



Trabajo de investigación

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS DE NANOFIBRAS Y SUS EFECTOS BIOLÓGICOS SOBRE LAS CÉLULAS PULPARES HUMANAS.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOFIBERS SCAFFOLDS AND THEIR BIOLOGICAL EFFECTS ON HUMAN PULP CELLS.

Leite ML¹, Usberti FR², Ortecho-Zuta U¹, Bordini EAF¹, Soares DG³, Hebling J⁴, de Souza Costa CA⁵.

¹Estudiante de doctorado en Rehabilitación Oral, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.

²Estudiante de Odontología, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.

³Profesora doctora, Departamento de Estética, Endodoncia y Materiales Odontológicos, Facultad de Odontología de Bauru, Universidade de São Paulo – USP, Rua Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru, SP, 17012-901, Brasil.

⁴Profesora titular, Departamento de Ortodoncia y Clínica infantil, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.

⁵Profesor titular, Departamento de Fisiología y Patología, Facultad de Odontología de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903, Brasil.

Correspondencia: cas.costa@unesp.br

Volumen 9.
Número 1.
Enero - Abril 2020

Recibido: 03 octubre 2019
Aceptado: 10 noviembre 2019

RESUMEN

Objetivo: El objetivo del presente estudio fue sintetizar y caracterizar morfológicamente diferentes andamios, con topografía nanofibrilar, a base de poli-caprolactona (PCL) y evaluar los posibles efectos tóxicos sobre las células de la pulpa dental humana (HDPCs). **Material y métodos:** Concentraciones al 10%, 12,5% y 15% de PCL en solución de cloroformo/dimetilformamida fueron preparadas, originando los grupos G1, G2 y G3, respectivamente. Cada solución final establecida se sometió a la técnica de eletrospinning para obtener andamios de nanofibras aleatorias. La caracterización morfológica de los andamios se realizó por el análisis de porosidad y determinación del diámetro de las nanofibras, usando imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido (SEM). A continuación, las HDPCs se cultivaron (1x10⁵) sobre los andamios, siendo analizada, viabilidad/proliferación (Alamar Blue; Live/Dead) y adhesión/propagación (F-actina) celular. En el control (G4), las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio (ANOVA/Tukey; $\alpha=5\%$). **Resultados:** El aumento de la concentración de PLC en la solución para preparar los andamios resultó en mayor diámetro de nanofibras y menor espacio interfibrilar. La viabilidad, proliferación, adhesión y propagación de las células fue significativamente mayor para todas las formulaciones de andamios de nanofibras comparados al G4 ($p<0,05$). Los andamios al 10% de PCL presentaron mejores resultados que las demás formulaciones. **Conclusión:** Los andamios al 10% de PCL presentaron menor diámetro de nanofibras y mayor porosidad, favoreciendo la viabilidad, proliferación, adhesión y propagación de las células pulpares.

Palabras Clave: Nanofibras, Dentina, Pulpa dental.

ABSTRACT

Objective: The objective of the present study was to synthesize and characterize morphologically different scaffolds with nanofibrous topography based on polycaprolactone (PCL) and evaluate their possible toxic effects on human dental pulp cells (HDPCs). **Material and methods:** For this purpose, concentrations of 10%, 12.5% and 15% of PCL in chloroform/dimethylformamide solution were prepared, establishing the groups G1, G2, and G3, respectively. Each prepared final solution was submitted to electrospinning technique to obtain aleatory nanofiber scaffolds. The morphological characterization of scaffolds was performed by the analysis of their porosity and determination of nanofiber diameter, using images obtained by scanning electron microscope (SEM). Next, HDPCs were seeded (1x10⁵) on the scaffolds, which allowed the analysis of cell viability/proliferation (AlamarBlue; Live/Dead) and adhesion / spreading (F-actin). As control (G4), cells were seeded on round-shaped cover glasses (ANOVA / Tukey; $\alpha = 5\%$). **Results:** The increase in PLC concentration in the solution used to prepare the scaffolds resulted in larger nanofiber diameter and smaller interfibrillary spaces. Cell viability, proliferation, adhesion, and spreading were significantly higher for all nanofiber scaffolds formulations compared to control ($p < 0.05$). Scaffolds based on 10% PCL showed the best results compared to other formulations. **Conclusion:** Scaffolds containing 10% poly-caprolactone presented smaller nanofiber diameter and higher porosity, favoring the viability, proliferation, adhesion and spread of the pulp cells on them.

Keywords: Nanofibers, Dentin, Pulp.



INTRODUCCIÓN

El complejo dentino-pulpar, está compuesto por dos tejidos con características histológicas distintas (dentina y pulpa), a pesar de ello, presenta el mismo origen embriológico. Estos tejidos se intercalan por una capa de células altamente diferenciadas, los odontoblastos, los cuales participan efectivamente del mantenimiento, defensa y adaptación del complejo dentino-pulpar durante toda la vida del individuo (de Souza Costa et al., 2014). Ante las agresiones capaces de alcanzar el tejido pulpar y generar la muerte de los odontoblastos, las células mesenquimales indiferenciadas presentes en este tejido son reclutadas al área afectada, diferenciadas en células odontoblastoides e inician su actividad secretora, con la consiguiente deposición de distintas proteínas típicas de la matriz dentinaria. Este proceso muestra el fuerte potencial regenerativo intrínseco del complejo dentino-pulpar (Schmalz et al., 2014). En la situación clínica donde el tejido pulpar se encuentra expuesto, se busca la activación de este proceso, de forma que una barrera de dentina sea formada junto a la herida (Sangwan et al., 2013; de Souza Costa et al., 2014).

Dentro de este contexto, los conceptos de ingeniería de tejidos han atraído la atención de investigadores para la inducción de la regeneración de los tejidos dentales (Galler et al., 2014). Esta técnica, es caracterizada por los siguientes principios básicos: 1) uso de un sustrato (andamios) que sirve de sustituto temporal de la matriz extracelular; 2) empleo de células con potencial para diferenciación y 3) señalización celular adecuada que permita la migración y diferenciación de las células. De este modo, los andamios pueden servir como sustrato para adhesión, proliferación y diferenciación celular, similar a aquel encontrado en una situación *in vivo* (Chatzistavrou et al., 2012; Gupte, Ma, 2012; Rambia et al., 2015). Como el tejido pulpar presenta una reserva de células madre, el empleo de terapias acelulares se presenta como una alternativa muy viable para regeneración de la dentina (Galler et al. 2014). Para que este evento ocurra, el andamio debe tener acción bioactiva y presentar una topografía similar al microambiente *in vivo*, de tal forma que favorezca y acelere el proceso de regeneración o reparación de tejidos (Ma et al., 2008; Gupte, Ma, 2012).

En base a esta perspectiva, se ha demostrado que los procesos de adhesión, proliferación y diferenciación de células madres mesenquimales se intensifican cuando los andamios con topografía de nanofibras son empleados, en comparación con andamios de superficie lisa (Bottino et al., 2013). Los andamios formados por nanofibras son obtenidos por la técnica de electrospinning, permitiendo el desarrollo de un biomaterial con potencial para mimetizar la nanomorfología estructural y funcional de la matriz extracelular (Pham et al., 2006). El empleo de esta técnica permite obtener nanofibras interconectadas, con diámetros variados y con elevada área de superficie, las cuales favorecen la adhesión celular y la formación de nuevo tejido en el área afectada (Murugan et al., 2006). De esta forma, sería interesante desarrollar y caracterizar andamios de nanofibras no tóxicas, con actividad bioactiva sobre células pulpares, el cual podría ser empleado en estrategias innovadoras para regeneración del complejo dentino-pulpar.

MÉTODOS Y MATERIALES

Preparación de los andamios por la técnica de electrospinning

Las concentraciones al 10%, 12,5% y 15% (m/v) de polilactolactona (PCL; Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA) fueron preparadas en una solución de cloroformo/dimetilformamida (Neon Comercial Ltda, Susano, SP, Brasil), dando origen a los grupos G1, G2 y G3, respectivamente. La preparación de las nanofibras se realizó a través de la técnica de electrospinning. Cada diferente concentración de solución de PCL fue colocada en una jeringa hipodérmica estéril de 5 mL con aguja de acero inoxidable de calibre 18G x 1½". La jeringa es conectada a una bomba de inyección automática (KDS Scientific, Holliston, MA, EUA), la cual es regulada para ejercer una presión sobre el émbolo, de manera que alcance una velocidad de inyección de 0,5 mL/h de flujo. El voltaje de la fuente de alta tensión fue establecida en 15 kV, la distancia entre la punta de la aguja y el colector plano de aluminio fue de 15 cm.

Caracterización morfológica de los andamios

En este análisis, los andamios experimentales fueron colocados en soportes metálicos, mantenidos en un desecador al vacío por un período de 72 horas y fueron metalizados con oro. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM; JEOL-JMS-6610V Scanning Microscope, Tóquio, Japão), con el voltaje de aceleración entre 10 y 15 kV. El diámetro de las nanofibras y la porosidad de los andamios se evaluaron por medio de imágenes SEM con el software "Image J". Se seleccionó 50 nanofibras al azar de 3 imágenes de cada grupo experimental (aumento de 2000x), para calcular el valor medio del diámetro de las nanofibras. Con el mismo software y las mismas imágenes, se calculó el porcentaje de porosidad de los andamios de nanofibras.

Cultivo primario de células de la pulpa dental humana

Con aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Odontología de Araraquara/UNESP (CAAE: 65455516.0.0000.5416), se recolectó dientes terceros molares sanos recién extraídos, incluidos o semi-incluidos, de voluntarios de ambos sexos, entre las edades de 18 a 25 años, quienes fueron atendidos en la Clínica de Cirugía de la misma institución. Para poder participar en la investigación, los pacientes firmaron un Consentimiento Informado. Después de la extracción dental, los dientes se acondicionaron inmediatamente en tubos con PBS (solución tampón de fosfato), antibiótico y antifúngico (Gibco, Grand Island, NY, EUA; 100 U/mL penicilina, 100 g/mL estreptomycin y 0,25 g/mL Fungizone). El tejido de la pulpa fue colectado de forma aséptica, siendo el mismo fragmentada en 1 mm, los cuales fueron sometidos a la desagregación enzimática en solución de colagenasa tipo 1 (3mg/mL; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo α MEM (Gibco) con 100 IU/mL de penicilina (Gibco), 100 μ g/mL de estreptomycin (Gibco), 2 mmol/L de glutamina (Gibco) y 10% de suero fetal bovino (SBF; Gibco), para obtener un cultivo primario de células de la pulpa dental humana (HDPCs) (Soares et al. 2018).

Evaluación de la viabilidad y proliferación celular

Los andamios de nanofibras se colocaron en cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro, de acuerdo con los parámetros establecidos anteriormente, fueron sometidos al protocolo de



lavado/esterilizado con alcohol 50% (10 minutos – 1x), alcohol 70% (20 minutos – 3x) y PBS (10 minutos – 2x), se mantuvieron en medio de cultivo completo α -MEM durante la noche. Los cubreobjetos de vidrio con los andamios, fueron colocados individualmente en placas de 24 compartimientos, siendo cultivada sobre ellos las HDPCs (1×10^5 células/andamio). Entonces, el conjunto células/andamio se mantuvieron incubados a 37°C por 30 minutos para permitir la adhesión inicial de las células. Finalmente, estos conjuntos se mantuvieron en la incubadora por períodos de 1, 3 y 7 días, el medio de cultivo (α -MEM con 10% SFB) fue renovado cada 48 horas. Para el grupo control, las células fueron cultivadas sobre los cubreobjetos de vidrio, sin andamios (G4).

Ensayo Alamar Blue: Para cada período de análisis, los conjuntos (n=6) fueron incubados en medio α -MEM con Alamar Blue (10:1) por 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Después de este periodo, el sobrenadante se transfirió para placas de 96 compartimientos y fue analizado en un lector de fluorescencia (540 nm excitación; 590 nm emisión; Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA).

Técnica Live/Dead: En los mismos periodos de análisis, los conjuntos (n=4) se incubaron con medio α -MEM con Calcein AM y Ethidil Homodímero-1 (1:1000; Live/Dead cell viability/cytotoxicity kit; Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) durante 30 minutos. En seguida, se realizó el análisis de las células vivas y muertas sobre la superficie de los andamios en el microscopio de fluorescencia (Leica DM 5500B, Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha).

Evaluación de la adhesión y propagación celular

Después de los periodos 1, 3 y 7 días, las células (n=4) fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, permeabilizadas en Triton al 0,1% e incubadas con una sonda fluorescente específica en BSA al 2% (1:20; Life Technologies; Grand Island, NY, EUA) para detectar los filamentos (F-actina) de actina. En seguida, las mismas células se incubaron con el colorante Hoescht (1:5000; Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) por 15 minutos, para contrafluorecer el núcleo. Las muestras fueron lavadas en PBS y analizadas en microscopio de fluorescencia (Leica DM 5500B).

Análisis de los datos

Los datos numéricos de la prueba de Alamar Blue se evaluaron con la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal y la

prueba de Levene para homogeneidad de las variaciones de grupo. Antes de la normalidad y la homocedasticidad de los datos, se sometieron a la prueba ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de Tukey. Todas las pruebas estadísticas se realizaron a un nivel de significación del 5%. Los análisis microscópicos fueron evaluados de forma descriptiva.

RESULTADOS

Caracterización morfológica de los andamios

De acuerdo con las imágenes SEM (Figura 1), se observó que ambas formulaciones de andamios permitieron la formación uniforme y aleatoria de las nanofibras. El aumento de concentración del polímero resultó en nanofibras con mayor diámetro (Tabla 1) y con menos porosidad (Tabla 2).

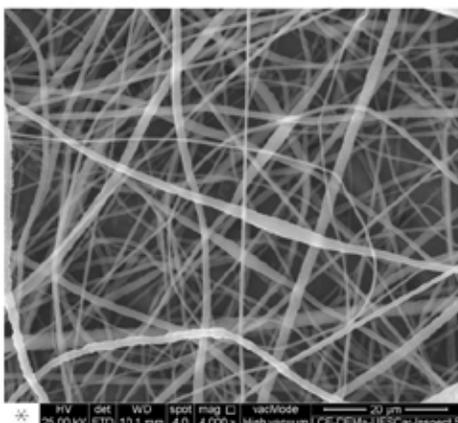
Evaluación de la viabilidad y proliferación celular

De acuerdo con el ensayo de Alamar Blue (Figura 2), se observó aumento significativo de la viabilidad celular para los grupos G4 (control) y G1 (10%) después de 3 y 7 días de cultivo ($p < 0,05$), siendo G1 el que presentó mayores valores de viabilidad en ambos periodos de análisis ($p < 0,05$). A pesar que, los grupos G2 (12,5%) y G3 (15%) presentaron valores de viabilidad superiores a G4, estos grupos no presentaron diferencia significativa en 3 y 7 días de cultivo. En la técnica de Live/Dead (Figura 3), las células permanecieron viables en ambas formulaciones; sin embargo, mayor cantidad de células vivas se observó en todos los periodos (1, 3 y 7 días) para G1 en comparación con los demás grupos experimentales y control.

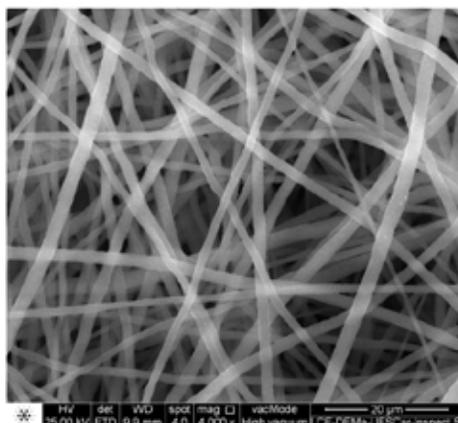
Evaluación de la adhesión y propagación celular

Las células cultivadas sobre los andamios al 10% de PCL (G1) presentaron mayor adhesión y propagación, así como en proliferación celular, comparados a los demás grupos (Figura 4). Se observó también, que la arquitectura de las nanofibras influyó en la proyección del citoesqueleto de las células, de forma que, los andamios con nanofibras de menor diámetro y mayor porosidad favorecieron a la morfología poligonal de las células.

G1 (10%)



G2 (12,5%)



G3 (15%)

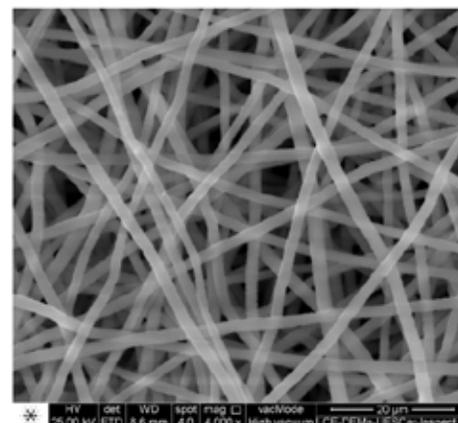


Figura 1 - Imágenes representativas de SEM (aumento 4000x) demostrando la morfología de los andamios de nanofibras de acuerdo con los parámetros probados.



Grupos	Media del diámetro (nm)
G1 (10%)	708,8
G2 (12,5%)	1246,7
G3 (15%)	1701,1

Tabla 1 - Diámetro de los andamios

Grupos	Media de la porosidad (%)
G1 (10%)	33,3
G2 (12,5%)	15,4
G3 (15%)	9,8

Tabla 2 - Porosidad de los andamios de nanofibras

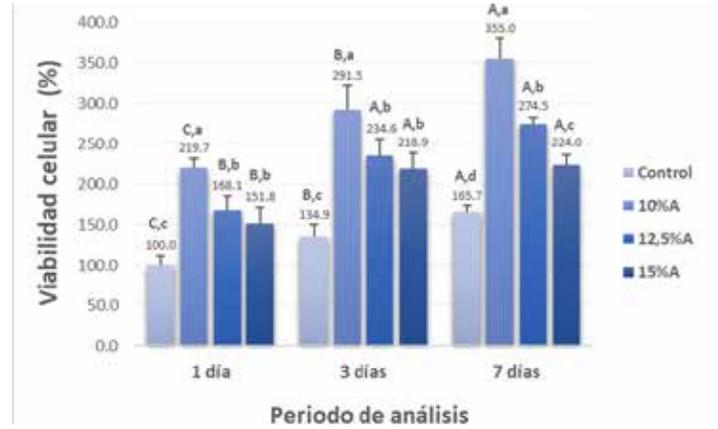


Figura 2 - Media y desviación estándar de los valores de viabilidad celular (n=8; ANOVA two-way/Tukey; $\alpha=0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre los periodos de análisis para cada grupo experimental. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre los grupos dentro de cada periodo de análisis.

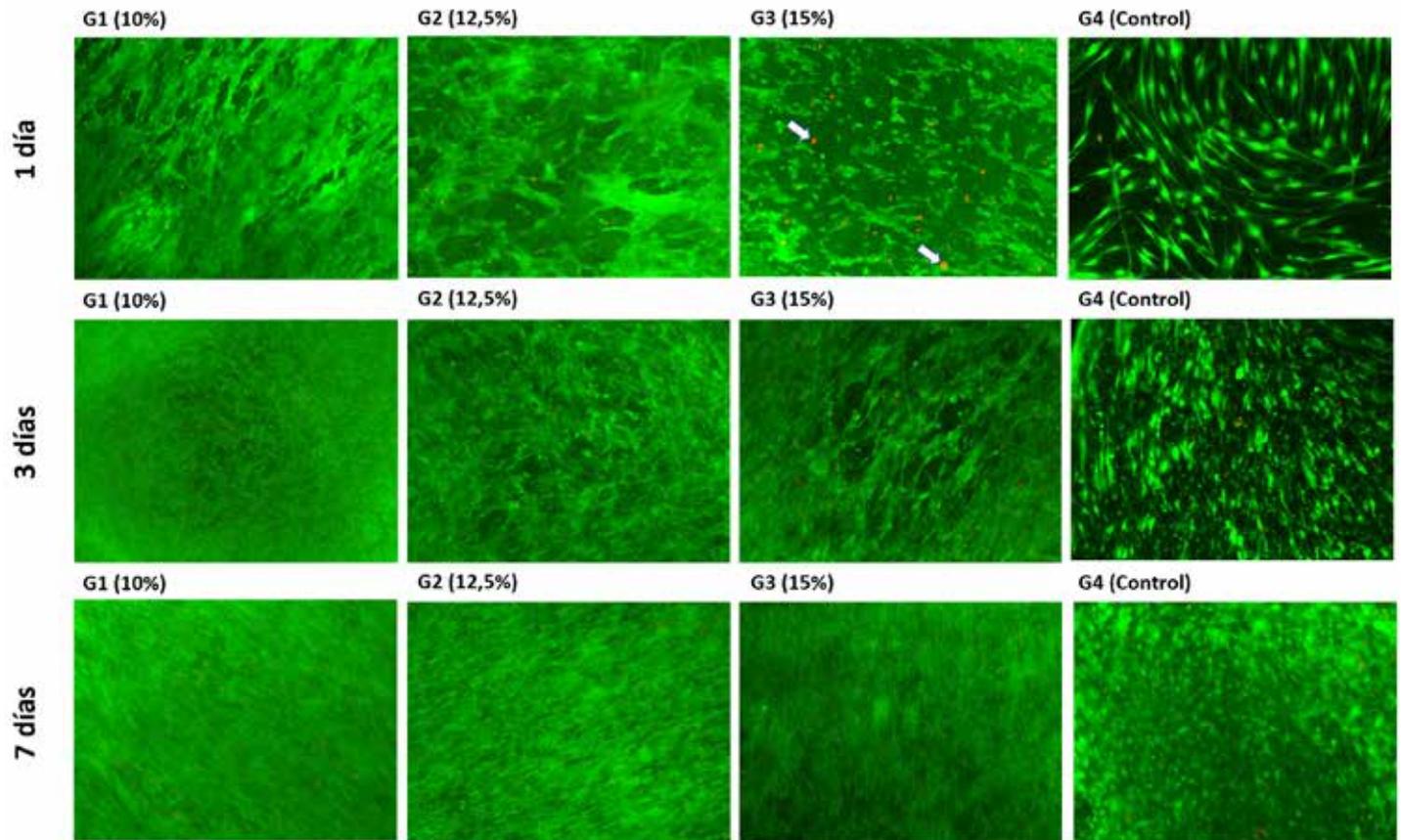


Figura 3 - Imágenes representativas de la técnica de *Live/Dead* (aumento10x). Fluorescencia verde indica la presencia de células viables. Fluorescencia roja indica la presencia de células muertas (flechas).

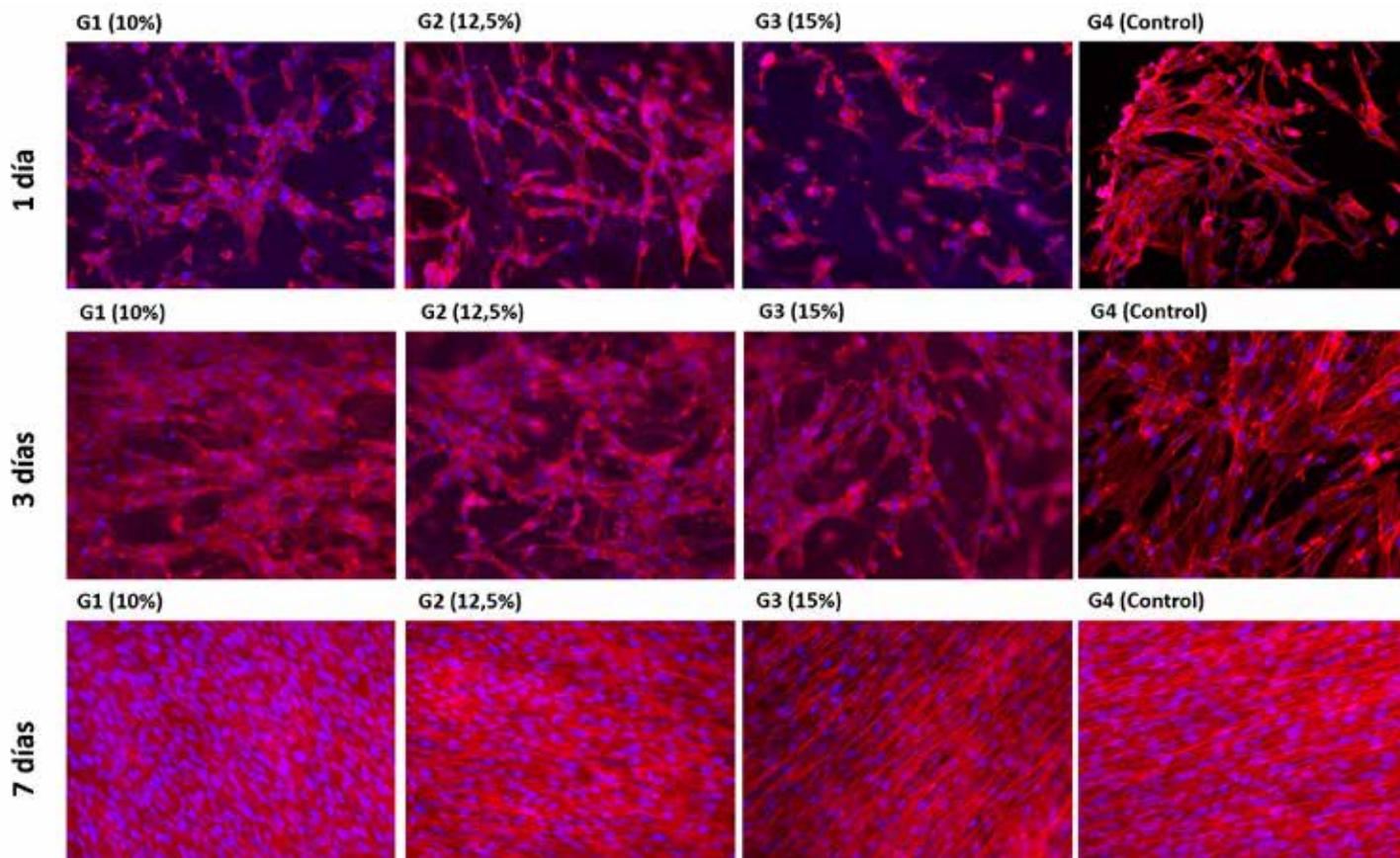


Figura 4 - Imágenes representativas de la técnica de F-actina (aumento10x). Fluorescencia roja indica la marcación de los filamentos de actina presentes del citoesqueleto de las células. Fluorescencia azul indica la marcación del núcleo de las células.

DISCUSIÓN

La técnica de electrospinning es una de las más utilizadas para la obtención de andamios de nanofibras. Para ejecutar esta técnica es necesario un campo electrostático, el cual es generado por una fuente de alta tensión que presenta un polo positivo conectado a la aguja de la jeringa inyectora (con la solución polimérica) y un polo negativo conectado al colector metálico. Cuando la tensión superficial, que mantiene la gota de la solución en la punta de la aguja, es superada por la carga eléctrica inducida en el interior de la solución por el suministro de alta voltaje, se forma el “Cono de Taylor”, generando una presión y un flujo constante de la solución en dirección al colector. En cuanto eso ocurre, el solvente presente en la solución polimérica evapora y las nanofibras se forman en la superficie del colector (Pham et al., 2006; Zhang et al., 2012). La morfología, porosidad, diámetro y disposición de las nanofibras obtenidas por medio de esa técnica pueden ser controladas a través de variaciones de diferentes parámetros como: potencia del campo electrostático, tipo de colector, diámetro de aguja, distancia entre la aguja y el colector, velocidad de inyección del polímero, tipo, peso molecular y concentración del polímero, tipo y concentración del solvente, bien como propiedades de la solución polimérica, tales como tensión superficial, conductividad y viscosidad (Farokhzad et al., 2006; Murugan et al., 2006). En el presente estudio, la variación establecida para obtener diferentes formulaciones de andamios fue la concentración del polímero, siendo los demás parámetros estandarizados; lo que permitió evaluar la influencia de esa variable en el padrón morfológico de las nanofibras.

Se pudo observar la relación directa entre la ampliación del diámetro de las fibras producidas, así como, la disminución de la porosidad y del área de superficie de los andamios, y el aumento en la concentración de la solución polimérica. Este dato obtenido en el presente estudio corrobora con estudios anteriores donde los investigadores demostraron que la topografía de los andamios está directamente relacionada con la concentración de la solución polimérica, bien como con sus propiedades (Liang et al., 2007; Murugan et al., 2006).

Sabiendo que la morfología de los andamios juega un papel clave en el éxito de la técnica de ingeniería de tejidos (Holzwarth et al., 2011), fue evaluado en este estudio nuevos biomateriales que promueven el reparo/regeneración del complejo dentino-pulpar y la influencia de la topografía de los andamios de nanofibras aleatorias sobre el metabolismo de las células obtenidas de la pulpa dental humana. Se observó que andamios de nanofibras con menor diámetro y mayor porosidad favorecen la manutención e incluso estimulan la viabilidad, proliferación, adhesión y propagación de las células cultivadas sobre ellos. Este resultado puede justificarse por el hecho de que la red de macroporos interconectados facilitan el intercambio de nutrientes y metabolitos por las células, estimulando su migración para el interior del biomaterial y permitiendo que estas células se proliferen, diferencien y sinteticen un nuevo tejido (Wang et al., 2011; Gupte, Ma, 2012; Liu et al., 2006). Asociado con esto, la característica nanofibrilar y tridimensional del andamio, que imita la topografía de la matriz extracelular, favorece el desarrollo morfológico y la expresión fenotípica de células del tejido original



(Woo et al., 2007; Galler et al., 2014; Schmalz et al., 2014).

Para la síntesis de los andamios evaluados en esta investigación, se utilizó poli-caprolactona (PCL), un polímero sintético que presenta biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad química, buen desempeño mecánico, comercialmente viable y de bajo costo (Hwang et al., 2016; Rabionet et al., 2017; Kim et al., 2013). Su empleo en el desarrollo de biomateriales para regeneración tisular ya se ha descrito en estudios *in vitro* (Gupta et al., 2009; Aviss et al., 2010; Teh et al., 2011; Hwang et al., 2016) e *in vivo* (Liu et al., 2017; He et al., 2018; Wang et al., 2018). En el contexto de reparo/regeneración del complejo dentino-pulpar, las propiedades del PCL parecen ser interesantes, independientemente de la formulación usada para la síntesis de andamios, las células pulpares cultivadas sobre ellos, permanecieron viables e incluso proliferaron durante el periodo de análisis, tal como fue observado por otros investigadores (Yang et al., 2010; Guo et al., 2014; Hokmabad et al., 2019; Hosseini et al., 2019). Sin embargo, la topografía de los andamios de nanofibras preparados con una concentración al 10% de PCL favoreció la adhesión, proliferación y propagación de las células en comparación con las otras formulaciones evaluadas en el presente estudio.

La topografía de los andamios es sólo uno de los factores que pueden favorecer el reparo y regeneración de distintos tejidos perdidos o dañados. Se sabe que las diferentes estrategias dentro del campo de la ingeniería de tejidos se basan en la asociación de tres pilares fundamentales: el sustrato (andamio), que actuará como matriz extracelular temporal; las células indiferenciadas, que tienen potencial de diferenciación en cepas específicas; y la señalización celular, que estimula la migración y diferenciación celular, así como la síntesis y deposición del nuevo tejido (Lee et al., 2007; Wang et al., 2011; Mi et al., 2015; Matthys et al., 2016; Kawamura et al., 2016). En este contexto, las terapias celulares y acelulares surgieron como dos estrategias muy prometedoras para la regeneración tisular (Ji et al., 2011; Galler et al., 2014). En la terapia celular, se espera que un biomaterial que contenga células madre pre-cultivadas se inserten juntos en el sitio de implantación y sirva como un sustrato poroso tridimensional con interesantes propiedades bioactivas para acondicionar las células, actuando, como matriz extracelular temporal y regulando el crecimiento celular *in vivo*. Por otro lado, en la terapia acelular se utilizan biomateriales que contienen moléculas bioactivas. Tras la introducción en el sitio de implantación, se espera que estos biomateriales liberen de forma controlada las moléculas bioactivas, que deberían actuar como agentes de señalización, estimulando la migración de células madres residentes hacia el área a ser reparada/regenerada, además de promover la proliferación y diferenciación local de estas células (Ji et al., 2011; Galler et al., 2014).

En vista de que el complejo dentino-pulpar presenta un notable potencial regenerativo intrínseco, particularmente debido a la rica fuente de células mesenquimales indiferenciadas presentes en la pulpa dental, la terapia acelular parece ser la alternativa más interesante y éticamente aceptable en este momento (Schmalz et al., 2014). Por lo tanto, el biomaterial que se aplicará en las pulpas expuestas, además de ser biocompatible, también debe presentar propiedad bioactiva capaz de estimular la migración de células indiferenciadas al sitio de la lesión, permitiendo o incluso estimulando su proliferación, diferenciación y síntesis de matriz de dentina en el lugar. A pesar de las limitaciones

de los datos científicos obtenidos con el desarrollo de la investigación de laboratorio y del hecho de que los resultados de los estudios *in vitro* no pueden ser directamente extrapolados para situaciones clínicas (de Souza Costa et al., 2014), en este estudio se pudo demostrar que los andamios sintetizados a partir de la incorporación al 10% de poli-caprolactona en la solución de cloroformo/dimetilformamida, presentan un diámetro de nanofibras y una porosidad capaz de estimular la viabilidad, proliferación, adhesión y dispersión de las células pulpares cultivadas sobre ellos. Sin embargo, como se informó anteriormente, los andamios de PCL no presentan potencial quimiotáctico para las células (Porter et al., 2009). De esta forma, parece imprescindible que agentes potentes de señalización sean incorporados en estos andamios, de tal forma que estos biomateriales puedan ser utilizados con seguridad en estrategias de terapia acelular para la cura de tejidos dañados o perdidos (Pilehvar-Soltanahmadi et al., 2018). Delante de interesantes datos originales obtenidos en este estudio y de importantes avances en el campo de la ingeniería de tejidos, sugerimos que estudios futuros sean desarrollados a fin de evaluar los efectos biológicos de la incorporación de moléculas bioactivas en andamios a base de 10% de PCL. Así, será posible continuar la línea de investigación dirigida al desarrollo de biomateriales y estrategias para el reparo/regeneración del complejo dentino-pulpar.

Conclusiones

De acuerdo con las metodologías empleadas en el presente estudio *in vitro*, fue posible concluir que los andamios sintetizados con diferentes concentraciones de poli-caprolactona (PLC) no fueron tóxicos para las células pulpares obtenidas de la pulpa humana. Los andamios al 10% de PLC fueron los que presentaron nanofibras con menor diámetro y mayor porosidad, favoreciendo la adhesión, estimulando la proliferación y propagación de las células.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación de Amparo para la Investigación del Estado de Sao Paulo (FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, procesos 2017/14210-8 y 2017/22739-9) y al Consejo Nacional de Investigación (CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa, Proceso 408721/2018-9 y 303599/2014-6) por el apoyo financiero para realización de la presente investigación.



REFERENCIAS

- de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater* 2014;30(7):769–784.
- Schmalz G, Smith AJ. Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *J Endod* 2014;40(4 Suppl):S2–S5.
- Sangwan P, Sangwan A, Duhan J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *Int Endod J* 2013;46(1):3–19.
- Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod* 2014;40(4):S41–S45.
- Chatzistavrou X, Papagerakis S, Ma PX, Papagerakis P. Innovative approaches to regenerate enamel and dentin. *Int J Dent* 2012;2012:856470.
- Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications. *J Dent Res* 2012;91(3):227–234.
- Rambhia KJ, Ma PX. Controlled drug release for tissue engineering. *J Control Release* 2015;219:119–128.
- Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60(2):184–198.
- Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, et al. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J Dent Res* 2013;92(11):963–969.
- Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng* 2006;12(5):1197–1211.
- Murugan R, Ramakrishna S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue Eng* 2006;12(3):435–447.
- Soares DG, Anovazzi G, Bordini EAF, Zuta UO, Leite MLAS, Basso FG, et al. Biological analysis of simvastatin-releasing chitosan scaffold as a cell-free system for pulp-dentin regeneration. *J Endod* 2018;44(6):971–976.
- Zhang Z, Hu J, Ma PX. Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64(12):1129–1141.
- Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58(14):1456–1459.
- Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59(14):1392–1412.
- Holzwarth JM, Ma PX. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2011;32(36):9622–9629.
- Wang J, Ma H, Jin X, Hu J, Liu X, Ni L, et al. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials* 2011;32(31):7822–7830.
- Liu X, Won Y, Ma PX. Porogen-induced surface modification of nano-fibrous poly (L-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27(21):3980–3987.
- Woo KM, Jun JH, Chen VJ, Seo J, Baek JH, Ryoo HM, et al. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials* 2007;28(2):335–343.
- Hwang PT, Murdock K, Alexander GC, Salaam AD, Ng JI, Lim DJ, et al. Poly (β -caprolactone)/gelatin composite electrospun scaffolds with porous crater-like structures for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2016;104(4):1017–1029.
- Rabionet M, Yeste M, Puig T, Ciurana J. Electrospinning PCL scaffolds manufacture for three-dimensional breast cancer cell culture. *Polymers (Basel)* 2017;9(12):328.
- Kim GM, Le KH, Giannitelli SM, Lee YJ, Rainer A, Trombetta M. Electrospinning of PCL/PVP blends for tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2013;24(6):1425–1442.
- Gupta D, Venugopal J, Prabhakaran MP, Dev VR, Low S, Choon AT, et al. Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomater* 2009;5(7):2560–2569.
- Avis KJ, Gough JE, Downes S. Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration. *Eur Cell Mater* 2010 19193–204.
- Teh TK, Toh SL, Goh JC. Aligned hybrid silk scaffold for enhanced differentiation of mesenchymal stem cells into ligament fibroblasts. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17(6):687–703.
- Liu J, Nie H, Xu Z, Niu X, Guo S, Yin J, et al. The effect of 3D nanofibrous scaffolds on the chondrogenesis of induced pluripotent stem cells and their application in restoration of cartilage defects. *PLoS One* 2014;9(11):e111566.
- He Y, Ye G, Song C, Li C, Xiong W, Yu L, et al. Mussel-inspired conductive nanofibrous membranes repair myocardial infarction by enhancing cardiac function and revascularization. *Theranostics* 2018;8(18):5159–5177.
- Wang Y, Cui W, Chou J, Wen S, Sun Y, Zhang H. Electrospun nanosilicates-based organic/inorganic nanofibers for potential bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018;172:90–97.
- Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2010;93(1):247–257.
- Guo T, Li Y, Cao G, Zhang Z, Chang S, Czajka-Jakubowska A, et al. Fluorapatite-modified scaffold on dental pulp stem cell mineralization. *J Dent Res* 2014;93(12):1290–1295.
- Hokmabad VR, Davaran S, Aghazadeh M, Rahbarghazi R, Salehi R, Ramazani A. Fabrication and characterization of novel ethyl cellulose-grafted-poly (β -caprolactone)/alginate nanofibrous/macroporous scaffolds incorporated with nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *J Biomater Appl* 2019;33(8):1128–1144.
- Hosseini FS, Enderami SE, Hadian A, Abazari MF, Ardashiryajimi A, Saburi E, et al. Efficient osteogenic differentiation of the dental pulp stem cells on β -glycerophosphate loaded polycaprolactone/polyethylene oxide blend nanofibers. *J Cell Physiol* 2019;234(8):13951–13958.
- Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59(4-5):339–359.
- Mi HY, Jing X, Turng LS. Fabrication of porous synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *J Cell Plast* 2015;51(2):165–196.
- Matthys OB, Hookway TA, McDevitt TC. Design principles for engineering of tissues from human pluripotent stem cells. *Curr Stem Cell Rep* 2016;2(1):43–51.
- Kawamura R, Hayashi Y, Murakami H, Nakashima M. EDTA soluble chemical components and the conditioned medium from mobilized dental pulp stem cells contain an inductive microenvironment, promoting cell proliferation, migration, and odontoblastic differentiation. *Stem Cell Res Ther* 2016;7(1):77.
- Ji W, Sun Y, Yang F, Van Den Beucken JJ, Fan M, Chen Z, Jansen JA. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharm Res* 2011;28(6):1259–1272.
- Porter JR, Henson A, Popat KC. Biodegradable poly (β -caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. *Biomaterials* 2009;30(5):780–788.
- Pilehvar-Soltanahmadi Y, Dadashpour M, Mohajeri A, Fattahi A, Sheervalilou R, Zarghami N. An overview on application of natural substances incorporated with electrospun nanofibrous scaffolds to development of innovative wound dressings. *Mini Rev Med Chem* 2018;18(5):414–427.