación 1:1000 en TBS-Tween 20-BSA (99.6 % TBS al 1X, 0.05 % Tween 20, 0.01 % BSA), dejándose en refrigeración a 4 °C toda la noche. A continuación, se recolectaron los Ac. primarios y se realizaron

dos lavados con TBS 1X, para después añadir el Ac. secundario anti IgG de conejo HRP (peroxidasa de rábano) durante 3 horas; transcurrido este tiempo se hicieron 3 lavados con TBS 1X y se colocó el reactivo de TMB (3, 3', 5, 5'- tetrametilbencidina) por 30 minutos, para finalmente añadir la solución stop (0.16 M de ácido sulfúrico) y leer en un lector de placas de ELISA a 450 nm.

6.8. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las fibras PVA/Qts/AgHap se analizaron sobre 2 cepas bacterianas: *Escherichia coli* (ATCC, 53868) y *Staphylococcus aureus* (ATCC, BAA-1747) mediante un antibiograma. Todos los microorganismos se activaron y posteriormente se cultivaron en agar nutritivo a 37 °C por 24 horas para la obtención de colonias. El inóculo se obtuvo de una dilución en tubo con solución salina al 0.8% a 0.5 de la escala de McFarland equivalente a 1×10^8 unidades formadoras de colonias. Después se inocularon las células microbianas en placas de agar Muller-Hinton a las cuales se les colocó las membranas de PVA/Qts, PVA/Qts/Hap y PVA/Qts/AgHap (10-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por triplicado y se incubaron a 37 °C por 24 horas para su posterior evaluación bactericida.

6.9. Análisis estadístico

Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. Las diferencias entre el grupo control y grupos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA una vía y fueron analizados mediante el software GraphPad 9.

7. Resultados

7.1. Estandarización de la síntesis de la fibra PVA/Qts/AgHAP

Se sintetizaron fibras PVA/Qts/AgHAp por la técnica de electrohilado, el resultado se puede observar en la figura 5, las fibras sintetizadas tienen un caraterístico color blanco correspondiente al PVA y Qts, los materiales con mayor composición en esta fibra.



Figura 5: Fotografía de una fibra PVA/Qts/AgHA.

Los parámetros de estandarización del electrohilado se presentan en la tabla 3 donde se muestran los diferentes valores de voltaje, flujo, distancia y observaciones del

proceso. Para la síntesis de la fibra que se observa en la fig. 5 se utilizaron los parámetros de **Voltaje 20 kV**, **Flujo 1 $\mu\text{L}/\text{h}$** y **distancia de 10 cm**, manteniendo una humedad relativa entre 23 y 35 %.

Parámetros evaluados utilizando la solución de PVA/Qts/AgHAP

Voltaje kV	Flujo $\mu\text{L}/\text{h}$	Distancia cm	Observaciones
15	1.5	15	No formación de fibras
		10	
		9	
	1.2	15	
		10	
		9	
1	15		
15	1	10	Formación de fibras
		9	
18	1.5	15	No formación de fibras
		10	
18	1.5	9	Formación de fibras
18	1.2	15	No formación de fibras
		10	
18	1.2	9	Formación de fibras
18	1	15	No formación de fibras
18	1	10	Formación de fibras
		9	
20	1.5	15	No formación de fibras
		10	
		9	
1.2	15		
20	1.2	10	Formación de fibras
		9	
20	1	15	No formación de fibras
20	1	10	Formación de fibras

Tabla 2: Parámetros evaluados utilizando la solución de PVA/Qts/AgHAP

7.2. Caracterización de la fibra PVA/Qts/AgHAP

7.2.1. Caracterización morfológica por Microscopía Electrónica de Barrido

Se realizó una microscopía electrónica de barrido (SEM) a la fibra PVA/Qts/AgHAP. En las figuras 6 y 7 se observa la estructura nanométrica de la fibra, en donde se muestra el entrecruzado de las fibras y ligeros cúmulos. Con estas microscopías se determinó el diámetro promedio de la fibra, siendo este de **127.5 nm**.

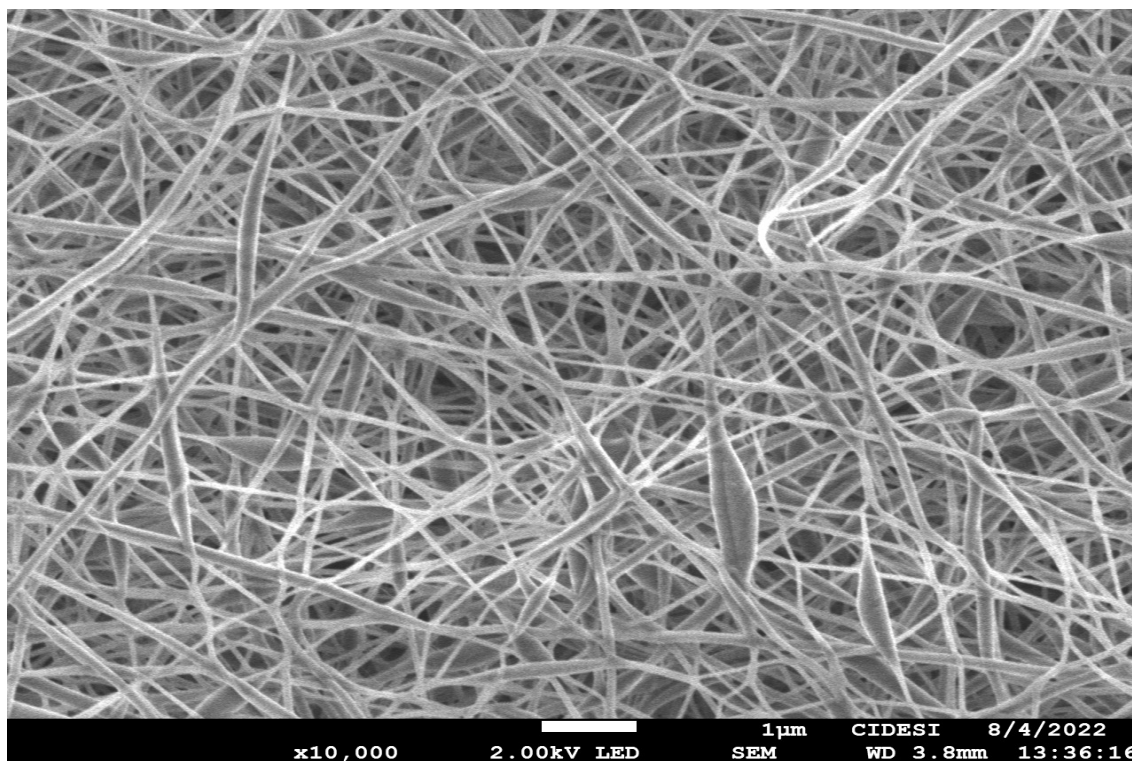


Figura 6: Microscopía electrónica de barrido de la fibra PVA/Qts/AgHAP con un objetivo de 10'000X.

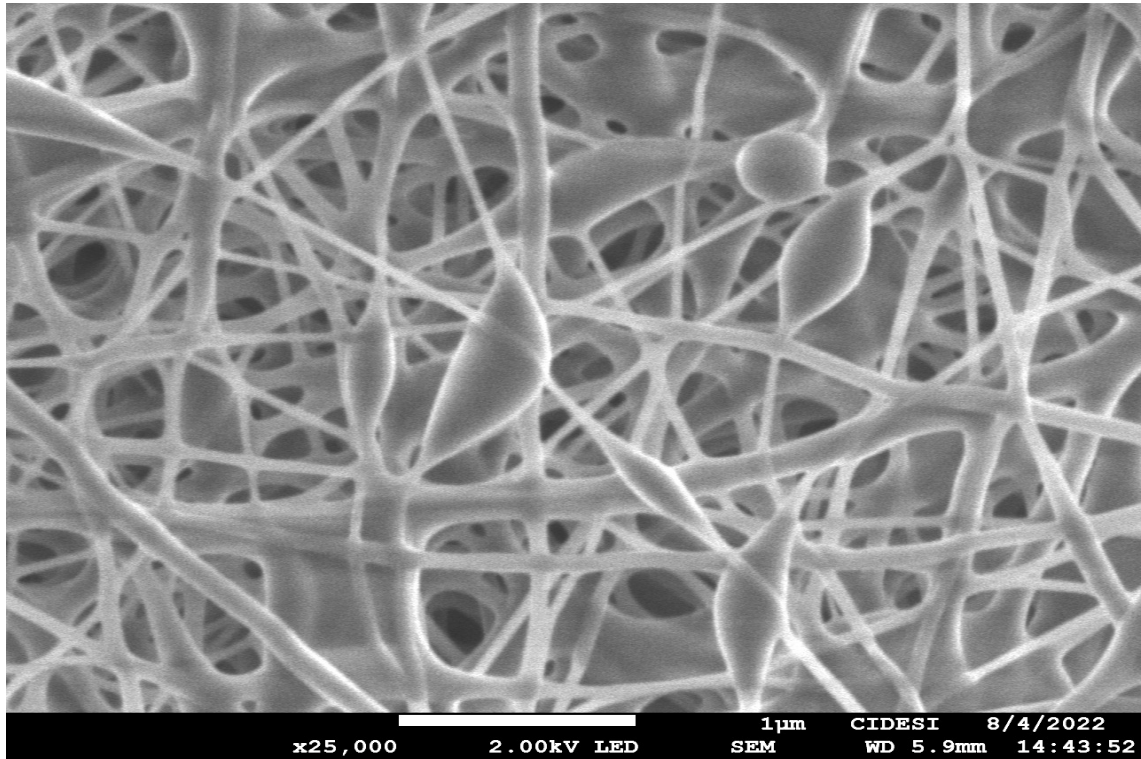


Figura 7: Microscopía electrónica de barrido de la fibra PVA/Qts/AgHAP con un objetivo de 25'000X.

7.2.2. Caracterización por Espectrofotómetro de transformada de Fourier

Con el objetivo de observar la interacción entre los diferentes grupos funcionales de la fibra, se realizó una espectrofotometría de transformada de Fourier (Fig. 8).

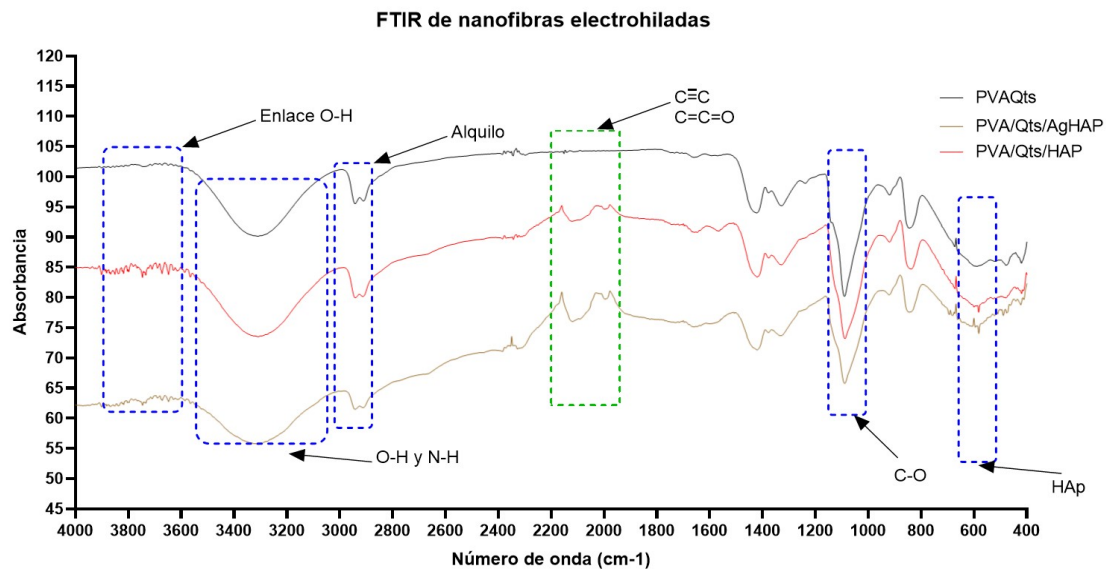


Figura 8: Espectrofotometría transformada de Fourier de la fibra PVA/Qts/AgHAP y sus elementos.

En el espectro de FT-IR se observaron las bandas las bandas características de los tres andamios sintetizados PVA/Qts, PVA/Qts/HAp y PVA/Qts/AgHAp. Se observó una banda a los 3800 cm^{-1} correspondiente al grupo O-H para las muestras que contenían HAp e AgHAp. Además, se encontró que las tres muestras presentaban grupos OH y NH a los 3300 cm^{-1} , bandas relacionadas con grupos alquilo a los 2980 a 2880 cm^{-1} , así como una banda perteneciente a C-O a los 1086 cm^{-1} . Para la muestra de PVA/Qts no se detectó la banda a los 2100 cm^{-1} relacionados con un triple enlace carbono-carbono presente en la muestras adicionadas con HAp; uno de los grupos de vibración reportados para HAp se encuentra a 550 cm^{-1} en su estado cristalino.

7.2.3. Caracterización por ángulo de contacto

Para determinar la hidrofiliidad de las nanofibras obtenidas se realizó el ensayo de ángulo de contacto, en donde se puede observar que todas las fibras presentan ángulos menores 90° , siendo este un indicador de materiales hidrofílicos; cabe mencionar que la adición de la hidroxiapatita disminuye ligeramente esta característica, obteniendo ángulos de 41.2 y 32.7° para las fibras de PVA/Qts y PVA/Qts/AgHAP 10,

respectivamente.

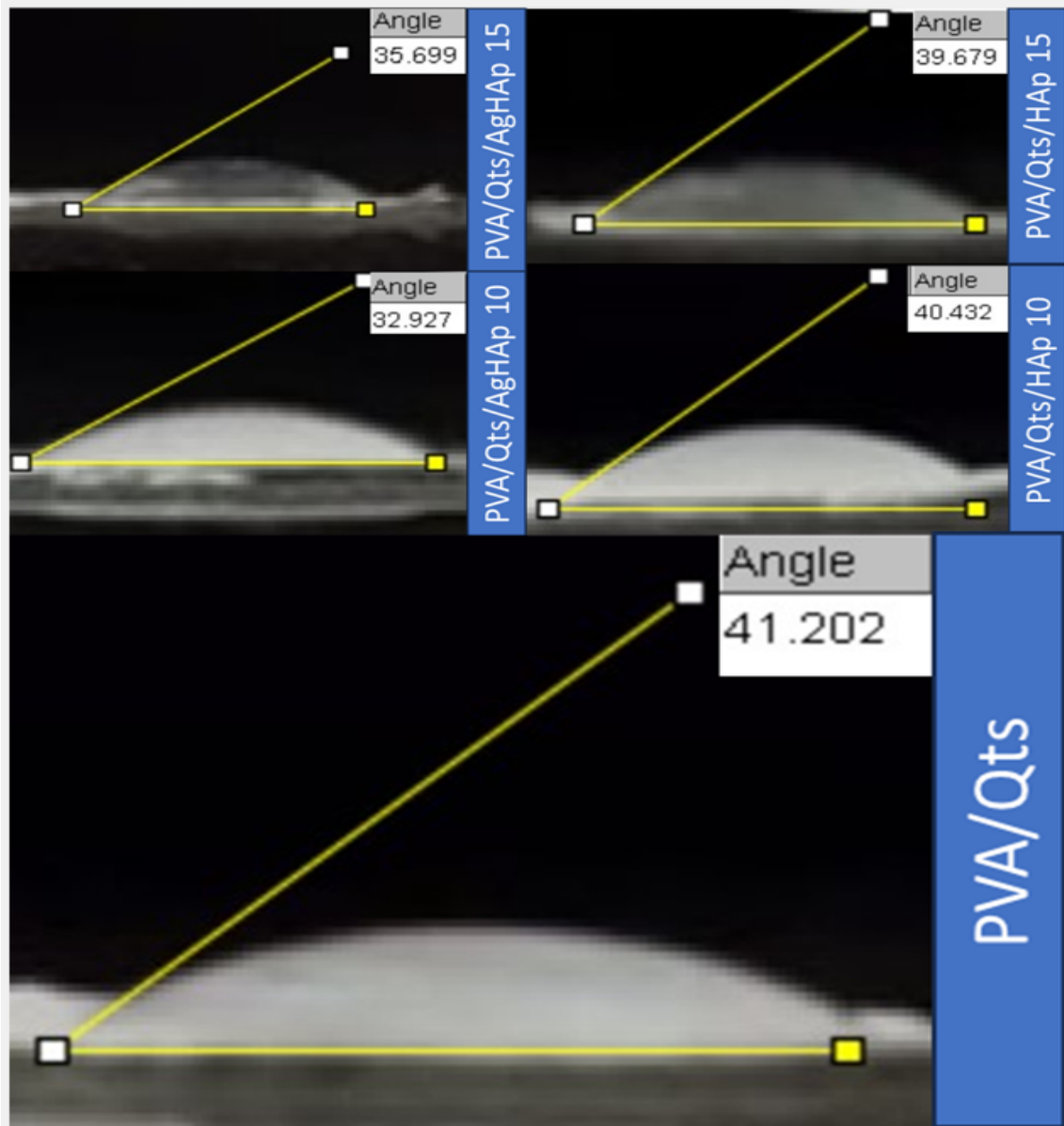


Figura 9: Determinación del ángulo de contacto de las fibras PVA/Qts y las que contienen HAp o AgHAp a diferentes concentraciones.

7.2.4. Prueba de Hinchamiento

Para determinar el porcentaje de absorción de la fibra se realizó un ensayo de hinchamiento, como se observa en la figura 10. Se analizaron fibras con diferentes con-

centraciones de HAp e AgHAp así como una fibra de solo PVA/Qts. Se observó que todas las fibras analizadas tienen un incremento del 100 al 200% después de 1 hora, siendo esta una diferencia significativa con respecto a su peso inicial de cada muestra; además se vio que las muestras con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HAp e AgHAp presentan mayor absorción sin tener una diferencia significativa entre ellas.

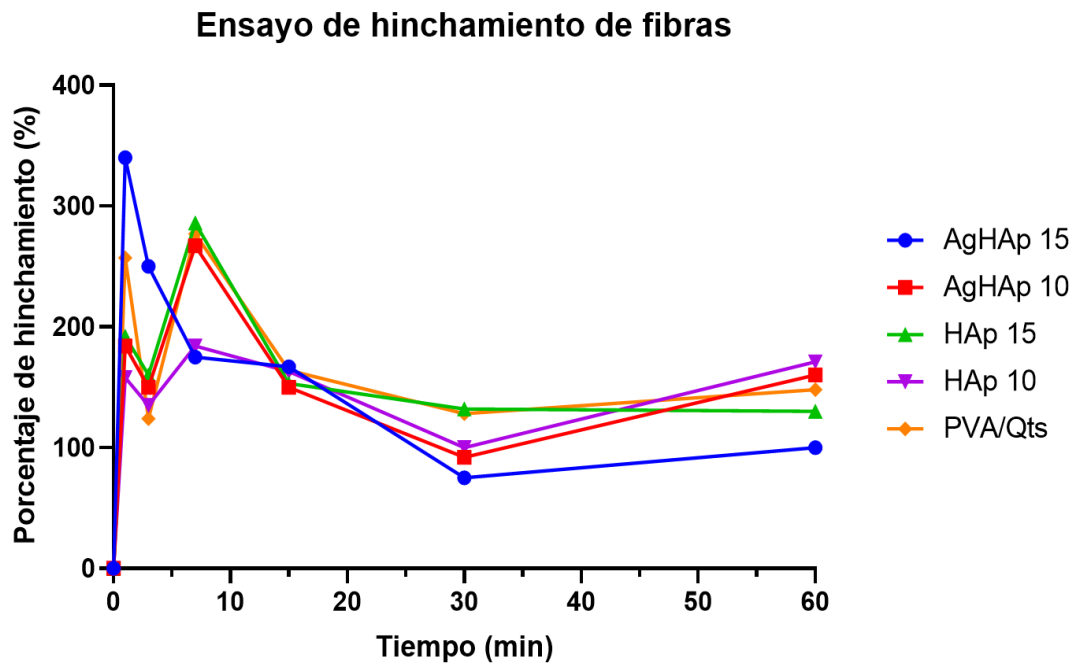


Figura 10: Determinación del hinchamiento de las fibras PVA/Qts y las que contienen HAp o AgHAp a diferentes concentraciones.

7.2.5. Caracterización por Degradabilidad

Se realizó el ensayo de degradación utilizando la pérdida de peso como indicativo de la misma, en donde se utilizaron las muestras de PVA/Qts y aquellas que fueron cargadas con 10 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HAp e AgHAp. Los resultados observados en la figura 11 muestra que se obtuvo una tasa de degradación del 51-66% sin presentar una diferencia significativa entre las fibras analizadas al término del día 28. Además, como se muestra en la 3; tras dos días de secado a temperatura ambiente (Día 30) se obtuvo una pérdida de peso del 47-79% en donde se aprecia que, a medida que se incrementa las concentraciones de carga con HAp e AgHAp hay un mayor porcentaje de degradación.

Ensayo de degradación en nanofibras

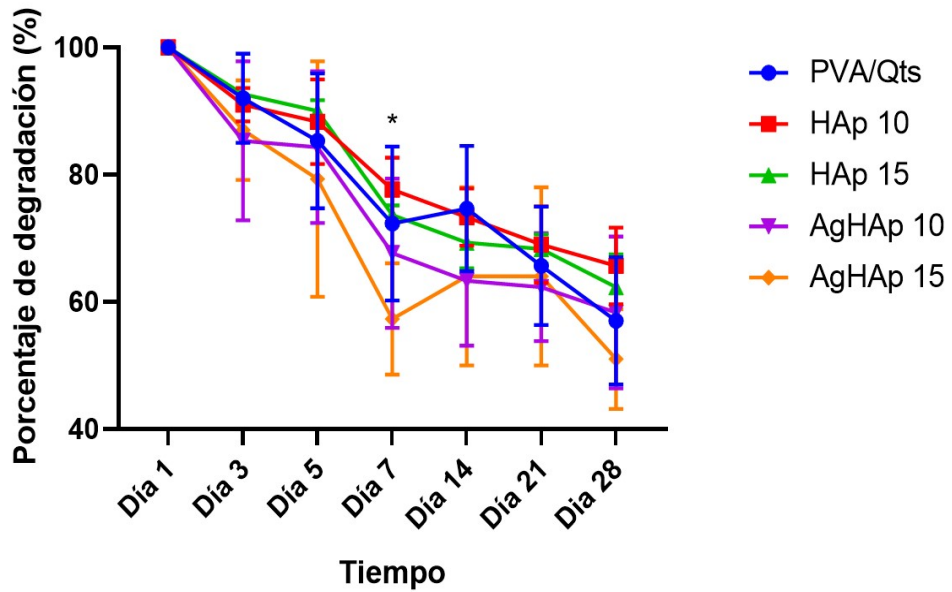


Figura 11: Determinación del porcentaje de degradación de la fibra HAp e AgHAp a diferentes concentraciones.

Porcentaje de degradación de las fibras al día 30

Muestras	Porcentaje de degradación
PVA/Qts	67 %
HAp 10	47 %
HAp 15	65 %
AgHAp 10	68 %
AgHAp 15	79 %

Tabla 3: Porcentaje de degradación de las fibras al día 30

7.3. Determinación de la viabilidad celular en MG-63 con precursores de AgHAP.

viabilidad celular MG-63 con precursores de AgHAP por ensayo de MTS Para sintetizar la fibra previamente se evaluó la viabilidad de las células MG-63 cultivadas y

tratadas con AgNO_3 , HAp e AgHAp. Estas pruebas mostraron que las concentraciones de 5-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no presentan una disminución en la viabilidad de la línea celular como se muestran en las figuras 12, 13 y 14. En el caso de los tratamientos con HAp se mostró que para dosis superiores a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hay incremento en la viabilidad; esto puede explicarse por una aceleración del metabolismo celular, lo cual ha sido reportado por Choi y colaboradores.

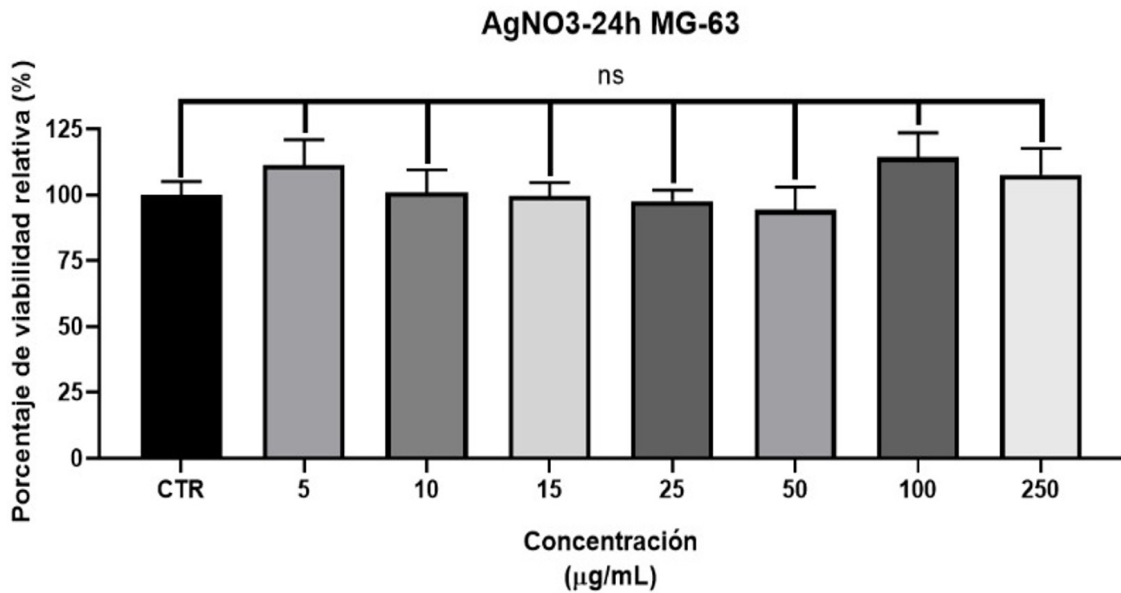


Figura 12: Determinación de la concentración no citotóxica de AgNO_3 en la línea celular MG-63 a 24 horas.

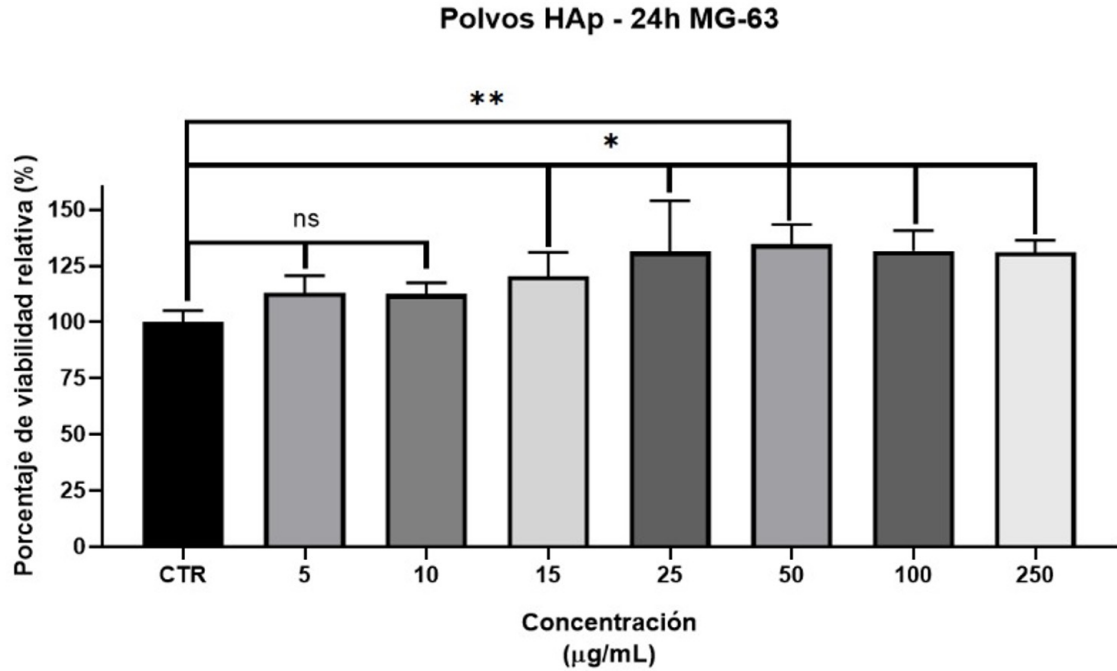


Figura 13: Determinación de la concentración no citotóxica de HAp en la línea celular MG-63 a 24 horas.

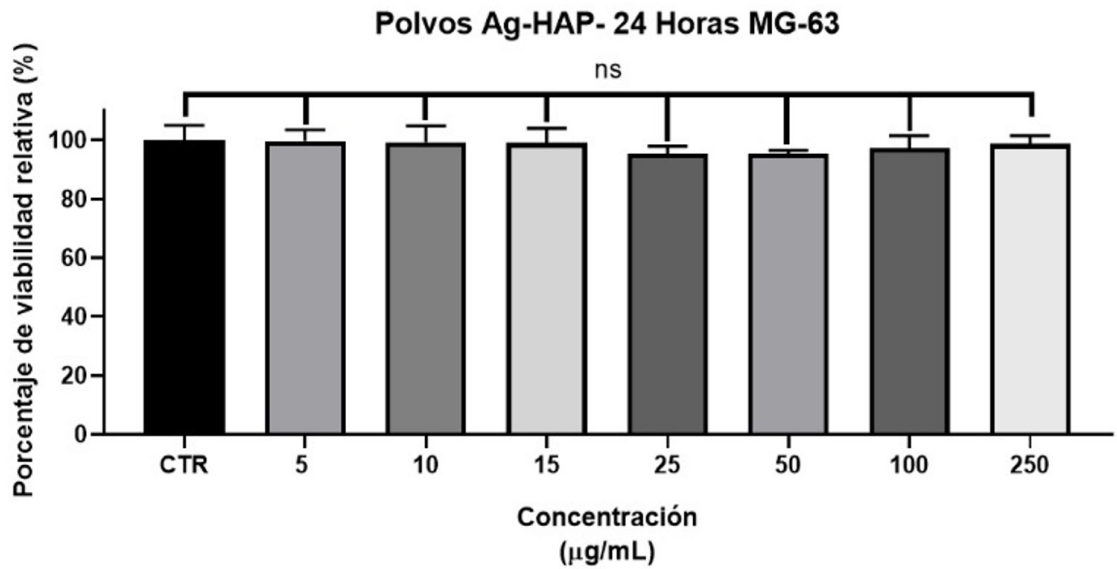


Figura 14: Determinación de la concentración no citotóxica de AgHAP en la línea celular MG-63 a 24 horas.

7.4. Determinación de la viabilidad celular en MG-63 con nanofibras de PVA/Qts/AgHAP.

Con base en los resultados anteriores, se evaluó la viabilidad de las fibras de PVA/Qts con las concentraciones previamente mencionadas (5-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de HAp e AgHAp, como se muestra en las figuras 15 y 16, en donde no se observó diferencia significativa para ambas muestras con respecto al control. Sin embargo, las fibras de PVA/Qts/AgHAp de 15 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentaron una disminución de un 16 y 14 % de la viabilidad con respecto al control de células sin tratamiento; cabe aclarar que la disminución en la citotoxicidad no es mayor al 20 %. Por la dificultad de síntesis de las fibras con mayores concentraciones de HAp e AgHAp se procedió a seleccionar las fibras con las concentraciones de 10 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el resto de los ensayos.

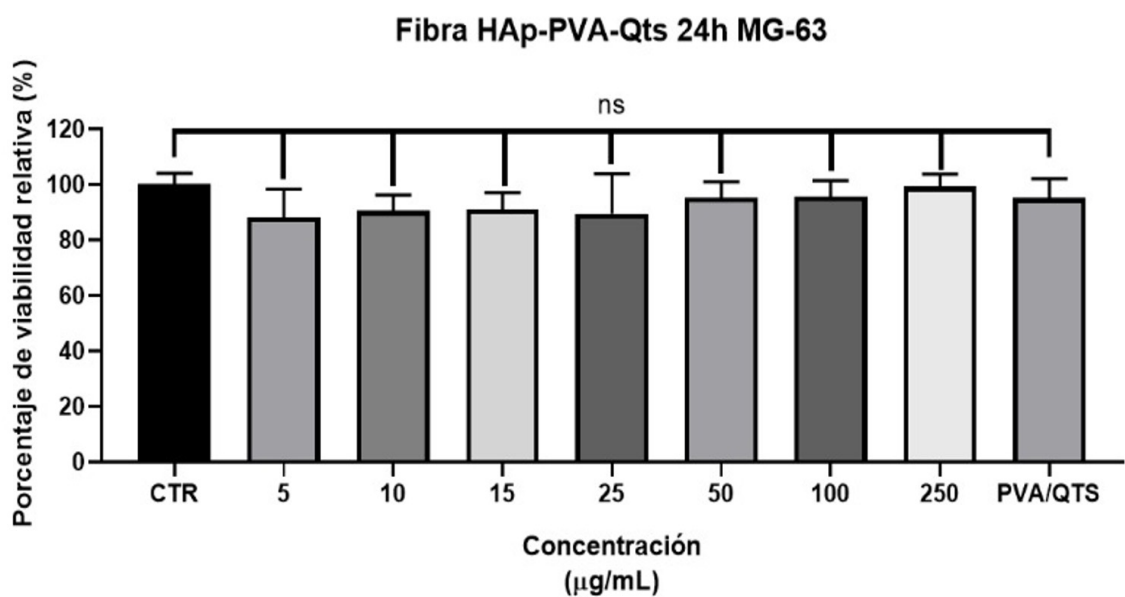


Figura 15: Determinación de la concentración no citotóxica de la fibra PVA/Qts en la línea celular MG-63 a 24 horas.

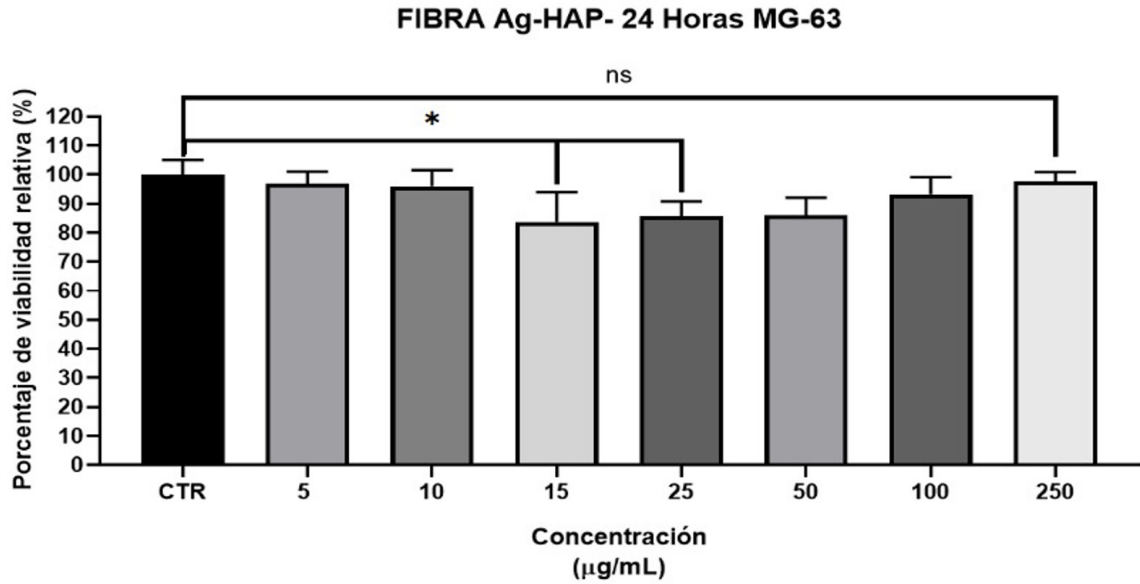


Figura 16: Determinación de la concentración no citotóxica de la fibra PVA/Qts/HAP en la línea celular MG-63 a 24 horas.

7.5. Determinación de la mineralización de la fibra en un modelo *in vitro*

Se midió la actividad de mineralización a los 3, 7 y 14 días para las muestras de PVA/Qts y para las fibras de PVA/Qts cargadas con 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$ de HAp y AgHAp, como se aprecia en la figura 17. En esta se observa que desde los primeros días (día 3) hay un incremento en el porcentaje de producción de cúmulos de calcio que van de 94-153 % en comparación al control de células sin tratamiento; posteriormente, al día 7 no se observa un importante aumento de los valores siendo estos de 133-168 %; finalmente, al día 14 se observa un incremento importante en la mineralización obteniendo de 244-282 % en la formación de cúmulos de calcio; sin embargo, no se apreció diferencia significativa entre las muestras.

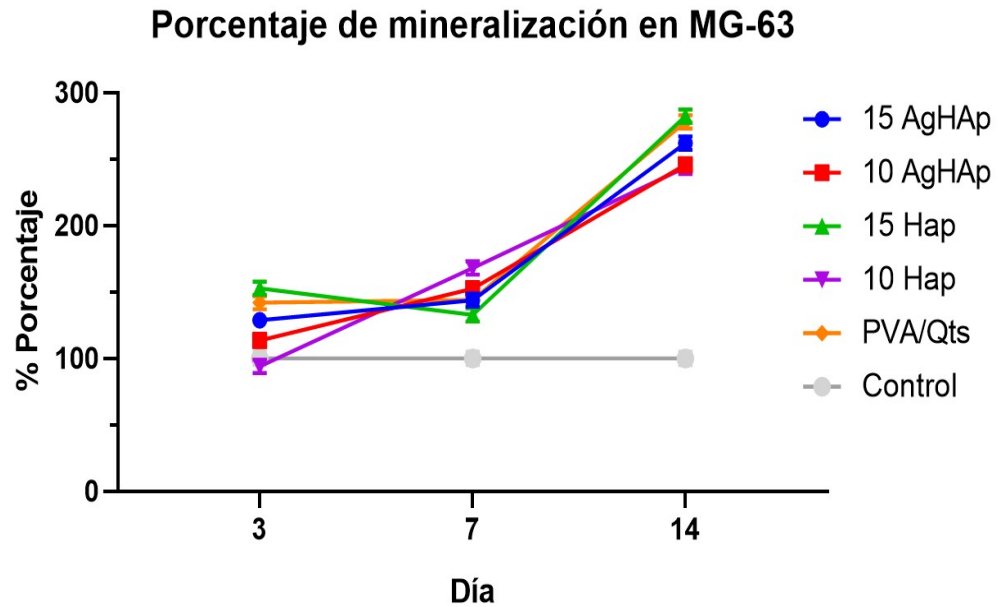


Figura 17: Porcentaje de mineralización de 3, 7 y 14 días en células MG-63.

7.6. Determinación de proteínas específicas en la regeneración ósea de la línea celular MG-63 tratadas con nanofibra

Se analizó la expresión relativa de 3 proteínas relacionadas con la diferenciación celular y el proceso de mineralización como lo son fosfatasa alcalina (ALP), proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) y osteocalcina (OCN) en la línea celular MG-63 tratadas con las diferentes nanofibras; para ello los valores fueron normalizados con β -actina.

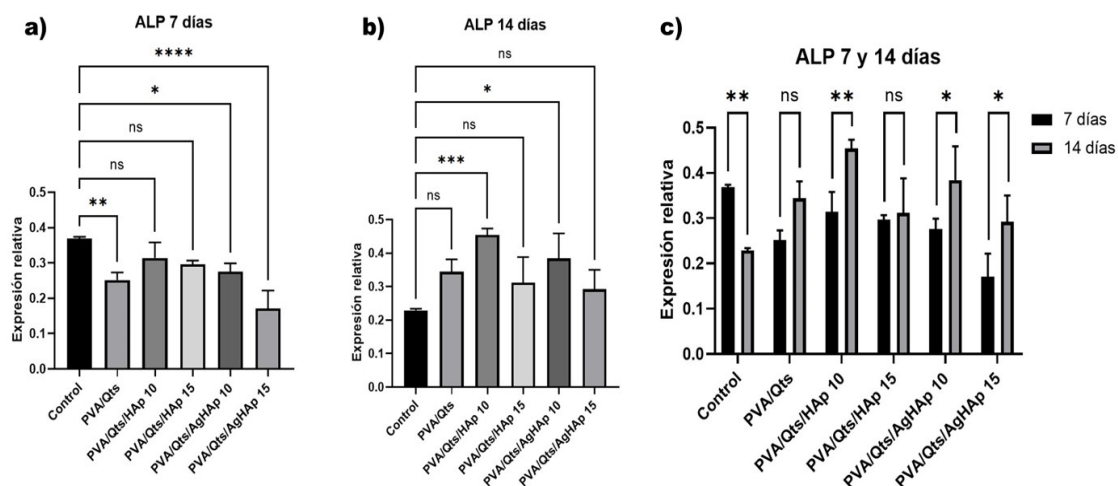


Figura 18: Determinación de la expresión relativa de fosfatasa alcalina (ALP) en la línea celular MG-63 a: a) 7 días; b) 14 días; c) y su comparación entre ambos tiempos.

Como se puede observar en la figura 18, se analizó la expresión relativa de ALP en dos tiempos; en el inciso a) se observó que a los 7 días se presentó una disminución en la expresión de la proteína en comparación al control con excepción de las muestras que contenía únicamente HAp; sin embargo, a los 14 días se vio un incremento en la expresión de ALP en todas las muestras, siendo significativo para las muestras que contenían HAp y AgHAp a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como se aprecia en el inciso b). Finalmente, en el inciso c) comparamos ambos tiempos y se obtuvo un incremento significativo en las muestras PVA/Qts/HAp 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y PVA/Qts/HAp 10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al finalizar los 14 días se obtuvo que la muestra con mayor expresión fue la fibra PVA/Qts/HAp 10 %.

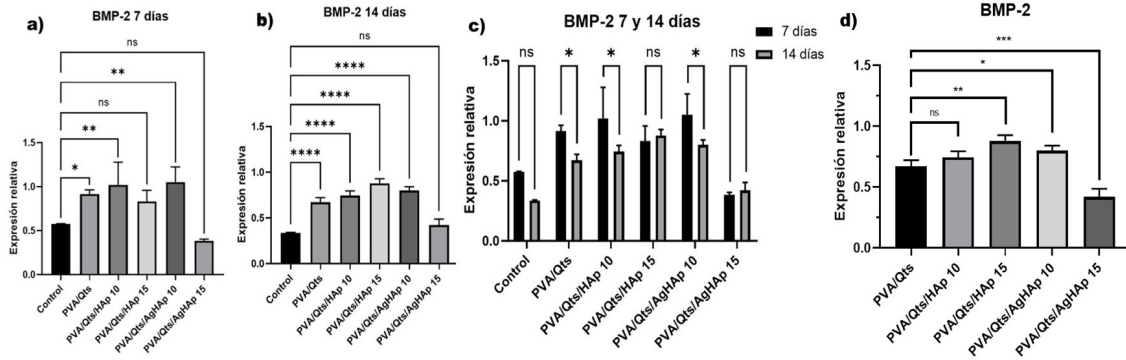


Figura 19: Determinación de la expresión relativa de proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) en la línea celular MG-63 a: a) 7 días; b) 14 días; c) su comparación entre ambos tiempos; d) y su comparación entre la fibra PVA/Qts frente a las fibras que contienen HAp e AgHAp.

De igual forma en la figura 19, se analizó la expresión relativa de BMP-2 en dos tiempos; en el inciso a) se observó que a los 7 días había un incremento en la expresión de la proteína con respecto al control, siendo significativo para aquellas células con las muestras las muestras de PVA/Qts, PVA/Qts/HAp 10 y PVA/Qts/AgHAp 10; además, a los 14 días se vio un incremento en la expresión de BMP-2, siendo significativo para todas las muestras a excepción de la PVA/Qts/AgHAp 15 $\mu\text{g/mL}$, como se aprecia en el inciso b). En el inciso c) se comparó ambos tiempos y se obtuvo una disminución significativa en las muestras PVA/Qts, PVA/Qts/HAp 10 $\mu\text{g/mL}$ y PVA/Qts/AgHAp 10 $\mu\text{g/mL}$. Por último, en el inciso d) se aprecia la expresión relativa de BMP-2 de las células tratadas con la fibra PVA/Qts frente a las fibras a las que se les adicionó HAp y AgHAp, encontrando que no hay diferencia significativa con la muestra PVA/Qts/HAp 10 $\mu\text{g/mL}$ pero, si con el resto de las fibras.

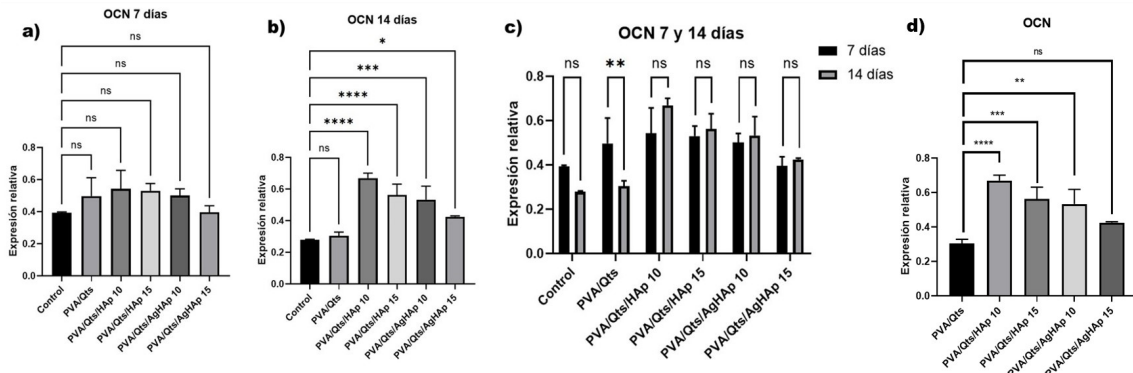


Figura 20: Determinación de la expresión relativa de osteocalcina (OCN) en la línea celular MG-63 a: a) 7 días; b) 14 días; c) su comparación entre ambos tiempos; d) y su comparación entre la fibra PVA/Qts frente a las fibras que contienen HAp e AgHAp.

Por último, en la figura 20, se analizó la expresión relativa de OCN a los 7 y 14 días; en el inciso a) se observó que a los 7 días ninguno de los tratamientos presentó diferencia significativa en la expresión relativa de la proteína, respecto al control de células; por otro lado, en el inciso b) se muestra un incremento significativo en la expresión de OCN en todas las muestras, siendo la fibra de PVA/Qts cargada con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HAp la que presentó mayor aumento; en el caso de la comparación de ambos tiempos como se aprecia en el inciso c), se ve un incremento en la expresión de OCN en casi todas las muestras sin tener diferencia significativa. Finalmente, en el inciso d) se comparó la expresión relativa de OCN en células tratadas con la fibra de PVA/QTS frente a las fibras a las que se les adicionó HAp y AgHAp, encontrando que todas las muestras presentaron un incremento significativo a excepción de la muestra PVA/Qts/AgHAp 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7.7. Determinación de la actividad antimicrobiana de la fibra en un modelo *in vitro*

Los ensayos realizados para determinar la actividad antimicrobiana muestran que existe crecimiento tanto de *E. coli*, como *S. aureus* incubadas con las muestras seleccionadas de PVA/Qts, PVA/Qts/HAp y PVA/Qts/AgHAp, siendo que estas no presentaron un halo de inhibición; sin embargo las fibras cargadas con AgHAp presentaron una ligera disminución de crecimiento en la zona de la fibra como se aprecia en la figura 21.



Figura 21: Actividad antimicrobiana en *E. coli* y *S. aureus* a las 24 horas en Agar Muller-Hinton para las muestras: 1. Fibra PVA/Qts, 2. Fibra PVA/Qts/HAp 10, 3. Fibra PVA/Qts/HAp 15, 4. Fibra PVA/Qts/AgHAp 10 y 5. Fibra PVA/Qts/AgHAp 15.

Para confirmar los resultados obtenidos se replicó el ensayo haciendo una pequeña modificación en donde la muestra marcada con el número 5 (fibra PVA/Qts/AgHAp 15 $\mu\text{g/mL}$) se embebió en la solución polimérica utilizada para electrohilar esta fibra, en donde se observó que para esta muestra existe la presencia de un halo de inhibición, como se puede apreciar en la figura 22.



Figura 22: Actividad antimicrobiana en *E. coli* y *S. aureus* a las 24 horas en Agar Muller-Hinton para las muestras: 1. Fibra PVA/Qts, 2. Fibra PVA/Qts/HAp 10, 3. Fibra PVA/Qts/HAp 15, 4. Fibra PVA/Qts/AgHAp 10 y 5. Fibra PVA/Qts/AgHAp 15 embebida en la solución PVA/Qts/AgHAp 15.

8. Discusión

Las nanofibras sintetizadas utilizando la técnica de electrohilado presentaron tamaños aproximados de 116 a 135 nm de diámetro (Fig. 6; 7); Nokhasteh y colaboradores produjeron fibras de PVA/Qts con distintos tamaños partiendo de diferentes concentraciones, donde la mejor proporción fue 30/70 % PVA/Qts con un tamaño promedio de 60 nm (Nokhasteh et al. 2015), comparadas con las fibras elaboradas en este trabajo, las cuales presentaron un mayor tamaño debido a que se utilizó una proporción 75/25 % PVA/Qts; se ha reportado que la incorporación de una mayor concentración de quitosano produce una disminución en el tamaño de las fibras debido a la ionización policationica de los grupos amino con el ácido acético, proporcionando una mayor conductividad y por tanto mayor deposición de fibras. La adición de materiales como los cerámicos en una solución polimérica influye en la viscosidad de la solución, por lo que su uso provoca variaciones en el tamaño de las nanofibras (Santiago-Castillo 2018; Melucci 2020). Por otro lado, su uso como materiales de carga implican un cambio en la morfología y su tamaño; Chong y colaboradores han mostrado que la incorporación de hidroxiapatita como material de carga en fibras de policaprolactona (PCL) producen un aumento en el tamaño de las fibras de 478 y 521 nm PCL y PCL/HAp respectivamente; esto podría explicar la variación en los tamaños obtenidos (Chong, Hassan y Sultana 2015).

Siguiendo con la caracterización se identificaron los grupos funcionales y su interacción en las fibras PVA/Qts, PVA/Qts/HAp y PVA/Qts/AgHAp por medio de la técnica de FTIR (Fig. 8). En la fig. 8 se observa la presencia de grupos O-H y N-H en la banda de los 3500 a 3000 cm^{-1} en todas las muestras, esto es debido al traslape de los grupos hidroxilo (OH) del PVA y quitosano, así como la amina (NH) del quitosano (Ali y Gherissi 2017). En este mismo intervalo el ancho de la banda de las fibras de PVA/Qts/HAp y PVA/Qts/AgHAp aumenta ligeramente en comparación con la muestra PVA/Qts, esto puede ocurrir debido al incremento en los grupos OH pertenecientes a la hidroxiapatita, los cuales aumentan los enlaces de H modificando así la estructura de la fibra (Pareja et al. 2008). Finalmente en los grupos PVA/Qts/HAp y PVA/Qts/AgHAp se aprecia una banda a los 550 cm^{-1} en

contraste con la muestra PVA/Qts, la cual corresponde a la fase cristalina de la HAp (Rodríguez-Aranda et al. 2007 and Angeles et al. 2018)

Para determinar la capacidad de los grupos radicales de las membranas que interactúan con el medio acuoso, se decidió realizar el ensayo de hidrofobicidad por ángulo de contacto (Fig. 9). Se puede apreciar que todas las fibras (PVA/Qts, PVA/Qts/HAp y PVA/Qts/AgHAp) son hidrofílicas, esto debido a la presencia de puentes de hidrogeno producidos por la interacción entre las moléculas del agua y los grupos hidroxilo (OH); tanto en el PVA y Qts como amino (NH_3) de este último (Pervez y Stylios 2018). Al añadir Hidroxiapatita se observó una mayor interacción con el agua debido al incremento en los grupos hidroxilo presentes en el cerámico (Barbosa et al. 2023); además, las partículas de plata pueden liberar iones producto de la oxidación en la fase acuosa, aumentando aún más su capacidad hidrofílica (Dubey et al. 2015).

En el ensayo de hinchamiento y degradabilidad analizan la integridad de la fibra en soluciones fisiológicas, similares a las del tejido. Para ello el ensayo de hinchamiento mide el grado de absorción del material, en la Fig. 10 se observa como las nanofibras sintetizadas no mostraron diferencia significativa entre sí, esto es debido a la proporción de PVA/Qts (3:1) presente en las muestras. Charernsriwilaiwat y colaboradores sintetizaron fibras de PVA/Qts a diferentes proporciones y observaron que el incremento en la concentración de quitosano (70:30) aumenta el hinchamiento de las fibras con un porcentaje cercano a 150 %, similares a los obtenidos en este trabajo (Charernsriwilaiwat et al. 2012). No obstante, se observa un ligero incremento en el porcentaje de hinchamiento en las muestras con menor concentración de Ag/HAp, esto puede deberse a que la presencia de hidroxiapatita genera interacciones intermoleculares entre los grupos OH y NH del quitosano y los OH de la hidroxiapatita, obteniendo una estructura más rígida (Alhosseini et al. 2012).

En contraste el ensayo de degradación mostró que las nanofibras PVA/Qts presentan un porcentaje en pérdida de peso del 67 % después de 30 días en solución salina (Fig. 11); Cay y colaboradores sintetizaron fibras PVA/Qts con distintos agentes estabilizantes, las nanofibras control presentaron un porcentaje de degradación del 71.43 % a los 30 días en agua destilada; al mismo tiempo, produjeron nanofibras de PVA que presentaban un mayor porcentaje de degradación, en 83.33 %, indicando que la incorporación de quitosano disminuyen su degradación por la interacción entre ambos polímeros (Cay, MirafTAB y Humbasar 2014). La incorporación de HAp y AgHAp

incrementa el porcentaje de degradación en las fibras sintetizadas, alcanzando un porcentaje de degradación de 79 % para la muestra PVA/Qts/AgHAp 15; Sofi y su grupo de trabajo incorporaron hidroxiapatita y nanopartículas de plata a fibras de celulosa, al colocarlas en buffer de fosfatos se observó que disminuye la densidad, permitiendo que la solución este en mayor contacto con la hidroxiapatita, provocando que se disuelva debido a los efectos de la ionización de los grupos OH de la HAp y los iones de plata (Sofi et al. 2018).

Una vez caracterizadas las nanofibras, se prosiguió a evaluar su actividad en un modelo biológico, para ello fue necesario determinar la concentración que no disminuya la viabilidad por debajo de un 20 %. Para ello se analizaron los precursores AgNO_3 , HAp e AgHAp de 5 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estas muestras no disminuyen significativamente la viabilidad después de 24h en las línea celular preosteoblastica de osteosarcoma MG-63, sin embargo, se observó un incremento en el porcentaje de las células tratadas con HAp mayor a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lo que sugiere una mayor supervivencia celular, disminución del arresto celular y/o activación metabólica (Fig. 13). Choi y colaboradores observaron que la incorporación de hidroxiapatita produce un aumento en el crecimiento celular, similar a lo observado en la muestras HAp e AgHAp (Choi et al. 2016). La muestra AgHAp no presento diferencias significativas en la viabilidad (Fig. 14), esto es debido a la incorporación de plata, ya que se ha reportado que bajas concentraciones de nanopartículas de plata presentan un ligero incremento en la proliferación de células MG-63 a las 24h (Xie, Wang y Wu 2018).

Posterior a la determinación de los precursores se prosiguió a evaluar la viabilidad de las fibras. La nanofibra de PVA/Qts no presentó una disminución en la viabilidad a las concentraciones analizadas, como se muestra en la figura 15, esto se puede deber a que las fibras de PVA presentan una ligera disminución en la viabilidad de las células MG-63, sin embargo la adición de quitosano incrementa su proliferación (Mejía-Suaza et al. 2023; Datta y Ray 2016). De igual manera la muestra PVA/Qts/HAp no presentó una disminución en la viabilidad; esto corresponde a lo reportado por Sarrami y colaboradores, en donde la hidroxiapatita no disminuye la viabilidad a las 24 horas (Sarrami et al. 2022). Las fibras de PVA/Qts/AgHAp presentan resultados similares a los anteriormente reportados obteniendo una viabilidad cercana al control, sin embargo a las concentraciones de 15 y 20 μg mostraron una disminución significativa (Fig. 16), esto puede deberse a que la hidroxiapatita dopada con plata en concentraciones de 7-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuyen la viabilidad en la línea celular MG-63 de un 20 % (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) después de las 24h (Martínez-Sanmiguel et

al. 2019; esto puede ser atribuido a que las células no se encuentran en exposición directa con la hidroxiapatita dopada con plata, sino al estar incorporados en las fibras se liberan de manera paulatina a través del tiempo (Torres-Martínez et al. 2018).

Parte de la regeneración ósea es el proceso de mineralización, donde la célula sintetiza depósitos de calcio y uno de los materiales que influye en este proceso es la hidroxiapatita. Para ello se evaluaron los depósitos de calcio producidos por MG-63 expuestos a PVA/Qts, PVA/Qts/HAp 10-15 y PVA/Qts/AgHAp 10-15 a los 3, 7 y 14 días (Fig. 17). Después de 14 días se observa un incremento significativo respecto al control en todas las muestras analizadas, esto concuerda con lo reportado Venugopal y colaboradores donde se sintetizaron nanofibras de colágeno/HAp y observaron que después de 10 días hubo un incremento significativo en las fibras que contenían hidroxiapatita (Venugopal et al. 2008); este efecto es debido al intercambio de iones de la hidroxiapatita y los fosfatos del suero fetal bovino presente en el medio de cultivo (Enayati et al. 2017). Entre las muestras analizadas no se observó una diferencia significativa, esto es debido a que el PVA se ha comprobado que favorece el proceso de mineralización, como lo reportado por Mejía y colaboradores, donde muestran que tanto las fibras de PVA 15% como PVA/fibroína de seda adicionadas con nanopartículas de plata presentaban un incremento significativo en los depósitos de calcio en la línea celular MG-63 después de 7 y 10 días (Mejía-Suaza et al. 2023). Demostrando que tanto el PVA como el complejo con nanopartículas de plata promueven el proceso de mineralización; dejando en evidencia que no hay diferencia significativa entre el empleo de nanofibras de PVA/Qts en el proceso de mineralización con HAp y su uso en fibras.

Para complementar el ensayo de mineralización se analizaron 3 proteínas características de la diferenciación y maduración de las células osteoblasticas a los 7 y 14 días; para ello se normalizaron los valores utilizando β -actina.

Primero se evaluó la fosfatasa alcalina (ALP), la cual se encuentra presente en las primeras etapas de mineralización (Czekanska, Stoddart, Ralphs et al. 2013). En la figura 18 se observa una ligera disminución proteica de los tratamientos con respecto al control al día 7, mientras que al día 14 se ve un incremento en todos los grupos comparados al control, esto es debido a que las células MG-63 presentan una baja expresión génica y proteica de ALP (Czekanska, Stoddart, Richards et al. 2012), como se aprecia al día 7; esto se puede correlacionar a lo mostrado en el ensayo de minera-

lización (Fig. 17) en donde no se aprecia un incremento significativo en los primeros días. Sin embargo, el uso de materiales similares a la hidroxiapatita natural promueve la expresión y actividad de esta enzima, Tsukamoto y colaboradores midieron la actividad de la ALP en cultivos de células fibroblásticas de pulpa humana expuestos a hidroxiapatita, donde obtuvieron un aumento de esta proteína (Tsukamoto, Fukutani y Mori 1992). En comparación con nuestros resultados se observó un incremento en la producción de ALP por parte de las células expuestas a los tratamientos al día 14, siendo el tratamiento de PVA/Qts/HAp 10 la que obtuvo una mayor producción de ALP con respecto al control; lo que implica que las concentraciones de 10 μg activaron la producción de ALP.

En la figura 19 se puede apreciar un incremento en la expresión de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) con los tratamientos, con respecto al control a los 7 y 14 días. Anteriormente se ha reportado que BMP-2 se expresa en células osteoprogenitoras y osteoblastos en etapas tempranas de diferenciación; por lo que en la línea celular MG-63 pre-osteoblasticas se encuentra en mayor proporción en los primeros 7 días, tal y como se observa en la figura 19 (Uribe et al. 2017). Li y colaboradores observaron la expresión de BMP-2 a los 1, 7 y 14 días utilizando como control GAPDH, ellos encontraron una baja expresión de esta proteína en los tres tiempos, siendo el más bajo al día 14 (Y. Li et al. 2018). Comparándolo con los resultados obtenidos en este trabajo se puede apreciar que los tratamientos no presentan una diferencia significativa para las fibras de PVA/Qts y PVA/Qts/AgHAp 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero se presenta una disminución para el resto de las nanofibras, lo que implica que las concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HAp generaron mayor diferenciación con relación al control.

En cambio la osteocalcina (OCN) se ha descrito como una proteína que expresan los osteoblastos en etapas tardías de la diferenciación (Modi et al. 2019). Por ello, la producción de OCN (Fig. 20) no presento diferencia significativa dentro de los primeros 7 días en todas las muestras; por otro lado, al día 14 las nanofibras cargadas con HAp e AgHAp presentaron una expresión significativamente mayor al control celular y a aquellas tratadas con nanofibras PVA/Qts demostrando la capacidad de diferenciación de las células al estar en contacto con materiales con HAp. Tsai y su equipo de trabajo probaron una matriz de colágeno electrohilada en la línea celular MG-63, donde observaron un mayor incremento en la expresión de OCN al día 21, con respecto a los días 7 y 14; esto nos da indicio que si se prolonga su medición se pudiera observar una mayor producción de OCN (Tsai et al. 2012). Así mismo, la

comparación entre las células expuestas a las fibras de PVA/Qts y aquellas a las que se les adicionó HAp y AgHAp muestra un incremento significativo de OCN para la fibra PVA/Qts/AgHAp 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la muestra PVA/Qts/HAp 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es altamente significativa. Xie y colaboradores encontraron que nanoparticulas de plata mayores a 5 μg disminuye la expresión de OCN en las células MG-63 tras 24 horas de exposición, lo que podría explicar porque las fibras con HAp inducen una mayor producción de OCN en las células (Xie, Wang y Wu 2018). Además, correlacionando la disminución en la expresión de BMP-2 y un alza en OCN podríamos decir que las fibras de PVA/Qts/HAp 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son adecuadas para el proceso de regeneración ósea.

Con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana, se utilizaron las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, las cuales no disminuyeron la viabilidad de las bacterias, es decir no tuvo un efecto bactericida a 24 horas al tratarse con las membranas electrohiladas, como se muestra en la figura 21; sin embargo, se apreció que en las zonas donde se colocaron las muestras no hubo crecimiento de ambas bacterias, teniendo un efecto bacterioestático. Lo anterior, puede deberse a que una baja concentración de quitosano, el cual presenta grupos amino cargados positivamente con los que atrae y desestabiliza la membrana bacteriana, inhibiendo su crecimiento (Barzegar et al. 2021). Previamente se ha descrito que la utilización de AgHAp a 10-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ presenta un efecto bactericida contra *Escherichia coli* y una bacteria gram positiva como lo es *Bacillus subtilis*; (Martínez-Sanmiguel et al. 2019). Los resultados obtenidos en este trabajo contradicen a los reportados a la literatura, esto puede deberse a que la HAp y la AgHAp se encuentra enlazado a las fibras produciendo una baja liberación de iones plata y no expuestas directamente a las bacterias. Por ello se realizó un ensayo en donde se colocó una gota de la solución con 10-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AgHAp que se utilizó para producir las nanofibras y se vio que si presenta un efecto bactericida confirmando que la liberación iónica en solución es la responsable de la capacidad antibacteriana de este (Fig. 22, posición 5).

Las nanofibras de PVA/Qts/AgHAp poseen un tamaño nanométrico de 127.5 nm con propiedades hidrofílicas, una tasa de degradación prolongada y una buena capacidad de hinchamiento debido a los grupos funcionales OH y NH_3 que contienen; además mostraron no ser tóxico para las células MG-63, tanto de sus precursores como las fibras cargadas con HAp e AgHAp de 5-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Así mismo el material promovió la actividad mineralizante y proteica de las células, principalmente para aquellas muestras con hidroxiapatita a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Finalmente se observó que las fibras

tienen características bacteriostáticas proporcionadas por el quitosano y la plata; sin embargo, la prueba se realizó a 24 horas, probablemente en un ambiente acuoso y con tiempos mayores se pudiera observar el efecto antimicrobiano. La muestra con mejores resultados analizando todas las pruebas fueron presentados por las fibras que contienen 10 $\mu g/ml$ de HAp sin plata, ya que esta disminuye la producción de BMP-2 proteínas y aumenta la OCN por parte de las células, siendo un buen modelo para regeneración; sin embargo, la utilización de fibras con 10 $\mu g/ml$ de AgHAp, podrían ser empleadas en un modelo para reparación ósea, así como en modelos contra osteomielitis.

9. Conclusión

De acuerdo a los objetivos se desarrollo y evaluó el potencial de nanofibras electrohiladas de PVA/Qts/AgHap en el proceso de regeneración óseo en un modelo *in vitro* de células osteoblásticas MG-63 Para ello se optimizaron los parámetros del electrohilado con un voltaje de 20 kv, velocidad de flujo de 1 $\mu\text{L}/\text{h}$ y una distancia entre el eyector y el colector de 10 cm. Las fibras producidas presentaron un tamaño promedio de 127.5 nm, propiedades hidrofílicas lo cual permite que los grupos radicales de las membranas interactúen con el medio acuoso y por ende con las células. Además, las nanofibras presentaron una tasa de hinchamiento del 200 al 300 % después de una hora y un porcentaje de degradación del 47 al 79 % después de 30 días, siendo la fibra de PVA/Qts/HAp 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la que menor porcentaje de degradación mostró.

Además, se examinó su actividad biológica en la línea celular MG-63, empezando por la viabilidad de las nanofibras y los precursores de HAp/AgHAp, encontrando que estas no son citotóxicas en concentraciones de los 5-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; así mismo, se analizó su capacidad mineralización mostrando un incremento cercano al 300 % respecto al control, pero sin mostrar diferencia significativa entre las fibras de PVA/Qts y aquellas a las que se les adicionó HAp e AgHAp; además, se determinó un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la mineralización como lo es ALP y OCN y una baja producción de proteínas tempranas de diferenciación como lo es BMP-2, siendo que la muestra PVA/Qts/HAp 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró una capacidad de diferenciación mayor las demás fibras. Finalmente, se evaluó la actividad de las nanofibras cargadas con Ag/HAp en contacto con las bacterias *E. coli* y *S. aureus* en donde se observó un efecto bacteriostático, siendo la que produjo una mejor inhibición de crecimiento la fibra de PVA/Qts/AgHAp 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$; sin embargo, probablemente en un ambiente acuoso y con tiempos mayores se pudiera observar el efecto antimicrobiano. Concluimos que las fibras con 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgHAp sean utilizadas para modelos de reparación y tratamientos de osteomielitis, mientras que las fibras adicionadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con HAp se utilicen para modelos de regeneración.

10. Perspectivas

Caracterizar por difracción de rayos X la hidroxiapatita y la hidroxiapatita adicionada con plata, presente en las nanofibras para confirmar los resultados obtenidos por FT-IR; así como determinar el perfil de liberación de la HAp e HAp a diferentes tiempos por un mes.

Complementar el ensayo de viabilidad realizado (actividad metabólica por MTS) con un ensayo de fluorescencia para poder observar la adherencia celular a la membrana con el reactivo DAPI.

Incrementar los tiempos de exposición de las membranas en las células MG-63 a 21 días para observar la diferenciación celular, actividad mineralizante, así como su capacidad de producir proteínas relacionadas a la reparación del hueso.

Evaluar la actividad antimicrobiana a tiempos superiores a un día en medio acuoso para determinar su efecto en las cepas *E. coli* y *S. aureus*

Implementar los ensayos realizados en este trabajo en una línea celular de hueso sana (hFOB) para observar su efecto comparado con la línea celular MG-63.

Implementar un modelo *in vivo* para evaluar el efecto de regeneración ósea de las fibras de PVA/Qts, PVA/Qts/HAp y PVA/Qts/AgHAp.

Bibliografía

- Albrektsson, T y C Johansson (2001). "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration". En: *European spine journal* 10.2, S96-S101.
- Alcázar, Micaela Pérez (2002). "Osteoporosis: Huesos frágiles". En: *Farmacia profesional* 16.2, págs. 46-52.
- Alhosseini, Sanaz Naghavi et al. (2012). "Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering". En: *International Journal of Nanomedicine* 7, págs. 25-34. DOI: 10.1109/ASCC.2015.7244569.
- Ali, Malek y Abderraouf Gherissi (2017). "Synthesis and Characterization of the Composite Material PVA/Chitosan/5% Sorbitol with Different Ratio of Chitosan". En: *International Journal of Mechanical and Mechatronics Engineering* 17.2. URL: <https://www.researchgate.net/publication/317213868>.
- Angeles, Susana Fragoso et al. (2018). "Síntesis y Caracterización de Hidroxapatita Sintética para la Preparación de Filmes de PLGA/HAp con Potencial Uso en Aplicaciones Biomédicas". En: *Revista electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica* 7. DOI: <https://www.redalyc.org/journal/5122/512257487005/html/>.
- Aoki, Kaoru et al. (2020). "The use of electrospun organic and carbon nanofibers in bone regeneration". En: *Nanomaterials* 10.3, pág. 562.
- Arbolea, Luis y Santos Castaneda (2013). "Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo". En: *Reumatología Clínica* 9.5, págs. 303-315.
- Aslam, Muhammad, Mazhar Ali Kalyar y Zulfiqar Ali Raza (2018). "Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites". En: *Polymer Engineering & Science* 58.12, págs. 2119-2132.
- Baker, Maribel I et al. (2012). "A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications". En: *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100.5, págs. 1451-1457.
- Barbosa, Frederico et al. (2023). "Hydroxyapatite-filled osteoinductive and piezoelectric nanofibers for bone tissue engineering". En: *Science and Technology of Advanced Materials* 24. DOI: 10.1080/14686996.2023.2242242.

- Barzegar, Sajjad et al. (2021). "Core-shell chitosan/PVA-based nanofibrous scaffolds loaded with *Satureja mutica* or *Oliveria decumbens* essential oils as enhanced antimicrobial wound dressing". En: *International Journal of Pharmaceutics* 597. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120288>.
- Bayda, Samer et al. (2019). "The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine". En: *Molecules* 25.1, pág. 112.
- Bhattarai, Deval Prasad et al. (2018). "A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering". En: *Membranes* 8.3, pág. 62.
- Cay, Ahmet, Mohsen Mirafteb y E. Perrin Akcakoca Humbasar (2014). "Characterization and swelling performance of physically stabilized electrospun poly(vinyl alcohol)/chitosan nanofibres". En: *European Polymer Journal*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.10.017>.
- Charernsriwilaiwat, Natthan et al. (2012). "Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing". En: *International Wound Journal*, págs. 215-222. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2012.01077.x.
- Chatterjee, Rajeshwari et al. (2022). "Chapter 1 - Chitosan: source, chemistry, and properties". En: *Chitosan in Drug Delivery*. Ed. por Md Saquib Hasnain, Sarwar Beg y Amit Kumar Nayak. Academic Press, págs. 1-22. ISBN: 978-0-12-819336-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819336-5.00001-7>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128193365000017>.
- Cheba, Ben amar (2020). "Chitosan: properties, modifications and food nanotechnology". En: *Procedia Manufacturing* 46, págs. 652-658.
- Chen, Guiqian, Chuxia Deng y Yi-Ping Li (2012). "TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation". En: *International journal of biological sciences* 8.2, pág. 272.
- Choi, Hong Jin et al. (2016). "MG-63 cells proliferation following various types of mechanical stimulation on cells by auxetic hybrid scaffolds". En: *Biomaterials Research*. DOI: 10.1186/s40824-016-0079-x.
- Chong, Lor Huai, Mohd Izzat Hassan y Naznin Sultana (2015). "Electrospun Polycaprolactone (PCL) and PCL/ nano-hydroxyapatite (PCL/nHA)-based nanofibers for bone tissue engineering application". En: *2015 10th Asian Control Conference (ASCC)*, págs. 1-4. DOI: 10.1109/ASCC.2015.7244569.

- Czekanska, E. M., M. J. Stoddart, J. R. Ralphs et al. (2013). "A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing". En: *Journal of Biomedical Materials Research* 102, págs. 2636-2643. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34937>.
- Czekanska, E. M., M. J. Stoddart, R. G. Richards et al. (2012). "In search of an osteoblast cell model for (*in vitro*) research". En: *European Cells and Materials* 24, págs. 1-17. DOI: 10.22203/eCM.v024a01.
- Datta, Pallab y Asmita Ray (2016). "Cellular behavior of L929 and MG-63 cells cultured on electrospun nanofibers of chitosan with different degrees of phosphorylation". En: *Progress in Biomaterials*, págs. 93-100. DOI: 10.1007/s40204-016-0048-4.
- Dubey, Poornima et al. (2015). "Silver-nanoparticle-Incorporated composite nanofibers for potential wound-dressing applications". En: *Journal of Applied Polymer Science* 132. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.42473>.
- Echeverri Cuartas, Claudia, Catalina Vallejo y Marta Londoño (dic. de 2009). "Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol hydrogels by freezing/thawing technique for medical applications". En: *Revista EIA*, págs. 59-66.
- Enayati, Mohammad Saied et al. (2017). "Development of electrospun poly (vinyl alcohol)-based bionanocomposite scaffolds for bone tissue engineering". En: *Journal of Biomedical Materials Research* 106. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36309>.
- Florencio-Silva et al. (2015). "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells". En: *BioMed research international*.
- Halima, Nihed Ben (2016). "Poly (vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation". En: *RSC advances* 6.46, págs. 39823-39832.
- Han, Shanshan et al. (2021). "3D Electrospun nanofiber-based scaffolds: from preparations and properties to tissue regeneration applications". En: *Stem Cells International* 2021.
- Hernández-Gil, Isabel Fernández-Tresguerres et al. (2006). "Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo". En: *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11, págs. 47-51.
- Ibrahim, HM y EMR El-Zairy (2015). "Chitosan as a biomaterial—structure, properties, and electrospun nanofibers". En: *Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials* 1.1, págs. 81-101.
- Jaffe, Harold L y Franklin M Rosenblum (1990). "Poly (vinyl alcohol) for adhesives". En: *Handbook of adhesives*. Springer, págs. 401-407.

- Keshvardoostchokami, Mina et al. (2021). "Electrospun Nanofibers of Natural and Synthetic Polymers as Artificial Extracellular Matrix for Tissue Engineering". En: *Nanomaterials* 11.1. ISSN: 2079-4991. URL: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/1/21>.
- Kou, Shijie, Linda M. Peters y Michael R. Mucalo (2021). "Chitosan: A review of sources and preparation methods". En: *International Journal of Biological Macromolecules* 169, págs. 85-94. ISSN: 0141-8130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020351631>.
- Li, Yutong et al. (2018). "Involvement of bone morphogenetic protein-related pathways in the effect of aucubin on the promotion of osteoblast differentiation in MG63 cells". En: *Chemico-Biological Interactions* 283, págs. 51-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.005>.
- Martínez-Sanmiguel, Juan J et al. (2019). "Anti-inflammatory and antimicrobial activity of bioactive hydroxyapatite/silver nanocomposites". En: *Journal of Biomaterials Applications* 33.10, págs. 1314-1326.
- Mejía-Suaza, Monica et al. (2023). "Poly(vinyl alcohol)/Silk Fibroin/Ag-NPs Composite Nanofibers as a Substrate for MG-63 Cells' Growth". En: *Polymers (Basel)*. DOI: 10.3390/polym15081838.
- Melucci, Martín Leonel (2020). "Matrices electrohiladas híbridas de PCL/quitosano con vidrio bioactivo para ingeniería de tejidos óseos". Tesis doct. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Modi, Prashant Kumar et al. (2019). "Effect of calcium glucoheptonate on proliferation and osteogenesis of osteoblast-like cells in vitro". En: *PLoS ONE* 14. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222240>.
- Murugan, Sivasankar y Sreenivasa Rao Parcha (2021). "Fabrication techniques involved in developing the composite scaffolds PCL/HA nanoparticles for bone tissue engineering applications". En: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 32.8, págs. 1-10.
- Niemczyk-Soczynska, Beata et al. (2021). "Hydrogel, electrospun and composite materials for bone/cartilage and neural tissue engineering". En: *Materials* 14.22, pág. 6899.
- Nokhasteh, Samira et al. (2015). "Preparation of PVA/Chitosan samples by electrospinning and film casting methods and evaluating the effect of surface morphology on their antibacterial behavior". En: *materials Research Express* 7.1.

- Oliveira, Geovane Rosa de et al. (2021). "Advances in nanotechnology and the benefits of using cellulose nanofibers in animal nutrition". En: *Veterinary World* 14.11, pág. 2843.
- Panda, Sikta, Chandan Kumar Biswas y Subhankar Paul (2021). "A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering". En: *Ceramics International* 47.20, págs. 28122-28144. ISSN: 0272-8842. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.07.100>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884221021398>.
- Pareja, Nathalia Marín et al. (2008). "Synthesis and Characterization of microporous hydroxyapatite, comparison with a commercial product". En: *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* 43, págs. 67-76. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43004307>.
- Pervez, Nahid y George K. Stylios (2018). "Investigating the Synthesis and Characterization of a Novel "Green" H₂O₂-Assisted, Water-Soluble Chitosan/Polyvinyl Alcohol Nanofiber for Environmental End Uses". En: *Nanomaterials (Basel)* 8. DOI: 10.3390/nano8060395.
- Rajula, M Prem Blaisie et al. (2021). "Nano-hydroxyapatite: A driving force for bone tissue engineering". En: *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 13.Suppl 1, S11.
- Rodríguez-Aranda, A. C. et al. (2007). "Obtención de hidroxiapatita de escamas de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*". En: *Coloquio de Investigación Multidisciplinaria* 1, págs. 292-298.
- Romero-Serrano, Alíed y Juan Pereira (2020). "Review: Chitosan, a versatile biomaterial. State of the art from its obtaining to its multiple applications". En: *Revista Ingeniería Universidad de Carabobo* 27.2, págs. 118-135.
- Salman, Sabah, Nabeel Bakr y Huda Humad (mar. de 2018). "Section C: Physical Sciences DSC and TGA Properties of PVA Films Filled with Na₂S₂O₃·5H₂O Salt". En: *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences* 8. DOI: 10.24214/jcbps.C.8.2.00111.
- Santiago-Castillo, Karina (2018). ".Estudio de fibras electrohiladas de PVA - quitosano con NPs Ag y NPs ZnO sintetizadas *in situ*". Tesis doct. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Altamira.
- Sarrami, Pooriya et al. (2022). "Fabrication and characterization of novel polyhydroxybutyrate-keratin/nanohydroxyapatite electrospun fibers for bone tissue engineering ap-

- plications". En: *International Journal of Biological Macromolecules* 220, págs. 1368-1389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.117>.
- Sofi, Hasham S et al. (2018). "Scaffolds fabricated from natural polymers/composites by electrospinning for bone tissue regeneration". En: *Cutting-edge enabling technologies for regenerative medicine*, págs. 49-78.
- Stocco, Thiago et al. (Oct. de 2021). "Nanohydroxyapatite Electrodeposition onto Electrospun Nanofibers: Technique Overview and Tissue Engineering Applications". En: *Bioengineering* 8, pág. 151. DOI: [10.3390/bioengineering8110151](https://doi.org/10.3390/bioengineering8110151).
- Tan, EPS y CT Lim (2006). "Mechanical characterization of nanofibers—a review". En: *Composites Science and Technology* 66.9, págs. 1102-1111.
- Torres-Martínez, Erick José et al. (2018). "A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System: Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices". En: *Curr Drug Deliv* 15, págs. 1360-1374. DOI: [10.2174/1567201815666180723114326](https://doi.org/10.2174/1567201815666180723114326).
- Tsai, Shiao-Wen et al. (2012). "MG63 Osteoblast-Like Cells Exhibit Different Behavior when Grown on Electrospun Collagen Matrix versus Electrospun Gelatin Matrix". En: *PLoSOne* 7. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031200>.
- Tsukamoto, Yoshio, Sachiko Fukutani y Masakazu Mori (1992). "Hydroxyapatite-induced alkaline phosphatase activity of human pulp fibroblasts". En: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 3, págs. 180-183. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00713446>.
- Udomluck, Nopphadol et al. (2019). "Recent developments in nanofiber fabrication and modification for bone tissue engineering". En: *International journal of molecular sciences* 21.1, pág. 99.
- Uribe, Francisca et al. (2017). "Proteína Morfogenética Ósea y su Opción como Tratamiento de la Fisura Alveolar". En: *International Journal of Morphology* 35, págs. 310-318. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000100049>.
- Venugopal, J. et al. (2008). "Mineralization of osteoblasts with electrospun collagen/hydroxyapatite nanofibers". En: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19, págs. 2039-2046. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3289-x>.
- Xie, Hongjun, Pei Wang y Jie Wu (2018). "Effect of exposure of osteoblast-like cells to low-dose silver nanoparticles: uptake, retention and osteogenic activity". En: *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, págs. 260-267. DOI: <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1552594>.

- Xue, Jiajia et al. (2017). "Electrospun nanofibers: new concepts, materials, and applications". En: *Accounts of chemical research* 50.8, págs. 1976-1987.
- Zhang, Mingxin et al. (2022). "Polymer-based nanofiber–nanoparticle hybrids and their medical applications". En: *Polymers* 14.2, pág. 351.
- Zhang, Ruizhong et al. (2015). "Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model". En: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11.8, págs. 1949-1959.